

刘兰,张东雪,张胜雷,等. miR-30b 在高磷诱导的血管平滑肌细胞凋亡中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 58-65.

Liu L, Zhang DX, Zhang SL, et al. High phosphorus promotes apoptosis of vascular smooth muscle cells by inhibiting miR-30b [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 58-65.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.008

miR-30b 在高磷诱导的血管平滑肌细胞凋亡中的作用

刘 兰,张东雪,张胜雷*,白亚玲

(河北医科大学第四医院 肾内科,石家庄 050011)

【摘要】 目的 观察微小 RNA30b (microRNA 30b, miR-30b) 在高磷诱导的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 凋亡中的作用及机制。方法 体外培养大鼠胸主动脉 VSMCs, 分为正常组和高磷组 (给予 10 mmol/L β -甘油磷酸盐刺激)。采用实时荧光定量 PCR 检测各组 VSMCs miR-30b 表达、Western blot 法测定促凋亡基因 BAX、抑凋亡基因 Bcl-2 的表达情况, 采用 MTT 法检测各组细胞的增殖情况、采用流式细胞法检测各组细胞的凋亡情况。为进一步验证 miR-30b 对 VSMCs 凋亡的影响, 给与转染 miR-30b 的抑制物 inhibitor-30b 和类似物 mimic-30b, 观察 VSMCs 增殖和凋亡情况以及 BAX、Bcl-2 表达情况。**结果** (1) 高磷对 VSMCs 凋亡的影响: 流式结果显示, 高磷组 VSMCs 凋亡细胞显著增多 ($P < 0.05$); MTT 结果显示, 高磷组细胞增殖减少 ($P < 0.05$); 高磷组 BAX 表达升高、Bcl-2 表达降低 ($P < 0.05$); 高磷组 miR-30b 的表达显著下降 ($P < 0.05$)。 (2) miR-30b 对 VSMCs 凋亡的影响: 转染 inhibitor-30b 后 VSMCs 凋亡细胞显著增多 ($P < 0.05$); 转染 inhibitor-30b 后 MTT 显示细胞增殖减少 ($P < 0.05$); 转染 inhibitor-30b 后, BAX 表达升高、Bcl-2 表达降低 ($P < 0.05$); 转染 mimic-30b 后 VSMCs 凋亡细胞显著减少 ($P < 0.05$); 转染 mimic-30b 后, BAX 表达降低、Bcl-2 表达升高 ($P < 0.05$)。**结论** 高磷可以诱导细胞凋亡, 其可能机制之一是高磷通过抑制 miRNA-30b 表达, 进而促进凋亡基因 BAX 表达, 降低抑凋亡基因 Bcl-2 表达, 导致 VSMCs 发生凋亡。

【关键词】 血管平滑肌细胞; 高磷; 凋亡; miR-30b; BAX

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0058-08

High phosphorus promotes apoptosis of vascular smooth muscle cells by inhibiting miR-30b

LIU Lan, ZHANG Dongxue, ZHANG Shenglei*, BAI Yaling

(Department of Nephrology, the Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the role and mechanism of miR-30b in apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by high phosphorus. **Methods** VSMCs from the rat thoracic aorta were cultured *in vitro* and divided into a normal group and high phosphorus group stimulated by 10 mmol/L β -glycerophosphate. Expression of miR-30b in VSMCs was quantified by Real-time PCR, and expression of pro-apoptotic protein BAX and anti-apoptotic protein Bcl-2 was determined by Western blot. Cell proliferation was assessed by MTT assays, and apoptosis was detected by flow cytometry. To verify the effect of miR-30b on VSMCs apoptosis, inhibitor-30b and mimic-30b were applied to observe changes in proliferation and apoptosis of VSMCs and expression of BAX and Bcl-2. **Results** (1) The effect of high phosphorus on apoptosis of VSMCs:

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题 (20180513, 20190702)。

[作者简介] 刘兰 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 临床内科学、肾脏病、血管钙化。E-mail: liulan807@163.com

[通信作者] 张胜雷 (1984—), 博士, 主治医师, 研究方向: 临床内科学、肾脏病、血管钙化。E-mail: lei06352511@126.com

Flow cytometry showed that apoptosis cells of VSMCs in high phosphorus group increased significantly ($P < 0.05$). The results of MTT showed that the proliferation of cells in high phosphorus group decreased ($P < 0.05$). The expression of BAX increased and Bcl-2 decreased in high phosphorus group ($P < 0.05$). The expression of miR-30b in high phosphorus group decreased significantly ($P < 0.05$). (2) Effect of miR-30b on apoptosis of VSMCs: After transfection of inhibitor-30b, the number of apoptotic cells in VSMCs increased significantly ($P < 0.05$). After transfection of inhibitor-30b, MTT assay showed that cell proliferation decreased ($P < 0.05$). The expression of BAX increased and the expression of Bcl-2 decreased after transfection of inhibitor-30b ($P < 0.05$). After mimic-30b transfection, the apoptotic cells of VSMCs decreased significantly ($P < 0.05$). After transfection of mimic-30b, the expression of BAX decreased and the expression of Bcl-2 increased ($P < 0.05$). **Conclusions** High phosphorus induces apoptosis. A possible mechanism is that high phosphorus inhibits miR-30b expression and then promotes expression of apoptosis gene BAX and decreases expression of anti-apoptosis gene Bcl-2, which leads to VSMCs apoptosis.

