

文章编号:1004-7220(2015)04-0339-07

# microRNA-34a 在低切应力诱导血管平滑肌细胞增殖中的作用

王聪聪, 姚庆苹, 马英英, 王凯旋, 齐颖新, 姜宗来

(上海交通大学 生命科学技术学院, 力学生物学研究所, 上海 200240)

**摘要:** **目的** 探讨 microRNA-34a(miR-34a)在低切应力诱导血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖中的作用。**方法** 应用细胞联合培养平行平板流动腔系统对与 VSMCs 联合培养的内皮细胞(endothelial cells, ECs)施加 1.5 Pa 正常切应力(normal shear stress, NSS)和 0.5 Pa 低切应力(low shear stress, LowSS),加载时间为 12 h。Western blotting 检测联合培养 VSMCs 的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)蛋白表达,以此反映 VSMCs 的增殖能力。实时 PCR 检测联合培养 VSMCs 的 miR-34a 表达变化。通过 TargetScan, miRWalk 等网站预测 miR-34a 的下游靶蛋白。Western blotting 检测联合培养 VSMCs 的 miR-34a 靶蛋白 Forkhead 转录因子 J2 (forkhead box j2, Foxj2)表达。通过 mimics 和 inhibitor 转染技术,分别上调和抑制 VSMCs 的 miR-34a 表达,Western blotting 检测 Foxj2 及 PCNA 的表达变化,验证 miR-34a 和 Foxj2 之间的调控关系。**结果** 与 NSS 相比,LowSS 促进联合培养 VSMCs 的 PCNA 表达,并显著上调联合培养 VSMCs 的 miR-34a 表达。通过 TargetScan, miRWalk 等网站预测 miR-34a 的下游靶蛋白为 Foxj2。LowSS 加载下联合培养 VSMCs 的 miR-34a 靶蛋白 Foxj2 表达明显降低。静态条件下上调 VSMCs 的 miR-34a 表达,靶蛋白 Foxj2 表达明显降低,PCNA 表达显著升高;抑制 VSMCs 的 miR-34a 表达,靶蛋白 Foxj2 表达明显上调,PCNA 表达显著降低。**结论** LowSS 通过调控联合培养 VSMCs 的 miR-34a 和靶蛋白 Foxj2,促进 VSMCs 增殖。研究结果为进一步阐明动脉粥样硬化疾病的发病机制及药物治疗靶标提供新的力学生物学实验依据。

**关键词:** 切应力; 血管内皮细胞; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.04.339

## The role of microRNA-34a in low shear stress-induced proliferation of vascular smooth muscle cells

WANG Cong-cong, YAO Qing-ping, MA Ying-ying, WANG Kai-xuan, QI Ying-xin, JIANG Zong-lai (*Institute of Mechanobiology & Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*)

**Abstract: Objective** To investigate the role of microRNA-34a (miR-34a) in the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by low shear stress (LowSS). **Methods** Using co-culture parallel plate flow chamber system, endothelial cells (ECs) and VSMCs were co-cultured and applied with normal shear stress (1.5 Pa) and LowSS (0.5 Pa) for 12 h. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the co-cultured VSMCs was detected by Western blotting to determine the proliferation capacity of VSMCs. Real-time PCR was used to examine the miR levels of miR-34a in the co-cultured VSMCs. The target proteins of miR-34a were predicted by TargetScan, miRWalk and some other websites. Western blotting was used to detect expression of Forkhead box j2 (Foxj2) in the co-cultured VSMCs. Mimics and inhibitor were used to up-regulate or in-

收稿日期:2015-02-04; 修回日期:2015-03-18

基金项目:国家自然科学基金项目(11232010, 11222223)。

通信作者:齐颖新, 研究员, 博士研究生导师, Tel: (021) 34204863; E-mail: qiyx@sjtu.edu.cn。

hibit the expression of miR-34a, and then the expression of Foxj2 and PCNA was detected by Western blotting to verify the regulation relationship between miR-34a and Foxj2. **Results** Compared with NSS, LowSS promoted the PCNA expression and significantly up-regulated the miR-34a expression in the co-cultured VSMCs. Foxj2 was predicted to be the downstream target protein of miR-34a by TargetScan, miRWalk and some other websites. Foxj2 expression decreased significantly in the co-cultured VSMCs under LowSS application. Under static condition, the expression of Foxj2 obviously decreased and the expression of PCNA obviously increased by up-regulating miR-34a expression in VSMCs. While inhibiting the expression of miR-34a in VSMCs would result in a significant increase in the expression of Foxj2 and a significant decrease in the expression of PCNA. **Conclusions** LowSS can promote the proliferation of VSMCs by regulating miR-34a and target protein Foxj2 in the co-cultured VSMCs. This research finding will provide new mechanobiological experimental reference for further illustrating the pathogenesis of atherosclerosis and finding the therapeutic targets for drugs.

