



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.12.012
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.12.012
Chinese Journal of General Surgery, 2022, 31(12):1644-1652.

· 基础研究 ·

miR-27b-3p对主动脉血管平滑肌细胞和单核细胞功能的影响及机制研究

肖远扬, 李良学

(武汉科技大学附属普仁医院 血管外科, 湖北 武汉 430081)

摘要

背景与目的: 大数据基因芯片数据分析发现, 在腹主动脉瘤(AAA)组织与患者血清中miR-27b-3p表达显著上调。然而, miR-27b-3p在主动脉血管平滑肌细胞(VSMC)中的功能及作用机制尚不清楚。因此, 本研究探讨miR-27b-3p在VSMC中的功能, 及其对单核巨噬细胞、细胞外基质的影响和作用机制。

方法: 将VSMC转染miR-27b-3p抑制物后, 用CCK-8检测细胞增殖活力, 流式细胞术检测细胞凋亡。将单核巨噬细胞THP-1转染miR-27b-3p抑制物后, 用ELISA法检测炎症因子表达, Western blot检测基质相关蛋白表达水平。用双萤光素酶报告基因实验以及相关功能实验验证miR-27b-3p和PTEN的靶向关系。

结果: miR-27b-3p敲低后, VSMC增殖能力明显增强, 细胞凋亡率明显降低(均 $P<0.05$)。miR-27b-3p敲低后, THP-1中促炎症因子(TNF- α 、IL-12)表达水平、基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达水平明显降低, 而抑炎因子(IL-4、IL-10)表达水平、金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)表达水平明显升高(均 $P<0.05$)。双萤光素酶实验证实miR-27b-3p的靶基因为PTEN。miR-27b-3p过表达的VSMC中PTEN蛋白表达水平明显下调($P<0.05$), 而PTEN过表达的VSMC增殖活力明显增强、凋亡比例明显减少($P<0.05$)。PTEN过表达THP-1的TNF- α 、IL-12表达水平与MMP-9蛋白表达水平下调, 同时IL-4、IL-10浓度与TIMP-1蛋白表达水平上调(均 $P<0.05$)。miR-27b-3p和PTEN同时过表达后, VSMC与THP-1以上指标的变化与对照组差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

结论: miR-27b-3p可通过靶向PTEN参与调节VSMC增殖和凋亡, 抑制单核巨噬细胞的炎症反应和细胞外基质蛋白表达。miR-27b-3p/PTEN分子轴可能在AAA发生和进展过程发挥重要作用。

关键词

主动脉瘤; 腹; 肌, 平滑; 血管; 单核细胞; 炎症反应; 细胞外基质; 微RNAs
中图分类号: R654.3

Effect of miR-27b-3p on the function of aortic vascular smooth muscle cells and monocytes and the mechanism

XIAO Yuanyang, LI Liangxue

(Department of Vascular Surgery, Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract

Background and Aims: Big data gene chip analysis showed that the expression of miR-27b-3p is significantly up-regulated in abdominal aortic aneurysm (AAA) tissue and patients' serum. However, the

基金项目: 湖北省武汉市卫健委课题基金资助项目(WX21D52)。

收稿日期: 2022-07-01; **修订日期:** 2022-11-25。

作者简介: 肖远扬, 武汉科技大学附属普仁医院副主任医师, 主要从事血管外科临床与基础方面的研究。

通信作者: 李良学, Email: 15972160889@139.com

function and action mechanism of miR-27b-3p in aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) remains unclear. Therefore, this study was conducted to investigate the function of miR-27b-3p in VSMCs, as well as its effects on macrophages and the extracellular matrix, and the action mechanism.

Methods: In VSMCs after transfection with miR-27b-3p inhibitor, the cell proliferation activity was detected by CCK-8, and the apoptosis was detected by flow cytometry. In mononuclear macrophage cell line, THP-1 cells after transfection with miR-27b-3p inhibitor, the expressions of inflammatory-associated factors were detected by ELISA, and the expression levels of matrix-related proteins were detected by Western blot. The targeting relationship between miR-27b-3p and PTEN was verified by dual luciferase reporter gene assay and related functional experiments.

Results: In VSMCs after miR-27b-3p knockdown, the proliferative ability was significantly increased, while the apoptotic rate was significantly decreased (both $P < 0.05$). In THP-1 cells after miR-27b-3p knockdown, the expression levels of pro-inflammatory factors (TNF- α , IL-12) and the matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) were significantly decreased, while the expression levels of inflammatory factors (IL-4, IL-10) and metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1) were significantly increased (all $P < 0.05$). Dual-luciferase experiments confirmed that PTEN was a target gene of miR-27b-3p. The expression level of PTEN protein was significantly down-regulated in VSMCs with miR-27b-3p overexpression, while the proliferation was significantly enhanced and the apoptotic rate was significantly decreased in VSMCs with PTEN overexpression (all $P < 0.05$). The expression levels of TNF- α and IL-12 as well as MMP-9 protein were significantly down-regulated, while the levels of IL-4 and IL-10 as well as TIMP-1 protein were significantly up-regulated in THP-1 cells with PTEN overexpression (all $P < 0.05$). In VSMCs and THP-1 cells with simultaneous miR-27b-3p and PTEN expression, the changes in the above variables showed no significant differences from those in the control group (all $P > 0.05$).

Conclusion: miR-27b-3p can participate in regulating VSMCs cell proliferation and apoptosis through targeting PTEN, and thereby inhibit the inflammatory response and extracellular matrix protein expression of the mononuclear macrophage cells. The miR-27b-3p/PTEN molecular axis may play an important role in the occurrence and development of AAA.