【Keywords】 vascular smooth muscle cells; high phosphorus; apoptosis; miR-30b; BAX

血管钙化能够增加心脏病、动脉粥样硬化斑块破裂、脑卒中的风险,是增加心血管疾病发病率和死亡率的重要危险因素^[1-2]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)凋亡是血管钙化的重要机制之一^[3]。此外,研究发现^[4], miRNAs 在细胞成骨转化、细胞转移及细胞凋亡中起重要作用。miR-30b 是 miR-30 家族的一员^[5],在人体组织中广泛表达,且已有报道显示,miR-30b 能够靶向调控人主动脉瓣瓣膜间质细胞的钙化^[6]。但 miR-30b 在血管平滑肌细胞凋亡中的作用机制尚不明确。因此,本研究对大鼠 VSMCs 进行体外培养,在高磷环境中探讨 miR-30b 参与调节大鼠血管平滑肌细胞凋亡的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

取 SPF 级雄性健康 SD 大鼠 6 只,4 周龄,体重约 80~100 g,由河北医科大学实验动物中心提供[SCXK(冀)2020-002],合格证编号:1305090。将实验动物饲养于河北医科大学第四医院实验动物中心[SYXK(冀)2018-001],环境温度 18℃~24℃,湿度 40%~60%,12 h/12 h 明/暗循环环境,饲料、饮水均经过高压灭菌处理。本研究已通过河北医科大学第四医院伦理委员会审核(2021KY044),所有动物实验操作均在 3R 原则的指导下给与实验动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养液(批号:31600-034)(美国 Gibco 公司);胎牛血清(批号:A0500-3210)(美国 Cegrogen 公司); β -甘油磷酸(批号:SLCD0875)(美国 Sigma 公司);RNA 反转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒(批号:R11068.5)(锐博生物公司);

miR-30b 的抑制物(批号:R11035.4)(锐博生物公司);GAPDH 抗体(批号:AP0063)(美国 Proteintech,公司);BAX 抗体(批号:50599-2-Ig)(美国 Proteintech 公司);Bcl-2 抗体(批号:AF6139)(美国 Affinity 公司);山羊抗兔二抗(批号:5220-0336)(美国 Seracare 公司)。

实时荧光定量 PCR 仪(批号:QuantStudio DX)(美国 life 公司);倒置相差显微镜(批号:Axio Observer D1)(日本 OLYMPUS 公司);细胞培养箱(批号:150i)(美国 Sheldon 公司);酶标仪(批号:Cytation III)(美国 Biotek 公司);蛋白电泳仪(批号:10025025 Rev A 12-0625 0312)(美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像系统(批号:FR0146)(美国 Proteinsimple 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验模型的制备与分组

对实验大鼠进行称重,根据体重腹腔注射 200 mg/kg 的戊巴比妥钠进行麻醉,75%乙醇溶液浸泡消毒 10 min 后,经腹部中线纵行切口,依次分离进入胸腔,取大鼠胸主动脉,分离中膜层,剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块,均匀铺于瓶底,组织贴壁法对 VSMCs 行原代培养。贴壁细胞占底壁的 80%~90% 时进行传代,使用 PBS 液冲洗 2 次,胰酶消化 1 min,加入等量完全培养基,吹打混匀,收集细胞并离心后,按 1:2 进行传代培养。传代至第 3~4 代将细胞分为两组:正常组和高磷组(给予 10 mmol/L β -甘油磷酸盐),干预 7 d 后检测 miR-30b、BAX、Bcl-2 等指标的变化。为进一步验证 miR-30b 对 VSMCs 的作用,给予转染 miR-30b 的抑制物 inhibitor-30b,将细胞分为 3 组:(1)正常组:细胞未转染;(2)inhibitor-NC 组:转染 20 μ mol/L 抑制物的对照 inhibitor-NC 5 μ L;(3)inhibitor-30b 组:转染 20