**Key words:** Low shear stress; Endothelial cells (ECs); Vascular smooth muscle cells (VSMCs); Cell proliferation

内皮细胞(endothelial cells, ECs)衬于血管壁的最内面,直接感受血流切应力,而平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)主要位于血管中膜,与 ECs 相邻。一般认为,VSMCs 并不直接感受切应力刺激,但切应力条件下 ECs 分泌的信号分子(生长因子、细胞因子等)可以通过旁分泌途径作用于 VSMCs,引起细胞的功能发生变化<sup>[1-2]</sup>。ECs 可视为力学因素与 VSMCs 之间的中介,活性氧(reactive oxygen species, ROS)和一氧化氮(nitric oxide, NO)是影响血管内环境稳定的重要分子,切应力的模式和大小决定了 ECs 产生 ROS 的数量。通常情况下,与稳定切应力相比,不稳定的切应力(如扰动流或振荡切应力)促使 ECs 产生更多的 ROS,导致 NO 的生物利用率降低,而生成较多的过氧亚硝酸盐,影响 VSMCs 的增殖、迁移等细胞功能,进而引发动脉粥样硬化等心血管疾病<sup>[3]</sup>。上述研究结果提示,ECs 感受切应力变化对 VSMCs 的增殖活性具有重要的调控作用,然而其中的机制仍不十分清楚。研究 ECs 感受低切应力(low shear stress, LowSS)刺激,进而调控 VSMCs 增殖活性及其力学生物学机制,对于深入了解心血管疾病血管重建发病机制具有重要意义。

microRNAs(miRs)由一系列内源性非编码的小 RNAs 组成,通过与靶 mRNAs 的 3' 非翻译端(3' UTR)互补配对方式使靶 mRNAs 降解或抑制其翻译,从而参与基因表达的转录后调节<sup>[4]</sup>。miR-34a 是一种力敏感的 miR,在不同类型的细胞中可产生不同的应答机制,并且与细胞增殖、分化等生物学过程有关<sup>[5-6]</sup>。通过调节 CDK4、CDK6、MYB 和 MEK1

的表达,miR-34a 能够促进 K562 细胞中佛波酯诱导的巨核细胞的分化<sup>[7-8]</sup>。无独有偶,miR-34a 的表达水平升高能够导致 SIRT1 等多个重要靶点表达下调,其中包括 FoxO1 和 eNOS,最终加速 ECs 的衰老和细胞凋亡<sup>[9]</sup>。叉头蛋白家族转录因子 J2(forkhead box j2, Foxj2)是一种最新发现的人类叉头蛋白转录激活因子,具有 2 个与 DNA 分子结合的特异性序列,并激活相应的基因表达,对于正向调节细胞周期和促进肿瘤发生具有重要作用<sup>[10-11]</sup>。本课题组前期研究表明,miR-34a 以 Foxj2 为靶蛋白参与了切应力诱导的内皮祖细胞向 ECs 的分化<sup>[12]</sup>。然而,在 LowSS 诱导与 ECs 联合培养的 VSMCs 增殖过程中,miR-34a 是否仍以 Foxj2 为靶位点参与调控作用尚不清楚。本研究探讨 LowSS 条件下 miR-34a 及靶蛋白 Foxj2 在促进 VSMCs 增殖过程中的分子机制,为进一步阐明动脉粥样硬化等心血管疾病的发病机制及寻找更为有效的治疗靶标提供力学生物学的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 ECs 原代培养和鉴定

采用胶原酶消化法培养原代大鼠胸主动脉 ECs<sup>[13]</sup>。无菌条件下,取 150 ~ 200 g 雄性 SD 大鼠胸主动脉。首先将血管内外的余血洗净,将血管纵行剪开,ECs 面向下平铺在盛有 0.2% I 型胶原酶(Sigma 公司)的细胞培养皿里,37 °C 消化并轻轻拍打培养皿 30 min 后,加入 ECs 培养液(Lonza 公司)终止消化,收集细胞液,以 1 100 r/min 的速度离心 10 min,小心倒掉上清液,用 ECs 培养液重悬细胞,

