



非编码RNA调控血管平滑肌细胞成骨样表型转化的研究进展

刘可可¹⁾ 曾高峰¹⁾ 江婷²⁾ 王燕^{1)*} 赵国军^{2)*}

(¹⁾ 南华大学附属第二医院, 衡阳 477200; (²⁾ 广州医科大学附属第六医院/清远市人民医院, 清远 511500)

摘要 分化成熟的血管平滑肌主要功能是收缩血管、调节血管周径及血压等。在高磷、高糖、维生素D₃、炎症等因素的作用下, 平滑肌细胞可转分化为成骨样细胞参与血管钙化的形成, 诱发心脑血管不良事件。非编码RNA是经基因转录但不翻译为蛋白质的一类RNA总称, 其通过调控多种细胞活动来参与机体的生理和病理过程。已有研究表明, 非编码RNA可通过调控血管平滑肌细胞成骨样表型转化影响血管钙化的发生、发展。本文从微小RNA、长链非编码RNA、环状RNA几方面综述非编码RNA在血管平滑肌成骨样表型转化中的调节作用, 有助于进一步了解血管钙化的分子机制以及发现防治血管钙化的新靶点。

关键词 非编码RNA, 血管平滑肌细胞, 成骨样表型转化, 成骨相关转录因子

中图分类号 Q522, R543

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0153

血管钙化 (vascular calcification, VC) 是指磷酸钙晶体在血管壁的病理性沉积, 往往预示着心脑血管疾病的不良预后, 甚至有研究认为这种病理改变是心血管发病和死亡的独立危险因素^[1]。VC最初被认为是一个被动的过程, 越来越多的证据显示, 它是一个主动的、类似于骨形成的过程, 并且在该过程中血管壁多种细胞及免疫细胞共同参与、相互作用。

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 作为构成血管壁的主要细胞, 其转分化为成骨样细胞是VC发生、发展的中心环节^[2]。VSMCs在高磷、高糖、维生素D₃、炎症等因素的作用下, 成骨相关转录因子如Runt相关转录因子2 (runt-related transcription factor 2, RUNX2)、Msh同源盒基因2 (msh homeo box 2, MSX2)、Osterix蛋白 (Osterix, Osx) 等表达增加, 从而促进成骨样表型标记物如骨钙素 (osteocalcin, OC)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 等表达升高。同时, 收缩表型

标记物如平滑肌蛋白22 α (smooth muscle protein 22 α , SM22 α)、 α 平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、钙调理蛋白 (calponin, Cap) 等表达下调, 细胞由收缩表型转化为成骨样表型^[3-5]。OC可促进磷酸钙沉积, OPN则使局部环境酸化抑制磷酸钙晶体沉积和VC; BMP可促进成骨相关转录因子的表达^[6], 同时还可抑制抗凋亡蛋白B细胞淋巴瘤2蛋白 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2), 诱导VSMCs凋亡, 释放凋亡小体, 为钙盐沉积提供位点^[7]。ALP可分解钙化抑制物焦磷酸盐, 其表达及活性的增加会导致无机磷和焦磷酸的失衡从而促进VC^[8]。在VSMCs成骨样表型转化过程中还存在一类特殊的酶, 即基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)。MMPs可分解包括弹性蛋白在内的细胞外基质蛋白。弹性蛋白经MMPs分解为可溶性弹性蛋白肽, 其与转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 协

* 通讯联系人。

赵国军. Tel: 13535987467, E-mail: zzhcsu@163.com

王燕. Tel: 13973402796, E-mail: wangyannhfe@163.com

收稿日期: 2020-07-29, 接受日期: 2020-09-15

同作用, 促进成骨标志物的表达, 诱导血管平滑肌细胞成骨样表型转化^[9], 同时细胞外基质的降解为磷酸钙晶体沉积提供位点. 转化后的VSMCs还可以释放基质囊泡, 这些囊泡内含有磷酸钙、ALP、钙化蛋白等, 吸引钙盐沉积导致VC^[10].

非编码RNA (non-coding RNA, ncRNA) 是指不编码蛋白质的RNA, 可通过参与染色体重构、

基因转录及转录后修饰等途径来调控多种重要的生命活动^[11]. ncRNA虽不翻译为蛋白质, 但其可调控合成蛋白质的数量, 充当多种细胞功能的调节器. 越来越多的证据显示ncRNA主要通过调控成骨转录因子的表达来参与VSMCs成骨样表型转化(图1).