Key words

Aortic Aneurysm, Abdominal; Muscle, Smooth, Vascular; Monocytes; Inflammation; Extracellular Matrix; MicroRNAs

CLC number: R654.3

腹主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) 是常见的主动脉慢性炎症扩张性疾病, 发病率和病死率高, 未破裂的AAA无明显特异性症状, 而破裂的AAA是影响中老年人健康的重要因素^[1-2]。AAA发病机制与主动脉血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖活性降低、凋亡增加、巨噬细胞浸润引起炎症反应和细胞外基质代谢异常密切相关^[3]。尽管如此, VSMC增殖和凋亡及主动脉局部炎症浸润的复杂分子调控机制尚未完全阐明^[4]。AAA病变组织中异常表达的微小RNA (miRNA) 与疾病发生和进展密切相关^[5-6]。如, miR-194在人和小鼠腹主动脉瘤模型中低表

达, 并通过靶向组蛋白去甲基化酶抑制平滑肌细胞凋亡和细胞外基质降解, 对主动脉瘤发挥保护作用^[7-8]。miR-27b-3p是最新鉴定的miRNA分子, 文献^[9]报道miR-27b-3p在动脉粥样硬化斑块中表达增加, 且可能参与动脉粥样硬化中巨噬细胞和平滑肌细胞增殖和凋亡。通过大数据基因芯片数据^[10]分析发现, 在AAA组织和血清中miR-27b-3p表达显著上调。尽管如此, miR-27b-3p在主动脉VSMC中的功能及机制尚不清楚。基于前人研究基础, 本研究旨在体外VSMC中探讨miR-27b-3p的功能、对单核巨噬细胞及细胞外基质的影响和作用机制, 为AAA的治疗提供潜在靶点和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

人主动脉 VSMC 和人单核巨噬细胞 THP-1 购自中国科学院典型培养物细胞库, 细胞培养基 RPMI-1640 购自美国 Thermo Fisher 公司。细胞培养基 DMEM 购于美国 Gibco 公司。pcDNA3.1-PTEN 质粒和阴性对照质粒、miR-27b-3p 抑制物 (miR-27b-3p inhibitor) 和模拟物 (miR-27b-3p mimics) 购自上海吉玛生物公司。TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。Lipofectamine™ 3000 和反转录试剂盒购于日本 TaKaRa 公司, ELISA 试剂盒购自美国 Sigma Aldrich 公司。磷酸酶及张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homologue, PTEN)、GAPDH、基质金属蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP-1) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 抗体均由美国 Cell Signaling Technology 公司购买。上海碧云天生物技术有限公司提供 BCA 蛋白定量试剂盒、CCK-8 试剂盒。美国 Promega 公司购买双荧光素酶报告基因试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 VSMC 置于 DMEM 培养基中培养, 而 THP-1 置于 RPMI-1640 培养, 均在 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中培养。待细胞生长密度达到 80% 时, 接种到 6 孔板 (2 × 10⁵ 个/孔) 中, 置于培养箱中培养。当细胞单层密度达到 50%~60% 时进行转染。将 VSMC 或 THP-1 分别转染 miR-27b-3p 抑制物、miR-27b-3p 模拟物和 pcDNA3.1-PTEN。转染后放入培养箱培养 48 h, 收集细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞分组 为测定 miR-27b-3p 敲低对 VSMC 增殖、凋亡的影响, 将 VSMC 分别转染 miR-27b-3p 抑制物 (miR-27b-3p 敲低组)、miR-27b-3p 模拟物 (miR-27b-3p 过表达组)、对照序列 (对照组)。为研究 miR-27b-3p 敲低对 THP-1 培养基中炎症因子和细胞基质相关蛋白表达影响, 对 THP-1 转染 miR-27b-3p 抑制物后, 分成 miR-27b-3p 敲低组和对照组。为研究 miR-27b-3p 靶向 PTEN 抑制 VSMC 增殖和诱导凋亡, 将 VSMC 分成对照组、PTEN 过表达组、miR-27b-3p+PTEN 组 (同时上调 miR-27b-3p 和 PTEN)。

1.2.3 qRT-PCR 检测 miR-27b-3p 表达水平 收集各

组处理后的细胞, 采用 TRIzol 提取细胞中总 RNA, 并采用 NanoDrop 检测 RNA 浓度。采用一步法反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 严格按照 qPCR 试剂盒说明书检测 miR-27b-3p 表达水平, 以 U6 为内参。miR-27b-3p 上游引物为 5'-CTG GAG TAT GTG CAA CTA TGC-3', 下游引物为 5'-GTG CCG AAG GGT CGG T-3'; U6 上游引物为 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT-3', 下游引物为 5'-ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT C-3'。实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达水平 收集生长良好 VSMC 和 THP-1, 采用 RAPI 裂解液提取细胞中总蛋白, 检测蛋白质浓度。取 40 μg 蛋白, 采用 10% SDS-PAGE 分离蛋白、电转膜法将目的条带转移至 PVDF 膜上, 室温封闭 1 h 后 (5% 脱脂奶粉), 然后分别加入 PTEN 一抗 (1:400)、TIMP1 一抗 (1:300)、MMP-9 一抗 (1:300)、GAPDH 一抗 (1:500), 并孵育过夜 (4 ℃), 加入山羊抗鼠二抗 (1:800) 室温孵育 2 h, ECL 染色, 凝胶成像仪采集图像, 通过 Image J 分析灰度值。所有实验均重复 3 次。