均匀接种至细胞培养皿中,平放于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中内 24 h,待细胞贴壁后换液。以后隔天换液 1 次。换液时将原培养液吸净,然后加入新鲜培养液。7~10 d 长至融合状态,即可传代。用抗血管性血友病因子(anti-von Willebrand factor, Anti-vWF) 抗体(DukoCyomation 公司)对 ECs 进行细胞免疫荧光鉴定,阳性率大于 95% 用于后续实验。

## 1.2 VSMCs 原代培养及鉴定

采用组织块贴壁法培养原代大鼠胸主动脉 VSMCs<sup>[14]</sup>。雄性 SD 大鼠 150~200 g,无菌条件下取胸主动脉,纵向剪开血管,去除 ECs 后将血管剪成约 1 mm<sup>2</sup> 的组织块,加入少量 VSMCs 培养液 [DMEM(Gibco 公司),10% 小牛血清(Hyclone 公司),青链霉素(BBI 公司)]。将组织块均匀铺展在细胞培养皿中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养,隔天换液。以后每 2 d 换液 1 次,4~5 d 观察细胞自组织块边缘爬出。使用抗  $\alpha$ -肌动蛋白抗体(DukoCyomation 公司)对 VSMCs 进行细胞免疫荧光鉴定,阳性率大于 95% 用于后续实验。

## 1.3 ECs 与 VSMCs 联合培养与流体切应力加载

### 1.3.1 ECs 与 VSMCs 的联合培养

ECs 与 VSMCs 的联合培养是通过联合培养杯来实现的<sup>[1]</sup>。取第 2~4 代 ECs,用胰酶消化、重悬、计数后,以  $2 \times 10^5$  个/mL 密度接种于培养杯底部(PET 膜)的外侧面。待 5~6 h 细胞贴壁后,将培养杯翻转并置于 6 孔培养板中,在联合培养杯底的内侧面以同样的密度接种第 4~7 代 VSMCs,进行联合培养。

### 1.3.2 切应力加载

应用 ECs 与 VSMCs 联合培养的平行平板流动腔系统对 ECs 施加切应力作用。将种有 ECs 与 VSMCs 的联合培养杯放置于平行平板流动腔中,切应力的大小通过改变上、下储液瓶高度来调节<sup>[15]</sup>。根据施加的切应力大小,将联合培养的 ECs 和 VSMCs 分为 2 组:① 1.5 Pa 正常切应力(normal shear stress, NSS) 组;② 0.5 Pa LowSS 组。切应力加载时间均为 12 h。实验前,待 ECs 和 VSMCs 均生长至约 80% 融合时,分别用含 1% 胎牛血清(Gibco BRL 公司)的 M199(Gibco BRL 公司)和 1% 小牛血清的 DMEM 培养液进行同步化 12 h,将细胞生长阻断在同一周期。各组 ECs 和 VSMCs 在实验结束后,提取样品进行蛋白质免疫印迹检测或实时荧光定量 PCR 检测。

## 1.4 miR-34a 的模拟体(mimics)和抑制剂(inhibitor)转染实验

选择生长状态较好的 4~7 代 VSMCs,胰酶消化后种在无菌 6 孔板中,控制细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/孔,待细胞融合至 60% 时即可进行转染实验。miR-34a 的转染均分为 4 组:inhibitor 转染、inhibitor 对照、mimics 转染、mimics 对照。大鼠 miR-34a 的 mimics 和 inhibitor 序列以及对照片段见表 1(上海吉玛生物制药公司)。转染步骤如下:① 准备好的 6 孔板细胞,将原来的培养液吸出,用温育过的 DMEM 培养基洗 2~3 遍,最后每孔留下 500  $\mu$ L DMEM;② 取 250  $\mu$ L opti-MEM(Invitrogen 公司),5  $\mu$ L Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000(Invitrogen 公司),轻轻混匀,作为 mix1 溶液;③ 取 250  $\mu$ L opti-MEM,转染片段 5  $\mu$ L(上海吉玛生物制药公司),轻轻混匀,作为 mix2 溶液;④ 将 mix1、mix2 溶液按照 1:1 的比例混合,上下颠倒混匀,离心,控制好混合时间为 20 min;⑤ 20 min 之后,将 mix3 溶液加入到对应的孔中,放入 37 °C 培养箱中培养;⑥ 6~8 h 后,根据实验需要进行补液。

