

## microRNA 调节血管钙化

龚海燕, 祖旭宇, 申莹莹, 刘江华

(南华大学附属第一医院内分泌科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] microRNA; 破骨细胞; 血管平滑肌细胞; 血管钙化

[摘要] 在冠状动脉疾病的患者中血管钙化是非常普遍的, 血管钙化与主要不良心血管事件发生有关, 可增加心血管死亡风险。血管钙化的发病机制复杂, 目前公认的是类似于骨骼的形成。血管平滑肌细胞(SMC)转分化为成骨样细胞、钙磷平衡的失调、破骨细胞活性和矿物质吸收能力的降低, 在血管钙化过程中都扮演着不可或缺的角色。最近的研究发现, microRNA(miRNA)作为一个血管钙化的重要调控物, 是通过引起 SMC 复杂的基因重组和其他相关细胞的功能反应而参与这个过程的。本文将详细介绍 miRNA 在血管钙化中的调节作用。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

### MicroRNA Regulate Vascular Calcification

GONG Hai-Yan, ZU Xu-Yu, SHEN Ying-Ying, and LIU Jiang-Hua

(Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] MicroRNA; Osteoclasts; Vascular Smooth Muscle Cell; Vascular Calcification

[ABSTRACT] Vascular calcification is highly prevalent in patients with coronary artery disease and, when present, is associated with major adverse cardiovascular events, including an increased risk of cardiovascular mortality. The pathogenesis of vascular calcification is complex and is now recognized to recapitulate skeletal bone formation. Vascular smooth muscle cells (SMC) play an integral role in this process by undergoing transdifferentiation to osteoblast-like cells, disrupting calcium and phosphate homeostasis, diminishing the activity of osteoclast-like cells with mineral resorbing capacity. Recent advances have identified microRNA (miRNA) as key regulators of this process by directing the complex genetic reprogramming of SMC and the functional responses of other relevant cell types relevant for vascular calcification. This review will detail the regulatory role of miRNA in SMC-mediated vascular calcification.

骨和牙齿之外的非骨性组织发生钙化, 伴或不伴有组织坏死或损伤, 均称为异位钙化。血管钙化是动脉粥样硬化、高血压、糖尿病血管病变、血管损伤和慢性肾病等疾病普遍存在的临床病理表现。动脉钙化是心脑血管疾病高发病率及高死亡率的重要因素之一<sup>[1-2]</sup>, 甚至是一个独立的预测全因死亡率的指标<sup>[3-4]</sup>。动脉粥样硬化血管中的钙化通常局限于内膜斑块, 向上可侵犯血管腔, 呈点状或片状分布<sup>[5]</sup>。血管钙化也发生在血管中膜, 被称为 Monckeberg 中膜硬化, 好发于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)、弹力膜和细胞外

基质<sup>[6]</sup>。

血管钙化过程与骨形成类似, 是一个骨细胞、炎性细胞和血管内皮细胞等参与的多细胞过程, 是主动的、可预防和不可逆转的高度可调控的生物学过程<sup>[7-10]</sup>。该过程部分涉及 VSMC 的基因重组和转分化为成骨样细胞, 还包括细胞外基质钙化、VSMC 骨化过程中凋亡小体或基质囊泡释放, 同时伴随着 VSMC 钙化抑制物丢失, 如基质 Gla 蛋白(matrix gla protein, MGP)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、胎球蛋白 A(fetuin-A, FA)等<sup>[11]</sup>。

血管钙化过程是一个被严格调控的过程, 包括

[收稿日期] 2015-11-05

[修回日期] 2016-01-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81170807)

[作者简介] 龚海燕, 硕士, 住院医师, 研究方向为糖尿病血管钙化, E-mail 为 183071770@qq.com。祖旭宇, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病及其并发症防治、乳腺癌侵袭转移机制, E-mail 为 zuxuyu0108@hotmail.com。申莹莹, 博士, 助理研究员, 研究方向为糖尿病及其并发症防治、肿瘤分析靶向治疗与肿瘤药理学, E-mail 为 shenyinying1113@126.com。通讯作者刘江华, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病及其并发症防治, E-mail 为 jianghua990@126.com。

