

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.02.012

miR-182 在肺动脉高压患者中的表达分析及对 HPVSMC 细胞增殖的影响*

郭天聪, 宁欣, 倪楠, 孟晓丹, 边明艳, 薛运昕[△]

(辽宁省金秋医院呼吸内科, 沈阳 110000)

[摘要] **目的** 研究 miR-182 在肺动脉高压(PAH)患者的差异性表达,探索其在 PAH 中的诊断及治疗中的辅助作用。**方法** 收集该院 2017 年 2 月至 2018 年 2 月就诊的 PAH 患者 30 例为试验组,并选取同期健康体检者 30 例为对照组,采用荧光素酶报告基因检测 miR-182,并研究与肌细胞增强因子 2C(MEF2C)靶向关系,采用 Western blot 方法验证 miR-182 对 MEF2C 蛋白的调控作用,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 miR-182 及 MEF2C 的相对表达水平,采用 CCK8 方法检测 miR-182 对肺动脉平滑肌细胞(HPVSMC)细胞增殖的作用。**结果** miR-182 靶向结合于 MEF2C 的 3'UTR 区;与对照组比较,miR-182 在试验组中高表达(0.963 ± 0.148 vs. 2.347 ± 0.220 , $P=0.006$),而 MEF2C 在试验组中低表达(1.013 ± 0.179 vs. 0.413 ± 0.068 , $P=0.035$);下调 miR-182 导致 MEF2C 蛋白表达增高($P=0.024$);下调 miR-182 可抑制 HPVSMC 细胞增殖能力($P=0.019$)。**结论** miR-182 在 PAH 患者中上调,并通过调节 MEF2C 促进平滑肌细胞增殖,miR-182 及 MEF2C 表达改变在 PAH 发病机制中起到一定的作用。

[关键词] miR-182;高血压,肺性;肌细胞,平滑肌;细胞增殖;肌细胞增强因子 2C**[中图法分类号]** R543 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0229-04

Expression of miR-182 in patients with pulmonary hypertension and its effects on cell proliferation of HPVSMC*

GUO Tiancong, NING Xin, NI Nan, MENG Xiaodan, BIAN Mingyan, XUE Yunxin[△]

(Department of Respiratory Medicine, Liaoning Jinqiu Hospital, Shenyang, Liaoning 110000, China)

[Abstract] **Objective** To research the differential expression of miR-182 in pulmonary arterial hypertension (PAH) and explore the role in the diagnosis and treatment of PAH. **Methods** The peripheral blood samples were collected from 30 PAH patients in Jinqiu hospital of Liaoning Province from Feb 2017 to Feb 2018. Concurrent 30 healthy people were selected as the control group. Luciferase reporter gene assay was used to detect miR-182 and investigate the targeting relationship with myocyte enhancement factor 2C (MEF2C). Western Blot was used to verify the regulatory effect of miR-182 on MEF2C protein. Real-time quantitative fluorescence PCR (RT-qPCR) was conducted to detect the relative expression of miR-182 and MEF2C. CCK8 method was used to detect the effect of miR-182 on promoting the proliferation of HPVSMC cells. **Results** miR-182 targeted to the 3' UTR region of MEF2C. Compared with the control group, miR-182 high-expressed in the PAH group (0.963 ± 0.148 vs. 2.347 ± 0.220 , $P=0.006$), and MEF2C low-expressed in the PAH group (1.013 ± 0.179 vs. 0.413 ± 0.068 , $P=0.035$). Downregulation of miR-182 increased the expression of MEF2C protein ($P=0.024$) and inhibited the cell proliferation of HPVSMC ($P=0.019$). **Conclusion** miR-182 up-regulated in patients with PAH and promotes the proliferation of smooth muscle cells by regulating MEF2C. The changes in the expression of miR-182 and MEF2C play a vital role in the pathogenesis of PAH.