表 1 大鼠 miR-34a 的模拟体和抑制剂序列以及对照片段

Tab.1 Sequence of rat miR-34a mimics, inhibitor and their negative control fragment

片段名称	序列
模拟体对照	正义链 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	反义链 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
miR-34a 模拟体	正义链 5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUGU-3'
	反义链 5'-AACCAGCUAAGACACUGCCA-3'
抑制剂对照	5'-CAGUACUUUGUGUAGUACAA-3'
miR-34a 抑制剂	5'-ACAACCAGCUAAGACACUGCCA-3'

## 1.5 蛋白质印迹实验(Western blotting)

培养在 6 孔板的细胞,首先吸出原来培养液,用冰的 PBS 洗 2 遍,根据细胞数量每孔加入 80~100  $\mu$ L  $2 \times$  蛋白上样缓冲液/loading buffer),冰上放置 3 min,用细胞刮轻刮 6 孔板底,在显微镜下观察到细胞漂起时即可把裂解下来的细胞收集到 1.5 mL EP 管中,做好标记,放入 -80 °C 保存。

用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电泳后将蛋白转移到硝酸纤维素膜;5% 脱脂奶粉 Tris 盐加 0.1% Tween20 溶液(tris-buffered saline

with 0.1% Tween20, TBST) 中封闭 1 h; 抗 Foxj2 (Abcam公司, 1:500), 增殖性细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) (Proteintech 公司, 1:500), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (Santa Cruz Biotechnology公司, 1:1 000), 4 °C 孵育过夜; 碱性磷酸酶标记二抗 (北京中杉生物技术公司, 1:1 000) 室温孵育 2 h; NBT/BCIP (KPL 公司) 底物显色。扫描后使用 Bio-Rad 公司一维分析软件 Quantity One 进行图像灰度分析。

## 1.6 逆转录及实时 PCR 实验

### 1.6.1 抽提细胞总 RNA

将已加入 TRIzol 的细胞裂解液从冰箱中取出, 室温静置使其融解, 并预冷离心机。在 1 mL TRIzol 裂解液中加入 200  $\mu$ L 氯仿, 盖紧管盖, 剧烈震荡 15 s, 室温放置 3 min; 4 °C, 以 12 000  $g$  转速离心 15 min; 吸取 500  $\mu$ L 上层水相到新的无 RNA 酶的 EP 管中, 加入 500  $\mu$ L 异丙醇, 室温静置 10 min; 4 °C, 以 12 000  $g$  转速离心 10 min; 弃上清, 用预冷的 1 mL 75% 乙醇 (用 DEPC 水配制) 1 mL 洗涤上下颠倒混匀; 4 °C, 以 7 500  $g$  转速离心 5 min; 弃上清, 室温反置吸水纸晾干 30 min; 加适量的无 RNA 酶水溶解, DEPC 处理水将 RNA 浓度稀释 100 倍, 用紫外分光光度计测定所提取 RNA 的纯度及浓度。

### 1.6.2 逆转录实验

大鼠 miR-34a 的特异性逆转录引物 (上海吉玛生物制药公司) 为干粉状, 使用前将其溶解, 调整为 1  $\mu$ mol/L 工作浓度。逆转录每个体系为 20  $\mu$ L, 各成分及配比如下: 5 $\times$  缓冲液 4  $\mu$ L, 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP, 10 mmol/L) 0.75  $\mu$ L, 反转录引物 1.20  $\mu$ L, RNA 酶抑制剂 (40 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, MMLV 逆转录酶 (200 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 根据需要加入一定量的 RNA 样品 (1~3  $\mu$ g), 加水至 20  $\mu$ L。配完反应体系, 按照如下程序进行逆转录反应: 25 °C、30 min; 42 °C、30 min; 85 °C、5 min。反应程序结束后, 立即将 cDNA 产物置于冰上冷却, -20 °C 短期保存, 长期保存放置在 -80 °C 冰箱中。

### 1.6.3 实时 PCR 实验

大鼠 miR-34a 的特异性 PCR 引物 (上海吉玛生物制药公司) 为干粉状, 使用前将其溶解, 调整为 5  $\mu$ mol/L 工作浓度。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 各成分及配比如下: SYBR Premix Ex Taq™ 10  $\mu$ L, miR Specific Primer Set 0.8  $\mu$ L, 根据需