平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的基因重组、促钙化剂和抑制剂的动态平衡,且有证据支持 miRNA 在血管钙化过程中起着不可或缺的作用。微小 RNA(microRNA, miRNA)是长度约 18~22 个氨基酸的小分子非编码调控 RNA,它通过与靶基因 mRNA 的 3'端非编码区相互配对结合,进而降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 翻译,以在转录后水平负调控靶基因表达<sup>[12]</sup>。越来越多的证据表明,miRNA 几乎参与了人体一切生命活动的调节和所有疾病的发病过程,涉及调控细胞生成、发育、增殖、凋亡、可塑性、表型变化及损伤修复等生理和病理过程。最近的数据证明 miRNA 通过调控几个重要的环节参与血管钙化的细胞过程。本文将概述血管钙化的细胞学和分子学机制,以及 miRNA 在调节血管壁钙化过程中的作用。

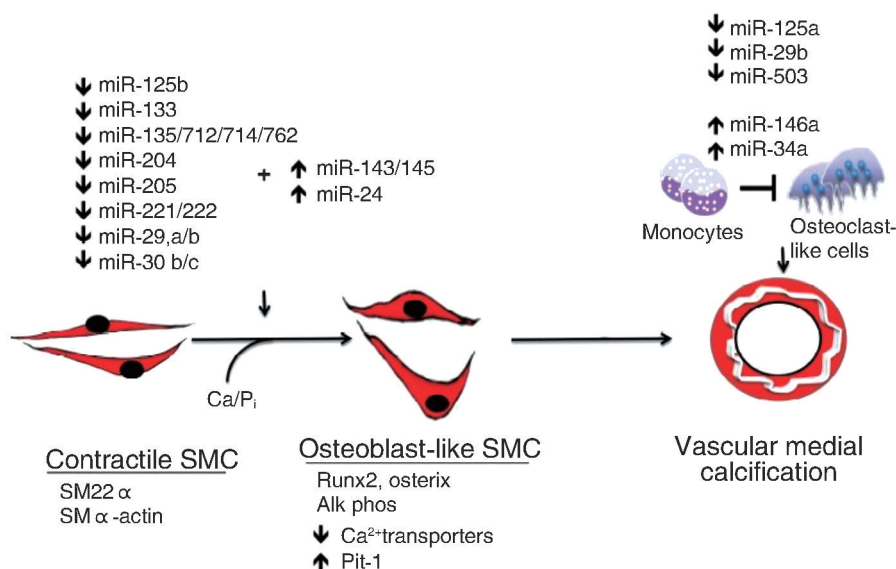
## 1 miRNA 调节 SMC 转分化

SMC 转分化为成骨样细胞形成骨基质促进血管钙化。这些钙化的 SMC 可能含有一个类似于成骨细胞的基因程序,能够利用相同的骨形成机制在血管壁形成原位钙化<sup>[13]</sup>。miRNA 通过调节 Runx2、Osterix 的表达和相关的信号通路在 SMC 分化中发挥不可或缺的作用(图 1)。

