

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.04.08

❖ 论著 ❖

miR-152-3p 对血管平滑肌细胞的作用及其机制研究

徐进, 杨波

(武汉大学人民医院心血管内科, 湖北 武汉 430060)

【摘要】目的: 研究 miR-152-3p 对血管平滑肌细胞(VSMCs)的作用及机制。**方法:** 使用 ox-LDL 刺激血管平滑肌细胞, 用 ApoE 基因敲除小鼠建立动脉粥样硬化动物模型。使用 qRT-PCR 检测 miR-152-3p 和转化生长因子-B2(TGFB2 Mma) 表达水平。分别使用 CCK-8 实验、transwell 实验和 TUNEL 实验检测 VSMCs 增殖、迁移和凋亡。通过生物信息分析预测 miR-152-3p 的下游靶点。MiR-152-3p 和 TGFB2 之间的相互作用通过双荧光素酶实验、qRT-PCR 和 Western blot 进行验证。**结果:** 在动脉粥样硬化小鼠主动脉平滑肌细胞和受到 ox-LDL 处理的 VSMCs 中 miR-152-3p 表达水平显著下调, 并表现出浓度和时间依赖特性。过表达 miR-152-3p 显著抑制了 VSMCs 的增殖和迁移, 诱导了细胞凋亡。从机制上来看, miR-152-3p 通过靶向作用于 TGFB2 发挥作用。**结论:** miR-152-3p 通过靶向抑制 TGFB2 抑制 VSMCs 的异常增殖和迁移。

【关键词】 miR-152-3p; 转化生长因子-B2; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞

【中图分类号】 R322.74 **【文献标志码】** A

Effects of mir-152-3p on vascular smooth muscle cells and the underlying mechanism

XU Jin, YANG Bo

(Department of Cardiovascular Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective: To explore the effects of miR-152-3p on vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods:** ox LDL stimulated vascular smooth muscle cells, ApoE knock out mice was used to establish atherosclerosis animal model. qRT-PCR was used to determine the expression of miR-152-3p and TGFB2 Mma. CCK-8 assay, transwell assay and TUNEL assay were performed to measure VSMCs proliferation, migration and apoptosis. The potential target genes of miR-152-3p were predicted by bioinformatic analysis. Interaction between miR-152-3p and TGFB2 was validated by qRT-PCR, western blot and luciferase reporter assay. **Results:** MiR-152-3p was found significantly decreased in high fat diet ApoE knock out mice and in VSMCs treated by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) with time-dependent and dose-dependent manner. Transfection of miR-152-3p mimics inhibited the proliferation and migration ability of VSMCs while miR-152-3p inhibitors worked the opposite effects. Mechanically, we confirmed that transforming growth factor beta 2 (TGFB2) was a target gene of miR-152-3p. **Conclusion:** MiR-152-3p inhibits VSMCs proliferation and migration via suppressing TGFB2.

【Key words】 MiR-152-3p; TGFB2; Atherosclerosis; Vascular smooth muscle cell

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是造成缺血性心脏病等多种高死亡率心血管疾病的基础^[1]。目前, AS 仍难以做到早期发现, 而主流的治疗方法也常是系统性的, 其疗效并不理想, 新兴的纳米治疗等方法距离临床使用仍有很长的路要走^[2]。因此, 继续深入探究 AS 发生发展过程中的分子机制, 寻找其可能的诊断、治疗靶点尤为重要。

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的异常增殖和迁移是 AS 的重要始动因素, VSMCs 能够从中膜迁移到内膜, 在内膜中异常增殖

形成内膜病变^[3-4]。同时, 越来越多的研究证明, 在包括 VSMCs 功能紊乱的整个 AS 进程中, 微小 RNA 扮演了关键的角色^[5]。MiR-152-3p 可以抑制多种肿瘤的发展, 如在神经胶质瘤中, miR-152-3p 即被发现抑制了癌细胞的增殖和迁移^[6]。然而, miR-152-3p 对 VSMCs 的增殖和迁移是否同样具有抑制作用尚不清楚。

转化生长因子-B2(transforming growth factor B2, TGFB2)是新近发现的调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族的一员, 对细胞的生长、分化和免疫功能

基金项目: 国家自然科学基金(81500278)