$\mu\text{mol/L}$ 抑制物 inhibitor-30b 2.5 μL 。转染 72 h 后检测凋亡情况。为进一步验证高磷环境中 miR-30b 的作用,给予转染 miR-30b 的类似物 mimic-30b,将细胞分为 3 组:(1)高磷组:10 mmol/L β -甘油磷酸盐培养,细胞未转染;(2)高磷+mimic-NC 组:10 mmol/L β -甘油磷酸盐培养,转染 20 $\mu\text{mol/L}$ 类似物的对照 mimic-NC 5 μL ;(3)高磷+mimic-30b 组:10 mmol/L β -甘油磷酸盐培养,转染 20 $\mu\text{mol/L}$ 类似物 mimic-30b 5 μL 。转染 72 h 后检测凋亡情况。

1.3.2 细胞 SM22 α 免疫组化染色

取出细胞用 4% 的中性福尔马林固定 30 min, PBS 洗 3 次,0.3% Triton-100,作用 20 min, PBS 洗 3 次, H_2O_2 作用 15 min, PBS 洗 3 次,加入 5% 山羊清封闭在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,加入 SM22 α 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日, PBS 洗 3 次,加入二抗 A 液,作用 30 min, PBS 洗 3 次,加入二抗 B 液,作用 30 min, PBS 洗 3 次,加入 DAB 显色液作用 30 s,自来水洗 3 次,苏木素复染,脱水封片。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖能力

接种于 96 孔板中的血管平滑肌细胞融合达 60%~70% 给予刺激,每组设 3 个复孔。取 MTT (5 mg/mL) 各检测孔加入 20 μL ,培养箱中培养 4 h,弃去培养液,取二甲亚砜各检测孔加入 150 μL ,于室温振荡 10 min。酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度(A)值,记录结果。

1.3.4 流式细胞法检测细胞的凋亡

给予刺激后,收集细胞,根据试剂说明书进行 Annexin V-PE/7-AAD 双重染色,流式细胞仪检测,右上象限 Annexin V 为阳性、7-AAD 为阳性,为晚期凋亡细胞;右下象限 Annexin V 为阳性、7-AAD 为阴性,为早期凋亡细胞。实验重复 3 次。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 检测各组 miR-30b 表达
分别提取各组的 miR-30b。实验均重复 3 次。锐博生物提供的 miR-30b 和 U6 的引物,U6 为内参,反应条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s;退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 个循环,重复 3 次。

1.3.6 Western blot 检测 Bcl-2、BAX 蛋白的表达

提取各组 VSMCs 的蛋白质,配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(10%),加样 20 μg 蛋白质,进行电泳 1.5 h(95 V 恒压)。后转膜 1 h(恒压 95 V),洗膜 3 次,牛清(5%)封闭 1 h。加入一抗稀释液(BAX 1:2000, Bcl-2 1:1000, GAPDH 1:5000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日加二抗稀释液(1:5000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。使用蛋白成像系统照膜,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

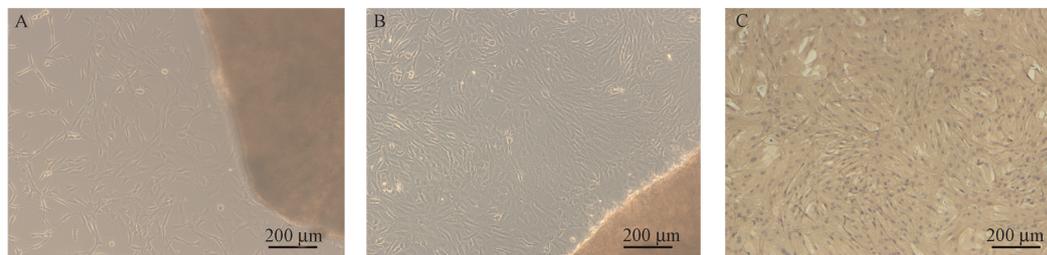
应用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计学处理,正态分布的计量资料结果用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高磷对 VSMCs 增殖凋亡的影响

2.1.1 VSMCs 的原代培养及细胞鉴定

VSMCs 原代培养第 3 天,即有血管平滑肌细胞从组织块周围爬出,长至第 7 天,组织块周围的细胞相互融合在一起,平行排列、呈束状,部分重叠在一起,呈“峰-谷”状生长。单个细胞呈梭形、不规则形,以梭形为主,细胞核为卵圆形。细胞 SM22 α 免疫组化染色可见细胞浆内呈棕黄色,胞质内的肌动蛋白被染成棕黄色,呈丝状沿细胞长轴平行分布细胞核为蓝色,SM22 α 染色为阳性,表明细胞为血管平滑肌细胞,见图 1。



注:A:原代培养第 3 天的组织块及爬出的血管平滑肌细胞;B:原代培养第 7 天的组织块及爬出的血管平滑肌细胞;C:血管平滑肌细胞 SM22 α 的免疫组化染色,呈棕黄色为阳性。

图 1 VSMCs 的原代培养及细胞鉴定

Note. A, Tissue block and crawled vascular smooth muscle cells on the 3rd day of primary culture. B, Tissue block and crawled vascular smooth muscle cells on the 7th day of primary culture. C, Immunohistochemical staining of SM22 α , a vascular smooth muscle cell, was brown and positive.