1.2.5 CCK-8 检测 VSMC 增殖活力 将处于对数生长期经 miR-27b-3p 转染的 VSMC 接种于 96 孔板中 (2 × 10⁴ 个/孔), 每孔中加入 100 μL DMEM 培养基, 置于 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中培养, 分别在 4 个时间点 (0、24、48、72、96 h) 于每孔中加入 CCK-8 溶液 10 μL, 继续置于培养箱中孵育 4 h 后, 酶标仪采集每孔光密度 (A450 nm) 值。

1.2.6 流式细胞术检测 VSMC 凋亡情况 将处于对数生长期经 miR-27b-3p 转染的 VSMC 接种于 96 孔板中 (1 × 10⁵ 个/孔) 中, 培养 24 h 后, 将细胞经过胰蛋白酶消化并洗涤重悬于 300 μL PBS 液体中, 分别加入 Annexin V-FITC (10 μL) 和 PI 溶液 (5 μL), 混合均匀后避光孵育 5 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡百分比。

1.2.7 双荧光素酶报告基因验证 miR-27b-3p 和 PTEN 的靶向关系 构建 PTEN 基因 3'UTR, 插入 pGL3-Promoter 质粒载体中, 并命名为 pGL3-PTEN-3'UTR WT, 基因定点突变获得 PTEN 突变型载体, 并命名为 pGL3-PTEN-3'UTR MUT。将 miR-27b-3p 过表达序列和对照序列、PTEN 野生型载体、PTEN 突变型载体共转染于 HEK 293T 细胞中, 常规培养 36 h, 采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。实验重复 3 次。

1.2.8 ELISA检测炎症因子的表达水平 将经转染miR-27b-3p的THP-1培养于RPMI-1640培养基,加入含有50%巨噬细胞培养上清液,继续培养24 h后,采集培养上清液,检测上清液中TNF- α 、IL-12、IL-4和IL-10浓度,严格按照ELISA试剂盒说明书操作,实验重复3次。

1.3 统计学处理

SPSS 22.0软件对所有数据进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-27b-3p敲低对VSMC增殖和凋亡的影响

qRT-PCR结果显示,miR-27b-3p敲低可降低VSMC中miR-27b-3p表达水平(4.33 ± 0.44 vs. 9.25 ± 1.24 , $P < 0.05$),miR-27b-3p过表达可增加VSMC中miR-27b-3p表达水平(15.33 ± 1.44 vs. 9.05 ± 1.08 , $P < 0.05$),提示转染成功,具有较好转染效率(图1A)。CCK-8结果显示,miR-27b-3p敲低后A450 nm值在48、72、96 h 3个时间点高于对照组(均 $P < 0.05$)(图1B),流式细胞术结果显示,miR-27b-3p敲低后VSMC凋亡率降低($2.13 \pm 0.11\%$ vs. $10.58 \pm 0.35\%$, $P < 0.05$)(图1C)。

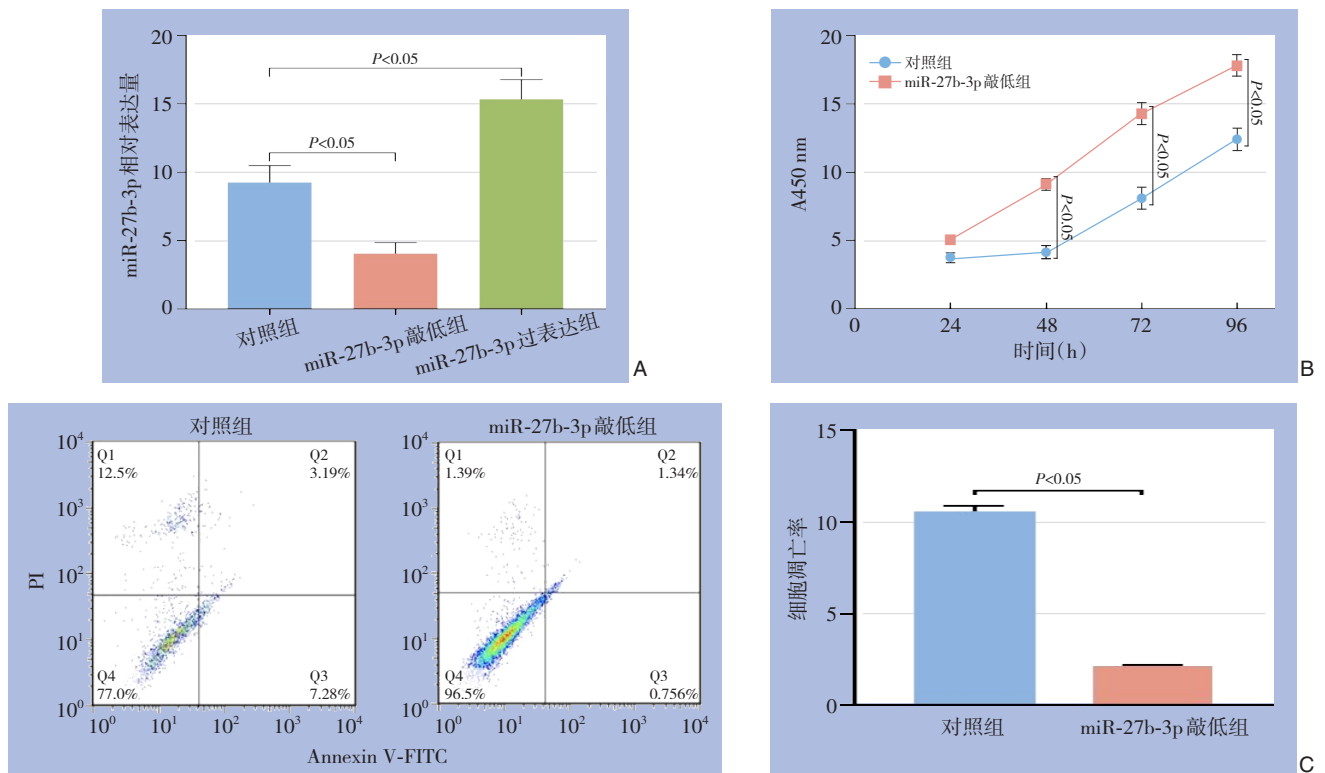


图1 miR-27b-3p敲低对VSMC增殖和凋亡的影响 A: 转染效率测定; B: CCK-8实验; C: 细胞凋亡检测

Figure 1 Effects of miR-27b-3p knockdown on proliferation and apoptosis of VSMCs A: Determination of transfection efficiency; B: CCK-8 assay; C: Apoptosis assay

