

microRNA 调控平滑肌细胞分化和表型转换的分子机制研究进展

张 莎 任安经 吴 弘

摘 要 生理情况下,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)保持分化和收缩状态,当发生血管增殖性疾病时,平滑肌细胞就由分化状态转换为去分化状态,获得增殖、迁移及合成分泌细胞外基质的能力,可导致血管腔狭窄而引起一系列的临床症状。研究表明,多种分子参与了平滑肌细胞的表型转换调控。本文就 microRNA 在血管平滑肌细胞表型转换中的调控作用进行阐述。

关键词 血管平滑肌细胞 microRNA 表型转换

中图分类号 R543.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.042

血管平滑肌细胞是动脉血管壁中膜层主要的细胞,存在 2 种表型:分化型(即收缩型)和去分化型(即增殖型/合成型)。通常将平滑肌 α -肌动蛋白(smooth muscle α -actin, α -SMA)、平滑肌肌球蛋白重链(smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC)、h1-钙调蛋白(calponin)和平滑肌 22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α)等作为分化型 VSMC 的分子标志物;将胚胎肌动蛋白重链(myosin heavy chain embryonic, SMemb)和原肌球蛋白 4(tropomyosin 4, TM4)作为去分化型 VSMC 的分子标志物^[1]。正常成熟的血管壁中膜层的 VSMC 多为收缩型,呈典型的纺锤状,含丰富的肌纤维,通过表达一系列特异的收缩蛋白和骨架蛋白来维持其收缩及调节血管张力的功能。当血管损伤后或用生长因子处理体外培养的 VSMC 时, VSMC 由收缩型转变为增殖型,肌纤维骤减,收缩功能消失,并获得增殖、迁移和合成、分泌大量细胞外基质的能力^[2]。研究表明, microRNA、细胞因子、生化因子、膜受体、离子通道、细胞骨架、细胞外基质等多种分子参与了上述病理生理过程。血管平滑肌细胞的分化和表型转化是高血压、动脉粥样硬化和血管成型术后再狭窄等心血管病的关键性起始步骤^[2]。因此,研究 VSMC 的分化和表型调节的分子机制,对上述疾病的防治具有重要意义。

一、miRNA 调控 VSMC 表型转换及机制

microRNA (miRNA) 是一类内源性单链非编码

的小分子 RNA,一般由 19~22 个核苷酸组成。miRNA 的在细胞核内由相关的 DNA 转录生成的 pri-miRNAs,被 Drosha 酶内切生成具有发夹结构的 pre-miRNAs,并由 exportin-5 和 Ran-GTP 转运出核^[3]。在胞质中经 Dicer 酶作用生成 miRNA,并与 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,形成 RISC-miRNA,此复合体与 mRNA 的 3'非编码区(untranslated region, UTR)特定位点(第 2~8 个核苷酸)存在碱基互补配对,当与 mRNA 完全互补时,会引发 mRNA 降解;当与 mRNA 不完全配对时,会引发转录后的基因沉默,从而阻止或抑制相应的 mRNA 翻译过程^[3]。目前的研究表明,miRNA 参与大量的生理和病理过程,如调控各种细胞的增殖、分化、凋亡与迁移,介导心血管疾病、原发性高血压、癌症等疾病的发生、进展^[1]。

在 SMC 核中存在 1 对相互对立的基因:收缩相关基因和增殖相关基因。在 2 组基因的启动子区域均存在 CArG[CC(A/T)6GG]元件,最初的研究发现血清应答因子(serum response factor, SRF)能够与收缩相关基因启动子区的 CArG 结合,从而促进 SMC 分化;随后发现,SRF 也能与增殖相关基因的启动子区的 CArG 结合,调控 SMC 增殖。SRF 在细胞核中的浓度及共因子的类别决定 SRF 介导 SMC 的表型。当细胞核内的 SRF 处于低水平时,SRF 与增殖基因启动子区的 CArG 亲和力升高,促进增殖相关基因表达;当细胞核内的 SRF 处于较高水平时,SRF 与收缩基因启动子区的 CArG 亲和力升高,促进收缩相关基因表达^[4]。心肌素(myocardin)和 myocardin 相关转录