Figure 1 Primary culture and cell identification of VSMCs

2.1.2 高磷对大鼠 VSMCs 凋亡的影响

流式细胞仪结果显示,与正常组比较,高磷组细胞凋亡显著增多($t = -12.841, P < 0.001$),有统计学差异($P < 0.05$),见图 2。

2.1.3 高磷对大鼠 VSMCs 增殖的影响

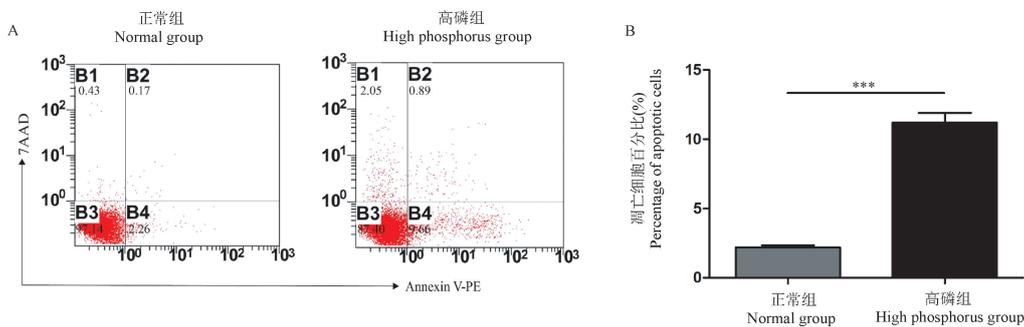
MTT 结果显示:与正常组比较,高磷组细胞增殖能力于 12、24、36、48 h 均显著降低($P < 0.05$)。高磷组与正常组比较,0、12、24、36、48 h 分别为($t = 0.105, P = 0.921, t = 13.03, P < 0.001, t = 16.892, P < 0.001, t = 12.659, P < 0.001, t = 18.049, P < 0.001$),有统计学差异($P < 0.05$),见图 3。

2.1.4 高磷对 BAX、Bcl-2 表达的影响

Western blot 结果显示,高磷组 VSMCs 促凋亡基因 BAX 上调($t = -4.727, P = 0.009$)、抑凋亡基因 Bcl-2 的表达明显下降($t = -14.872, P < 0.001$),有统计学差异($P < 0.05$),见图 4。

2.2 高磷对大鼠 VSMCs miR-30b 表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示,与正常组比较,高磷组 VSMCs miR-30b 的表达明显下降(1.00 ± 0.00 vs $0.387 \pm 0.05, t = 19.497, P < 0.05$),有统计学差异($P < 0.05$),提示高磷能够抑制 miR-30b 的表达,见图 5。

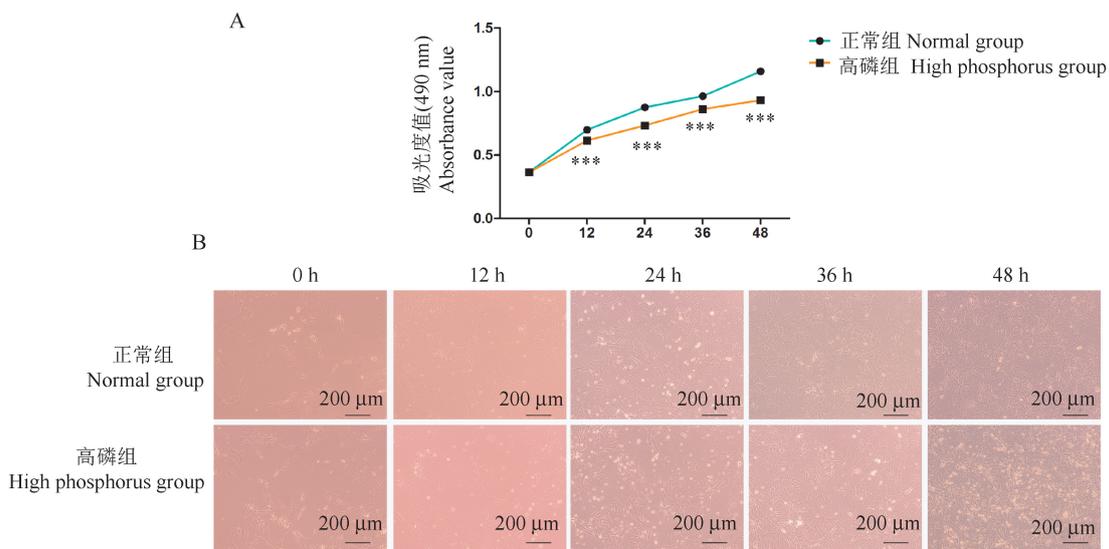


注:A:正常组与高磷组的流式结果;B:正常组与高磷组凋亡细胞百分比。与正常组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 2 两组血管平滑肌细胞的凋亡情况($n = 3$)