一些研究已经确定了 miRNA 与 SMC 体外钙化有关,且这些研究发现参与血管钙化的多种 miRNA

具有相同的靶点。例如,miR-125b 是第一个被认为与人冠状动脉 SMC 钙化相关的 miRNA。SMC 成骨诱导 21 天后,miR-125b 表达下降。下调 miR-125 后,发现其靶基因 Runx2、Osterix 表达增加,碱性磷酸酶活性升高和 SMC 钙化<sup>[12]</sup>。高磷条件下的人主动脉 SMC,3 天后 miR-205 表达有所下降,10 天后下降 50%,且下降发生于 miR-205 的靶基因 Smad1 和 Runx2 表达增加以及细胞钙化之前<sup>[14]</sup>。另有研究发现,靶向 Runx2 的 miRNA(miR-133、miR-204)下调后,在体外可以导致小鼠主动脉 SMC 钙化<sup>[15-16]</sup>。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)家族成员为钙化调控物,BMP2 和 BMP4 是公认的成骨分化因子。BMP 通过受体复合物(I 型和 II 型受体)激活钙化信号,激活 Smad 1/5/8 信号启动 Runx2 转录<sup>[17]</sup>。BMP2 通过下调 miR-30b 和 miR-30c 刺激人冠状动脉 SMC 钙化。这些 miRNA 被认为是结合到 Runx2 的 3'-非翻译端而调节其表达。钙化的人冠状动脉以及钙化狭窄的人主动脉瓣中,miR-30b 是下调的<sup>[18-19]</sup>。miRNA 芯片结果显示,细胞成骨过程中有 22 个下调的 miRNA,包括 miR-133、miR-30 家族以及 miR-135,均靶向 RUNX2 和 Smads<sup>[20]</sup>。此外,研究发现钙化的大鼠 SMC 中 miR-29 a/b 表达减少,miR-29 a/b 通过调节凝血酶敏感蛋白(disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7, ADAMTS-7)、BMP2、p-Smad 1/5/8 和 Runx2 蛋白的表达而参与 SMC 钙化<sup>[21]</sup>。



**图 1. miRNA 调节血管钙化** miRNA 促进 SMC 转分化为成骨样细胞,成骨样细胞能表达主要的成骨转录因子、Runx2、Osterix,也表达 ALP 和骨基质;SMC 转分化的发生伴随着 SMC 收缩蛋白的下调;miRNA 在血管壁抑制破骨细胞生成和破骨细胞的骨吸收能力,促进血管钙化。几个不同的 miRNA 可以调节靶向相同的蛋白和信号通路。

**Figure 1. miRNA regulate vascular calcification**

## 2 miRNA 调节钙磷平衡

钙磷平衡的失调也促进 SMC 分化和血管钙化<sup>[22]</sup>。体内研究发现, Klotho 突变小鼠 (KL/KL) 具有高磷水平, 血管中 Runx2 的表达增加<sup>[23]</sup>。用 miRNA 芯片检测 3 周龄小鼠主动脉中层 miRNA 的表达, KL/KL 小鼠与对照组相比, 17 个 miRNA 表达增加, 3 个 (miR-1、miR-93 和 miR-302b) 下降。KL/KL 小鼠钙化的动脉中 miR-135a、miR-762、miR-714 和 miR-712 较对照组表达水平更高, 这种表达模式在钙和无机磷酸盐处理的 SMC 中被证实。有趣的是, 这 4 个 miRNA 中单独某个 miRNA 上调或下调对 SMC 钙化无影响, 但是同时抑制这 4 个 miRNA 后, 钙含量下降 30%。这得出一个结论: 特定的 miRNA 参与血管钙化且作为一个整体发挥其功能<sup>[24]</sup>。为了明确与 SMC 钙化有关的其他 miRNA, 钙化诱导小鼠主动脉 SMC, 9 天后 miRNA 芯片检测确定了超过 100 个差异性表达的 miRNA。其中, 有几个 miRNA (miR-221/222/2/27a/31) 在体外被证实表达下调。有趣的是, 这些 miRNA 不靶向 Runx2, 而是通过调节核苷酸内焦磷酸酶/磷酸二酯酶 1 和 Pit1 的表达影响磷酸盐代谢<sup>[25]</sup>。

## 3 miRNA 与破骨细胞形成

另一种理论认为, 血管钙化是一个动态的过程, 包括同时发生的成骨细胞的骨基质形成、破骨细胞的骨吸收、破骨样细胞数量的减少和活性的丧失<sup>[26]</sup>。破骨细胞形成和破骨细胞样细胞对血管钙化的贡献仍然存在争议; 然而, 在血管钙化区发现了破骨细胞样细胞, 这表明, 这很可能是血管钙化过程中一个重要的组成部分<sup>[27]</sup>。钙化的血管 SMC 和破骨样细胞之间的联系也被发现。体外研究证实, SMC 转分化成骨样细胞表达 Runx2, Runx2 通过直接与 RANKL 启动子结合, 增加 RANKL 的表达及分泌, 导致骨髓来源的巨噬细胞迁移和分化。这些骨髓来源的巨噬细胞转变为多核抗酒石酸酸性磷酸酶阳性的破骨细胞样细胞。因此, 类似于骨形成, 血管钙化也与破骨细胞形成有关<sup>[28]</sup>。

