

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.32.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 32-0025-08

MicroRNA-486 和 TGF- β_1 对人主动脉瓣膜钙化的影响及其机制研究*

蒋伟坚, 方明, 苏锦文, 王温慧, 王雪君, 李新明
(上海健康医学院附属周浦医院, 上海 201318)

摘要: 目的 研究 microRNA-486 (miRNA-486) 对人主动脉瓣膜间质细胞 (VICs) 钙化的影响及作用机制。**方法** 体外培养 VICs, 经成骨诱导后用双荧光素报告基因检测 miRNA-486 靶基因。转染 miR-486 mimic、miR-486 Inhibitors 后, 将细胞分为 miR-486 mimic 组、miR-486 mimic NC 组、miR-486 Inhibitors 组、miR-486 Inhibitors NC 组。采用茜红素染色、ALP 试验分析各组钙化程度, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)、免疫荧光试验检测 miR-486 靶基因及成骨相关因子 mRNA 和蛋白的表达水平。**结果** 双荧光素报告基因检测和 Western blot 检测结果显示, 转录生长因子- β_1 (TGF- β_1) 为潜在靶基因。茜红素染色、ALP 试验结果显示, miR-486 mimic 组钙化程度高于 miR-486 Inhibitors 组。qRT-PCR、免疫荧光试验结果表明, miR-486 mimic 组 TGF- β_1 、SMAD3 mRNA 和蛋白表达水平较低 ($P < 0.05$); miR-486 mimic 组 RUNX2、骨钙素 mRNA 表达水平较 miR-486 Inhibitors 组高 ($P < 0.05$)。**结论** miR-486 可通过下调 TGF- β_1 的表达, 促进 RUNX2、骨钙素的表达和活性, 诱导间质细胞向成骨细胞分化。

关键词: 心脏瓣膜疾病; microRNA-486; 转录生长因子- β_1 ; 茜红素染色; 碱性磷酸酶活性; 主动脉瓣膜

中图分类号: R542.5

文献标识码: A

Effect of microRNA-486 and TGF- β_1 on calcification of human aortic valve and its mechanism*

Wei-jian Jiang, Ming Fang, Jin-wen Su, Wen-hui Wang, Xue-jun Wang, Xin-ming Li
(Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China)

Abstract: Objective To explore the effect of miRNA-486 (miR-486) on calcification of human aortic valve interstitial cells (VICs) and its mechanism. **Methods** VICs were cultured *in vitro*. After osteogenesis induction the target genes of miR-486 were detected by dual luciferase report gene and Western blot. After transfection of miR-486 mimic and miR-486 inhibitors, VICs were divided into four groups including a miR-486 mimic group, a miR-486 mimic NC group, a miR-486 inhibitor group and a miR-486 inhibitor NC group. Alizarin red staining and ALP test were used to analyze the level of calcification. Meanwhile, qRT-PCR and immunofluorescence assay were applied to show the mRNA and protein expressions of miR-486 target gene and osteoblast-associated factors. **Results** The results of dual luciferase report gene and Western blot showed that the TGF β_1 gene was the potential target gene and the results of alizarin red staining revealed that the degree of calcification in the miR-486 mimic group was higher than that in the miR-486 inhibitor group ($P < 0.05$). Meanwhile, the mRNA and protein expression levels of TGF β_1 and SMAD3 decreased in the miR-486 mimic group ($P < 0.05$); the mRNA levels of Runx2 and osteocalcin in the miR-486 mimic group were higher than those in the miR-486 inhibitor group ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-486 can promote the expression and activity of Runx2 and osteocalcin by down-regulating TGF- β_1 , and induce the

收稿日期: 2018-05-31

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81560077); 上海健康医学院种子基金 (No: HMSF-16-22-030); 上海市浦东新区卫计委优秀青年医学人才培养计划 (No: PWRq2015-24)

[通信作者] 方明, E-mail: fangming0422@aliyun.com; Tel: 13062747415

differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts.

Keywords: valvular heart disease; *miR-486*; transcription growth factor- β_1 ; alizarin red staining; alkaline phosphatase activity; aortic valve

近年来, 全球钙化性主动脉瓣疾病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 的发病率不断上升, 成为老年人最常见的心脏瓣膜疾病之一^[1-3]。最新研究提示, 多种 microRNA (miRNA) 在主动脉瓣钙化及瓣膜内异位骨化中起重要调控作用^[4], 国外学者 HEATH 等^[5]亦在研究中阐述了 miRNA 与 CAVD 的联系。但笔者查阅文献发现 miRNA-486 与 CAVD 的研究较少, 现有研究发现其多数功能作用与转录生长因子- β_1 (transcription growth factor- β_1 , TGF- β_1) 相关, 为 CAVD 进程中的靶基因及作用机制仍未明确^[3-5]。因此, 本研究拟通过转染 miRNA-486 模拟物和抑制物, 进一步验证其作用, 以期 CAVD 的治疗寻找一个潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

1.1.1 细胞及试剂 人主动脉瓣膜间质细胞 (human aortic valve interstitial cells, VICs) 由上海健康医学院附属周浦医院提供, 维生素 C、地塞米松、 β -甘油磷酸、茜素红购自美国 Sigma 生物公司, 胶原酶、SMAD3 抗体、TGF- β_1 抗体购自杭州远方生物科技有限公司, 高糖 DMEM 培养基、青霉素 / 链霉素、10% 胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。