Note. A, Flow results of normal group and high phosphorus group. B, Percentage of apoptotic cells in normal group and high phosphorus group. Compared with normal group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Apoptosis of vascular smooth muscle cells in two groups



注:A:各组细胞的 MTT 结果;B:各组细胞不同时间段的显微镜下照片。与正常组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 3 两组血管平滑肌细胞的增殖情况($n = 3$)

Note. A, MTT results of cells in each group. B, Microscopic photos of cells in each group at different time periods. Compared with normal group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Proliferation of vascular smooth muscle cells in two groups

2.3 miR-30b 对 VSMCs 增殖凋亡的影响

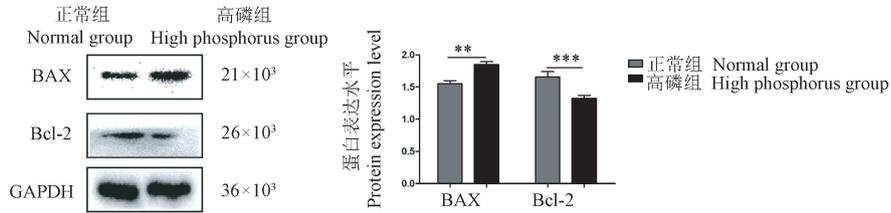
2.3.1 miR-30b 低表达对 VSMCs 凋亡的影响

流式结果显示,与正常组比较, inhibitor-30b 组 VSMCs 凋亡增多 ($P < 0.001$), 与 inhibitor-NC 组比较, inhibitor-30b 组 VSMCs 凋亡增多 ($P < 0.001$) 有统计学差异 ($P < 0.05$), 提示 miR-30b 低表达能够促

进 VSMCs 凋亡, 见图 6。

2.3.2 miR-30b 低表达对 VSMCs 增殖的影响

MTT 结果显示: 与正常组和 inhibitor-NC 组比较, inhibitor-30b 组细胞增殖能力于 12、24、36、48 h 均显著降低 ($P < 0.05$)。正常组和 inhibitor-NC 组比较, 无统计学差异 ($P > 0.05$)。见图 7。

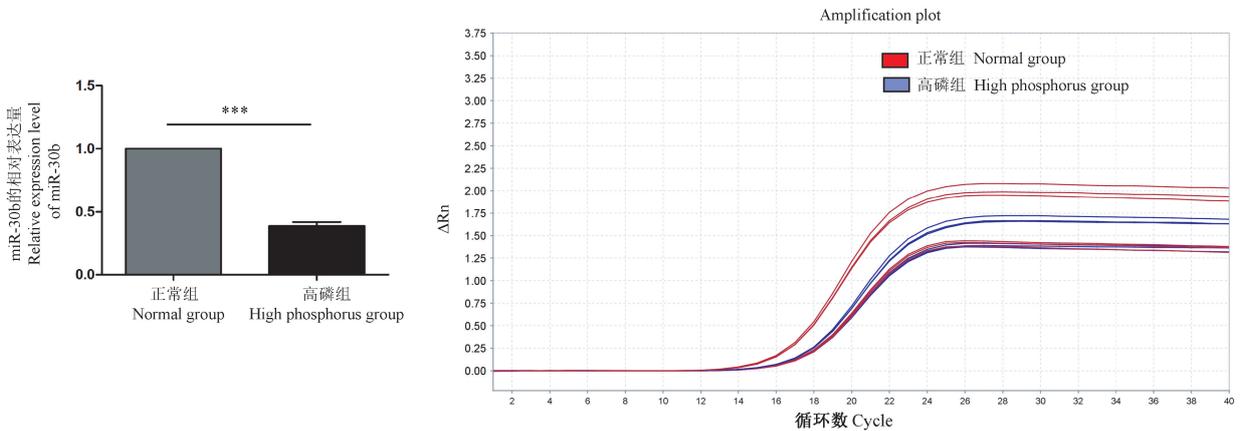


注: 与正常组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 两组血管平滑肌细胞相关蛋白表达情况 ($n = 3$)

Note. Compared with normal group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Expression of vascular smooth muscle cells related proteins in two groups