要加入一定量的 cDNA, 最后加水至 20  $\mu$ L。miRs 实时定量 PCR 反应程序: 95 °C、3 min 预热; 95 °C、12 s; 62 °C、40 s, 40 个循环。

## 1.7 miRs 靶蛋白预测

通过 TargetScan、miRWalk 和 Pictar 等网站预测 miR-34a 的下游靶蛋白。

## 1.8 统计学分析

各组间实验数据采用均数  $\pm$  标准差的形式表示, 两组数据间的差异采用  $t$  检验对比, 所有实验均独立重复 3 次以上,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义,  $P < 0.01$  表示差异具有高度统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LowSS 促进联合培养 VSMCs 的增殖

应用平行平板流动腔系统对与 VSMCs 联合培养的 ECs 分别施加 NSS 和 LowSS, 作用时间为 12 h。Western blotting 检测联合培养 VSMCs 的 PCNA 表达变化, 以反映 VSMCs 的增殖能力。结果显示, 与 NSS 相比, LowSS 显著上调联合培养 VSMCs 的 PCNA 表达, 说明 LowSS 促进联合培养的 VSMCs 增殖 (见图 1)。

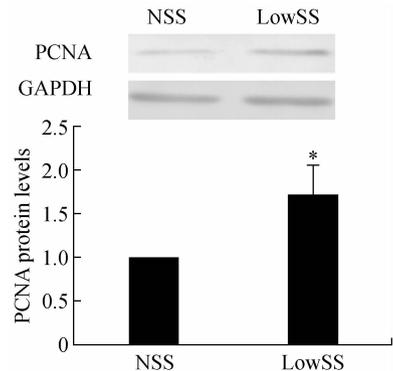


图1 LowSS 促进联合培养 VSMCs 的 PCNA 表达 (\*  $P < 0.05, n = 5$ )

Fig.1 LowSS increased the expression of PCNA in the co-cultured VSMCs

### 2.2 LowSS 显著上调联合培养 VSMCs 的 miR-34a 表达

同样, 在 ECs 和 VSMCs 联合培养的条件下分别对 ECs 施加 NSS 和 LowSS, 作用时间为 12 h。实时 PCR 检测联合培养 VSMCs 的 miR-34a 表达。结果显示, 与 NSS 组相比, LowSS 条件下, 联合培养 VSMCs 的 miR-34a 表达显著升高, 说明 LowSS 能够促进联合培养 VSMCs 的 miR-34a 表达 (见图 2)。

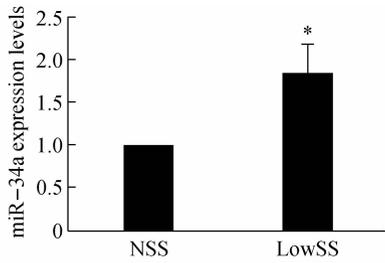


图2 LowSS 显著上调联合培养 VSMCs 的 miR-34a 表达 (\*  $P < 0.05$ ,  $n = 6$ )

Fig.2 LowSS significantly increased the expression of miR-34a in the co-cultured VSMCs

### 2.3 生物信息学预测 miR-34a 靶蛋白

通过 TargetScan、miRWalk 等网站,预测大鼠 miR-34a 的下游靶蛋白。结果显示,Foxj2 可以作为 miR-34a 的下游靶蛋白,彼此之间有相互结合位点,提示 Foxj2 有可能作为 miR-34a 的下游靶蛋白参与 LowSS 条件下联合培养 VSMCs 增殖的调控(见图3)。

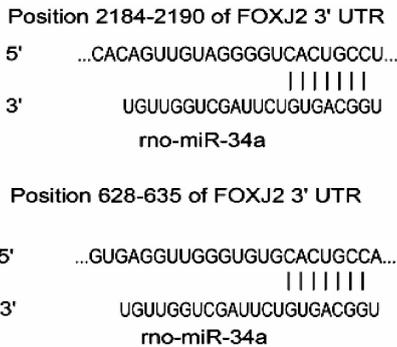


图3 大鼠 miR-34a 与 Foxj2 3'非翻译端的互补结合位点  
 Fig.3 Putative binding sites between rno-miR-34a and Foxj2 3'-UTR