虽然没有研究直接证明血管钙化时 miRNA 调节单核细胞/巨噬细胞分化为破骨细胞, 但调节破骨细胞功能的 miRNA 在血管钙化中是相互协同的。研究发现, miRNA 与破骨细胞生成和心血管疾病有关。同样, 表达于动脉粥样硬化动脉的 miR-146a, 通过减少抗酒石酸酸性磷酸酶阳性细胞的数量抑

制破骨细胞生成<sup>[29]</sup>。值得注意的是, miR-34a 被确定为一种破骨细胞生成的强效抑制物。miR-34a 基因敲除小鼠骨吸收增加, 骨量减少, 而过表达 miR-34a 的小鼠则出现相反的效果。在体内的研究显示, miR-34a 参与了骨质疏松和恶性肿瘤骨转移, 确定了它的重要调节作用<sup>[22]</sup>。同样, miR-29b 调控钙化 SMC 的 Wnt 信号, 在人破骨细胞形成过程中是逐渐减少的。过表达 miR-29b 通过靶向 Nfatc1、组织蛋白酶 K、基质金属蛋白酶、抗酒石酸酸性磷酸酶和 RANK 调节破骨细胞的生成, 导致骨吸收活性下降和细胞外基质降解<sup>[30]</sup>。

其他的 miRNA 也参与了破骨细胞功能的调节。患有骨质疏松的绝经后妇女破骨细胞活性增加, CD14<sup>+</sup>外周血单核细胞中的 miR-503 是下调的。体外研究证实了 miR-503 靶向破骨细胞受体 RANK, 且由 17 $\beta$ -雌二醇调节<sup>[31]</sup>。因此, 很可能血管钙化时 miR-503 上调, 而破骨细胞减少。外周血单核细胞转化为破骨样细胞的过程中 miR-125a 是下调的。miR-125a 的下调直接导致它的靶基因肿瘤坏死因子受体相关因子 6 表达上调, 这对于破骨细胞的正常功能是至关重要的。此外, 破骨细胞转录因子 Nfatc1 能与 miR-125a 结合并抑制其转录, 从而形成一个反馈回路<sup>[32]</sup>。总之, 有令人信服的证据表明, miRNA 调控破骨细胞的成熟与功能, 由此可以推断出它们能调节血管钙化。

## 4 结 语

血管钙化为一种严重的血管末期病理表现, 与血管功能障碍有关, 是不可逆的。尤其是血管中膜钙化, 好发于动脉粥样硬化、糖尿病和 CKD 患者以及老年人。调节血管中膜钙化的过程尚不完全清楚, 但包括了 SMC 转分化为成骨样细胞, 钙磷平衡紊乱, 再吸收骨基质的破骨样细胞数量或活性减少。这些病理过程包括了由 miRNA 介导的基因重组。miRNA 表达的变化被证明能调节 SMC 和单核细胞转分化为成骨样或破骨样表型。此外, 有些特定的 miRNA 通过时间或细胞特异性的 miRNA 程序调节 SMC 表型转变, 从而诱导钙化。未来的研究将确定这些主要的 miRNA 程序, 并对其进行干预治疗。

### [参考文献]

- [1] Lu Y, Bian Y, Wang Y, et al. Globular adiponectin reduces vascular calcification via inhibition of ER-stress-mediated smooth muscle cell apoptosis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8 (3): 2