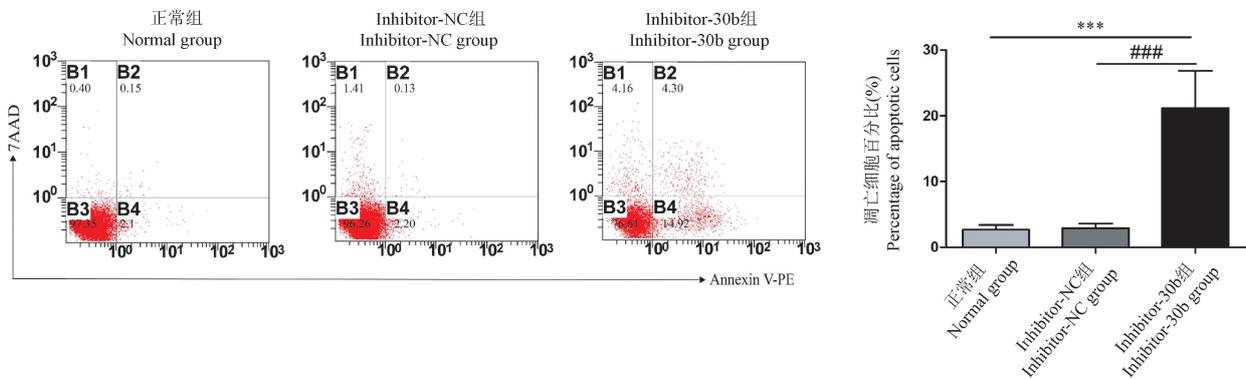


注: 与正常组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 5 两组血管平滑肌细胞的 miR-30b 的表达 ($n = 3$)

Note. Compared with normal group, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Expression of miR-30b in vascular smooth muscle cells of the two groups



注: 与正常组相比, *** $P < 0.001$; 与 inhibitor-NC 组相比, ### $P < 0.001$ 。

图 6 各组血管平滑肌细胞的凋亡情况 ($n = 3$)

Note. Compared with normal group, *** $P < 0.001$. Compared with inhibitor-NC group, ### $P < 0.001$.

Figure 6 Apoptosis of vascular smooth muscle cells in each groups

2.3.3 miR-30b 低表达对 BAX、Bcl-2 表达的影响

Western blot 印迹结果结果显示, inhibitor-30b 组 VSMCs 促凋亡基因 BAX 上调 ($P < 0.01$)、抑凋亡基因 Bcl-2 的表达明显下降 ($P < 0.01$), 有统计学差异 ($P < 0.05$), 见图 8。

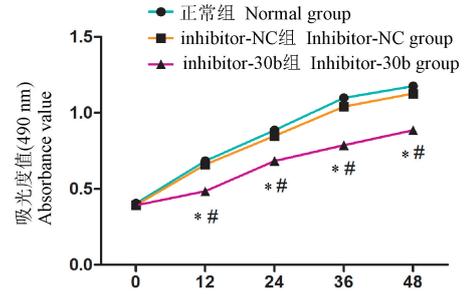
2.3.4 miR-30b 高表达对 VSMCs 凋亡的影响

流式结果显示, 与高磷组比较, 高磷-mimic-30b 组 VSMCs 凋亡减少 ($P < 0.01$), 与高磷-mimic-NC 组比较, 高磷-mimic-30b 组 VSMCs 凋亡减少 ($P < 0.01$), 有统计学差异 ($P < 0.05$), 提示 miR-30b 高表达能够抑制 VSMCs 凋亡, 见图 9。

2.3.5 miR-30b 高表达对 BAX、Bcl-2 表达的影响

Western blot 印迹结果结果显示, 与高磷组和高磷-mimic-NC 组比较, 高磷-mimic-30b 组 VSMCs 促凋亡

基因 BAX 下调、抑凋亡基因 Bcl-2 的表达明显上调, 有统计学差异 ($P < 0.05$), 见图 10。

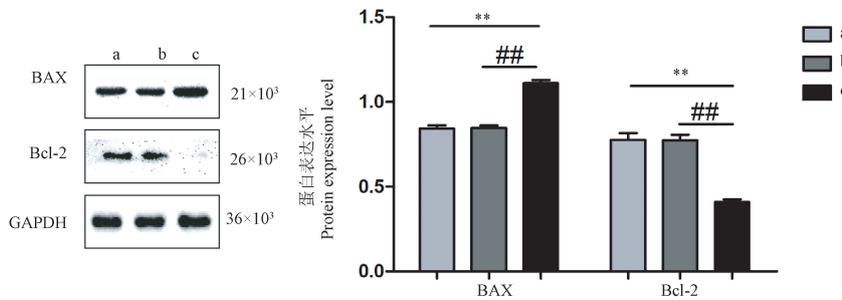


注: 与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 inhibitor-NC 组相比较, # $P < 0.05$ 。

图 7 各组血管平滑肌细胞的增殖情况

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with inhibitor-NC group, # $P < 0.05$.

