

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.08.006
文章编号: 1005-8982 (2022) 08-0028-05

实验研究·论著

MicroRNA-183对急性主动脉夹层细胞外基质重塑的作用及其机制研究*

韦耀东, 袁敏, 魏梦瑶, 刘岳恒, 于洋, 蒋璇, 赵晔, 师恩祎, 谷天祥

(中国医科大学附属第一医院 心脏外科, 辽宁 沈阳 110000)

摘要: 目的 探讨microRNA-183(miR-183)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在急性主动脉夹层(AAD)中的表达水平及其参与调节平滑肌细胞细胞外基质(ECM)的机制。**方法** 收集20例确诊为AAD的组织标本作为AAD组, 20例无主动脉病变的冠状动脉粥样硬化性心脏病患者的组织标本作为NC组, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和Western blotting检测miR-183、MMP-9蛋白相对表达量。将人主动脉平滑肌细胞(HASMC)分为3组: Mimic组、Inhibitor组和对照组; Mimic组用miRNA-183 mimic转染HASMC; Inhibitor组用miRNA-183 inhibitor转染HASMC, 对照组未做处理。采用qRT-PCR和Western blotting检测miR-183、MMP-9 mRNA、MMP-9蛋白及其底物弹性蛋白(Elastin)的表达。**结果** AAD组miR-183相对表达量低于NC组($P < 0.05$), 而MMP-9蛋白相对表达量高于NC组($P < 0.05$)。与对照组比较, Mimic组miR-183、Elastin升高($P < 0.05$), MMP-9 mRNA和蛋白降低($P < 0.05$); Inhibitor组miR-183、Elastin降低($P < 0.05$), MMP-9 mRNA和蛋白升高($P < 0.05$)。**结论** miR-183可能通过调控平滑肌细胞中MMP-9的表达, 参与平滑肌细胞ECM的重塑过程, 促进AAD的发生、发展。

关键词: 急性主动脉夹层; microRNA-183; 基质金属蛋白酶-9; 细胞外基质

中图分类号: R654.3

文献标识码: A

The role of microRNA-183 in regulating extracellular matrix remodeling in the setting of acute aortic dissection and its mechanism*

Yao-dong Wei, Min Yuan, Meng-yao Wei, Yue-heng Liu, Yang Yu, Xuan Jiang,

Ye Zhao, En-yi Shi, Tian-xiang Gu

(Department of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110000, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of microRNA-183 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in acute aortic dissection (AAD) and the mechanisms underlying their regulation of extracellular matrix of smooth muscle cells. **Methods** The tissue samples of 20 patients with AAD and 20 patients with coronary heart disease without the involvement of aorta were collected and set as AAD group and NC group, respectively. The relative expressions of miR-183 and MMP-9 in these samples were detected. The human aortic smooth muscle cells (HASMC) were divided into mimic group, inhibitor group and control group, where the cells were transfected with miRNA-183 mimics, miRNA-183 inhibitors or untreated. The expressions of miRNA-183, MMP-9 mRNA, MMP-9 protein, and its substrate elastin were detected. **Results** The relative expression of miRNA-183 in AAD group was

收稿日期: 2021-11-18

* 基金项目: 国家重点研发计划(No: 2017YFC1308000)

[通信作者] 谷天祥, E-mail: emugtx@sina.com

lower than that in NC group ($P < 0.05$), while the relative expression of MMP-9 protein in AAD group was higher than that in NC group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of microRNA-183 and elastin were increased, but the mRNA and protein expressions of MMP-9 were decreased in mimic group ($P < 0.05$). In contrast, the expressions of microRNA-183 and elastin were decreased, but the mRNA and protein expressions of MMP-9 were increased in inhibitor group relative to those in control group ($P < 0.05$). **Conclusions** MicroRNA-183 may participate in the extracellular matrix remodeling by regulating the expression of MMP-9 in smooth muscle cells, thereby promoting the development of acute aortic dissection.

Keywords: acute aortic dissection; microRNA-183; matrix metalloproteinase-9; extracellular matrix