2.2 miR-27b-3p敲低对THP-1培养基中炎症因子和细胞基质相关蛋白表达影响

miR-27b-3p敲低后,THP-1培养基中促炎因子(TNF- α 、IL-12)表达水平低于对照组,而THP-1培养基中抑炎因子(IL-4、IL-10)表达水平高于对

照组(均 $P < 0.01$)(表1),上述结果提示miR-27b-3p敲低可抑制THP-1相关炎症反应。Western blot结果显示,miR-27b-3p敲低后,THP-1的MMP-9表达水平低于对照组,而TIMP-1表达水平高于对照组(均 $P < 0.01$)(图2)。

表 1 miR-27b-3p 敲低对 THP-1 培养基中炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of miR-27b-3p knockdown on inflammatory factors in THP-1 cell culture medium ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IL-12(pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IL-10(pg/mL)
对照组	120.6 \pm 12.6	129.6 \pm 17.6	90.5 \pm 8.3	120.6 \pm 9.5
miR-27b-3p 敲低组	70.4 \pm 9.3	64.4 \pm 8.3	220.5 \pm 12.6	270.5 \pm 13.1
<i>t</i>	5.55	5.80	14.92	16.04
<i>P</i>	0.005	0.004	0.001	0.000

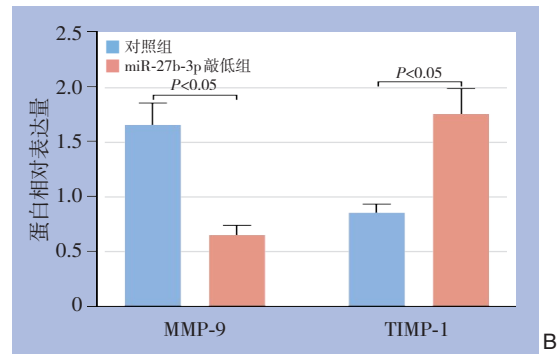
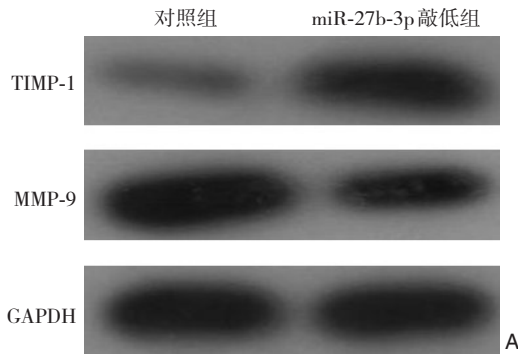


图 2 TPH-1 细胞中细胞基质相关蛋白表达水平检测 A: Western blot 结果; B: 表达量比较

Figure 2 Determination of expression levels of cell matrix-related proteins in TPH-1 cells A: Western blot; B: Comparison of expression levels

2.3 miR-27b-3p 直接靶基因为 PTEN

查阅 TargetScan 数据库发现 PTEN 存在和 miR-27b-3p 结合位点, 是其潜在的靶基因 (图 3A), 双萤光素酶报告基因结果显示, 同对照组相比,

miR-27b-3p 过表达可明显减少野生型 PTEN 质粒萤光素酶活性 ($P < 0.05$), 但对突变型 PTEN 质粒萤光素酶活性几乎无影响 ($P > 0.05$) (图 3B)。

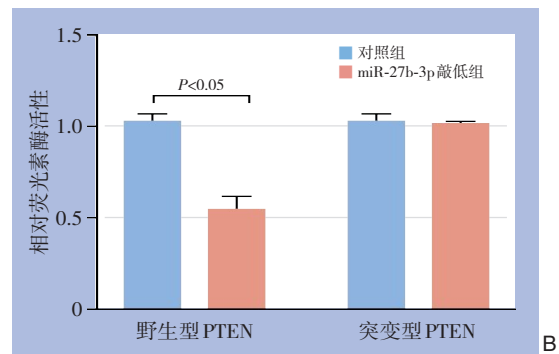
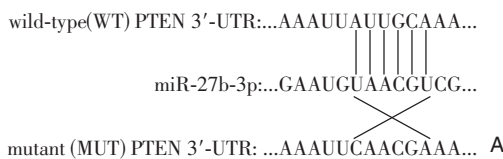


图 3 miR-27b-3p 靶基因分析 A: TargetScan 数据库发现 PTEN 存在和 miR-27b-3p 结合位点; B: 双萤光素酶实验

Figure 3 Analysis of the target gene of miR-27b-3p A: TargetScan database showing the existence of the binding site for PTEN and miR-27b-3p; B: Double luciferase assay