[Key words] miR-182; hypertension, pulmonary; myocytes, smooth muscle; cell proliferation; myocyte enhancement factor 2C

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种进展性的复杂心血管系统疾病,其血流动力学诊断标准为:海平面静息状态下,右心导管检

测肺动脉平均压(mean pulmonary artery pressure, PAP) ≥ 25 mm Hg。PAH 是常见病、多发病,为肺动脉压力升高并且超过一定界值的血流动力学和病理

生理状态,可导致右心心力衰竭,临床上 PAH 可以是一种独立的疾病,也可以是并发症或是综合征^[1]。随着新治疗方法的不断出现,PAH 仍是一种病死率较高的疾病,病死率约为 5.5/10 万人^[2],因此,仍需要对其进行深入的研究。miRNA(miR)是一类长 19~25 NT 的非编码小 RNA,通过抑制翻译或降解 mRNA 转录本的方式,从转录及转录后水平调控靶基因的表达^[3]。miR 参与调节细胞的多种生物学功能,包括增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭及细胞周期^[4]。然而,miR 在心血管疾病中的研究较少。因此,本研究拟从 miR 的角度探索 PAH 的发生、发展,以期对 PAH 的诊断及治疗带来新的帮助,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 2 月至 2018 年 2 月本院初诊的 30 例 PAH 患者为试验组,患者未经任何降压治疗,除外其他基础疾病。纳入标准:诊断严格遵守尼斯 2013 版 PAH 诊疗标准^[5],且经过动脉导管测量确诊,同时根据世界卫生组织(WHO)标准^[6]对患者进行功能分级,其中 1 级 7 例,2 级 16 例,3 级 6 例,4 级 1 例。排除标准:(1)心肌梗死、肝肾功能不全、左心心力衰竭、肺栓塞、自身免疫性疾病、肿瘤、近期手术;(2)近期感染;(3)低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)<70 mg/L;(4)妊娠或哺乳期。30 例患者中男 13 例,女 17 例,中位年龄 29 岁。选取同期本院健康体检者 30 例作为对照组,其中男 16 例,女 14 例,中位年龄 31 岁。两组对象性别、中位年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺动脉平滑肌细胞(HPVSMC)购自上海富衡生物,人胚肾细胞株 HEK293 购自上海生科院,常规培养于 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素及 100 IU/mL 青霉素),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的条件下进行培养,取对数期细胞进行后续实验。

1.2.2 荧光素酶报告基因检测 HEK293 细胞应用 miR-182 mimics 及肌细胞增强因子 2C(MEF2C) 3' UTR 荧光素酶载体共转染,以 NC 及空载体为对照,转染 24 h 后进行荧光素酶检测,参照 Promega 公司荧光素酶检测系统。mimics 由上海吉玛公司合成,MEF2C 3'UTR 荧光素酶载体由赛业生物构建。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 PAH 患者入院后于第 1 次治疗前采集外周血标本,并收集同期健康体检者外周血标本,采血 2~3 mL 于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,外周血标本采用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,并加 Trizol 1 mL 于 EP 管中于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。标本收集完成后,采用 Trizol-

氯仿方法提取细胞总 RNA,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱临时保存,随后采用 Oligo dT 法及特异性引物法进行反转录,以管家基因 U6 为内参,同时进行 miR-182、MEF2C 及 U6 的 RT-PCR。反应体系如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,35 个循环,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。RT-PCR 反应设置 3 个复孔,得出 Ct 均值,以健康者为对照,应用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 相对定量法分析 miR-182 及 MEF2C 表达水平的差异。 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ 试验组 - ΔCt 对照组, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ 目的基因 - Ct 管家基因, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 即为基因表达差异的倍数。引物序列,MEF2C 正向:TCT GTC TGG CTT CAA CAC TG;反向:TGG TGG TAC GGT CTC TAG GA。miR-182 正向 1:GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA GTG TGA G;正向 2:CGG CGG TTT GGC AAT GGT AGA ACT;反向 2:GTG CAG GGT CCG AGG T。U6 正向:CTC GCT TCG GCA GCA CA;反向:AAC GAT TCA CGA ATT TGC GT。