急性主动脉夹层(acute aortic dissection, AAD)是一种急性心血管疾病,发病机制与主动脉中膜细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解有关。有研究报告,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)通过调节ECM重塑,参与胸主动脉瘤或胸主动脉夹层的发病,其中MMP-9作为MMPs家族的一员,具有很强的降解弹性蛋白和胶原蛋白的能力,可导致主动脉中层的弹性蛋白和胶原蛋白大量崩解,诱导平滑肌细胞凋亡,从而促进主动脉夹层的形成^[1-2]。MicroRNA(miRNAs)的异常表达与多种心血管疾病的发展、发展有关^[3],引起人们广泛关注。在肿瘤中,细胞的增殖、侵袭、转移与MMP-9在ECM重塑和蛋白水解中的作用密不可分^[4],而miR-183能够通过靶向调控MMP-9的表达,抑制细胞的增殖、侵袭、转移^[5-6]。目前miR-183在AAD中的表达及作用机制尚不清楚,本研究旨在探讨miR-183和MMP-9在AAD中的表达及其作用机制,以及其参与调节平滑肌细胞ECM的作用机制。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取2017年8月—2018年8月在中国医科大学附属第一医院就诊的AAD患者。纳入标准:①经影像学诊断为AAD;②签字接受主动脉手术治疗的患者;③临床资料完整。排除标准:①马方综合征;②大动脉炎;③梅毒性主动脉夹层;④主动脉粥样硬化。根据纳入和排除标准,共纳入20例AAD患者作为AAD组,其中男性14例,女性6例;年龄32~69岁,平均(52.2±10.6)岁;选取20例同期本院无主动脉病变的冠状动脉粥样硬化性心脏病患者为NC组,其中男性12例,女性8例;年龄33~65岁,平均(54.8±9.0)岁。AAD组标本取自升主动脉段破口周

围的组织,NC组标本取自在升主动脉处打孔的废弃组织,组织离体后,立即置于液氮中速冻,置入-80℃冰箱冷冻保存备检。本研究经医院医学伦理委员会批准(No: AF-SOP-07-1.1-01)。

1.2 主要试剂与仪器

人主动脉平滑肌细胞(HASMC)(美国ATCC公司),引物、miRNA-183 mimic、miRNA-183 inhibitor及RNAifectin™ Transfection Reagent(加拿大ABM公司),RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),兔抗人MMP-9、Elastin抗体(英国Abcom公司)。ABI 7500实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(美国ABI公司)。

1.3 HASMC细胞培养与转染

将细胞快速解冻复苏,培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,置于37%、5%二氧化碳培养箱中。取增殖状态良好的细胞进行消化、离心、计数,按 1×10^5 个/孔的密度种植于6孔板中,待细胞融合达70%~80%,按照RNAifectin™ Transfection Reagent说明书实验步骤用miRNA-183 mimic、miRNA-183 inhibitor对HASMC进行转染,分别作为Mimic组、Inhibitor组,同时设置空白作为对照组,每组至少3孔。转染后置于培养箱内6h,更换培养基后继续培养48h,收集细胞用于下一步实验。

1.4 qRT-PCR检测miRNA-183、MMP-9 mRNA的表达

采用TRIzol法提取组织及细胞中总RNA,检测RNA浓度及纯度,按照说明书进行逆转录,按比例加入Master Mix、正反向引物、RNAase-free水,共20 μL,在qRT-PCR仪上反应,反应条件:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火34 s,共40个循

环, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算组织 miRNA-183 相对表达量, 以及细胞 miRNA-183、MMP-9 mRNA 相对表达量。引物序列由加拿大 ABM 公司提供, 具体序列未告知。

1.5 Western blotting 检测 MMP-9、Elastin 蛋白的表达

使用 RIPA 裂解液提取组织和细胞中总蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度, 配制 SDS-PAGE 凝胶, 每个孔道加入等量蛋白, 电泳分离, 标准湿式转膜, 用 PVDF 膜封闭于含 5% 脱脂牛奶中, 水平摇床上室温封闭 1.5 ~ 2.0 h, 一抗 4℃ 孵育过夜 (MMP-9 稀释比例 1:3 000, Elastin 稀释比例 1:300), 二抗室温孵育 2 h, 使用 ECL 发光液在暗室中发光显色。Image J 分析条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 以各目的蛋白与内参蛋白的比值作为组织中 MMP-9 蛋白, 以及细胞中 MMP-9、Elastin 蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 25.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或方差分析; 进一步两两比较用 LSD- t 检验; 计数资料以构成比 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

AAD 组与 NC 组年龄、性别构成比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。见表 1。

表 1 两组一般资料比较 ($n=20$)

组别	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	男/女/例
AAD 组	52.2 \pm 10.6	14/6
NC 组	54.8 \pm 9.0	12/8
t/χ^2 值	0.832	0.440
P 值	0.411	0.507

2.2 两组 miRNA-183、MMP-9 蛋白相对表达量比较

两组 miRNA-183、MMP-9 蛋白相对表达量比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), AAD 组 miRNA-183 相对表达量低于 NC 组, 而 MMP-9 蛋白相对表达量高于 NC 组。见表 2 和图 1。

表 2 两组 miRNA-183、MMP-9 蛋白相对表达量比较 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	miRNA-183	MMP-9 蛋白
AAD 组	0.55 \pm 0.21	0.97 \pm 0.04
NC 组	1.01 \pm 0.15	0.64 \pm 0.13
t 值	-5.668	4.728
P 值	0.000	0.013