Figure 7 Proliferation of vascular smooth muscle cells in each groups

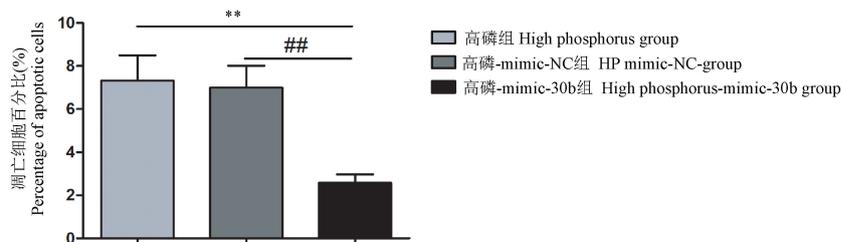
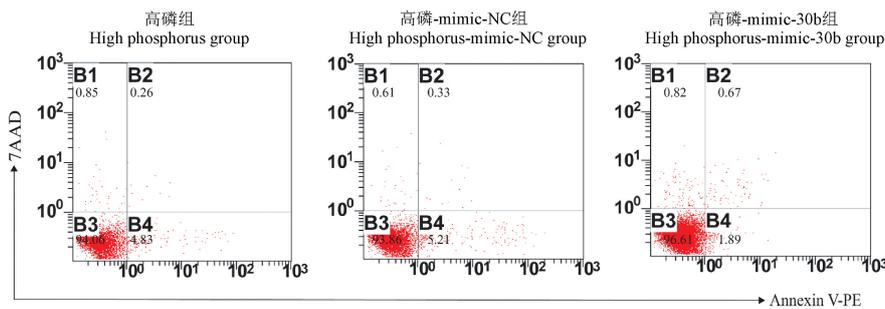


注: a: 正常组; b: inhibitor-NC 组; c: inhibitor-30b 组。与正常组相比, ** $P < 0.01$; 与 inhibitor-NC 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 8 各组血管平滑肌细胞相关蛋白表达情况 ($n = 3$)

Note. a, Normal group. b, Inhibitor-NC group. c, Inhibitor-30b group. Compared with normal group, ** $P < 0.01$. Compared with inhibitor-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 8 Expression of vascular smooth muscle cell related proteins in each groups

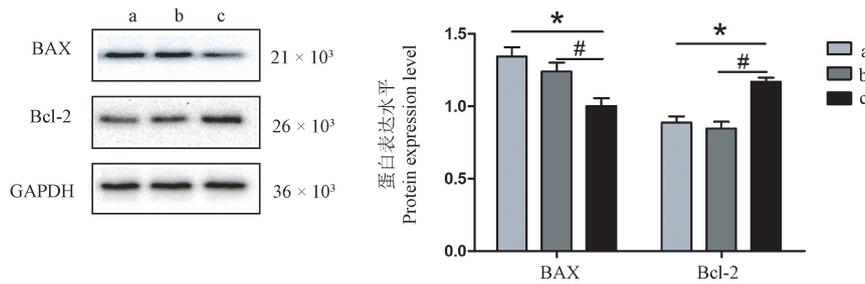


注: 与高磷组相比, ** $P < 0.01$; 与高磷-mimic-NC 组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 9 miR-30b 高表达对血管平滑肌细胞凋亡的影响 ($n = 3$)

Note. Compared with High phosphorus group group, ** $P < 0.01$. Compared with High phosphorus-mimic-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 9 Effect of miR-30b overexpression on apoptosis of vascular smooth muscle cells



注: a:高磷组; b:高磷-mimic-NC 组; c:高磷-mimic-30b 组。与高磷组相比, * $P < 0.05$; 与高磷-mimic-NC 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 10 miR-30b 高表达对相关蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Note. a, High phosphorus group. b, High phosphorus-mimic-NC group group. c, High phosphorus-mimic-30b group. Compared with High phosphorus group, * $P < 0.05$. Compared with High phosphorus-mimic-NC group group, # $P < 0.05$.

Figure 10 Effect of miR-30b overexpression on expression of related proteins

3 讨论

心血管疾病死亡率增高的独立危险因素是血管钙化^[7]。而细胞凋亡是调控血管钙化的重要机制之一^[8]。而参与细胞凋亡的机制有多种,高磷血症是导致血管中膜钙化的重要危险因素之一^[9],而 VSMCs 是血管中膜的重要组成成分。因此本研究采用大鼠 VSMCs,给予高磷刺激,探究血管平滑肌细胞凋亡和血管钙化的发生机制。本研究结果显示,高磷可导致血管平滑肌细胞发生凋亡,其机制可能是通过下调 miR-30b 表达,促进凋亡蛋白 BAX 表达,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,进而引起血管平滑肌细胞发生了凋亡。