1.2.4 Western blot 检测 单去污裂解液提取 HPVSMC 总蛋白,以考马斯亮蓝法进行定量。将煮沸变性后蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,并低温转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。室温封闭膜后与 MEF2C 抗体(1:1 000)和 GAPDH 内参抗体(1:5 000)进行一抗孵育过夜,相应的辣根过氧化物酶标记二抗孵育(1:5 000)1 h,最后以 ECL 发光法检测条带。

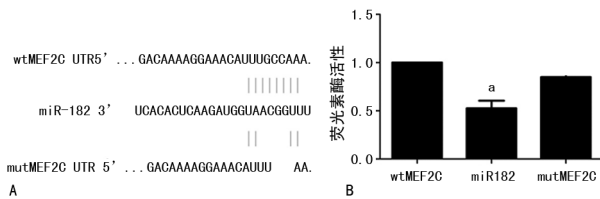
1.2.5 细胞增殖能力检测 采用 DOJINDO 细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞增殖能力,于转染第 0~4 天分别进行检测,操作严格遵守说明书进行,并在多功能酶标分析仪 MB580 检测波长为 450 nm 的 OD 值。细胞活力%=(试验组 OD-空白组 OD)/(对照组 OD-空白组 OD) $\times 100\%$ 。细胞检测时间设为 5 个时间点:0、1、2、3、4 d,其中 0 d 设为转染后 6 h。细胞计数 2 000 个并铺板,铺板 6 h 后进行转染,每 48 h 进行细胞换液。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,增殖曲线采用重复测量 t 检验;计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-182 与 MEF2C 的 3'UTR 靶向调控关系验证 根据生物信息学预测(targetscan),发现 miR-182 可以靶向结合于 MEF2C 的 3'UTR 区,见图 1A。荧光素酶报告基因结果显示,wtMEF2C 与 miR-182 mimics 共转染,荧光素酶活性降低($t=6.042, P=0.004$),而 mutMEF2C 与 miR-182 共转染,荧光素酶

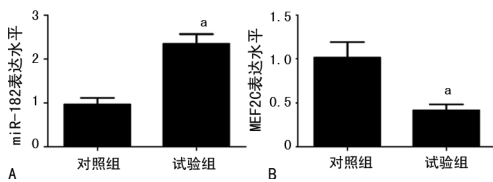
活性并无显著降低($P=0.563$),见图 1B。



A: miR-182 靶向结合 MEF2C 的 3'-UTR 区示意图及突变型载体; B: wtMEF2C、mutMEF2C、miR-182 共转染 HEK293 细胞 24 h 后荧光素酶活性检测柱状图;^a: $P<0.05$,与 wtMEF2C 比较

图 1 miR-182 靶向结合于 MEF2C 的 3'-UTR 区

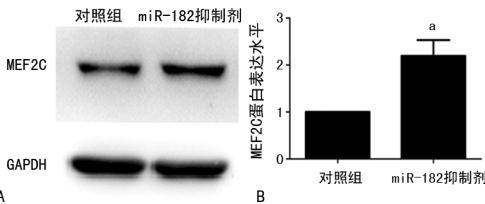
2.2 两组 miR-182 及 MEF2C 相对表达水平比较 与对照组比较,试验组 miR-182 表达升高($t=5.216$, $P=0.006$),而 MEF2C 表达降低($t=3.128$, $P=0.035$),见图 2。



A: miR-182 相对表达水平; B: MEF2C 相对表达水平;^a: $P<0.05$,与对照组比较

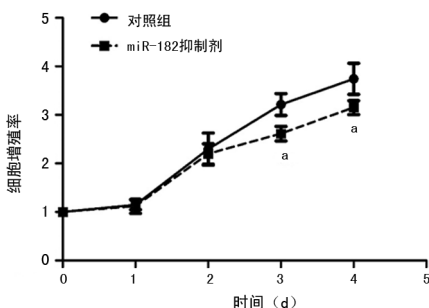
图 2 两组 miR-182 及 MEF2C 相对表达水平比较

2.3 miR-182 对 MEF2C 蛋白的调控 与对照组比较,转染 miR-182 抑制剂后,HPVSMC 中 MEF2C 蛋白表达显著增高($t=3.526$, $P=0.024$),见图 3。