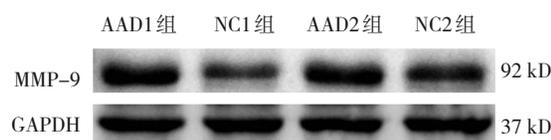


图 1 各组 MMP-9 蛋白的表达

2.3 转染后各组 miRNA-183、MMP-9 mRNA 和蛋白、Elastin 相对表达量比较

对细胞进行转染后, Mimic 组、Inhibitor 组、对照组 miRNA-183、MMP-9 mRNA 和蛋白、Elastin 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与对照组比较, Mimic 组 miRNA-183、Elastin 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$), MMP-9 mRNA 和蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); Inhibitor 组 miRNA-183、Elastin 相对表达量降低 ($P < 0.05$), MMP-9 mRNA 和蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 2。

表 3 转染后各组 miRNA-183、MMP-9 mRNA 和蛋白、Elastin 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miRNA-183	MMP-9 mRNA	MMP-9 蛋白	Elastin 蛋白
Mimic 组	1.59 \pm 0.19	0.62 \pm 0.15	0.32 \pm 0.03	1.22 \pm 0.11
Inhibitor 组	0.82 \pm 0.15	1.53 \pm 0.17	1.19 \pm 0.1	0.31 \pm 0.06
对照组	1.01 \pm 0.07	1.01 \pm 0.13	0.69 \pm 0.02	0.79 \pm 0.04
F 值	33.649	49.109	139.958	110.194
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

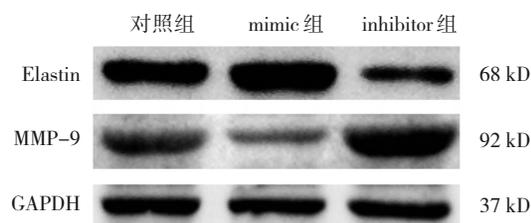


图 2 过表达或抑制 miR-183 对 MMP-9、Elastin 蛋白表达的影响

3 讨论

AAD 是一种严重威胁人类生命的心血管疾病, 病情危急凶险, 发病急骤、进展迅速、病死率高, 每年发病率为 4/10 万 ~ 7/10 万, 且逐年上升^[7-8]。据文献报道, 未经治疗的 Stanford A 型 AAD 患者发病早期的病死率高达 1% ~ 2%/h, 48 h 内的病死率约为 50%^[9]。近 20 年来, 随着影像学诊断技术、外科治疗技术和血管内治疗技术的进步, A 型 AAD 患者的总病死率有所下降, 且 A 型和 B 型 AAD 患者的手术病死率显著下降^[10]。目前对 AAD 的早期诊断、鉴别诊断、风险分层及预后评估都有其局限性。因此, 积极探索 AAD 的发病机制, 对预测高发人群, 寻找干预治疗靶点具有重要价值。

散发性 AAD 的病理特征包括 ECM 的改变和平滑肌细胞的丢失^[11-12], 其中 ECM 的改变主要是胶原蛋白和弹性蛋白大量降解及表达下调^[13]。MMPs 是一种锌依赖性内源性蛋白酶家族, 在 ECM 成分蛋白的重塑和降解中发挥多种作用。大多数蛋白水解酶无法降解胶原蛋白和弹性蛋白, 而 MMPs 对胶原蛋白和弹性蛋白具有极强的降解能力^[14]。MMP-9 是一种 IV 型胶原蛋白酶, 能够降解多种胶原蛋白, 对弹性蛋白同样具有很强的降解能力^[15]。有研究表明, 在胸主动脉夹层患者的主动脉壁中, MMP-9 蛋白主要定位于组织病变严重的区域^[16], 这与其降解胶原蛋白和弹性蛋白的能力有关。本研究结果表明, MMP-9 蛋白明显高表达, 且体外实验中, Elastin 随着 MMP-9 表达增加或减少而呈现相反趋势, 这表明在平滑肌细胞中, MMP-9 能够促进弹性蛋白水解, 参与 ECM 重塑过程。

miRNAs 是由 19 ~ 25 个核苷酸组成的小分子单链非编码 RNA, 具有高度保守性, 以碱基互补配对的方式与靶基因 mRNAs 的 3'-非编码区特异性结合, 转录后调控靶基因表达, 参与大多数生物过程^[17]。AAD 的发生、发展与 miRNAs 的异常表达有关^[18]。miR-183 在不同的生物中高度保守, 其表达具有组织特异性。有研究报道, 神经胶质瘤中 miR-183 通过靶向 IDH2, 促进低氧诱导转录因子的表达, 进而促进缺氧组织的血管生成^[19], miR-183 可通过上调 IRS1 的表达, 增强人脐带血管内皮细胞活性, 抑制炎症水平, 抵抗细胞损伤^[20]。本研究发现, miR-183 在 AAD 患者主动脉组织中明显低表达, 表明

miR-183 在血管的病理生理过程中发挥了作用。为进一步探讨 miR-183 在 AAD 中可能的分子机制, 本研究用 miR-183 模拟物和抑制物对 HASMC 进行转染, 结果发现 miR-183 与 MMP-9 存在负性关系, 因此笔者推测 miR-183 可能是通过调控 MMP-9 在 AAD 患者体内发挥生物作用。