1.1.2 主要仪器 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 (ABI7900HT)、逆转录试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司, 日本 Olympus FV1000 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司), Eppendorf 基因扩增仪、Leica 倒置荧光相差显微图像系统、组织切片仪、组织包埋机购自上海赛默飞世尔科技有限公司, 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司), Odyssey 双色红外激光成像系统 (美国 LICOR 公司), 免疫荧光试剂包括多聚甲醛、Triton X-100、BSA、PBS、DAPI、抗淬灭封片剂购自上海国药集团化学试剂有限公司, 核酸蛋白电泳设备 (上海生工生物工程股份有限公司), 各种离心及冷藏设备 (低温冰箱和液氮罐) (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用胶原酶溶解人主动脉瓣组织后, 刮取内皮细胞层再次溶解制成细胞悬液。常规培养于

高糖 DMEM 培养基, 添加 10% 胎牛血清、100 μ g/ml 青霉素和链霉素, 控制培养箱条件为 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO₂ 恒温。密切观察 12 h 后改用钙化培养基 (含 10 nmol/L 地塞米松、50 mg/L 维生素 C 和 10 mmol/L β -甘油磷酸钠) 培养细胞, 观察两组细胞状态, 每隔 2 天更换培养液, 当细胞生长至 70% ~ 80% 时, 胰蛋白酶消化传代, 取传代后 3 ~ 7 代细胞进行后续实验。

1.2.2 双荧光素酶报告基因检测 初步应用 TargetScan 6.2 版本等生物信息学软件检索 miRNA-486 靶基因, 结果显示 TGF- β_1 基因可能是其潜在靶基因。收集第 3 代 VIC 细胞按 1×10^6 个 / 孔接种于 6 孔板, 利用 PCR 法获取 VIC 细胞中的 cDNA 模板, 构建包含 miRNA-486 结合位点 TGF- β_1 基因 3'-UTR 的序列, 插入 pMIR-REPORT luciferase 报告载体中, 经限制性内切酶处理后, 纯化鉴定。构建获得的 TGF- β_1 -WT (野生型) 重组载体质粒和 TGF- β_1 -Mut (突变型) 重组载体质粒, 所有构建获得的表达质粒经酶切和测序鉴定。按照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行操作, 将上述重组质粒载体和 miR-486 mimic、miR-486 mimic NC、miR-486 Inhibitors、miR-486 Inhibitors NC (美国 Invitrogen 公司合成) 共转染 293T 细胞 (生长状态良好), 24 h 后行双荧光素酶报告基因检测。以荧光素为底物, 检测萤火虫荧光素酶活性, 加入 Stop&Glo8 试剂, 检测海肾荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶活性作为内参照, 同时加入抑制荧光素酶催化荧光素发光的物质, 计算各组细胞内的相对荧光素酶活性。荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值 / 海肾荧光素酶活性值。实验操作重复 3 次。

1.2.3 miRNA-486 转染及分组 分别将 miR-486 mimics、miR-486 mimics NC、miR-486 mimic Inhibitors、miR-486 mimic Inhibitors NC 通过 Lipofectamine 2000 转染第 3 代 VICs 细胞, 分为 4 组。PBS 洗涤 3 次后, 各组按量加入 DEPC 处理的水, 轻荡混匀。调整细胞状态, 在 500 μ l 无血清、无双抗的转染专用 opti-MEM 培养基中加入 Lipofectamine 2000, 作用 5 min。轻轻吹打, 室温静置 20 min。弃培养皿中细胞上清液, 配成 0.5 ml 转染液, PBS 清洗培养皿中细胞 2 次, 加入无血清的 1.5 ml opti-MEM。放入培养箱孵育 6 h, 弃转染液, PBS 洗 1 次, 加入成骨诱导液继续孵育。

1.2.4 Western blot 检测 采用 Western blot 检测内源性 TGF- β_1 蛋白表达水平。选取第 3 代细胞, 转染 miRNA 并成骨诱导后第 7 天, 取 6 孔细胞培养板, PBS 清洗 2 次, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入细胞裂解液, 摇匀, 静置 20 min。4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于新的离心管中。用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒进行蛋白定量, 样品按量加入 96 孔的蛋白标准孔, 再加入 200 μ l BCA 工作液, 反应 30 min, SDS-PAGE (8% 分离胶, 5% 浓缩胶) 凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h 后分别加入 TGF- β_1 抗体稀释液 (1 : 1 000), 4℃过夜孵育, TBS 洗膜 3 次, 5 min/次。室温下加入 1 : 3 000 的二抗稀释液 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG) 孵育 1.5 h, TBS 洗 3 次。