A: HPVSMC 中转染 miR-182 抑制剂后 MEF2C 蛋白检测; B: MEF2C 及 GAPDH 灰度值分析柱状图;^a: $P<0.05$,与对照组比较

图 3 miR-182 对 MEF2C 蛋白的调控



A: 转染 miR-182 抑制剂后 HPVSMC 的增殖曲线;^a: $P<0.05$,与对照组比较

图 4 miR-182 对 HPVSMC 的增殖影响

2.4 miR-182 对 HPVSMC 细胞增殖能力的影响 与对照组比较,在 HPVSMC 中转染 miR-182 抑制剂后,发现 HPVSMC 的增殖能力降低,采用重复测量

T 检验发现,miR-182 抑制剂对 HPVSMC 细胞增殖抑制作用具有时间依赖性($P=0.019$),提示 miR-182 促进 HPVSMC 的细胞增殖。其中抑制率在第 3 天及第 4 天即达到显著差异($P=0.005, 0.027$),见图 4。

3 讨论

PAH 是一种多因素疾病,遗传学、表观遗传学及环境均可导致 PAH 的发生。近年来,越来越多的 miR 被发现参与 PAH 的发病,COURBOULIN 等^[7]在 PAH 患者和健康对照者的肺组织标本中比对了 337 个 miR,发现有 6 种 miR 存在上调,而只有 1 种 miR 存在下调。随之,RHODES 等^[8]通过对 PAH 患者和健康对照者的血浆标本进行芯片筛查,发现有 58 种 miR 存在异常表达,其中 miR-150 降低最为显著,且对于 PAH 患者有着更差的预后。此外,研究者发现还有更多的 miR 在 PAH 患者中存在异常表达,但是迄今为止,仅有数种 miR 被通过实验证明确实在 PAH 的发生、发展中发挥一定的作用,包括 miR-17-92、miR-143/145、miR-21 和 miR-124 等^[9-13]。

miR-182 通常被认为是原癌基因在肿瘤的高表达,并促进肿瘤细胞增殖,例如 miR-182 在乳腺癌中高表达,并且通过靶向叉头蛋白 F2(FOXF2)促进肿瘤细胞增殖和迁移^[14]。miR-182 在结肠癌中高表达,并且通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路维持肿瘤细胞的干细胞状态^[15]。miR-182 在胶质瘤中高表达,并且通过靶向果糖-2,6-二磷酸酶 2(PFKFB2)提高肿瘤细胞增殖及侵袭能力^[16]。本研究首次通过 PCR 方法发现 miR-182 在 PAH 患者中存在显著上调,推测其可能在 PAH 的发生、发展中起到某种作用。而关于 miR-182 在非肿瘤性疾病中研究较少,有研究证明其在脑梗死患者存在高表达,且预示着较高的复发率,因此需要进一步来研究 miR-182 在 PAH 的作用机制。另外,miR-182 在 PAH 患者血浆中存在高表达,提示其作为 PAH 诊断靶点的可能性,目前右心导管检查是 PAH 诊断的金标准,但作为有创性检查较大地限制了其应用。MEF2C 通常被认为参与 HPVSMC 增殖及分化^[17],重建其高表达会抑制肺动脉内皮细胞的增殖,进而缓解 PAH 症状^[18]。而 miR-182 可通过下调 MEF2C 促进 HPVSMC 的增殖,并通过 CCK-8 实验验证了这一现象。有研究通过小鼠实验表明 miR-182 可通过靶向 MYADM 重塑 HPVSMC 表型来延缓动脉粥样硬化^[19],这与本研究一致,同时也辅助证明 miR-182 参与 HPVSMC 的增殖。

本研究中首次报道了 miR-182 在 PAH 患者中高表达,为 PAH 患者的诊断提供新的帮助。miR-182 通过调节 MEF2C 促进 HPVSMC 的增殖,参与