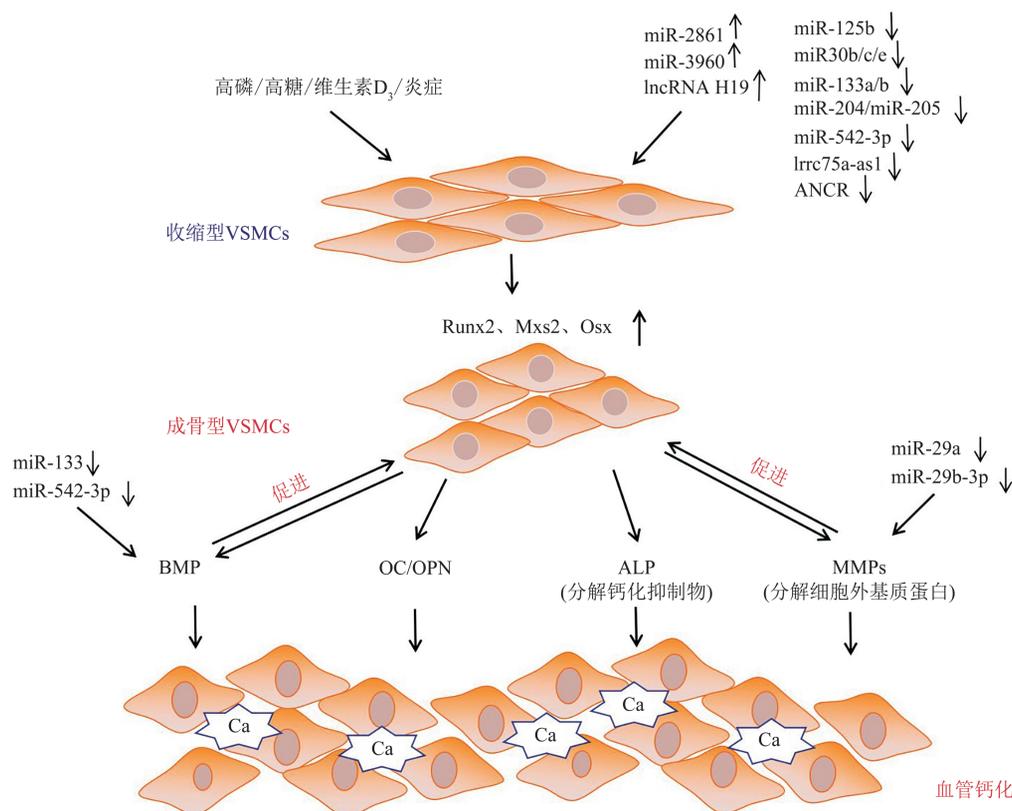


Fig. 1 ncRNA regulates the osteoblast-like phenotype transformation of VSMCs

图1 ncRNA调控VSMCs成骨样表型转化

在VSMCs成骨样表型转化过程中, 成骨相关转录因子 (Runx2、Mxs2、Osx) 表达增加, 促进成骨特异性蛋白 (OC、OPN、BMP、ALP) 及MMPs的表达, 进而诱导VC. 在该过程中BMP和MMPs又可促进成骨相关转录因子的表达. ncRNA则主要通过直接或间接作用促进或抑制成骨相关转录因子的表达调控VSMCs成骨样表型转化. ANCR: 抗分化非编码RNA; Runx2: Runt相关转录因子2; Mxs2: msh同源盒基因2; Osx: Osterix蛋白; OC: 骨钙素; OPN: 骨桥蛋白; BMP: 骨形态发生蛋白; ALP: 碱性磷酸酶; MMPs: 基质金属蛋白酶.

1 miRNA调控VSMCs成骨样表型转化

微小RNA (microRNA, miRNA) 作为ncRNA的一种, 长度约为20~24个核苷酸, 主要参与基因转录后调节. 它与靶基因mRNA的3'端非编码区完全或不完全结合来降解mRNA或抑制mRNA翻译, 阻遏靶基因的表达^[12]. 研究表明, miRNA靶向调控成骨相关转录因子的表达, 在调节VSMCs成骨样表型转化中起着不可或缺的作用.