1.2.5 茜红素染色 沉积的钙可与茜红素发生显色反应, 细胞外基质被染成橘红色, 而细胞本身被染成粉红色。用 100 ml 蒸馏水溶解 1 g Tris, 滴管缓慢滴加 HCl 到溶液中, 观察溶液酸碱度, 当 pH=8.3 时, 向溶液中加入 0.1 g 茜红素粉末, 配置为 pH=8.3 的 0.1% 茜红素-Tris-HCl 工作液。同时, 取转染后细胞, 在 100 倍倒置显微镜下观察消化后细胞的形态变化, 用血球计数板计数, 24 孔板加入爬片, 细胞 2 万个/孔; 贴壁加入 PBS 清洗 2 遍, 95% 乙醇固定。10 min 后, 双蒸馏水清洗 3 次, 加入配置好的工作液, 37℃恒温作用 30 min。将茜红素染液用 0.22 μ m 滤纸过滤, 加入染液覆盖住底孔, 室温染色放置 5 min, PBS 漂洗 3 次, 风干, 甘油明胶封片, 倒置显微镜观察钙结节染色情况, 橘红色矿化结节为阳性结果。根据实验需要, 在加入成骨诱导液 7 和 14 d 时进行染色; 每组设 3 个重复, 每样本随机取 1 个视野, 比较各组间差异。

1.2.6 碱性磷酸酶活性测定 PNPP 制备: 5.4 ml Assay Buffer 溶解 2 片 PNPP, 制成 5 mmol 工作液。ALP 酶制备: 1 ml Assay Buffer 加入 ALP 酶。取 160 μ l Assay Buffer 混入 40 μ l PNPP 制成 1 mmol 标准品。标准孔中每个梯度加入 0、4、8、12、16 和 20 μ l Assay Buffer, 吹打摇匀后孵育 5 min, 加入 10 μ l ALP 酶。清洗转染后细胞, 加入 50 μ l Assay Buffer, 13 000 r/min 离心 3 min。取 20 μ l 样品, 加入 Assay Buffer 至 80 μ l, 加入 50 μ l/孔 PNPP 反应液 50 μ l, 25℃避光作用 60 min, 加入 20 μ l 终止液混匀, 于 405 nm 处测定吸光度值, 制作标准曲线并计算 ALP 活性。

1.2.7 qRT-PCR 采用 qRT-PCR 检测 TGF- β_1 、

SMAD3, 以及成骨相关因子 RUNX2、骨钙素。选取第 3 代细胞, 于转染后 24 h、2 d 和 7 d, 检测各组细胞 TGF- β_1 、SMAD3、RUNX2 及骨钙素 mRNA 相对表达量。弃用培养基后, PBS 清洗细胞 3 次, 加入 Trizol 试剂, 裂解细胞。反复吹打后, 将裂解液转移至无 RNA 酶的离心管中, 振荡离心 10 min, 取上清液。将上清液转移至另一离心管中 (无 RNA 酶), 加入氯仿, 反复震荡, 静置 10 min, 11 200 r/min 离心, 待样品分层后取上清, 同时加入等体积异丙醇, 混匀后低温过夜。次日取出, 溶解后离心 10 min, 收集沉淀, 用 75% 乙醇 (DEPC 溶解) 清洗摇匀, 弃上清, 风干, 取 2 μ l 总 RNA 溶解液稀释。引物长度 18 ~ 22 bp, TGF- β_1 、SMAD3、RUNX2、骨钙素扩增片段长度分别为 185、224、233 和 202 bp 以 GAPDH 为内参, 检测各目的基因的 Ct 值, 采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各目的基因的相对表达量, 操作重复 3 次, 内参基因及目的基因引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列 (5' -3')	长度 /bp
TGF- β_1	正向: GCCTGGACACCAACTATTGCTT	185
	反向: AGCTCCACTTGCAGGAGCGCA	
SMAD3	正向: ACAAGGTCCTCACCAGATG	224
	反向: TGGCGATACACCACCTGTTA	
RUNX2	正向: AGCTTCTGTCTGTGCTTCTGG	233
	反向: GGAGTAGAGAGCAAGAGTTT	
骨钙素	正向: CTTTGTGTCCAAGCAGGA	202
	反向: CTGAAAGCCGATGTGGTCAG	
GAPDH	正向: AGCCACATCGCTCAGACAC	232
	反向: TGGACTCCACGACGTACTC	

1.2.8 免疫荧光 采用免疫荧光检测各组 TGF- β_1 、RUNX2 蛋白相对表达量。各组细胞成骨诱导后第 14 天, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 2、3 次, 4% 多聚甲醛固定 1 h, 0.01 mol PBS 浸洗 3 次, 3 min/次。采用 0.1% Triton X-100 透膜作用 15 min, 0.01 mol PBS 浸洗 3 次; 1% BSA-PBS 封闭, 倾去, 滴加稀释后的一抗 (1 : 100), 放入湿盒中 4℃避光过夜。次日拿出, 弃一抗, 0.01 mol PBS 冲洗 3 次, 滴加对应荧光标记二抗 (1% BSA-PBS 以 1 : 100 比例稀释), 37℃孵育 30 min, 弃二抗, PBS 冲洗后用 DAPI 复染细胞核, 染色约 20 min, PBS 冲洗 3 次, 3 min/次。抗淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下观察并拍照记录。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