PAH 的发生、发展,为 PAH 的发病机制提供新的思路,并且为其治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] GABOR K, DANIEL D, ANDREAS B, et al. Definition, clinical classification and initial diagnosis of pulmonary hypertension: updated recommendations from the cologne consensus conference 2018[J/OL]. *Int J Cardiol*, 2018. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016752731834347X>.
- [2] 张艺韬, 曾伟杰, 程康林. 左心疾病相关肺动脉高压流行病学[J]. *心血管病学进展*, 2016, 37(4): 333-336.
- [3] PRASHANT S, PRAGYA J, JAINARAYANAN A K, et al. Intronic miRNA mediated gene expression regulation controls protein crowding inside the cell[J]. *Gene*, 2018, 679: 172-178.
- [4] 尚晋, 陈志忠, 王志红, 等. miRNA-132、miRNA-125b、miRNA-143 和 miRNA-145 表达对多发性骨髓瘤细胞自噬及凋亡的影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 2018, 26(6): 1688-1694.
- [5] SIMONNEAU G, ROBBINS I M, BEGHETTI M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(1 Suppl): S43-54.
- [6] WHITWORTH J A, CHALMERS J. World health organisation - international society of hypertension (WHO/ISH) hypertension guidelines[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2004, 26(7): 747-752.
- [7] COURBOULIN A, PAULIN R, GIGUÈRE N J, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(3): 535-548.
- [8] RHODES C J, WHARTON J, BOON R A, et al. Reduced microRNA-150 is associated with poor survival in pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(3): 294-302.
- [9] ZHU G, ZHANG W, LIU Y, et al. miR-371b-5p inhibits endothelial cell apoptosis in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via PTEN/PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6): 5489-5501.
- [10] LI F W, SHI W H, WAN Y X, et al. Prediction of target genes for miR-140-5p in pulmonary arterial hypertension using bioinformatics methods[J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(12): 1880-1890.
- [11] BAPTISTA R, MARQUES C, CATARINO S, et al. MicroRNA-424(322) as a new marker of disease progression in pulmonary arterial hypertension and its role in right ventricular hypertrophy by targeting SMURF1[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(1): 53-64.
- [12] CARUSO P, DUNMORE B J, SCHLOSSER K, et al. Identification of microRNA-124 as a major regulator of enhanced endothelial cell glycolysis in pulmonary arterial hypertension via PTBP1 (polypyrimidine tract binding protein) and pyruvate kinase M2[J]. *Circulation*, 2017, 71(Suppl 3): A48-49.
- [13] MIAO C, CHANG J, ZHANG G. Recent research progress of microRNAs in hypertension pathogenesis, with a focus on the roles of miRNAs in pulmonary arterial hypertension[J]. *Mol Biol Rep*, 2018, 45: 2883.
- [14] ZHANG X Z, MA G S, LIU J C, et al. MicroRNA-182 promotes proliferation and metastasis by targeting FOXF2 in triple-negative breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4805-4811.
- [15] JIA L, LUO S H, REN X, et al. miR-182 and miR-135b mediate the tumorigenesis and invasiveness of colorectal cancer cells via targeting ST6GALNAC2 and PI3K/AKT pathway[J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(12): 3447-3459.
- [16] HE Z, YOU C, ZHAO D. Long non-coding RNA UCA1/miR-182/PFKFB2 axis modulates glioblastoma-associated stromal cells-mediated glycolysis and invasion of glioma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(3): 569-576.
- [17] LI W, ZHANG R, SUI L, et al. MiR-448 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration in through directly targeting MEF2C[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(28): 22294-22300.
- [18] KIM J, HWANGBO C, HU X Y, et al. Restoration of impaired endothelial myocyte enhancer factor 2 function rescues pulmonary arterial hypertension[J]. *Circulation*, 2015, 131(2): 190-199.
- [19] SUN L, BAI Y Y, ZHAO R, et al. Oncological miR-182-3p, a novel smooth muscle cell phenotype modulator, evidences from model rats and patients[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(7): 1386-1397.

(收稿日期: 2018-06-28 修回日期: 2018-10-11)