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(31271221)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院心内科

通讯作者:吴弘,硕士生导师,电子信箱:Doctorwh666@126.com

因子(myocardin-related transcription factor, MRTF)是SRF介导SMC收缩表型经典的共因子;而Klf4和Elk-1是SRF介导SMC增殖表型经典的共因子^[4]。近些年的研究发现:miRNA通过直接或间接作用于上述分子,双向调控VSMC的分化,如miR-221、miR-146a、miR-24等可正向调控VSMC的表型转换;而miR-143、miR-663、miR-1等可负向调控VSMC的表型转换^[1]。本文通过重点介绍几种目前已研究比较深入的miRNA对VSMC增殖、分化、迁移的影响,旨在阐明miRNA在血管损伤后管腔再狭窄过程中所起的作用,从而为血管增殖性疾病的治疗提供一个新的靶点;权衡miRNA是否可作为一种血清学分子标志物预测冠心病及经皮冠脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后血管再狭窄。

(一)miRNA促进VSMC分化

1. miR-143/145促进VSMC分化:miR-143和miR-145的编码基因位于人第5号染色体,鼠第18号染色体,二者由同一段基因转录生成,其启动子区域包含几个高度保守的cis反应元件,如SBE(Smad binding element)和CArG等。(1)多种细胞因子调控miR-143/145的表达:骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)通过激活Rho-A诱导肌动蛋白聚合,引发MRTF-A入核与SRF/CArG结合,促进pri-miR-143/145的转录;转录生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)通过磷酸化Smads,使Smad2/3入核,在早期,Smads通过作用于SBE元件促进myocardin和miR-143/145的转录,而miR-143/145的持续上调尚需早期产生的myocardin进一步刺激;Jag-1与膜受体Notch结合,Notch胞内部分入核并与CBP1(C promoter binding factor 1)结合,促进miR-143/145转录激活;而血小板源性的生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF-BB)通过激活Src,继而抑制P53在转录及转录后水平上调miR-143/145的表达^[5]。(2)miR-143/145促进SMC分化:miR-145通过上调myocardin而促进收缩相关基因的表达,而myocardin亦可促进miR-145的转录,即二者之间形成一个正反馈环路。miR-145通过抑制Klf4入核,减少Klf4-SRF复合体与SMC内增殖相关基因启动子区的TCE元件结合,进而抑制细胞增殖;miR-143通过抑制Elk1-SRF-CArG通路,抑制SMC增殖相关基因的表达^[6]。(3)miR-143/145在病理模型中表达的变化:目前已建立多种miR-143/miR-145敲除的小

鼠模型,敲除miR-143/miR-145会明显影响VSMC的收缩表型。与野生型小鼠相比,敲除小鼠血管壁变薄,平滑肌细胞的数量减少,收缩压及舒张压均降低^[7,8]。在颈动脉结扎、球囊损伤颈动脉、ApoE敲除的动物模型中均可检测到miR-143/miR-145的表达明显下降,而过表达miR-145则降低球囊损伤后内膜的形成^[7,8]。

2. miR-663促进VSMC分化:miR-663是一种仅表达于人类和灵长类动物的miRNA^[9]。PDGF-BB以时间依赖和剂量依赖的方式引起VSMC内miR-663的水平下降。使用分化培养基培养VSMC或用全反式维甲酸诱导VSMC分化时,miR-663表达水平均以时间依赖的方式上升。过表达miR-663,引起VSMC内SM22 α 、SMA、calponin等分化标志分子表达上升,PDGF-BB介导VSMC增殖、迁移水平的升高减弱;低表达miR-663可促进PDGF-BB介导的VSMC增殖、迁移活动。颈动脉结扎14天,损伤处血管内膜明显增厚;而经Ad-miR-663转染处理组,损伤处新生内膜的面积及内膜中膜比较阳性对照组明显降低。miR-663通过直接作用于Jun B一方面上调SMC分化标志分子的表达,另一方面抑制VSMC的增殖和血管损伤后内膜的形成;miR-663还可通过作用于JunB/MyI9和MMP-2/9抑制VSMC的迁移。