作者简介: 徐进(1985-), 男, 主管护师。E-mail: juyidao2078@163.com

通讯作者: 杨波。E-mail: yybb112@whu.edu.cn

能都有重要的调节作用。近年来,越来越多的研究提示,TGF-B2参与了AS的发生发展。不仅补充TGFB2可以促进VSMCs的增殖和迁移^[7],过多的TGFB2还增加了血管内膜厚度^[8]。这些研究说明TGFB2可能对AS的进程具有潜在的促进作用。然而,TGFB2的上游调控机制尚不完全清楚。

本研究通过使用ox-LDL刺激VSMCs,同时使用小鼠建立AS动物模型,深入探究miR-152-3p和TGFB2在VSMCs功能紊乱中的具体作用和调控机制,以期进一步阐明AS发生发展过程中的理论基础,为探究防治AS的高效作用靶点提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 实验材料

人VSMC细胞购自中国科学院细胞中心。RPMI1640培养液、胎牛血清和胰蛋白酶购自Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, 美国)。Lipofectamine3000、青霉素/链霉素、TRIzol试剂和荧光素酶检测试剂盒购自Invitrogen (Carlsbad, CA, 美国)。TGFB2野生型质粒、TGFB2突变型质粒、TGFB2过表达质粒(pcDNA3.1-TGFB2)、miR-152-3p mimics、miR-152-3p inhibitors及其阴性对照均由GenePharma (上海)构建。C57BL/6小鼠购自于北京大学医学部实验动物科学部。TUNEL检测液和CCK-8试剂盒购买于Beyotime Biotechnology (上海)。抗TGFB2抗体和山羊抗小鼠IgG均购自Abcam (上海)。Transwell小室购自Corning (北京)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和分组 人VSMCs细胞用含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI1640培养液、置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养。在细胞的对数生长期采用0.25%胰蛋白酶进行消化传代。取对数生长期细胞,消化传代后以每孔5×10⁶/孔的密度种植在6孔板中,待细胞生长稳定后,根据供应商的说明书使用Lipofectamine3000将TGFB2过表达质粒、miR-152-3p mimics、miR-152-3p inhibitors及其阴性对照物(NC-mimics和NC-inhibitors)分别转入人VSMC细胞。在后续实验中,分别使用0,25,50,100 mg/L的ox-LDL处理VSMCs 24 h或使用100 mg/L的ox-LDL分别处理VSMCs 0,6,12,24 h。

细胞分为NC组(正常培养)、ox-LDL组(使用ox-LDL刺激VSMCs)、ox-LDL + NC-mimics组(向VSMCs中转染NC-mimics再使用ox-LDL处理)、ox-LDL + miR-152-3p mimics组(向VSMCs中转染miR-152-3p mimics再使用ox-LDL处理)、ox-LDL + NC-

inhibitors组(向VSMCs中转染NC-inhibitors再使用ox-LDL处理)、ox-LDL + miR-152-3p inhibitors组(向VSMCs中转染miR-152-3p inhibitors再使用ox-LDL处理)、ox-LDL + miR-152-3p mimics + pcDNA3.1-TGFB2组(向VSMCs中共转染miR-152-3p mimics和pcDNA3.1-TGFB2再使用ox-LDL处理)。

1.2.2 AS小鼠的构建 本实验选用80只8周龄C57BL/6小鼠,其中60只为载脂蛋白E基因敲除小鼠(ApoE^{-/-}小鼠),20只为野生型(wild type, WT) C57BL/6小鼠。所有WT小鼠中,10只WT小鼠常规饲料喂养(normal diet, ND),另外10只采用高脂饲料喂养(high fat diet, HFD)。ApoE^{-/-}小鼠中,10只采用常规饲料喂养,50只采用高脂饲料喂养以建立动脉粥样硬化模型。所有小鼠均可自由进食饮水,饲养环境温度为(22±2)℃,湿度为50%~60%。采用人工控制室内照明保持12 h光照(8:00~20:00)和黑暗(20:00~次日8:00)交替循环。其中40只高脂饮食ApoE^{-/-}小鼠分为4组,每组10只:miR-152-3p mimics NC组、miR-152-3p mimics组、miR-152-3p inhibitors NC组、miR-152-3p inhibitors组。ApoE基因敲除小鼠适应环境1周后,将miR-152-3p mimics或inhibitors或其对应的阴性对照以20 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量溶于0.2 mL生理盐水中,并通过尾静脉分别注入小鼠体内,每2周注射1次。12周培养结束后处死小鼠,分离小鼠主动脉平滑肌细胞。本研究动物实验方案已经过武汉大学人民医院动物伦理委员会批准。