### 2.4 LowSS 诱导联合培养 VSMCs 的 miR-34a 靶蛋白 Foxj2 表达下调

在 ECs 与 VSMCs 联合培养的条件下分别对 ECs 施加 NSS 和 LowSS,作用时间为 12 h。Western blotting 检测联合培养 VSMCs 的 Foxj2 表达。结果显示,与 NSS 组相比,LowSS 条件下,联合培养 VSMCs 的 miR-34a 靶蛋白 Foxj2 的表达明显降低,与上述 miR-34a 的表达变化相反。结果表明,miR-34a 可能以 Foxj2 为靶蛋白参与调控 LowSS 诱导的 VSMCs 增殖(见图4)。

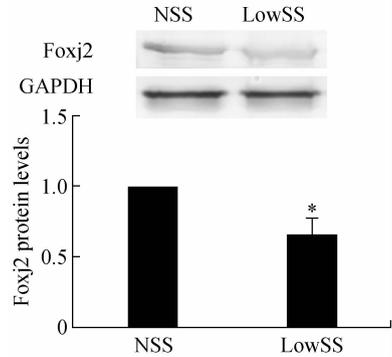


图4 LowSS 显著抑制联合培养 VSMCs 的 Foxj2 表达 (\*  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ )

Fig.4 LowSS significantly decreased the expression of Foxj2 in the co-cultured VSMCs

### 2.5 mimics 和 inhibitor 转染对 Foxj2 及 PCNA 表达的影响

为验证大鼠 miR-34a 和 Foxj2 之间存在调控关系,分别通过转染 miR-34a 的 mimics 和 inhibitor 改变 VSMCs 的 miR-34a 表达,Western blotting 检测 VSMCs 的 miR-34a 表达变化后,其靶蛋白 Foxj2 及 PCNA 的表达变化。结果显示,转染 mimics 促进 VSMCs 的 miR-34a 表达后,靶蛋白 Foxj2 表达显著下调[见图5(a)],而 PCNA 表达显著升高[见图5(b)]。

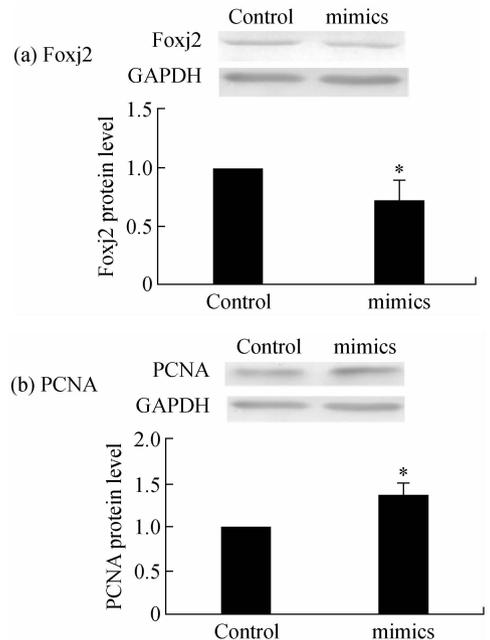


图5 miR-34a mimics 转染对 VSMCs 的 Foxj2 和 PCNA 表达的影响 (\*  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ )

Fig.5 Influence of miR-34a mimics transfection on the expressions of Foxj2 and PCNA in VSMCs (a) Foxj2, (b) PCNA

转染 inhibitor 抑制 VSMCs 的 miR-34a 表达后, 靶蛋白 Foxj2 表达明显上调[见图 6(a)], 而 PCNA

表达显著降低[见图 6(b)], 验证了 miR-34a 以 Foxj2 为靶蛋白参与调控 VSMCs 的增殖过程。

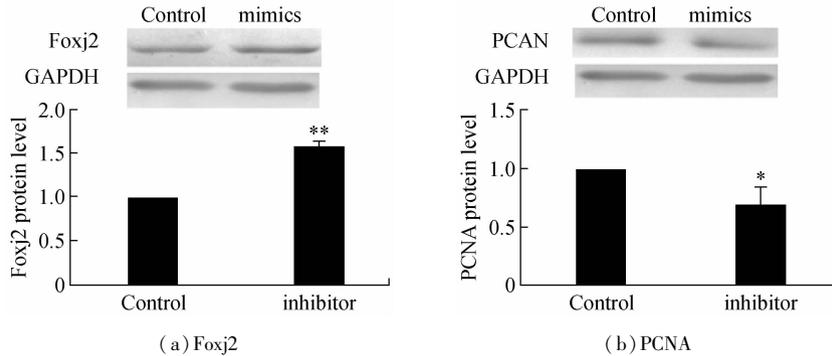


图6 miR-34a inhibitor 转染对 VSMCs 的 Foxj2 和 PCNA 表达的影响 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ,  $n = 5$ )