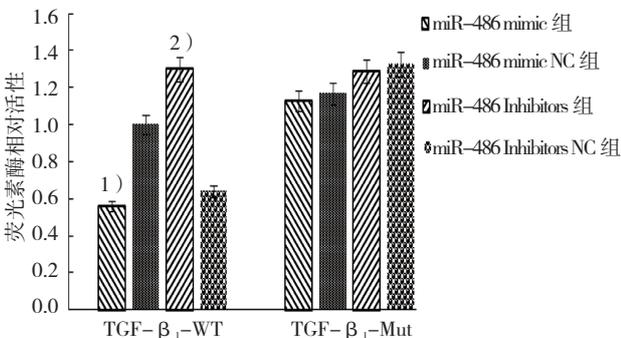
2.1 TGF-β₁ 是 miRNA-486 的直接靶基因

荧光素酶活性检测结果显示, miR-486 mimic、miR-486 mimic NC 组、miR-486 mimic 组及 miR-486 mimic NC 组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 6.052, P = 0.000$)。进一步两两比较经 SNK-*q* 检验, miR-486 mimic+TGF-β₁-WT 共转染组细胞的荧光素酶活性强度低于 miR-486 mimic NC 组 ($P < 0.05$)。进一步转染 miR-486 Inhibitors+TGF-β₁-WT、miR-486 Inhibitors NC+TGF-β₁-WT、miR-486 Inhibitors+TGF-β₁-Mut 和 miR-486 Inhibitors NC+TGF-β₁-Mut 至 293T 细胞, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 5.006, P = 0.003$); miR-486 Inhibitors +TGF-β₁-WT 共转染组细胞的荧光素酶活性强度高于 miR-486 Inhibitors NC+TGF-β₁-WT 共转染组 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 1。

表 2 双荧光素酶报告基因检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β ₁ -WT	TGF-β ₁ -Mut
miR-486 mimic 组	0.56 ± 0.03 ¹⁾	1.13 ± 0.06
miR-486 mimic NC 组	1.00 ± 0.05	1.17 ± 0.07
miR-486 Inhibitors 组	1.30 ± 0.03 ²⁾	1.29 ± 0.09
miR-486 Inhibitors NC 组	0.64 ± 0.02	1.33 ± 0.06

注: 1) 与 miR-486 mimic NC 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-486 Inhibitors NC 组比较, $P < 0.05$

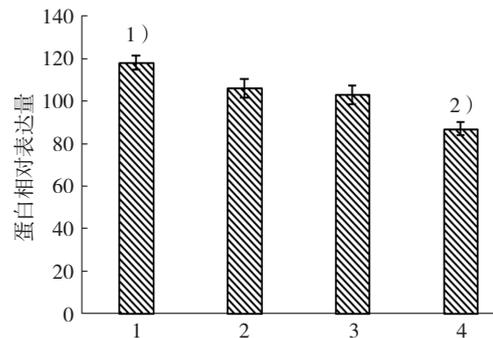
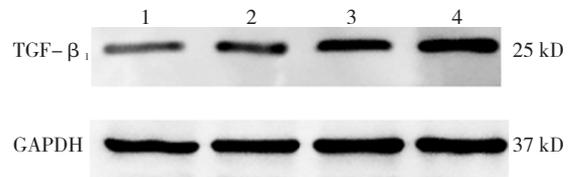


1) 与 miR-486 mimic NC 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-486 Inhibitors NC 组比较, $P < 0.05$

图 1 双荧光素酶报告基因检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 miRNA-486 对内源性 TGF-β₁ 蛋白表达的影响

Western blot 检测显示, miR-486 mimic 组、miR-486 mimic NC 组、miR-486 Inhibitors 组、miR-486 Inhibitors NC 组的 TGF-β₁ 蛋白相对表达量分别为 (87.31 ± 3.11)、(103.34 ± 4.38)、(118.15 ± 3.46) 和 (106.07 ± 4.57), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 4.148, P = 0.028$)。进一步两两比较经 SNK-*q* 检验, miR-486 mimic 组 TGF-β₁ 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); miR-486 Inhibitors 组 TGF-β₁ 蛋白水平较 miR-486 Inhibitors NC 组升高 ($P < 0.05$)。见图 2。



1) miR-486 Inhibitors 组; 2) miR-486 Inhibitors NC 组; 3) miR-486 mimics NC 组; 4) miR-486 mimics 组。1) 与 miR-486 Inhibitors NC 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-486 mimics NC 组比较, $P < 0.05$

图 2 各组 TGF-β₁ 蛋白的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 各组钙盐沉积情况

茜素红染色结果显示, miR-486 转染后, 培养第 14 天时, miR-486 mimic NC 组可见着色小点形成, 少量橘红色沉淀; miR-486 mimic 组可见大量橘红色钙盐沉积; miR-486 Inhibitors NC 组橘红色沉淀较少; miR-486 Inhibitors 组钙盐沉积减少。见图 3。

2.4 各组 ALP 活性比较

miR-486 mimic 组、miR-486 mimic NC 组、miR-486 Inhibitors 组、miR-486 Inhibitors NC 组 ALP 活性分别为 (6.23 ± 0.31)、(3.96 ± 0.22)、(2.07 ± 0.14) 和 (4.15 ± 0.27) mmol/(min · mg), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 7.361, P = 0.000$)。进一步两两比较经 SNK-*q* 检验, miR-486 mimic 组 ALP 活性高于 miR-486 mimic NC 组 ($P < 0.05$); 与 miR-486