- 545-554.
- [2] Patsch JM, Zulliger MA, Vilayphou N, et al. Quantification of lower leg arterial calcifications by high-resolution peripheral quantitative computed tomography[J]. Bone, 2014, 58: 42-47.
- [3] 金波, 尹恒冲, 汪凌清, 等. 平滑肌细胞成骨分化致血管钙化中 MAPK 信号通路基因的表达谱变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17 (20): 3 618-625.
- [4] 刘畅, 吴斌, 李兴岳, 等. 内质网应激在高糖所致血管平滑肌细胞钙化中的作用与机制[J]. 成都医学院学报, 2015, 10 (5): 531-534.
- [5] Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, et al. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis[J]. J Clin Invest, 1994, 94 (4): 1 597-604.
- [6] Zitt E, Knoll F, Lhotka K. Variable mechanisms of vascular calcification in different segments of the arterial tree in patients with chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2014, 86 (4): 858.
- [7] 邵文, 李书国. 血管平滑肌细胞与血管钙化机制的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19 (16): 2 898-901.
- [8] Cho HJ, Cho HJ, Lee HJ, et al. Vascular calcifying progenitor cells possess bidirectional differentiation potentials [J]. PLoS Biol, 2013, 11 (4): e1001534.
- [9] Hjortnaes J, New SE, Aikawa E. Visualizing novel concepts of cardiovascular calcification [J]. Trends Cardiovasc Med, 2013, 23 (3): 71-79.
- [10] Rocha-Singh KJ, Zeller T, Jaff MR. Peripheral arterial calcification: prevalence, mechanism, detection, and clinical implications [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2014, 83 (6): E 212-220.
- [11] Selisko B, Potisopon S, Agred R, et al. Molecular basis for nucleotide conservation at the ends of the dengue virus genome [J]. PLoS Pathog, 2012, 8 (9): e1002912.
- [12] Goettsch C, Rauner M, Pacyna N, et al. MiR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells[J]. Am J Pathol, 2011, 179 (4): 1 594-600.
- [13] Hruska KA. Vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of vascular calcification[J]. Circ Res, 2009, 104 (6): 710-711.
- [14] Qiao W, Chen L, Zhang M. MicroRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33 (6): 1 945-953.
- [15] Liao XB, Zhang ZY, Yuan K, et al. MiR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. Endocrinology, 2013, 154 (9): 3 344-352.
- [16] Cui RR, Li SJ, Liu LJ, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo[J]. Cardiovasc Res, 2012, 96 (2): 320-329.
- [17] Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens[J]. Circ Res, 2011, 109 (5): 564-577.
- [18] Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, 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): e3905.
- [19] Nigam V, Sievers HH, Jensen BC, et al. Altered microRNAs in bicuspid aortic valve: a comparison between stenotic and insufficient valves [J]. J Heart Valve Dis, 2010, 19 (4): 459-465.
- [20] Wu T, Zhou H, Hong Y, et al. MiR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (10): 7 503-511.
- [21] Du Y, Gao C, Liu Z, et al. Upregulation of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7 by miR-29 repression mediates vascular smooth muscle calcification [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32 (11): 2 580-588.
- [22] Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, et al. MiR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgfr2 [J]. Nature, 2014, 512 (7515): 431-435.
- [23] Lim K, Lu TS, Molostvov G, et al. Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23[J]. Circulation, 2012, 125 (18): 2 243-255.
- [24] Gui T, Zhou G, Sun Y, et al. MicroRNAs that target  $Ca^{2+}$  transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification [J]. Lab Invest, 2012, 92 (9): 1 250-259.
- [25] Clement T, Salone V, Charpentier B, et al. Identification of new microRNAs targeting genes regulating the Pi/PPi balance in chondrocytes[J]. Biomed Mater Eng, 2014, 24 (1 Suppl): 3-16.
- [26] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications [J]. Circ Res, 2006, 99 (10): 1 044-059.
- [27] Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21 (12): 1 998-2 003.
- [28] Byon CH, Sun Y, Chen J, et al. Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31 (6): 1 387-396.
- [29] Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, et al. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63 (6): 1 582-590.
- [30] Rossi M, Pitari MR, Amodio N, et al. MiR-29b negatively regulates human osteoclastic cell differentiation and function: implications for the treatment of multiple myeloma-related bone disease [J]. J Cell Physiol, 2013, 228 (7): 1 506-515.
- [31] Chen C, Cheng P, Xie H, et al. MiR-503 regulates osteoclastogenesis via targeting RANK[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29 (2): 338-347.
- [32] Guo LJ, Liao L, Yang L, et al. MiR-125a TNF receptor-associated factor 6 to inhibit osteoclastogenesis[J]. Exp Cell Res, 2014, 321 (2): 142-152.

(此文编辑 文玉珊)