2.4 miR-27b-3p 过表达下调 VSMC 中 PTEN 表达

Western blot 结果显示, miR-27b-3p 过表达可下调 VSMC 中 PTEN 蛋白表达水平 ($P < 0.05$) (图 4)。

2.5 miR-27b-3p 靶向 PTEN 抑制 VSMC 增殖并诱导凋亡

CCK-8 结果显示, PTEN 过表达可显著促进 VSMC 增殖活力 ($P < 0.05$); 拯救实验显示, PTEN 和 miR-27b-3p 同时过表达后可减缓由 PTEN 过表达对 VSMC 增殖的促进作用及对细胞凋亡的抑制作用 ($P < 0.05$) (图 5)。

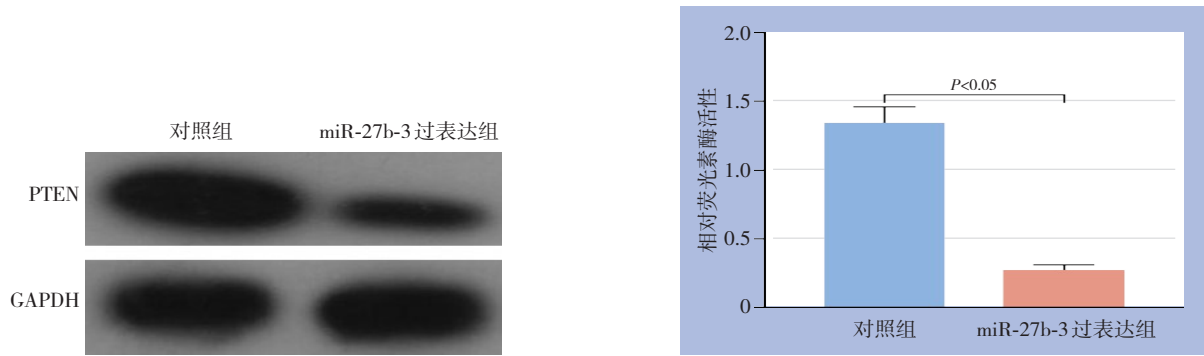


图4 miR-27b-3p过表达对VSMC中PTEN表达的影响
Figure 4 Effect of miR-27b-3p overexpression on PTEN expression in VSMCs

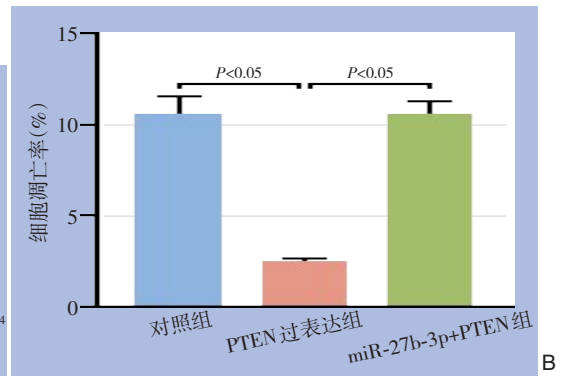
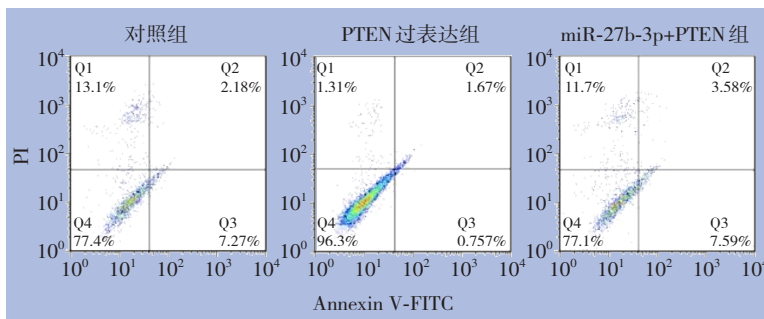
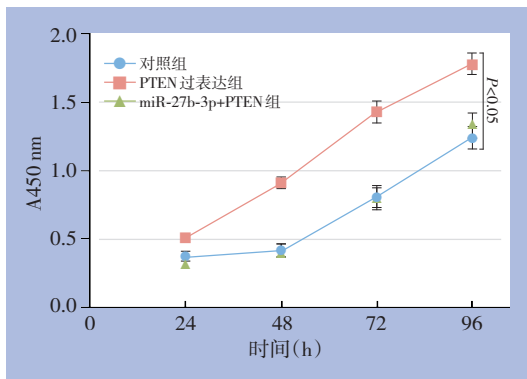


图5 miR-27b-3p与PTEN对VSMC增殖与凋亡的影响 A: CCK-8; B: 细胞凋亡检测

Figure 5 Effects of miR-27b-3p and PTEN on proliferation and apoptosis in VSMCs A: CCK-8; B: Apoptosis assay

2.6 miR-27b-3p靶向PTEN下调THP-1炎症反应和细胞基质蛋白表达

ELISA结果显示, PTEN过表达后, 与对照组相比, THP-1培养基中TNF- α 、IL-12表达水平下调 ($P < 0.05$), 同时IL-4、IL-10浓度上调 ($P < 0.05$); miR-27b-3p和PTEN同时过表达后促炎因子(TNF- α 、IL-12)和抗炎因子(IL-4、IL-10)表达水平与对

照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表2)。Western blot检测显示, PTEN过表达可抑制MMP-9蛋白表达和促进TIMP-1蛋白表达 ($P < 0.05$), miR-27b-3p和PTEN同时过表达后MMP-9蛋白和TIMP-1表达水平与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图6)。

表2 TPH-1细胞培养基中炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of inflammatory factors in TPH-1 cell culture medium ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IL-12(pg/mL)	IL-4(pg/mL)	IL-10(pg/mL)
对照组	118.4 \pm 10.4	120.3 \pm 17.4	90.5 \pm 8.3	120.6 \pm 9.5
PTEN过表达组	60.4 \pm 12.3 ¹⁾	60.8 \pm 8.9 ¹⁾	220.5 \pm 12.6 ¹⁾	210.5 \pm 13.1 ¹⁾
miR-27b-3p+PTEN组	112.9 \pm 11.6	118.4 \pm 17.7	90.5 \pm 8.3	120.6 \pm 9.5