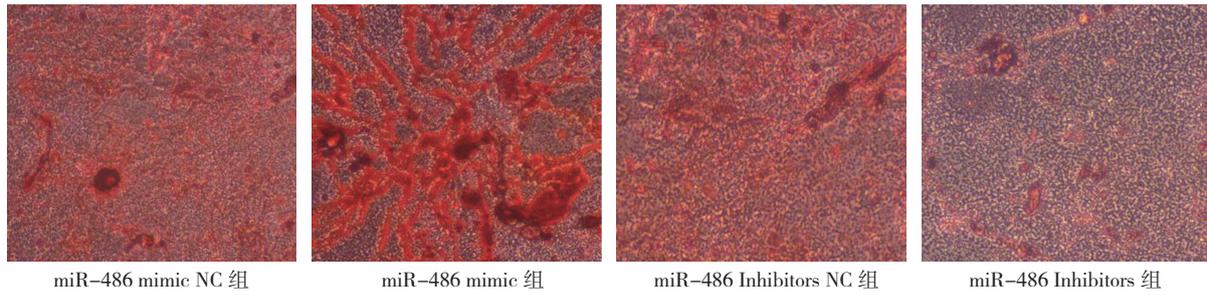
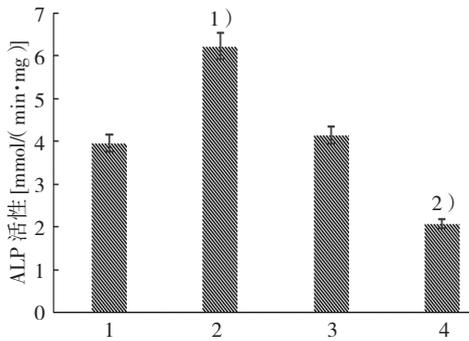


图 3 各组 miR-486 转染后 14 d 钙盐沉积情况 (茜素红染色 × 100)

Inhibitors NC 组比, miR-486 Inhibitors 组 ALP 活性下降 ($P < 0.05$); miR-486 Inhibitors NC 组与 miR-486 mimic NC 组 ALP 活性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); miR-486 mimic 组 ALP 活性高于 miR-486 Inhibitors 组 ($P < 0.05$)。见图 4。



1: miR-486 mimics NC 组; 2: miR-486 mimic 组; 3: miR-486 Inhibitors NC 组; 4: miR-486 Inhibitors 组。1) 与 miR-486 mimic NC 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-486 Inhibitors NC 组比较, $P < 0.05$

图 4 各组成骨诱导 14 d 后 ALP 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

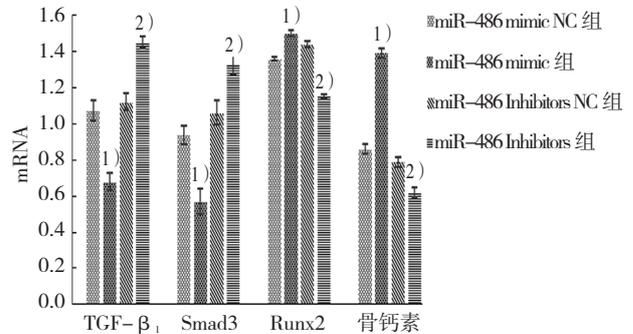
2.5 各组 TGF-β₁、SMAD3、RUNX2 及骨钙素 mRNA 表达水平

miR-486 mimic 组、miR-486 mimic NC 组、miR-486 Inhibitors 组、miR-486 Inhibitors NC 组 TGF-β₁、SMAD3、RUNX2 及骨钙素 mRNA 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 SNK-q 检验, miR-486 mimic 组 TGF-β₁ 和 SMAD3 mRNA 表达水平低于 miR-486 mimic NC 组 ($P < 0.05$), Runx2 和骨钙素 mRNA 高于 miR-486 mimic NC 组 ($P < 0.05$); miR-486 Inhibitors 组 TGF-β₁ 和 SMAD3 mRNA 表达水平高于 miR-486 Inhibitors NC 组 ($P < 0.05$), RUNX2 和骨钙素 mRNA 低于 miR-486 Inhibitorsost NC 组 ($P < 0.05$); miR-486 mimic NC 组与 miR-486 Inhibitors NC 组各 mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3 和图 5。

表 3 各组 TGF-β₁、SMAD3、RUNX2 及骨钙素 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β ₁	SMAD3	RUNX2	骨钙素
miR-486 mimic NC 组	1.07 ± 0.06	0.94 ± 0.05	1.36 ± 0.01	0.86 ± 0.03
miR-486 mimic 组	0.68 ± 0.04 ¹⁾	0.57 ± 0.07 ¹⁾	1.5 ± 0.02 ¹⁾	1.39 ± 0.02 ¹⁾
miR-486 Inhibitors NC 组	1.12 ± 0.05	1.06 ± 0.06	1.44 ± 0.03	0.79 ± 0.03
miR-486 Inhibitors 组	1.45 ± 0.04 ²⁾	1.33 ± 0.05 ²⁾	1.15 ± 0.01 ²⁾	0.62 ± 0.02 ²⁾
F 值	4.327	5.378	3.805	3.524
P 值	0.001	0.000	0.011	0.016

注: 1) 与 miR-486 mimic NC 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-486 Inhibitors NC 组比较, $P < 0.05$



1) 与 miR-486 mimic NC 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-486 Inhibitors NC 组比较, $P < 0.05$