1.1 miRNA促进VSMCs成骨样表型转化

1.1.1 miR-221/miR-222

miR-221/miR-222可诱导VSMCs由收缩表型转换为增殖、迁移相关的合成表型, 并促进VC的发生、发展^[13]. 用miR-221和miR-222单独或联合转染高磷酸盐培养的VSMCs时, 其钙沉积呈时间依赖性不断增加, 尤其是联合转染时, 其钙沉积是单独转染的两倍, 这提示miR-221和miR-222可协同改变VSMCs的表型, 加快VC的发展^[14]. 该研究

还发现, miR-221/miR-222可能通过调控外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1, ENPP1) 和III型钠依赖型PI共转运蛋白1 (type III sodiumdependent Pi cotransporter-1, Pit-1) 的表达参与构成细胞内高磷环境诱导VSMCs成骨样表型转化及VC。

1.1.2 miR-3960/miR-2861

Runx2作为成骨细胞的特异性转录因子参与组织的形成和重建。有研究显示Runx2/miR-3960/miR-2861调节反馈环在成骨细胞分化中发挥着重要作用^[15]。Xia等^[16]发现,在β甘油磷酸钠诱导VSMCs向成骨样细胞分化过程中,miR-2861和miR-3960表达显著增加,并且在过表达miR-3960/miR-2861的细胞中ALP活性、OC分泌和Runx2表达也显著增加。在该过程中miR-2861和miR-3960通过靶向抑制Runx2降解促进剂组蛋白去乙酰化酶5 (histone deacetylase 5, HDAC5) 及Runx2表达抑制因子同源异形盒A2 (homeobox A2, HOXA2) 的表达间接上调Runx2的表达来诱导VSMCs成骨样表型转化。反过来,过表达Runx2可诱导VSMCs中miR-2861和miR-3960的表达,用转染技术特异性沉默Runx2的表达,miR-2861和miR-3960的表达也随之下降。由此可见,Runx2/miR-3960/miR-2861调节反馈环也在VSMCs成骨样表型转化中起着重要作用,并促进VC。

1.2 miRNA抑制VSMCs成骨样表型转化

1.2.1 miR-29

miR-29家族可作用于降解细胞外基质蛋白的MMPs抑制VSMCs成骨样表型转化。Du等^[17]发现,miR-29a/b靶向7型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7, ADAMT-7) 抑制软骨寡聚基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP) 降解及BMP-2的活性,进而减少VSMCs成骨样表型转化及VC。同时,miR-29b-3p可靶向MMP-2抑制维生素D₃诱导的VSMCs成骨样表型转化及钙盐沉积^[18]。然而关于miR-29b抑制VSMCs成骨样表型转化的观点仍有争议,有研究发现其可通过抑制弹性蛋白及抗成骨分化因子的表达促进高磷诱导的VSMCs成骨样表型转化^[19-20]。目前尚无确切的机制来解释这一争议,考虑可能与不同方式诱导VC的机制不同。以上研究也提示,特定的miRNA可以靶向调控多

种mRNA,并且特定的mRNA可能包含多个miRNA的结合位点,同时这也反映了miRNA调控VSMCs成骨样表型转化机制的复杂性。

1.2.2 miR-125b

miR-125b是调节细胞增殖和分化最典型的miRNAs之一。有研究表明,它通过抑制细胞增殖负向调控成骨细胞的分化^[21]。Wen等^[22]试图明确其在VSMCs成骨样表型转化中的作用,β甘油磷酸钠处理大鼠主动脉VSMCs导致其钙化过程中,miR-125b表达显著降低,核心结合因子β1、OC和OPN表达增加,SM22α表达降低。而过表达miR-125b,OC和OPN表达下调,SM-22α蛋白表达上调,大鼠主动脉VSMCs钙沉积减少。此外,miR-125b可抑制E26转录因子 (E26 transformation specific -1, Ets1) 的表达,而Ets1基因敲除阻断了大鼠主动脉VSMCs向成骨样细胞转化,由此推测,miR-125b可能通过下调Ets1的表达减少VSMCs成骨样表型转化。经荧光素酶报告分析证实了以上推测。该研究也在临床上进行了验证,尿毒症患者桡动脉钙化组织中miR-125b表达降低;同时又有研究显示,终末期肾病患者血清miR-125b水平与VC的程度成反比,并且血清miR-125b水平可预测VC的进展^[23-24]。由此可见,miR-125b是参与调控VSMCs成骨样表型转化的重要分子及评估VC程度、预测其远期预后的一个有效生物学标志物。