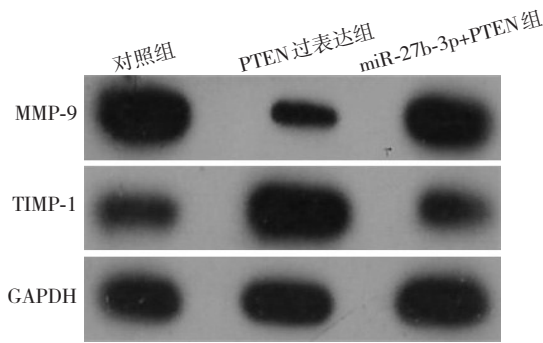
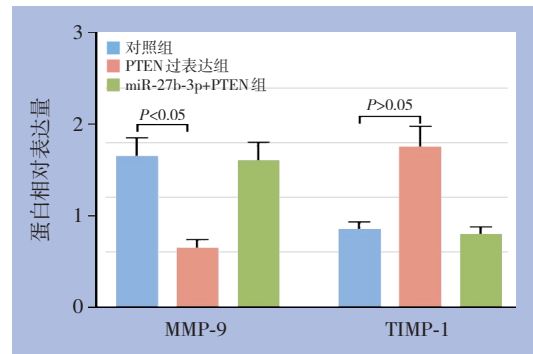
注:1)与对照组比较, $P < 0.05$ Notes:1) $P < 0.05$ vs. control group

图6 细胞基质蛋白表达检测

Figure 6 Determination of cell matrix protein expressions



3 讨论

AAA是一种严重危及中老年人健康的大血管扩张性疾病,患者常缺乏及时治疗导致病死率高,手术和腔内治疗是主要治疗手段^[11-13]。AAA发病机制尚未完全阐明,血流动力学、血管周围脂肪组织、外膜成纤维细胞、血管滋养管重塑、管腔内血栓和巨噬细胞亚型分布异常是其常见发病机制^[14]。近年来研究^[15]显示miRNA参与调控AAA发生、发展过程,可作为AAA潜在的诊断和监测进展的分子标志物。

本研究首先基于文献^[10]报道在AAA病变组织中miR-27b-3p表达水平上调,通过在体外培养的VSMC中敲低miR-27b-3p后发现miR-27b-3p敲低后可增加VSMC增殖,并抑制其凋亡,可发挥抑制和延缓AAA进展作用。miR-27b-3p在心脑血管疾病中发挥重要作用,缺血性休克患者循环中表达水平增加,其高表达来源于损伤的血管内皮细胞和平滑肌细胞,而抑制miR-27b-3p表达后血管内皮细胞凋亡比例降低,可作为缺血性休克炎症和内皮细胞损伤的诊断分子标志物^[16]。在小鼠心肌纤维化模型中miR-27b-3p高表达可促进小鼠心肌细胞纤维化和心肌细胞凋亡^[17]。文献^[18]报道在体外培养的经过不同浓度的血管紧张素II诱导的VSMC中,其miR-199a-5p表达水平显著上调,且下调miR-199a-5p

后,VSMC增殖能力增强,而凋亡比例减少,显示其延缓AAA的发生和进展。最新研究^[7]显示miR-194在小鼠的腹主动脉瘤模型中表达水平显著下调,同时上调miR-194表达后可抑制VSMC增殖和促进凋亡,增加小鼠AAA模型中病变动脉中巨噬细胞数目、加重炎症反应和氧化应激程度,提示其高表达可促进AAA的发生和进展。文献^[19]报道miR-155过表达可抑制VSMC增殖并诱导VSMC凋亡而促进动脉瘤的进展,上述结果均提示miRNA可作为VSMC增殖和凋亡功能的重要调节分子,参与AAA发生和进展。

本研究发现敲低miR-27b-3p表达后,在体外培养THP-1培养基中,促炎因子(TNF- α 、IL-12)表达水平较对照组降低,而抑炎因子(IL-4、IL-10)表达水平较对照组增加,提示在THP-1中敲低miR-27b-3p后可抑制细胞炎症反应。文献^[20]报道AAA发病机制与单核巨噬细胞聚集和慢性炎症反应密切相关,局部慢性炎症反应和氧化应激反应越严重,越易导致动脉壁内血栓形成,越易导致AAA快速进展和破裂。文献^[21]报道miR-146在AAA小鼠模型中高表达,miR-146敲低表达后,THP-1中炎症反应降低,主要表现为促炎因子(TNF- α 、IFN- γ)表达水平降低,而抑炎因子(IL-10)表达水平增加。在小鼠AAA模型^[22]中,miR-155敲低表

达后, THP-1中促炎因子(TNF- α 、IL-6和IL-1 β)显著降低,提示miR-155可能通过抑制单核巨噬细胞炎症反应减轻和延缓血管紧张素II所致的小鼠AAA的形成和进展。本研究通过Western blot实验发现,敲低miR-27b-3p表达后,THP-1表达的MMP9表达水平降低,而TIMP-1表达水平增加,前者在AAA形成和进展中发挥破坏动脉壁细胞外基质和动脉壁弹力纤维作用,进而加速AAA形成,而后者功能正好相反,对AAA发挥保护作用^[23]。