图 5 各组 TGF-β₁、SMAD3、RUNX2 及骨钙素 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.6 各组 TGF-β₁、SMAD3、RUNX2 的蛋白表达

培养 14 d 后经免疫荧光检测, 对比 miR-486 mimic 组、miR-486 mimic NC 组、miR-486 Inhibitors 组、miR-486 Inhibitors NC 组 RUNX2 蛋白表达水平, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 SNK-q 检验, miR-486 mimic 组 Runx2 蛋白表达水平高于 miR-486 mimic NC 组, 荧光增强 ($P < 0.05$);

miR-486 Inhibitors 组较 miR-486 Inhibitors NC 组 荧光强度降低, 仅表达少量 RUNX2 蛋白 ($P < 0.05$)。各组 TGF- β_1 和 SMAD3 蛋白表达水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, miR-486 mimic 组 TGF- β_1 、SMAD3 蛋白表达水平低于 miR-486 mimic NC 组, 荧光强度降低 ($P < 0.05$); 而转染 miR-486 Inhibitors 后, miR-486 Inhibitors 组 TGF- β_1 、SMAD3 荧光强度增加, 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 6、7。

表 4 各组 TGF- β_1 、SMAD3、RUNX2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	RUNX2	SMAD3	TGF- β_1
miR-486 mimic 组	103 \pm 3.72 ¹⁾	62 \pm 4.46 ¹⁾	71 \pm 2.64 ¹⁾
miR-486 mimic NC 组	81 \pm 4.84	78 \pm 5.57	92 \pm 3.25
miR-486 Inhibitors NC 组	76 \pm 4.66	85 \pm 4.38	89 \pm 3.03
miR-486 Inhibitors 组	54 \pm 3.69 ²⁾	109 \pm 4.11 ²⁾	113 \pm 2.91 ²⁾
F 值	7.009	9.713	3.962
P 值	0.000	0.000	0.008

注: 1) 与 miR-486 mimic NC 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-486 Inhibitors NC 组比较, $P < 0.05$

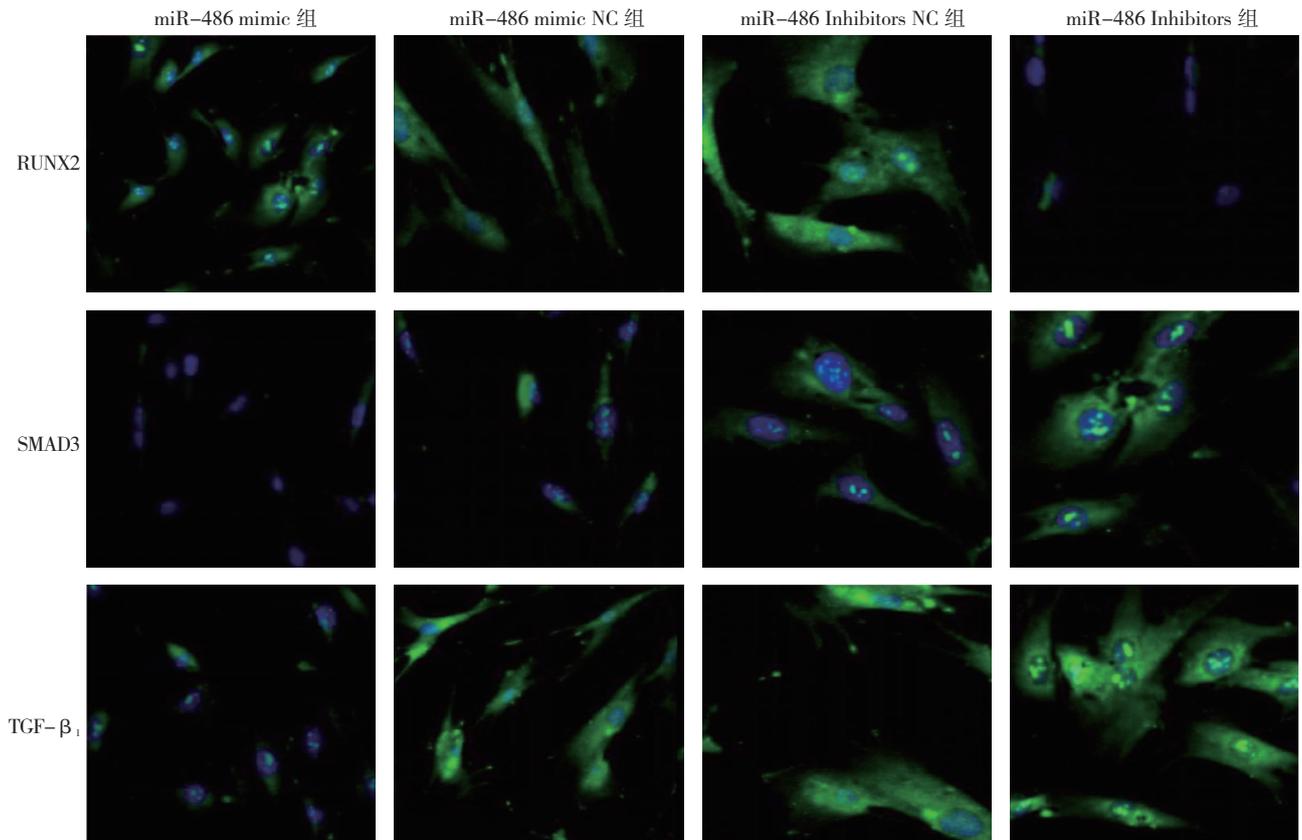
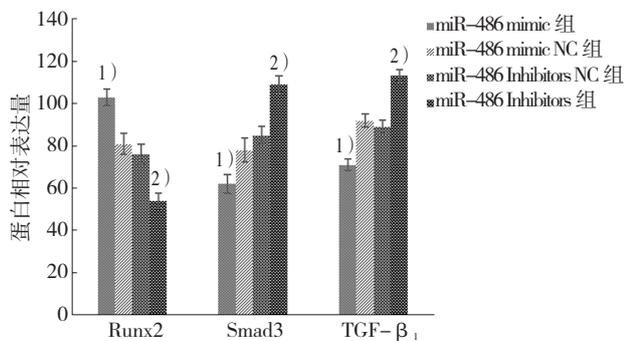