1.2.3 miR-30

miR-30家族可抑制Runx2的表达减少VSMCs成骨样表型转化。Balderman等^[25]发现,miR-30b/miR-30c作用于Runx2 mRNA的3'端非编码区来抑制Runx2的表达,阻遏VSMCs成骨样表型转化。miR-30e则通过下调胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor, IGF) 的表达抑制VSMCs成骨样表型转化^[26]。目前尚无关于miR-30a调控VSMCs成骨样表型转化及VC的研究,但有研究表明,miR-30a可调控人脐静脉内皮细胞成骨样转化^[27]。

1.2.4 miR-133

miR-133是维持VSMCs正常表型的重要分子,可直接作用于BMP-2抑制VSMCs成骨样表型转化^[28],同时还可靶向调控BMP下游介质的表达来维持VSMCs的收缩表型。在β甘油磷酸钠诱导的VSMCs钙化过程中,miR-133a表达下降。而过表达miR-133a,VSMCs钙盐沉积减少。miR-133a通过与Runx2 mRNA的3'非编码区域结合,下调

Runx2的表达从而抑制ALP活性及OC分泌,维持VSMCs正常表型减轻VC^[29].除了miR-133a,miR-133b也可靶向调控Runx2的表达抑制VSMCs成骨样表型转化^[20].由此可见,miR-133家族在VSMCs向成骨样细胞转分化过程中起着重要的调节作用.

1.2.5 miR-204/miR-205

miR-204可通过下调Runx2的表达抑制小鼠主动脉VSMCs成骨样表型转化和VC^[30].miR-205与miR-204作用类似,也可通过靶向调控Runx2的表达来减少HASMCs成骨样表型转化及VC.在高磷酸诱导人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells, HASMCs)钙化的过程中,miR-205表达下降.过表达miR-205,ALP活性、OC分泌和Runx2表达则降低,同时还可抑制HASMCs向成骨样细胞分化^[31].反之抑制miR-205的表达,则促进HASMCs向成骨样细胞分化.miR-204和miR-205同样也可调节成骨细胞分化及骨形成,这就侧面印证了VC与骨形成可能有共同的信号通路,为研究VC疾病的相关机制及治疗提供新的思路.

1.2.6 miR-542-3p

BMP是一组具有诱导骨和软骨形成的蛋白质.在幼龄小鼠的VSMCs中过表达miR-542-3p能抑制 β 甘油磷酸钠诱导的VSMCs成骨样表型转化及钙盐沉积.此外,在过表达miR-542-3p的细胞中过表达BMP-7,OPN和Runx2表达明显升高,SM22 α 和Cap表达显著下降,钙盐沉积增加,同时VSMCs由收缩表型转化为成骨样表型.荧光素酶报告基因检测显示miR-542-3p能靶向调控BMP-7的表达^[32].上述结果提示miR-542-3p可靶向调控BMP-7的表达抑制VSMCs成骨样表型转化.

1.2.7 miRNA-145

miRNA-145参与VSMCs的增殖、分化和表型转化,是维持VSMCs收缩表型的重要分子^[33].Chen等^[34]在3/4期慢性肾病患者的血液标本中发现,miR-145的表达下降.体外实验发现,慢性肾病大鼠钙化的胸主动脉组织内miR-145的表达也下降,同时参与维持VSMCs收缩表型的重要转录因子心肌素(myocardin, MYOCD)的表达也下调.另外有研究表明,miR-145通过解除Krüppel样因子5(Krüppel-like factor 5, KLF5)对MYOCD产生抑制从而维持VSMCs收缩表型^[35].因此在VC的过程中,MYOCD表达随着miR-145表达的下调而下调,提示miR-145可通过增加MYOCD的表达

来维持收缩表型.