Fig. 6 The influence of miR-34a inhibitor transfection on the expression of Foxj2 and PCNA in VSMCs (a) Foxj2, (b) PCNA

### 3 讨论

LowSS 等血流动力学环境是影响血管结构、形态和功能的重要因素。ECs 和 VSMCs 构成血管壁的主要细胞成分, 它们在解剖位置上相邻, 在功能上相互影响, 共同维持血管功能的稳定。VSMCs 在切应力条件下受到相邻 ECs 的影响, 发生基因表达及细胞功能的变化, 表现为增殖、凋亡和迁移等功能的改变, 最终导致血管重建<sup>[1, 16]</sup>。

本研究发现, 与 NSS 相比, LowSS 促进联合培养 VSMCs 的增殖。在 ECs 与 VSMCs 联合培养的模型中, ECs 响应 LowSS 的刺激, 释放某种生长因子, 通过旁分泌途径作用于 VSMCs, 促进 VSMCs 的增殖, 其中的力学生物学机制较为复杂。本课题组前期研究发现, ECs 感受切应力变化, 将力学信号转导为胞内信号, LowSS 条件下, ECs 感受 LowSS 刺激, 分泌血小板衍生生长因子-BB (platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB) 和转换生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 等生长因子, 进而促进 ECs 和 VSMCs 的增殖和迁移<sup>[1]</sup>。本研究发现, 在 LowSS 促进联合培养 VSMCs 增殖的同时, 联合培养 VSMCs 的 miR-34a 表达显著上调。本课题组前期通过双荧光素酶报告基因实验表明, 人 Foxj2 的 3'-UTR 含有与 miR-34a 的结合位点<sup>[12]</sup>。本文通过大鼠 miR-34a 的 mimics 和 inhibitor 转染检测 Foxj2 表达, 发现 miR-34a 负调控 Foxj2 的表达, 证实 miR-34a 以 Foxj2 为靶蛋白调控了 LowSS 诱导的联

合培养 VSMCs 的增殖。这一研究结果为 LowSS 诱导与 ECs 联合培养 VSMCs 增殖的力学生物学机制增添了新的证据。

近年来, miRs 已成为国内外学者的研究热点, 而对于 miR-34a 的研究主要集中在癌症方面。研究发现, p53 肿瘤抑制蛋白是癌症细胞中重要的调控因子, miR-34a 是 p53 转录调节网络中的重要组成部分, 通过对 miR-34a 初级转录本和启动子序列的分析发现, miR-34a 直接受到 p53 的负调控, miR-34a 调控的下游基因含量相当丰富, 足以调控细胞周期进程、凋亡、DNA 修复和血管新生等过程, 可见 miR-34a 在调控 p53 肿瘤抑制因子功能方面具有重要作用<sup>[17]</sup>。在化学治疗敏感性的膀胱癌细胞中 miR-34a 表达显著上调, 细胞周期依赖性激酶 6 (cyclin-dependent kinases 6, CDK6) 和沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (sirtuin type 1, SIRT1) 作为 miR-34a 的靶蛋白受到 miR-34a 的负调控, 它们的表达显著下调, 进而导致膀胱癌细胞的化疗敏感性<sup>[18]</sup>。miR-34a 在肾小管上皮细胞中以 Notch1 和 Jagged1 为靶点, 促进低氧诱导的肾小管上皮细胞向间充质干细胞的转换<sup>[19]</sup>。本研究发现, miR-34a 和 Foxj2 在 LowSS 诱导的 VSMCs 增殖中具有重要调控作用。VSMCs 增殖功能的改变可能诱发血管重建, 进而导致动脉粥样硬化等心血管疾病。研究结果为进一步阐明动脉粥样硬化等心血管疾病的发病机制及寻找更为有效的治疗靶标提供了力学生物学基础。