图 6 各组 TGF- β_1 、Smad3、Runx2 蛋白免疫荧光强度



1) 与 miR-486 mimic NC 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 miR-486 Inhibitors NC 组比较, $P < 0.05$

图 7 各组 TGF- β_1 、SMAD3、RUNX2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

CAVD 发病率随年龄增长而升高, 是一种常见的老年慢性疾病, 病情呈缓慢进展趋势。到中晚期时, CAVD 可显著增高心肌梗死发生率、心血管死亡率^[6-7]; 尽管经导管主动脉瓣置换术治疗主动脉瓣狭窄已取得一定成效, 但是在减缓 CAVD 发生、阻止病情进展上仍未达到预想效果。主动脉瓣钙化到主动脉瓣狭窄是一个相对漫长的过程, 可研究的作用因子较多, 病情延缓可依靠持续的药物治疗, 因而药物的早期干预已成为当前临床治疗 CAVD 的目标之一^[8], 而寻找

与 CAVD 相关的靶基因则是研究新型有效药物的方向之一。目前, 已有研究在钙化性主动脉瓣狭窄动物实验中发现某些 microRNA 变化与异位骨化、炎症细胞激活等现象相关^[9]。国外学者 OHUKAINEN 等^[10]通过体外培养的人 THP-1 巨噬细胞, 检测 microRNA 靶预测数据库与瓣膜 microRNA 表达谱结合度, 证实 micro125b、趋化因子 CCL4 的水平含量与 CAVD 关系密切。尽管证实多种 microRNA 具有调控发育、增殖、凋亡、代谢和免疫等多方面的生物学作用^[11], 但其参与调控 CAVD 的作用及可能机制仍属于国内较新的研究。

TGF- β 在炎症、组织修复及胚胎发育等方面有不可或缺的调控作用, 其主要类型分为 TGF- β_1 、TGF- β_2 及 TGF- β_3 , 其中 TGF- β_1 在细胞和组织中含量较为丰富, 其调控的信号通路多为 Smads 通路, 可结合受体 T β RII 使 SMAD2 和 SMAD3 磷酸化, 进而调节靶基因的转录^[12]。在本研究中, 双荧光素酶报告基因系统结果显示, miR-486 mimic+TGF- β_1 -WT 共转染组荧光素酶活性强度降低, 而 miR-486 Inhibitors+TGF- β_1 -WT 共转染组细胞的荧光素酶活性强度升高, 对照组间无差异, 这提示 TGF- β_1 可能是 miR-486 的直接靶基因。笔者采用 Western blot 检测 miR-486 mimic、miR-486 Inhibitors 转染后, 钙化性 VICs 细胞中 TGF- β_1 的表达差异, 结果提示与各对照组相比, miR-486 mimic 组 TGF- β_1 较低, miR-486 Inhibitors 组则相反。以上结果进一步证明 TGF- β_1 可能是 miR-486 的靶基因, miR-486 的某些作用与 TGF- β_1 存在密切联系。学者 MARTÍNEZ-MICHAEL 等^[13]认为, miR-486 与 miR-718 在主动脉瓣疾病的发生中扮演重要角色, 其靶基因可能是 TGF- β_1 、RUNX2, 与本研究结论一致。

茜素红染色可显示成骨细胞培养中矿化结节的数量、大小及形态, 实验中观察到的深红色带色化合物即为茜素红与钙结合而成的显色物质, 常用于判断体外诱导细胞向成骨细胞分化程度的高低及成骨活性的大小^[14]。在本实验中, 对钙化培养 14 d 后的各组细胞进行茜素红染色, 结果显示, miR-486 mimic 组可见大量橘红色钙盐沉积; miR-486 Inhibitors 组钙盐沉积减少, 提示 miR-486 可能具有促使 VICs 细胞成骨分化的作用, 可加速细胞钙化。碱性磷酸酶作为成骨细胞和骨组织的标志物, 在主动脉钙化瓣膜及体外培养细胞成骨分化后, 其表达增强, 含量升高。在 ALP 实验中, 可发现转染 miR-486 mimic 后细胞 ALP 活性增

加, 而 miR-486 Inhibitors 转染后却降低, 此现象提示, miR-486 能增强 VICs 细胞中 ALP 的活性, 即能促进 VICs 细胞钙化。