综上所述,多种miRNA都可调控VSMCs成骨样表型转化,miR-29家族作用于细胞外基质调控VSMCs成骨样表型转化,miR-3960/miR-2861、miR-125b、miR-30b/c/e、miR-133a/b、miR-204/miR-205、miR-542-3p则通过作用于成骨相关转录因子或其上、下游介质发挥作用.这些基础实验结果为临床研究提供了方向.Lee等^[36]发现,VC的患者与无VC的患者相比,miR-29a/b、miR-223水平升高,并且miR-29a与血管钙化的严重程度显著相关;Chen等^[37]认为,慢性肾脏病患者血管重构异常是心血管疾病的危险因素,同时VSMCs的表型转化又在血管重构中发挥着重要的作用,于是他们检测了90例慢性肾脏病3/4期患者循环中参与调控VSMCs表型转化的miRNA:miR-125、miR-145、miR-155水平,发现慢性肾脏病较正常患者组低,并且随着肾小球滤过率的下降而下降;在动物实验中也发现了类似的结果.这些临床研究为miRNA作为一种血管钙化甚至心血管疾病的生物学标志物提供了希望.

miRNA除了通过靶向成骨分化相关转录因子的表达来诱导VSMCs成骨样转化及VC外,还可从以下方面调控VC,如miR-135a、miR-762、miR-714及miR-712作用于钙离子通道,抑制钙外排,从而造成VSMCs钙沉积^[38].MiR-223的过表达可促进RAW 264.7(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)向破骨样细胞分化来抑制VC^[39].

2 其他非编码RNA调控VSMCs成骨样表型转化

2.1 长链非编码RNA

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于200个核苷酸的ncRNA,可以从以下几个方面实现对基因表达的调控:a.在表观遗传学水平,lncRNA通过改变染色体构象、组蛋白修饰及DNA甲基化调控基因的表达;b.在转录水平,lncRNA可作为顺式作用元件,干扰基因的转录,影响mRNA的表达,此外,lncRNA还可以与转录因子结合使其无法与目标基因结合,从而抑制目标基因的转录;c.在转录后水平,lncRNA可与mRNA的3'非编码区结合,直接调控基因的表达,也可通过“分子海绵”作用间接调控基因的表达^[40].miRNA可与含有相应miRNA反应元件(miRNA response element, MRE)的RNA分

子相互作用, 从而在转录后水平抑制RNA分子的表达及活性. MRE不单单只存在于mRNA中, 在lncRNA、环状RNA (circular RNA, circRNA) 及假基因的序列中也同样存在. 这些具有相同MRE的RNA分子可竞争性与miRNA结合从而抑制miRNA与靶基因mRNA结合, 间接调控靶基因的表达. 这些具有相同MRE的RNA分子统称为竞争性内源性RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA), 这种竞争性结合miRNA的作用被称为miRNA海绵作用^[41]. 同时还有研究发现一些lncRNA在细胞内经剪切作用形成miRNA的前体. 虽对lncRNA的研究在不断增加, 但lncRNA调控VSMCs成骨样表型转化的研究较少.

2.1.1 lncRNA抑制VSMCs成骨样表型转化

研究发现lrrc75a反义lncRNA1 (lrrc75a antisense RNA1, lrrc75a-as1) 可以减少A10细胞 (来自血管平滑肌的细胞系) 中的钙沉积, 而敲除lrrc75a-as1基因增加了A10细胞的钙沉积. 过表达lrrc75a-as1可显著降低成骨相关因子Runx2和BMP-2的表达水平, 使VSMCs表型从成骨样表型转变为收缩表型, 并减少钙盐沉积^[42]. 由此可见lrrc75a-as1可通过抑制VSMCs成骨样表型转化改善VC.

抗分化非编码RNA (anti-differentiation non-coding RNA, ANCR) 作为抑制成骨分化的ncRNA之一^[43-44], 也可负向调控VSMCs成骨样转化. 用 β 甘油磷酸钠诱导小鼠VSMCs成骨样表型转化过程中, ANCR的表达下调, Runx2及BMP-2的表达上调, 细胞内可见明显的钙化结节. 过表达ANCR可抑制Runx2及BMP-2的表达, 同时VSMCs钙化也显著减少^[45].

2.1.2 lncRNA促进VSMCs成骨样表型转化

lncRNA H19可通过调控成骨分化相关因子的表达来促进间充质细胞分化为成骨细胞^[46-47], 最近有研究显示其也参与了VC中“成骨分化”. 研究显示, lncRNA H19通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路调控Runx2的表达诱导VSMCs成骨样表型转化促进VC^[48].