本研究给予高磷刺激,观察细胞增殖凋亡情况。MTT 结果提示高磷刺激的血管平滑肌细胞增殖显著减弱,流式检测结果提示高磷刺激的血管平滑肌细胞发生了凋亡。有研究表明,高磷可诱导血管平滑肌细胞发生凋亡,与本研究结果一致^[10]。高磷诱导发生凋亡的血管平滑肌细胞中 miR-30b 表达显著降低,促进凋亡蛋白 BAX 表达显著升高,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低。表明 miR-30b 参与了高磷诱导的 VSMCs 的凋亡过程。

miRNAs 是一类小的内源性非编码 RNA,长约 18~24 个核苷酸,具有调控功能,通过调节细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学过程调控血管钙化^[11]。研究发现 miRNA30 家族参与调控血管钙化^[12-13]。有关人结肠癌的研究发现 miR-30b 可诱导细胞周期 G1 的停止和细胞凋亡^[14]。有关人主动脉瓣的研究发现 miR-30b 是主动脉瓣间质细胞的多功能调节

器^[6]。Xu 等^[15]在人肺成纤维细胞 WI-38 细胞实验中,下调 miR-30b 后人肺成纤维细胞 WI-38 细胞的 BAX 表达升高,凋亡增加。有研究证实, BAX 被激活并转移到线粒体,引起线粒体外膜通透化,导致细胞破坏,诱导凋亡^[16]。BAX 和 Bcl-2 是一对正负凋亡调节因子, BAX 起促进凋亡作用, Bcl-2 起抗凋亡作用^[17]。本研究为探究 miR-30b 与 VSMCs 凋亡的关系,给予转染 miR-30b 的抑制物,结果显示,转染 miR-30b 的抑制物后,流式检测结果及 MTT 显示, VSMCs 凋亡细胞增多、增殖显著降低;促凋亡蛋白 BAX 上调、抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显下降,表明 miR-30b 抑制物能够上调 BAX,下调 Bcl-2,促进了 VSMCs 发生凋亡。

综上,本研究在体外实验中发现高磷可促进血管平滑肌细胞发生凋亡,可能机制是通过抑制 miR-30b 表达,促进 BAX 表达,抑制 Bcl-2 表达,进而导致 VSMCs 发生凋亡。

参考文献:

- [1] Modi ZJ, Lu Y, Ji N, et al. Risk of cardiovascular disease and mortality in young adults with end-stage renal disease: an analysis of the US renal data system [J]. JAMA Cardiol, 2019, 4(4): 353-362.
- [2] Wang P, Zhou P, Chen WS, et al. Combined effects of hyperphosphatemia and hyperglycemia on the calcification of cultured human aortic smooth muscle cells [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 863-868.
- [3] 张东雪, 高少辉, 张胜雷. SET8 介导 AKT 信号通路在调控高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化中的作用 [J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36(3): 214-220.
- [4] Croset M, Pantano F, Kan CWS, et al. miRNA-30 family

- members inhibit breast cancer invasion, osteomimicry, and bone destruction by directly targeting multiple bone metastasis-associated genes [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(18): 5259–5273.
- [5] Xu J, Lv H, Zhang B, et al. miR-30b-5p acts as a tumor suppressor microRNA in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(7): 3015–3029.
- [6] Zhang M, Liu X, Zhang X, et al. microRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 147(3): 1073–1080.
- [7] Budoff MJ, Young R, Burke G, et al. Ten-year association of coronary artery calcium with atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) events: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39: 2401–2408.
- [8] 吴奇敏, 张新霞. 非编码 RNA 在血管钙化中的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(11): 955–959, 971.
- [9] Tani T, Fujiwara M, Orimo H, et al. Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improves survival probability in the CKD-MBD mouse model [J]. *J Pathol*, 2020, 250(1): 30–41.
- [10] Cui L, Bai Y, Zhang J, et al. Effects of extracellular acid stimulation on rat vascular smooth muscle cell in Gas6/Axl or PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2016, 38(5): 451–456.
- [11] Gong Y, He Y, Wang H, et al. Silencing of osterix expression by siRNA inhibits aldosterone-induced calcification of vascular smooth muscle cells in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2111–2118.
- [12] Balderman J, Lee H, Mahoney C, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification [J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(6): e003905.
- [13] Bridge G, Monteiro R, Henderson S, et al. The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis [J]. *Blood*, 2012, 120(25): 5063–72.
- [14] Liao W, Ye Y, Zhang N, et al. microRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and Bcl-2 [J]. *J Pathol*, 2014, 232(4): 415–27.
- [15] Xu J, Li H, Lv Y, et al. Silencing XIST mitigated lipopolysaccharide(LPS)-induced inflammatory injury in human lung fibroblast WI-38 cells through modulating miR-30b-5p/CL16 axis and TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Open Life Sci*, 2021, 16(1): 108–127.
- [16] Zhou D, Lai JR. Isolation of synthetic antibodies against BCL-2-associated X protein (BAX) [J]. *Methods Mol Bio*, 2019, 1877: 351–357.
- [17] Zhang Y, Yang X, Ge X, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/BAX/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726–733.

[收稿日期] 2021-09-27