RUNX2 是骨发生过程中调节间充质干细胞成骨分化至成熟的重要转录因子之一, 亦是成骨细胞特异转录因子, 在大部分 CAVD 患者细胞中呈高表达状态, 常作为骨代谢状态的一种检测指标^[15]。SMAD3 作为 TGF- β_1 的下游因子, 联合 TGF- β_1 形成 TGF- β_1 -SMAD3 信号通路可介导多种生理反应, 作用广泛。本研究采用 qRT-PCR 和免疫荧光检测各组成骨相关因子及可能信号通路中基因的表达含量。结果提示, TGF- β_1 、SMAD3 mRNA 和蛋白水平在 miR-486 mimic 组降低, 在 miR-486 Inhibitors 组中升高, 对照组无差异; miR-486 mimic 组 RUNX2、骨钙素 mRNA 水平较高, miR-486 Inhibitors 组降低, 且 RUNX2 蛋白在 miR-486 mimic 组表达较高; 上述现象均提示 miR-486 能下调 TGF- β_1 的表达, 可能通过 TGF- β_1 -SMAD3 信号转导, 促进 RUNX2、骨钙素的表达和活性, 诱导间质细胞向成骨细胞分化, 发生异位骨化。

本研究尚有不足, TGF- β_1 介导的信号通路较复杂, 未能进行深入讨论; 成骨分化相关因子较多, 本研究纳入较局限。笔者将在以后的研究中, 增加实验类型与难度, 进一步探讨 TGF- β_1 下游因子在 CAVD 进展中的作用, 纳入更多成骨分化相关因子, 以证实该结论。

综上所述, 本研究通过转染 miR-486 模拟物及抑制剂, 参照各对照组, 分析其对 VICs 细胞成骨分化的影响及可能的作用机制, 证实 miR-486 的靶基因可能为 TGF- β_1 , 其可促进 VICs 细胞成骨分化。

参 考 文 献

- [1] 奚望, 李伟, 殷亮, 等. 钙化性主动脉瓣疾病发病机制及临床诊治研究进展 [J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(3): 309-314.
- [2] 李宁, 刘晓红, 龚德军, 等. 钙化性主动脉瓣疾病动物模型研究进展 [J]. 国际心血管病杂志, 2017, 44(2): 11-13.
- [3] 王银堂, 宋卫华. 钙化性主动脉瓣疾病中瓣膜间质细胞向成骨样表型再分化的调节机制 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2015(3): 1361-1364.
- [4] GUAUQUEOLARTE S, MESSIKAZEITOUN D, DROIT A, et al. Calcium signaling pathway genes RUNX2 and CACNA1C are associated with calcific aortic valve disease[J]. Circulation Cardiovascular Genetics, 2015, 8(6): 812.
- [5] HEATH J M, FERNANDEZ E J, KHAMBOUNEHEUANG L, et al. Mechanosensitive microRNA-181b regulates aortic valve endothelial matrix degradation by targeting TIMP3[J]. Cardiovasc

- Eng Technol, 2017, DOI: 10.1007/s13239-017-0296-z.
- [6] HALPER B, HOFMANN M, OESEN S, et al. Influence of age and physical fitness on miRNA-21, TGF- β and its receptors in leukocytes of healthy women[J]. Exercise Immunology Review, 2015, 21(1): 154-163.
- [7] KAMSTRUP P R, HUNG M Y, WITZTUM J L, et al. Oxidized phospholipids and risk of calcific aortic valve disease: the copenhagen general population study[J]. Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology, 2017, 37(8): 1570-1578.
- [8] 王刚, 解寒冰. microRNA-221 在结直肠癌中的表达及其对癌细胞迁移的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(4): 58-63.
- [9] RANGANATHAN K, LODER S, AGARWAL S, et al. Heterotopic ossification: basic-science principles and clinical correlates[J]. Journal of Bone Joint Surgery American Volume, 2015, 97(13): 1101-1111.
- [10] OHUKAINEN P, SYVÄRANTA S, NÄPÄNKANGAS J, et al. MicroRNA-125b and chemokine CCL4 expression are associated with calcific aortic valve disease[J]. Annals of Medicine, 2015, 47(5): 423-429.
- [11] OUIOMET M, EDIRIWEERA H N, GUNDRU U M, et al. MicroRNA-33-dependent regulation of macrophage metabolism directs immune cell polarization in atherosclerosis[J]. Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(12): 4334.
- [12] 黄进, 张晨, 詹菲, 等. 黄芪多糖对肝纤维化大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015(6): 2184-2186.
- [13] MARTÍNEZ-MICHAEL N, BELTRÁN-DEBÓN R, BAIGES I, et al. Specific circulating microRNA signature of bicuspid aortic valve disease[J]. Journal of Translational Medicine, 2017, 15(1): 76.
- [14] 郝松, 孟越, 李威, 等. 甲状旁腺素非 PLC 依赖 PKC 通路激活增强成骨细胞 CITED1 表达 [J]. 南方医科大学学报, 2015(4): 486-491.
- [15] 梁广胜, 陈伟才, 殷婷婷, 等. 淫羊藿总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程 BMP-2/RunX2/OSX 通路的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(5): 614-618.

(童颖丹 编辑)