Yu等^[49]发现, lncRNA TUG1作为分子海绵, 通过碱基配对“吸附”miR-204-5p, 抑制miR-204-5p与Runx2 mRNA结合使其免于被降解, 上调Runx2的表达, 从而导致主动脉瓣间质细胞成骨样分化及瓣膜钙化. 同时有研究显示TUG1可作为

miR-133a的分子海绵抑制其表达^[50], 那么lncRNA TUG1是否可以通过抑制miR-204-5p或miR-133a对Runx2 mRNA的降解引起平滑肌细胞成骨样表型转化及VC, 还需更深一步的实验验证.

lncRNA ES3可作为ceRNA参与VSMCs钙化. Lin等^[51]发现, lncRNA ES3可介导高糖诱导的VSMCs钙化. lncRNA ES3可竞争性结合miR-34c-5p, 增强miR-34c-5p靶基因BMP的表达, 促进VSMCs钙化. 随着对lncRNA ES3研究的进一步加深, 发现在高糖条件下其还可充当miR-95-5p、miR-6776-5p、miR-3620-5p和miR-4747-5p的ceRNA诱导VSMCs钙化^[52]. 由此可见, lncRNA ES3在高糖条件下调控VSMCs钙化可能为糖尿病条件下心血钙化的诊疗提供新的靶点.

2.2 circRNA

circRNA是一类具有闭合环状结构的ncRNA分子, 没有5'帽子结构和3' poly (A) 结构, 根据其形成方式及来源不同分为3种类型: 外显子来源的circRNA (exonic circRNA, ecircRNA)、内含子来源的circRNA (circularintronic RNA, ciRNA)、外显子-内含子circRNA (exonic-intronic circRNA, EiciRNA). 除了常见的miRNA海绵作用, circRNA特殊的结构使其具有许多特殊的功能: circRNA的成环和mRNA的剪切几乎共享相同的剪切位点, 两者相互竞争, 相互制约, 保持两者之间的平衡; 可作为蛋白质海绵, 充当蛋白质支架; 在特定条件下具有编码功能, 可翻译为多肽^[53]. 尽管已鉴定出多种circRNA, 但circRNA在VSMCs成骨样表型转化的研究进展不大. 最近也有一项关于VC的研究. 研究显示, circSamd4a在正常和钙化的大鼠VSMCs中表达有差异. 当沉默circSamd4a时, VC程度加重, 反之则减轻. 经分析验证miR-125a-3p和miR-483-5p是circSamd4a的靶标, 而后经钙分析实验显示转染miR-125a-3p和miR-483-5p可增加VSMCs钙盐沉积, 而过表达circSamd4a后可减轻VSMCs钙盐沉积. 由此表明, circSamd4a可作为分子海绵“吸附”miR-125a-3p和miR-483-5p抑制VSMCs钙化. 由RNA测序数据分析发现, 钙调素调节蛋白相关蛋白家族成员2 (calmodulin regulated spectrin-associated protein family member 2, Camsap2) 及细丝蛋白A (filaminA, FlnA) 是miR-125a-3p和miR-483-5p的靶基因, 并通过荧光素酶报告实验验证了这一点. 当Camsap2或FlnA表达被siRNA抑制时,

VSMCs 钙盐沉积增加, 而过表达 circSamd4a, VSMCs 钙盐沉积减少, 考虑是 circSamd4a 抑制 miR-125a-3p 和 miR-483-5p 的结果^[54]. 综上所述, circSamd4a 可以作为分子海绵“吸附” miR-125a-3p 和 miR-483-5p, 从而解除其对 Camsap2 及 FlnA 的抑制作用, 促进 Camsap2 及 FlnA 基因的表达阻遏 VC 的发展.

3 结 语

ncRNA 在 VSMCs 成骨样表型中的作用越来越受到人们重视, 本文对参与调控 VSMCs 成骨样表型转化的 ncRNA 进行了归纳总结 (表1). miRNA

主要通过调控成骨相关转录因子的表达、钙磷代谢、细胞外基质降解来发挥作用, lncRNA 和 circRNA 则作为 ceRNA, 抑制 miRNA 对 mRNA 的作用, 形成 lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA 轴. 尽管 VSMCs 成骨样表型转化的研究目前有一定进展, 但还有很多问题亟待解决, 如: 不同诱导条件下成骨样表型的转化是否有共通的机制? 同一 ncRNA 在不同诱导条件下的作用是否有差异? 多种 ncRNA 都可作用于 Runx2 mRNA, 哪个或哪些发挥关键作用? miRNA 对 VSMCs 成骨样表型转化的研究较多, 然而, lncRNA/circRNA 作为 miRNA 的“分子海绵”, 必定会发挥相应作用, 而此部分内容