然而, 深入探讨 LowSS 促进联合培养 VSMCs 的

增殖的调控机制,仍需要进行一些后续实验,如 miR-34a 参与调控了 LowSS 促进 VSMCs 的增殖过程,在 VSMCs 中何种转录因子参与调控 miR-34a 的表达仍需进一步探讨。本文仅涉及了细胞增殖的研究,细胞迁移等其他功能在 LowSS 条件下是否也受到 miR-34a 和 Foxj2 的影响将是一个有意义的科学问题。

## 参考文献:

- [1] Qi YX, Jiang J, Jiang XH, et al. PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(5): 1908-1913.
- [2] Chiu JJ, Usami S, Chien S. Vascular endothelial responses to altered shear stress: Pathologic implications for atherosclerosis [J]. Ann Med, 2009, 41(1): 19-28.
- [3] Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, et al. Shear-induced endothelial mechanotransduction: The interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications [J]. J Biomed Sci, 2014, 21(1): 3.
- [4] Wang QX, Zhu YQ, Zhang H, et al. Altered miRNA expression in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(3): 933-944.
- [5] Chang SJ, Weng SL, Hsieh JY, et al. MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. BMC Med Genomics, 2011, doi: 10.1186/1755-8794-4-65.
- [6] Fineberg SK, Datta P, Stein CS, et al. MiR-34a represses Numbl in murine neural progenitor cells and antagonizes neuronal differentiation [J]. PLoS One, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0038562.
- [7] Navarro F, Gutman D, Meire E, et al. MiR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53 [J]. Blood, 2009, 114(10): 2181-2192.
- [8] Ichimura A, Ruike Y, Terasawa K, et al. MicroRNA-34a inhibits cell proliferation by repressing mitogen-activated protein kinase kinase 1 during megakaryocytic differentiation of K562 cells [J]. Mol Pharmacol, 2010, 77(6): 1016-1024.
- [9] Zhao T, Li J, Chen AF. MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1 [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 299(1): E110-116.
- [10] Wijchers PJ, Hoekman MF, Burbach JP, et al. Identification of forkhead transcription factors in cortical and dopaminergic areas of the adult murine brain [J]. Brain Res, 2006, 1068(1): 23-33.
- [11] Kehn K, Berro R, Alhaj A, et al. Functional consequences of cyclin D1/BRCA1 interaction in breast cancer cells [J]. Oncogene, 2007, 26(35): 5060-5069.
- [12] Cheng BB, Qu MJ, Wu LL, et al. MicroRNA-34a targets Forkhead box j2 to modulate differentiation of endothelial progenitor cells in response to shear stress [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 74: 4-12.
- [13] 陆奇明,顾翔,姜晓华,等. Rab28 相关信号通路在低切应力诱导血管平滑肌细胞迁移中的作用[J]. 医用生物力学, 2014, 29(1): 7-13.
- [14] Lu QM, Gu X, Jiang XH, et al. The role of Rab28 and ERK in low shear stress induced migration of vascular smooth muscle [J]. J Med Biomech, 2014, 29(1): 7-13.
- [15] 沈岩,王璐,韩悦,等. 活化激酶 C 受体 1 在切应力调控血管平滑肌细胞增殖中的作用[J]. 医用生物力学, 2014, 29(6): 491-497.
- [16] Shen Y, Wang L, Han Y, et al. Shear stress modulates the proliferation of vascular smooth muscle cells via receptor for activated C kinase 1 [J]. J Med Biomech, 2014, 29(6): 491-497.
- [17] 从兴忠,姜宗来,李玉泉,等. 用于内皮细胞与平滑肌细胞联合培养的流动腔系统[J]. 医用生物力学, 2001, 16(1): 1-5.
- [18] Cong XZ, Jiang ZL, Li YQ, et al. A new flow chamber system for endothelial cells and smooth muscle cells co-culture model [J]. J Med Biomech, 2001, 16(1): 1-5.
- [19] Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells [J]. J Biomech, 2005, 38(10): 1949-1971.
- [20] Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis [J]. Mol Cell, 2007, 26(5): 745-752.
- [21] Li XJ, Ren ZJ, Tang JH. MicroRNA-34a: A potential therapeutic target in human cancer [J]. Cell Death Dis, 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.270.
- [22] Du R, Sun W, Xia L, et al. Hypoxia-Induced down-regulation of microRNA-34a promotes EMT by targeting the Notch signaling pathway in tubular epithelial cells [J]. PLoS One, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0030771.