3. 其他miRNA促进VSMC分化:miR-23b通过作用于FoxO4/Myocardin通路而上调VSMC分化标志分子的表达,通过FoxO4/MM-9通路抑制VSMC的迁移,通过作用于uPA、Smad3等靶基因抑制VSMC的增殖、迁移及表型转换,但对其凋亡无明显调控作用^[10]。本研究构建了大鼠颈动脉球囊损伤的病理模型,血管损伤后,miR-23b出现一个先下降后上升的变化过程,在损伤后第7天达最低水平。在血管损伤局部过表达miR-23b,术后第3天,通过Ki67染色发现:SMC的增殖降低,术后第14天,通过HE染色发现:过表达miR-23b后,新生内膜面积、内膜/中膜明显降低。用PDGF-BB或20%血清处理VSMC,在最初的3~24h内,miR-214的表达显著下调。通过荧光素酶报告基因检测系统分析发现,二者是通过下调Twist-1,而在转录水平上抑制miR-214的表达。在VSMC内,miR-214通过负向调控NCKAP1的表达进一步抑制平滑肌细胞的增殖、生长和迁移。在小鼠股动脉导丝损伤血管局部过表达miR-214后,NCKAP1的表达水平明显降低,VSMC的增殖与

迁移能力降低,损伤处内膜的形成降低^[11]。

(二) miRNA 促进 VSMC 去分化

1. miR - 221/222 促进 VSMC 去分化:miR - 221 和 miR - 222 的编码基因位于 X 染色体,二者存在相同的种子序列。miR - 221 调控 VSMC 的表型转换,包括提高增殖、迁移能力,降低收缩基因的表达。用 PDGF 处理 VSMC,3h 内 miR - 221 的表达水平迅速升高。miR - 221 通过抑制周期素依赖性蛋白激酶抑制剂 p27Kipl 促进 VSMC 的增殖,抑制 miR - 221 可减弱 PDGF 介导的 p27Kipl 的降低和 SMC 的增殖。PDGF 通过上调 miR - 221 而抑制收缩基因的表达,过表达 miR - 221 可明显下调 myocardin 表达,但 miR - 221 与 myocardin 之间不存在直接作用。进一步研究发现,miR - 221 可通过下调酪氨酸激酶 c - kit 而降低 myocardin 的表达。过表达 miR - 221 提高 VSMC 的迁移能力,但干扰 p27Kipl 或者 c - kit 并未引起 miR - 221 样促迁移作用,提示 miR - 221 尚存在其他的靶基因调控 SMC 的迁移^[12]。球囊损伤大鼠颈动脉,引起损伤处 miR - 221 和 miR - 222 的表达量明显上升。对选择性敲低血管 miR - 221/222 的小鼠行颈动脉球囊损伤术,术后 14 天新生内膜的厚度较对照组薄^[13]。

2. miR - 146a 促进 VSMC 去分化:过表达 miR - 146a 促进 SMC 增殖;敲低 miR - 146a 减弱 PDGF 介导的 SMC 的增殖。miR - 146a 通过作用于 KLF4 3' UTR 抑制其翻译过程;而 KLF4 通过与 miR - 146a 启动子区域的 CACCC/GGGTG 元件结合抑制 miR - 146a 的翻译。即在 KLF4 与 miR - 146a 之间形成了一个反馈环路调控彼此的表达。球囊损伤大鼠颈动脉,损伤处 miR - 146a 的表达水平明显升高;而在敲低 miR - 146a 组,新生内膜的面积明显减少,内膜/中膜明显降低^[14]。随后,Wu 等^[15]分别从冠心病和正常大鼠主动脉分离获得 VSMC,与正常组相比,冠心病组 miR - 146a 的表达水平明显升高,VSMC 的凋亡率升高。进一步研究发现:冠心病组 VSMC 内线粒体膜电位降低,PS 曝光率及 caspase - 3 活性升高,提示 miR - 146a 可以通过作用于死亡受体介导的外源信号通路及线粒体介导的内源通路而促进 VSMC 的凋亡。同时发现,实验组 VSMC 内 NF - κ B 的表达量明显升高,而通过 TPCA - 1 抑制 NF - κ B 通路后,caspase - 3 的活性明显降低,即凋亡率较实验组明显降低。这提示,miR - 146a 还可以通过 NF - κ B 通路调控 VSMC 的凋亡^[15]。