1.2.3 miR-152-3p和TGFB2 mRNA的检测 使用TRIzol试剂提取小鼠血清和人VSMCs总RNA。根据Bio-Rad PCR系统(Bio-Rad, CA, USA)的标准方案,使用qRT-PCR检测miR-152-3p和TGFB2 mRNA的表达,U6作为内参。相对表达量采用2^{-ΔΔCT}方法进行计算,各引物序列如下:miR-152-3p:上游:5'-ACACTCCAGCTGGGTCAGTGCATGACAG-3',下游:5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCAAGTT-3';TGFB2:上游:5'-TTAGAAATGTG-CAGGATAATTGCT-3',下游:5'-CAGAAGTTGGCAT-TGTACCCT-3';U6:上游:5'-GCTTCGGCAGCA-CATATACTAAAAT-3',下游:5'-CGCTTCACGAATTT-GCGTGTCTAT-3'。

1.2.4 TGFB2表达检测 向VSMCs细胞加入裂解液,充分裂解后用4℃,12 000 rpm,离心15 min,吸取上清。BCA法蛋白定量。SDS-PAGE电泳后转膜、封闭,加入抗TGFB2抗体(1:1 000稀释),4℃环境下孵育过夜,TBST洗涤后HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:2 500稀释)室温孵育1 h,混合等体积

的化学发光液与 PVDF 膜反应,曝光并保存图片。采用图像分析软件 ImageJ 对 Western blot 实验所得结果图像进行灰度分析。所有结果重复 3 次,以 GAPDH 为内参对照,结果用灰度比值表示。

1.2.5 双荧光素酶实验验证 miR-152-3p 和 TGFB2 的相互结合关系 首先通过生物信息学预测 miR-152-3p 在 TGFB2 上的结合位点并用 PCR 对 TGFB2 上 miR-152-3p 的结合位点进行扩增。随后将扩增片段插入到 pmir-GLO report 载体,构建 TGFB2 野生型质粒(TGFB2 WT)。用基因突变技术将部分核苷酸突变,构建 TGFB2 突变型质粒(TGFB2 MUT)。用 TGFB2 野生型质粒、TGFB2 突变型质粒和 miR-152-3p mimics 或 mimics-NC 转染细胞后,用荧光素酶检测试剂盒进行检测,最后检测各组荧光素酶活性。

1.2.6 CCK-8 实验检测 VSMCs 增殖活性 VSMCs 转染 48 h 后,用胰蛋白酶消化并重悬细胞,调整细胞密度为 2×10^3 个细胞/mL,96 孔板中每孔接种 100 μ L 细胞悬液,每组设 5 个复孔。将培养板置于细胞培养箱中,继续培养 24 h、36 h、48 h 和 72 h,每个时间点取一组细胞,每孔加入 CCK-8 10 μ L,继续培养 1.5 h,在酶标仪波长 450 nm 处测各孔的吸光度(OD)值。

1.2.7 Transwell 实验检测 VSMCs 迁移能力 取对数生长期的 VSMCs 细胞,制备 2×10^6 /L 的细胞悬液,取 100 μ L 接种于 Transwell 小室中,待细胞贴壁后,上室加入含 1% FBS 的 RPMI1640 培养液,24 孔板下室加入 600 μ L 含 10% 胎牛血清的培养液,继

续培养 18 h,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,自来水脱色,无水乙醇脱水后,取出小室,棉签擦净未迁移的细胞,切下小室薄膜,拍照观察。倒置显微镜观察小室底部,取 5 个视野计数细胞,计算平均值,实验均重复 3 次。

1.2.8 TUNEL 检测 VSMCs 凋亡情况 各组 VSMCs 处理完毕后,去培养基,PBS 洗涤一次。用免疫染色固定液固定细胞 30 ~ 60 min,PBS 洗涤一次。加入免疫染色洗涤液,冰浴孵育 2 min。在样品上加 50 μ L TUNEL 检测液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次。用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察,每份样品随机选取 5 个视野,计算细胞凋亡率:凋亡率 = 凋亡细胞/总细胞 \times 100%。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用 ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-152-3p 在 AS 小鼠和受到 ox-LDL 刺激的 VSMCs 中的表达