本研究进一步探讨miR-27b-3p调控VSMC和THP-1参与AAA发生和进展机制,生物信息学分析发现PTEN是miR-27b-3p的靶基因,通过双荧光素报告基因实验证实,在VSMC中miR-27b-3p过表达可抑制PTEN表达,上述实验证实miR-27b-3p直接调控PTEN表达。PTEN是常见的抑癌基因,其在多种癌症中表达水平降低^[24]。文献^[25]报道miR-17-5p可促进血管内皮前体细胞增殖,从而加速对动脉瘤血管修复功能,其分子机制是miR-17-5p通过调节PTEN/PI3K/AKT/VEGFA信号通路而实现。文献^[26]报道对过氧化氢诱导的平滑肌细胞损伤,miR-26a可通过激活PTEN/AKT/mTOR信号通路而发挥抑制作用。文献^[27]报道miR-29a-3p可通过靶向调节PTEN而调节AAA发生和进展。

本研究探讨miR-27b-3p靶向PTEN后是否可影响VSMC和THP-1功能。VSMC中过表达PTEN后细胞增殖能力增强、凋亡减少。在THP-1中过表达PTEN后,炎症严重程度减轻、TIMP-1表达增加,而MMP-9表达降低,上述结果均显示PTEN表达增加,可以延缓和抑制AAA发生和进展。尽管如此,当PTEN和miR-27b-3p同时过表达时,PTEN过表达对AAA发生和进展的延缓和抑制作用则可被miR-27b-3p过表达所抵消。上述结果证实miR-27b-3p靶向PTEN后影响VSMC和THP-1功能而参与AAA发生和进展。文献^[28]报道在小鼠动脉瘤模型中miR-126高表达可通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制VSMC增殖并促进凋亡。文献^[29]报道在小鼠腹主动脉瘤模型中,miR-144-3p表达可发挥启动子作用,促进p21基因表达而诱导VSMC凋亡,抑制其增殖活性和迁移能力,促进THP-1炎症作用,从而加速AAA动脉瘤发生和进展。

值得一提的是,由于本研究是基于前人在对组织行基因芯片测序及大数据分析得出miR-27b-3p在AAA组织和血清中miR-27b-3p表达显著上调,故

本研究未在AAA组织及血清中重复检测miR-27b-3p的表达水平,而直接在前人的基础上在VSMC和THP-1中行功能和机制研究,不可避免地存在一定的不足,后期值得进一步在组织标本中验证。另外,miR-27b-3p在动物实验中的作用也值得进一步研究。

综上所述,本研究发现miR-27b-3p可通过靶向PTEN参与调节VSMC和THP-1功能,miR-27b-3p表达抑制或PTEN过表达均可促进VSMC增殖和抑制凋亡、抑制THP-1炎症反应和细胞外基质蛋白表达,可能参与延缓AAA发生和进展。miR-27b-3p/PTEN分子轴可能在AAA发生和进展过程发挥重要作用,可能成为AAA潜在治疗靶点。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Golledge J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(4):225-242. doi: 10.1038/s41569-018-0114-9.
- [2] Golledge J, Moxon JV, Singh TP, et al. Lack of an effective drug therapy for abdominal aortic aneurysm[J]. *J Intern Med*, 2020, 288(1):6-22. doi: 10.1111/joim.12958.
- [3] Riches K, Clark E, Helliwell RJ, et al. Progressive development of aberrant smooth muscle cell phenotype in abdominal aortic aneurysm disease[J]. *J Vasc Res*, 2018, 55(1):35-46. doi: 10.1159/000484088.
- [4] Li ZQ, Kong W. Cellular signaling in abdominal aortic aneurysm[J]. *Cell Signal*, 2020, 70: 109575. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109575.
- [5] Zalewski DP, Ruszel KP, Stepniowski A, et al. miRNA Regulatory Networks Associated with Peripheral Vascular Diseases[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(12):3470. doi: 10.3390/jcm11123470.
- [6] Li T, Wang TL, Yan LR, et al. Identification of potential novel biomarkers for abdominal aortic aneurysm based on comprehensive analysis of circRNA-miRNA-mRNA networks[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6):1468. doi: 10.3892/etm.2021.10903.
- [7] Zhang H, et al. microRNA-194 acts as a suppressor during abdominal aortic aneurysm via inhibition of KDM3A-mediated BNIP3[J]. *Life Sci*, 2021, 277: 119309. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119309.
- [8] Wågsäter D, Ramilo AB, Näsström M, et al. miR-10b promotes aortic aneurysm formation and aortic rupture in angiotensin II-induced ApoE-deficient mice[J]. *Vascul Pharmacol*, 2021, 141: 106927. doi: 10.1016/j.vph.2021.106927.
- [9] Su YL, Guan P, Li D, et al. Intermedin attenuates macrophage