3. miRNA 对 VSMC 表型转换的综合调控:miRNA 可双向调控 VSMC 的表型转换。Albinsson 等^[16]利用 Cre/loxp 技术,以 SM22 α 为靶点,选择性删除平滑肌细胞内 Dicer 酶,进一步观察 miRNA 对小鼠生存的影响。在出生后存活的 97 只幼鼠中,无基因型为 SMC - Dicer KO 小鼠。进一步研究表明:SMC - Dicer KO 鼠于胚胎 16 ~ 17 天时因广泛的内脏出血而死亡;于胚胎 15.5 天,对 SMC - Dicer KO 鼠的主动脉表型进行分析:管腔扩大,管壁变薄,主动和被动收缩功能降低,平滑肌细胞数量减少,增殖能力降低,收缩基因表达降低。于小鼠成年后,诱导敲除 VSMC 内的 dicer 酶,发现 VSMC 的功能大量丧失,如血管收缩功能降低,平滑肌细胞数量减少,收缩基因表达降低^[17]。提示 miRNA 对 VSMC 总的效应是促进其分化。Ji 等^[18]分别于血管损伤 7、14、28 天时取损伤处血管,检测 140 种 miRNA 水平,发现在血管损伤 7 天时,有 60 种 miRNA 上调,53 种下调;损伤 14 天时,63 种 miRNA 上调,47 种下调;损伤 28 天时,有 55 种 miRNA 上调,47 种下调。提示多种 miRNA 共同参与血管损伤后内膜的形成。可能的机制为在血管损伤早期,介导去分化的 miRNA 表达上升,使收缩型平滑肌细胞转换为合成表型,有助于损伤的修复;后期,介导分化的 miRNA 表达上升,使合成表型的 VSMC 恢复收缩型相关分子的表达,有助于内膜的稳定。

二、miRNA 在心血管系统方面的临床价值

随着人类生活质量的提高,冠心病的发生率逐年升高,介入治疗成为缓解心绞痛,降低病死率的有效措施,与此同时,支架置入所引起的支架内再狭窄与支架内血栓形成等严重并发症日益引起人们的重视。研究证实,支架内再狭窄与 VSMC 增殖、迁移密切相关,为 miRNA 用于治疗血管增殖性疾病提供了病理基础。经皮介入治疗理想的状态是血运重建、抑制平滑肌细胞的增殖、促进内皮的修复。目前临床上应用广泛的药物洗脱支架可以实现血运重建,但是支架表面的药物在抑制 SMC 增殖的同时也抑制内皮的修复,而 miRNA 的出现为这一问题的解决提供了新的靶点,但 miRNA 用于治疗血管增殖性疾病从科研到临床的转化过程中仍存在很多问题尚未解决,如在体内模拟特定 miRNA 的方法、将 miRNA 类似物或拮抗剂靶向作用于心血管系统的途径以及 miRNA 引起的促肿瘤不良反应^[19]。

miRNA 的另一重要临床应用前景为早期预测支架内再狭窄^[20]。He 等^[21]分别收集了支架内再狭

窄、支架内血流通畅,冠状动脉正常患者的血清,检测其 miRNA 的水平,发现与支架通畅组相比,支架内再狭窄组 miR - 21、miR - 143、miR - 145、miR - 100 的表达水平失调,提示上述几种 miRNA 与药物洗脱支架植入后支架内再狭窄存在密切关系,而这些表达有差异的 miRNA 确实参与调控支架内再狭窄过程相关蛋白的表达。在临床上,对于冠心病低风险分层的患者,冠脉造影是明确诊断的“金标准”,血管内介入是首选的治疗方法。但对于一些 PCI 术后高风险分层的患者,如置入多枚支架、冠状动脉多支病变的患者,完全的再血管化是无法实现的,而某种特定的 miRNA 作为一种敏感度、特异性高的非侵入性的血清标志物将使这部分高危患者获益,减少不必要的 PCI 术,及时优化药物治疗方案。