高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠颈动脉血管平滑肌细胞中 miR-152-3p 表达水平显著低于其他组别 ($P < 0.001$,图 1A)。ox-LDL 诱导的 VSMC 细胞中,miR-152-3p 的表达水平显著下降,且具有浓度和时间依赖效应 ($P < 0.01$,图 1B、1C)。

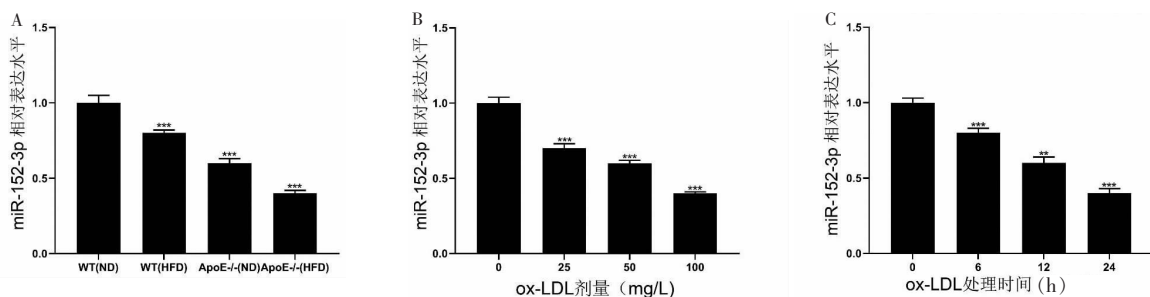


图 1 miR-152-3p 在 AS 小鼠和受到 ox-LDL 刺激的 VSMCs 中的表达水平。

A. 通过 qRT-PCR 检测小鼠主动脉血管平滑肌细胞中 miR-152-3p 的表达水平。B-C. 通过 qRT-PCR 检测使用不同浓度的 ox-LDL 处理 VSMCs 24 h 或相同浓度 (100 mg/L) 的 ox-LDL 干预 VSMCs 不同时间后细胞中 miR-152-3p 表达水平。在 A 中,*** $P < 0.001$,与 WT(ND)组相比;在 B 中,*** $P < 0.001$,与 0 mg/L 组相比;在 C 中,** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$,与 0 h 组相比。

2.2 miR-152-3p 对 VSMCs 增殖、迁移和凋亡的影响

在前文的实验中,课题组观察到受到 100 mg/L 的 ox-LDL 刺激 24 h 后 VSMCs 中 miR-152-3p 的表达水平最低,因此后续实验均使用此条件对 VSMCs 进行处理。向 VSMCs 中转染了 miR-152-3p mimics 和 miR-152-3p inhibitors 以过表达或敲低 VSMCs 中

的 miR-152-3p,并通过 qRT-PCR 检测了 VSMCs 中 miR-152-3p 的表达,确定了细胞模型构建成功 ($P < 0.001$,图 2A)。CCK-8 实验证实,ox-LDL 显著增强了 VSMCs 的增殖能力,过表达 miR-152-3p 减轻了 ox-LDL 的作用,但在敲低 miR-152-3p 后 VSMCs 增殖能力进一步提高 ($P < 0.05$,图 2B、2C)。类似的,

Transwell 的结果提示, miR-152-3p mimics 显著抑制了 VSMCs 的迁移能力, miR-152-5p inhibitors 却对其具有促进作用 ($P < 0.01$, 图 2D)。进一步通过 TUNEL, 还观察到 miR-152-3p 具有显著提高 VSMCs 凋亡率的作用 ($P < 0.001$, 图 2E)。