Table 1 Mechanisms of ncRNA involved in the osteoblast-like phenotype transformation of VSMCs

表1 ncRNA参与VSMCs成骨样表型转化的机制

ncRNA	诱导条件	钙化模型	VSMCs成骨 样表型转化	作用机制	参考文献
miR-221/222	β甘油磷酸钠、维生素C	原代小鼠VSMCs	促进	上调Enpp1和Pit-1的表达	[14]
miR-2861	β甘油磷酸钠	小鼠原代主动脉VSMCs	促进	下调HDAC5的表达	[16]
miR-3960	β甘油磷酸钠	小鼠原代主动脉VSMCs	促进	下调HOXA2的表达	[16]
miR-29a/b	氯化钙	大鼠VSMCs、尿毒症大鼠VSMCs、 尿毒症患者VSMCs	抑制	下调ADAMTS-7的表达	[17]
miR-29b-3p	维生素D ₃	大鼠VSMCs、大鼠钙化动脉	抑制	下调MMP的表达	[18]
miR-29b	无机磷酸盐	人VSMCs	促进	下调弹性蛋白的表达	[19]
	高磷膳食、尿毒症大鼠 血清、高磷培养基	原代大鼠动脉SMCs、肾切除大鼠的 钙化血管	促进	下调HDAC4、CTNBP1、 ACVR2A的表达	[20]
miR-125b	β甘油磷酸 高磷酸盐	原代大鼠动脉SMCs 大鼠动脉SMCs、慢性肾病大鼠的 钙化血管、终末期肾病患者血清	抑制 抑制	下调Est1的表达 下调Runx2和OC的表达	[22] [23-24]
miR30b/c	BMP-2	人冠状动脉SMCs	抑制	下调Runx2的表达	[25]
miR-30e	β甘油磷酸钠、维生素C	小鼠动脉SMCs、Apo E ^{-/-} 小鼠主动脉	抑制	下调IGF的表达	[26]
miR-133a	β甘油磷酸钠	小鼠动脉SMCs、Apo E ^{-/-} 小鼠主动脉	抑制	下调Runx2的表达	[29]
miR-133b	高磷膳食、尿毒症大鼠 血清、高磷培养基	原代大鼠动脉SMCs、肾切除大鼠的 钙化血管	抑制	下调Runx2的表达	[20]
miR-204	β甘油磷酸钠、维生素D ₃	小鼠动脉SMCs、小鼠主动脉	抑制	下调Runx2的表达	[30]
miR-205	β甘油磷酸钠	人动脉SMCs	抑制	下调Runx2和Smad1的表达	[31]
miR-542-3p	β甘油磷酸钠	大鼠VSMCs	抑制	下调BMP-7的表达	[32]
lrrc75a-as1	无机磷酸盐	A10细胞	抑制	抑制Runx2及BMP-2的表达	[42]
lncRNA ANCR	β甘油磷酸钠	小鼠VSMCs	抑制	抑制NF-κB的活化及Runx2和 BMP-2的表达	[45]
lncRNA H19	β甘油磷酸钠	VSMCs	促进	促进Runx2的表达	[48]

VSMCs: 血管平滑肌细胞; SMCs: 平滑肌细胞; Enpp1: 外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1; Pit-1: III型钠依赖型PI共转运蛋白1; HDAC5: 组蛋白去乙酰化酶5; Hoxa2: 同源异形盒A2; ADAMT-7: 7型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶; MMP-2: 基质金属蛋白酶2; HDAC4: 组蛋白去乙酰化酶4; CTNBP1: 连环蛋白β互动蛋白1; ACVR2A: II型激活素A受体; Est1: E26转录因子; Runx2: Runt相关转录因子2; BMP-2: 骨形态发生蛋白2; IGF: 胰岛素样生长因子; Smad1: Smad蛋白1; BMP-7: 骨形态发生蛋白7; NF-κB: 核因子κB.