综上所述, miR-183 在 AAD 患者主动脉组织中低表达, MMP-9 蛋白则高表达, 上调或下调 miR-183 的表达能够在 mRNA 和蛋白水平上影响 MMP-9 的表达, 从而改变 Elastin 的表达水平。miRNA-183 调控平滑肌细胞中 MMP-9 的表达, 参与主动脉中膜 ECM 重塑过程, 为 AAD 发病机制的研究提供新思路。

参考文献:

- [1] SCHLATMANN T J, BECKER A E. Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta. Comparative histopathologic study of significance of medial changes[J]. *Am J Cardiol*, 1977, 39(1): 21-26.
- [2] 于长江, 方妙弦, 李欣, 等. 主动脉夹层致病基因及分子机制的研究进展[J]. *岭南心血管病杂志*, 2017, 23(5): 640-642.
- [3] CHEN J, WANG D. microRNAs in cardiovascular development[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012, 52(5): 949-957.
- [4] HUANG H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances[J]. *Sensors (Basel)*, 2018, 18(10): 3249.
- [5] FAN D, WANG Y, QI P, et al. MicroRNA-183 functions as the tumor suppressor via inhibiting cellular invasion and metastasis by targeting MMP-9 in cervical cancer[J]. *Gynecologic Oncology*, 2016, 141(1): 166-174.
- [6] RUAN H, LIANG X, ZHAO W, et al. The effects of microRNA-183 promotes cell proliferation and invasion by targeting MMP-9 in endometrial cancer[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 89: 812-818.
- [7] HOWARD D P J, BANERJEE A, FAIRHEAD J F, et al. Population-based study of incidence and outcome of acute aortic dissection and premorbid risk factor control: 10-year results from the oxford vascular study[J]. *Circulation*, 2013, 127(20): 2031-2037.
- [8] MCCLURE R S, BROGLY S B, LAJKOSZ K, et al. Epidemiology and management of thoracic aortic dissections and thoracic aortic aneurysms in Ontario, Canada: A population-based study[J]. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2018, 155(6): 2254-2264.
- [9] HIRST A J, JOHNS V J, KIME S J. Dissecting aneurysm of the

- aorta: a review of 505 cases[J]. *Medicine (Baltimore)*, 1958, 37(3): 217-279.
- [10] EVANGELISTA A, ISSELBACHER E M, BOSSONE E, et al. Insights from the international registry of acute aortic dissection[J]. *Circulation*, 2018, 137(17): 1846-1860.
- [11] QUINTANA R A, TAYLOR W R. Cellular mechanisms of aortic aneurysm formation[J]. *Circulation Research*, 2019, 124(4): 607-618.
- [12] GUO D C, PAPKE C L, HE R, et al. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 1085(1): 339-352.
- [13] TANG P C Y, COADY M A, LOVOULOS C, et al. Hyperplastic cellular remodeling of the media in ascending thoracic aortic aneurysms[J]. *Circulation*, 2005, 112(8): 1098-1105.
- [14] van DOREN S R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin[J]. *Matrix Biology*, 2015, 44-46: 224-231.
- [15] RABKIN S W. The role matrix metalloproteinases in the production of aortic aneurysm[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 239-265.
- [16] NAGASAWA A, YOSHIMURA K, SUZUKI R, et al. Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms[J]. *J Surg Res*, 2013, 183(1): 472-477.
- [17] BARTEL D P. MicroRNAs[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [18] MILEWICZ D M. MicroRNAs, fibrotic remodeling, and aortic aneurysms[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(2): 490-493.
- [19] TANAKA H, SASAYAMA T, TANAKA K, et al. MicroRNA-183 upregulates HIF-1alpha by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells[J]. *J Neurooncol*, 2013, 111(3): 273-283.
- [20] ZHANG Y, ZHAN Y, LIU D, et al. Inhibition of microRNA-183 expression resists human umbilical vascular endothelial cells injury by upregulating expression of IRS1[J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 612-621.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 韦耀东, 袁敏, 魏梦瑶, 等. MicroRNA-183 对急性主动脉夹层细胞外基质重塑的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(8): 28-32.

Cite this article as: WEI Y D, YUAN M, WEI M Y, et al. The role of microRNA-183 in regulating extracellular matrix remodeling in the setting of acute aortic dissection and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(8): 28-32.