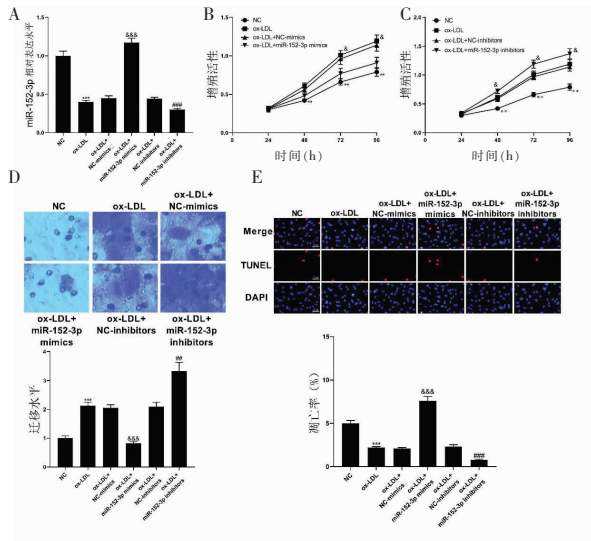


图 2 miR-152-3p 对 VSMCs 增殖、迁移和凋亡的影响

A. 通过 qRT-PCR 检测 miR-152-3p 在 VSMCs 中的表达水平。B-C. 通过 CCK-8 检测 VSMCs 细胞增殖活性。D. 通过 transwell 检测 VSMCs 细胞迁移。E. 通过 TUNEL 检测 VSMCs 细胞凋亡。在 A, D, E 中, $***P < 0.001$, ox-LDL 组与 NC 组相比, $***P < 0.001$, ox-LDL+NC-mimics 组与 ox-LDL+miR-152-3p mimics 组相比, $##P < 0.01$, $###P < 0.001$, ox-LDL+NC-inhibitors 组与 ox-LDL+miR-152-3p inhibitors 组相比; 在 B 中, $**P < 0.01$, NC 组与 ox-LDL 组相比, $&P < 0.05$, ox-LDL+miR-152-3p mimics 组与 ox-LDL+NC-mimics 组相比; 在 C 中, $**P < 0.01$, NC 组与 ox-LDL 组相比, $&P < 0.05$, ox-LDL+miR-152-3p inhibitors 组与 ox-LDL+NC-inhibitors 组相比。

2.3 miR-152-3p 靶向调控 TGFB2

通过 microT、miRanda、miRmap 和 TargetScan 四个数据库可对 miR-152-3p 的下游靶点进行了预测, 发现四个数据库均显示 TGFB2 是 miR-152-3p 的下游靶点之一(图 3A), 此外, 通过公共的基因芯片数据集 (GSE68021) 发现 TGFB2 在被 ox-LDL 处理了 24 h 后的 VSMCs 中显著上调(图 3B), 因此猜想 miR-152-3p 可能会通过调控 TGFB2 发挥作用。实验选择了四个数据库共同预测的 miR-152-3p 和 TGFB2 之间的结合位点构建了荧光素酶载体(图 3C)。双荧光素酶实验显示, 在 TGFB2 WT 中, 与 mimics NC 组相比, miR-152-3p mimics 组中 TGFB2 载体的荧光素酶活性显著减弱 ($P < 0.001$), 而在 TGFB2 MUT 中, TGFB2 载体的荧光素酶活性没有显著差异(图 3D)。qRT-PCR 和 Western blot 则表明, miR-152-3p 具有在 mRNA 和蛋白质水平上同时抑制 TGFB2 表达的功能 ($P < 0.05$, 图 3E、3F)。此外, 在受到 ox-LDL 处理的 VSMC 细胞中, 观察到

TGFB2 mRNA 的表达水平随着 ox-LDL 处理的浓度的增高和时间的延长而提高, 这与 miR-152-3p 表达减少的趋势相反(图 3G、3H)。这进一步证实了 miR-152-3p 和 TGFB2 之间的相互调控关系。