- phagocytosis via regulation of the long noncoding RNA Dnm3os/miR-27b-3p/SLAMF7 axis in a mouse model of atherosclerosis in diabetes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 583:35–42. doi: [10.1016/j.bbrc.2021.10.038](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.038).
- [10] Plana E, Gálvez L, Medina P, et al. Identification of novel microRNA profiles dysregulated in plasma and tissue of abdominal aortic aneurysm patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13):4600. doi: [10.3390/ijms21134600](https://doi.org/10.3390/ijms21134600).
- [11] Quaye KB, Pack N, Wilson-Byrne T, et al. Contemporary management of abdominal aortic aneurysms[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2022, 24(4):431–438. doi: [10.1007/s11886-022-01662-z](https://doi.org/10.1007/s11886-022-01662-z).
- [12] 耿印帅, 李观强, 张喜成. 胸腹主动脉瘤外科治疗现状及进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2021, 30(6): 730–735. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2021.06.014](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2021.06.014).
Geng YS, Li GQ, Zhang XC. Current status and progress of surgical treatment of thoracic-abdominal aortic aneurysm[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2021, 30(6): 730–735. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2021.06.014](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2021.06.014).
- [13] 吴明炜, 熊江. “ENGAGE” 治疗腹主动脉瘤 8 年随访数据解读及展望[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(6):713–716. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.06.002](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.06.002).
Wu MW, Xiong J. “ENGAGE” for abdominal aortic aneurysm: interpretation of 8-year follow-up data and future prospects[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2022, 31(6): 713–716. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.06.002](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.06.002). [万方]
- [14] Gao JP, Guo W. Mechanisms of abdominal aortic aneurysm progression: a review[J]. *Vasc Med*, 2022, 27(1): 88–96. doi: [10.1177/1358863X211021170](https://doi.org/10.1177/1358863X211021170).
- [15] Zalewski DP, Ruszel KP, Stępniewski A, et al. Dysregulation of microRNA modulatory network in abdominal aortic aneurysm[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(6):1974. doi: [10.3390/jcm9061974](https://doi.org/10.3390/jcm9061974).
- [16] Cheng XL, Kan PC, Ma ZL, et al. Exploring the potential value of miR-148b-3p, miR-151b and miR-27b-3p as biomarkers in acute ischemic stroke[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20181033. doi: [10.1042/BSR20181033](https://doi.org/10.1042/BSR20181033).
- [17] Yang ZZ, Xiao Z, Guo HM, et al. Novel role of the clustered miR-23b-3p and miR-27b-3p in enhanced expression of fibrosis-associated genes by targeting TGFBR3 in atrial fibroblasts[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5):3246–3256. doi: [10.1111/jcmm.14211](https://doi.org/10.1111/jcmm.14211).
- [18] Tao WY, Hong YM, He HW, et al. microRNA-199a-5p aggravates angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell senescence by targeting Sirtuin-1 in abdominal aortic aneurysm[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(13):6056–6069. doi: [10.1111/jcmm.16485](https://doi.org/10.1111/jcmm.16485).
- [19] Zhao L, et al. miR-155-5p inhibits the viability of vascular smooth muscle cell via targeting FOS and ZIC3 to promote aneurysm formation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 853:145–152. doi: [10.1016/j.ejphar.2019.03.030](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.030).
- [20] Yuan Z, Lu Y, Wei J, et al. Abdominal aortic aneurysm: roles of inflammatory cells[J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 609161. doi: [10.3389/fimmu.2020.609161](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609161).
- [21] Zhang CL, Wang HH, Yang B. miR-146a regulates inflammation and development in patients with abdominal aortic aneurysms by targeting CARD10[J]. *Int Angiol*, 2020, 39(4): 314–322. doi: [10.23736/S0392-9590.20.04283-2](https://doi.org/10.23736/S0392-9590.20.04283-2).
- [22] Zhang ZD, Liang K, Zou GQ, et al. Inhibition of miR-155 attenuates abdominal aortic aneurysm in mice by regulating macrophage-mediated inflammation[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(3): BSR20171432. doi: [10.1042/BSR20171432](https://doi.org/10.1042/BSR20171432).
- [23] Zhai H, Qi X, Li ZX, et al. TIMP-3 suppresses the proliferation and migration of SMCs from the aortic neck of atherosclerotic AAA in rabbits, via decreased MMP-2 and MMP-9 activity, and reduced TNF- α expression[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2):2061–2067. doi: [10.3892/mmr.2018.9224](https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9224).
- [24] Luongo F, Colonna F, Calapà F, et al. PTEN tumor-suppressor: the dam of stemness in cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1076. doi: [10.3390/cancers11081076](https://doi.org/10.3390/cancers11081076).
- [25] Tian Y, Li XX, Bai C, et al. miR-17-5p promotes the endothelialization of endothelial progenitor cells to facilitate the vascular repair of aneurysm by regulating PTEN-mediated PI3K/AKT/VEGFA pathway[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(24): 3608–3621. doi: [10.1080/15384101.2020.1857958](https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1857958).
- [26] Peng JL, He XQ, Zhang L, et al. microRNA-26a protects vascular smooth muscle cells against H₂O₂-induced injury through activation of the PTEN/AKT/mTOR pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1367–1378. doi: [10.3892/ijmm.2018.3746](https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3746).
- [27] Zhou Y, Wang MG, Zhang J, et al. microRNA-29a-3p regulates abdominal aortic aneurysm development and progression via direct interaction with PTEN[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(12): 9414–9423. doi: [10.1002/jcp.29746](https://doi.org/10.1002/jcp.29746).
- [28] Huang CP, Fang X, Xie XP, et al. Effect of miR-126 on the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in aortic aneurysm mice under PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Mol Biotechnol*, 2021, 63(7): 631–637. doi: [10.1007/s12033-021-00327-6](https://doi.org/10.1007/s12033-021-00327-6).
- [29] Yang Z, Zhang L, Liu Y, et al. Potency of miR-144-3p in promoting abdominal aortic aneurysm progression in mice correlates with apoptosis of smooth muscle cells[J]. *Vasc Pharmacol*, 2022, 142: 106901. doi: [10.1016/j.vph.2021.106901](https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106901).

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 肖远扬, 李良学. miR-27b-3p 对主动脉血管平滑肌细胞和单核细胞功能的影响及机制研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2022, 31(12):1644–1652. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.12.012](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.12.012)

Cite this article as: Xiao YY, Li LX. Effect of miR-27b-3p on the function of aortic vascular smooth muscle cells and monocytes and the mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2022, 31(12): 1644–1652. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2022.12.012](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.12.012)