综上所述,不同的 miRNA 通过作用于不同的靶基因对血管损伤后平滑肌细胞的增殖、迁移及凋亡产生不同的影响。据此,临床上可以将特定的 miRNA 转化为药物,用于血管增殖性疾病的治疗,但目前尚存在一系列难题有待解决。对于 miRNA 作为一种血清学分子标志物,用于预测冠心病及 PCI 术后管腔再狭窄等疾病存在很大的可行性,尤其是对那些血管介入术后高风险分层的患者,但目前尚未应用于临床。

参考文献

- 1 Zhang MJ, Zhou Y, Chen L, *et al.* An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation[J]. *Histochem Cell Biol*, 2016, 145(2): 119 - 130
- 2 Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767 - 801
- 3 Davis BN, Hata A. Regulation of microRNA biogenesis: a miRiad of mechanisms[J]. *Cell Commun Signal*, 2009, 7: 18
- 4 Horita H, Wysoczynski CL, Walker LA, *et al.* Nuclear PTEN functions as an essential regulator of SRF - dependent transcription to control smooth muscle[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10830
- 5 Brandt N, Davis - Dusenbery CW. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(11): 2370 - 2377
- 6 Rangrez AY, Massy ZA, Metzinger - Le Meuth V, *et al.* miR - 143 and miR - 145: molecular keys to switch the phenotype of vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4(2): 197 - 205
- 7 Cheng Y, Liu X, Yang J, *et al.* MicroRNA - 145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neo-

- 8 Cordes KR, Sheehy NT, White MP, *et al.* miR - 145 and miR - 143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity[J]. *Nature*, 2009, 460(7256): 705 - 710
- 9 Li P, Zhu N, Yi B, *et al.* MicroRNA - 663 regulates human vascular smooth muscle cell phenotypic switch and vascular neointimal formation[J]. *Circ Res*, 2013, 113(10): 1117 - 1127
- 10 Iaconetti C, De Rosa S, Polimeni A, *et al.* Down - regulation of miR - 23b induces phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 107(4): 522 - 533
- 11 Afzal TA, Luong LA, Chen D, *et al.* NCK associated protein 1 modulated by miRNA - 214 determines vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and neointima hyperplasia[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(12): e004629
- 12 Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, *et al.* Induction of microRNA - 221 by platelet - derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3728 - 3738
- 13 Liu X, Cheng Y, Zhang S, *et al.* A necessary role of miR - 221 and miR - 222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia[J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 476 - 487
- 14 Sun SG, Zheng B, Han M, *et al.* miR - 146a and Kruppel - like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *EMBO Rep*, 2011, 12(1): 56 - 62
- 15 Wu ZW, Liu YF, Wang S, *et al.* miRNA - 146a induces vascular smooth muscle cell apoptosis in a rat model of coronary heart disease via NF - κ B pathway[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 18703 - 18712
- 16 Albinsson S, Suarez Y, Skoura A, *et al.* MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(6): 1118 - 1126
- 17 Albinsson S, Skoura A, Yu J, *et al.* Smooth muscle miRNAs are critical for post - natal regulation of blood pressure and vascular function[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18869
- 18 Ji R, Cheng Y, Yue J, *et al.* MicroRNA expression signature and antisense - mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation[J]. *Circ Res*, 2007, 100(11): 1579 - 1588
- 19 Gareri C, Rosa SD, Indolfi C. MicroRNAs for restenosis and thrombosis after vascular injury[J]. *Circ Res*, 2016, 118(7): 1170 - 1184
- 20 De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, *et al.* Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs[J]. *Circulation*, 2011, 124(18): 1936 - 1944
- 21 He MJ, Gong YT, Shi J, *et al.* Plasma microRNAs as potential non-invasive biomarkers for instant restenosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112043

(收稿日期:2017 - 02 - 04)

(修回日期:2017 - 03 - 10)