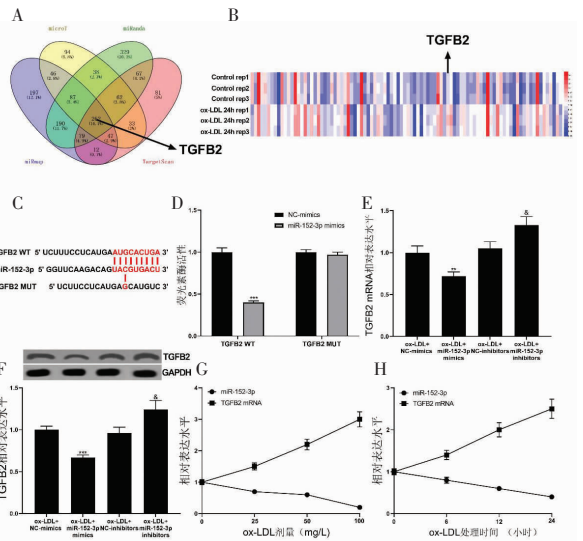


图 3 TGFB2 是 miR-152-3p 的下游靶点

A. 通过 microT、miRanda、miRmap 和 TargetScan 数据库筛选 miR-152-3p 的下游靶点。B. 通过基因芯片数据集 GSE68021 筛选 VSMCs 细胞被 ox-LDL 处理 24 h 后表达异常的基因。C. 通过四个数据库共同预测的 miR-152-3p 和 TGFB2 之间的结合位点。D. 通过双荧光素酶报告基因验证 miR-152-3p 和 TGFB2 之间的结合关系。E-F. 分别通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 TGFB2 mRNA 及其蛋白质的影响。G-H. 通过 qRT-PCR 检测不同浓度或不同时间的 ox-LDL 处理对 VSMCs 中 miR-152-3p 和 TGFB2 mRNA 表达水平的影响。在 D 中, $***P < 0.001$, NC-mimics 组和 miR-152-3p mimics 组相比; 在 E、F 中, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ox-LDL+NC-mimics 组和 ox-LDL+miR-152-3p mimics 组相比; $&P < 0.05$, ox-LDL+NC-inhibitors 组和 ox-LDL+miR-152-3p inhibitors 组相比。

2.4 过表达 TGFB2 对 miR-152-3p 作用的逆转

进一步向 VSMCs 中共转染了 miR-152-3p mimics 和 pcDNA3.1-TGFB2 以验证 miR-152-3p 和 TGFB2 在功能上的相互作用, 先通过 qRT-PCR 和 western blot 确认了 miR-152-3p 和 TGFB2 的表达水平, 发现转染 pcDNA3.1-TGFB2 后 TGFB2 mRNA 及其蛋白质表达水平确实显著提高了, 但过表达 TGFB2 对 miR-152-3p 的表达水平没有显著影响, 这说明 miR-152-3p 对 TGFB2 的调控是单向的 ($P < 0.05$, 图 4A-4C)。通过 CCK-8, transwell 和 TUNEL, 观察到 miR-152-3p 抑制 VSMCs 增殖、迁移并促进细胞凋亡的作用均被共转染的 pcDNA3.1-TGFB2 逆转了 ($P < 0.05$, 图 4D-4F)。

2.5 miR-152-3p 在小鼠体内对 TGFB2 的影响

通过 qRT-PCR, 确认小鼠主动脉平滑肌细胞中 miR-152-3p 的表达水平受到了干扰 ($P < 0.001$, 图 5A)。Western blot 结果说明, 高表达的 miR-152-3p

显著抑制了小鼠主动脉平滑肌细胞中 TGFB2 的表达,但低表达的 miR-152-3p 对 TGFB2 具有显著的促进作用($P < 0.001$,图 5B)。

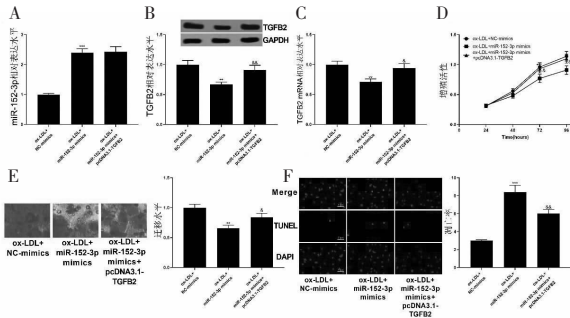


图 4 补充 TGFB2 逆转了 miR-152-3p 的作用

A. 通过 qRT-PCR 检测 VSMCs 中 miR-152-3p 的表达水平。B-C. 通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测 VSMCs 中 TGFB2 及其 mRNA 的表达水平。D. 通过 CCK-8 检测共转染 pcDNA-3.1TGFB2 和 miR-152-3p mimics 对 VSMCs 增殖活性的影响。E. 通过 transwell 检测共转染 pcDNA-3.1TGFB2 和 miR-152-3p mimics 对 VSMCs 迁移的影响。F. 通过 TUNEL 检测共转染 pcDNA-3.1TGFB2 和 miR-152-3p mimics 对 VSMCs 凋亡的影响。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$, ox-LDL+NC-mimics 组和 ox-LDL+miR-152-3p mimics 组相比; & $P < 0.05$ 、&& $P < 0.01$, ox-LDL+miR-152-3p mimics 组和 ox-LDL+miR-152-3p mimics +pcDNA3.1-TGFB2 组相比。

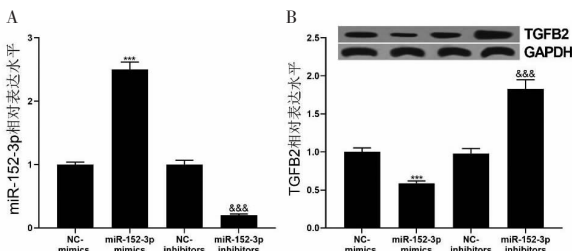


图 5 miR-152-3p 在小鼠体内对 TGFB2 的影响

A. 通过 qRT-PCR 检测小鼠颈动脉血管平滑肌细胞中 miR-152-3p 的表达水平。B. 通过 Western blot 检测小鼠颈动脉血管平滑肌细胞中 TGFB2 表达水平。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$, NC-mimics 组和 miR-152-3p mimics 组相比; && $P < 0.01$ 、&&& $P < 0.001$, NC-inhibitors 组和 miR-152-3p inhibitors 组相比。

3 讨论

研究证实, ox-LDL 通过诱发炎症等方式促进 VSMCs 的增殖和迁移,抑制其凋亡,促进了 AS 的发生发展^[9],但其机制还未完全阐明。本研究发现,在经 ox-LDL 处理的 VSMCs 中,表达降低的 miR-152-3p 可以通过靶向抑制 TGFB2 改善 ox-LDL 导致的 VSMCs 功能紊乱。

近年来,越来越多的微小 RNA 被发现调控了 VSMCs 的生物学行为。如 miR-let-7 g 被证明靶向

作用于 LOX-1,从而减轻了 VSMCs 的增殖与迁移,并在 AS 小鼠体内显著减弱了新生内膜形成^[10]。本研究中,体内外的 AS 模型中,miR-152-3p 表达显著下调,进一步通过 CCK-8, transwell 和 TUNEL 证实,miR-152-3p 可以抑制 VSMCs 增殖和迁移,并促进其凋亡。研究提示 miR-152-3p 具有抑制 AS 进程的作用,是潜在的 AS 诊断和治疗靶点。miR-152-3p 对细胞增殖和迁移的抑制作用较为广泛,在胶质母细胞瘤中,miR-152-3p 的表达水平显著下调,通过靶向作用于 DNMT1, miR-152-3p 促进了癌细胞的凋亡,并抑制了其侵袭^[11];在乳腺癌细胞系 HCC1806 中,miR-152-3p 的模拟物被证实诱导了癌细胞的凋亡,减弱了癌细胞的生存能力^[12],miR-152-3p 发挥的这些抑癌作用与本实验发现的功能相似。

MiRNAs 常通过与其下游靶 mRNA 相结合发挥其作用。本研究通过生物信息学分析和双荧光素酶报告基因发现并验证了 miR-152-3p 和 TGFB2 之间存在结合位点,miR-152-3p 可以同时 mRNA 和蛋白质水平上抑制 TGFB2 的表达。而共转染 miR-152-3p mimics 和 pcDNA3.1-TGFB2 后,miR-152-3p 对 VSMCs 增殖、迁移的抑制作用和对 VSMCs 细胞凋亡的促进作用均被逆转,这些结果进一步证实了 miR-152-3p 和 TGFB2 在 VSMCs 中的相互调控。TGF- β 通路在细胞分化、增殖、细胞外基质积累、组织修复、炎症反应和免疫等许多细胞过程中发挥重要作用^[13]。既往研究证实 TGF- β 也参与了动脉粥样硬化、再狭窄等心血管疾病的发生发展^[14]。而 TGFB2 则是 TGF- β 家族中具有良好前景的 AS 防治靶点之一。在一项探究 cAMP 功能及其机制的研究中,通过使用 forskolin 上调 cAMP 后, TGFB2 的表达被显著下调,提示 cAMP 可能通过抑制 TGFB2 抑制 VSMCs 的增殖;在另一项探究血小板反应蛋白-1 促进 VSMCs 迁移和增殖的实验中,同样发现抑制 TGFB2 显著减轻了 VSMCs 的增殖和迁移。这些研究中发现的 TGFB2 促进 VSMCs 功能紊乱的潜能和本研究结果相一致,也进一步提示调控 miR-152-3p/TGFB2 通路可能成为一种有效的 AS 防治策略。

综上所述,研究发现在 AS 的发生发展过程中, VSMCs 中 miR-152-3p 表达下降,而 TGFB2 水平显著升高。证明了 miR-152-3p 可以通过抑制 TGFB2 减轻 ox-LDL 导致的 VSMCs 增殖和迁移,增加细胞凋亡。本研究进一步揭示了 AS 发生发展过程中的分子机制,为探究 AS 防治的新靶点提供了新的理论支持。

(下转第 615 页)