研究太少. 鉴于调控 VSMCs 成骨样表型转化机制的复杂性及所涉及的 ncRNA 种类较多, 还需要更多的研究来筛选确定最佳 ncRNA 用于检测及防治 VC. 深入探讨 VSMCs 转成骨样表型转化的机制及 ncRNA 在其中的作用, 将为 ncRNA 作为早期 VC 及预测心血管疾病预后的生物学标志物及治疗 VC 的靶点提供更完善的依据.

参 考 文 献

- [1] 孙学娇, 刘乃丰. 关注糖尿病与 VC 的共同发病机制和临床意义. 中国动脉硬化杂志, 2020, **28**(2): 169-174
Sun X J, Liu N F. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2020, **28**(2): 169-174
- [2] Hou Y C, Lu C L, Yuan T H, *et al.* The epigenetic landscape of vascular calcification: an integrative perspective. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(3): 980
- [3] Goettsch C, Hutcheson J, Aikawa E J C R. MicroRNA in cardiovascular calcification: focus on targets and extracellular vesicle delivery mechanisms. *Circ Res*, 2013, **112**(7): 1073-1084
- [4] Kurozumi A, Nakano K, Yamagata K, *et al.* IL-6 and sIL-6R induces STAT3-dependent differentiation of human VSMCs into osteoblast-like cells through JMJD2B-mediated histone demethylation of RUNX2. *Bone*, 2019, **124**: 53-61
- [5] Yang T, Guo L, Chen L, *et al.* A novel role of FKN/CX3CR1 in promoting osteogenic transformation of VSMCs and atherosclerotic calcification. *Cell Calcium*, 2020, **91**: 102265
- [6] Zhao Y G, Meng F X, Li B W, *et al.* Gelatinases promote calcification of vascular smooth muscle cells by up-regulating bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, **470**(2): 287-293
- [7] 崔源源, 王欣, 赵福海. 血管平滑肌细胞表型转化及相关机制. 心血管病学进展, 2018, **39**(6): 900-903
Cui Y Y, Wang X, Zhao F H. *Advances in Cardiovascular Diseases*, 2018, **39**(6): 900-903
- [8] Rattazzi M, Bertacco E, Iop L, *et al.* Extracellular pyrophosphate is reduced in aortic interstitial valve cells acquiring a calcifying profile: implications for aortic valve calcification. *Atherosclerosis*, 2014, **237**(2): 568-576
- [9] Sinha A, Vyavahare N R. High-glucose levels and elastin degradation products accelerate osteogenesis in vascular smooth muscle cells. *Diab Vasc Dis Res*, 2013, **10**(5): 410-419
- [10] Disthabanchong S, Srisuwan P. Mechanisms of vascular calcification in kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2019, **26**(6): 417-426
- [11] Cech T R, Steitz J A. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 2014, **157**(1): 77-94
- [12] Szelenberger R, Kacprzak M, Saluk-Bijak J, *et al.* Plasma MicroRNA as a novel diagnostic. *Clin Chim Acta*, 2019, **499**: 98-107
- [13] Chistiakov D A, Sobenin I A, Orekhov A N, Bobryshev Y V. Human miR-221/222 in physiological and atherosclerotic vascular remodeling. *Biomed Res Int*, 2015, **2015**: 354517
- [14] Mackenzie N C, Staines K A, Zhu D, *et al.* miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem Funct*, 2014, **32**(2): 209-216
- [15] Hu R, Liu W, Li H, *et al.* A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, 2011, **286**(14): 12328-12339
- [16] Xia Z Y, Hu Y, Xie P L, *et al.* Runx2/miR-3960/miR-2861 positive feedback loop is responsible for osteogenic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells. *Biomed Res Int*, 2015, **2015**: 624037
- [17] 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, **32**(11): 2580-2588
- [18] Jiang W, Zhang Z, Yang H, *et al.* The involvement of miR-29b-3p in arterial calcification by targeting matrix metalloproteinase-2. *BioMed Res Int*, 2017, **2017**: 6713606
- [19] Sudo R, Sato F, Azechi T, *et al.* MiR-29-mediated elastin down-regulation contributes to inorganic phosphorus-induced osteoblastic differentiation in vascular smooth muscle cells. *Genes Cells*, 2015, **20**(12): 1077-1087
- [20] Panizo S, Naves-Diaz M, Carrillo-Lopez N, *et al.* MicroRNAs 29b, 133b, and 211 regulate vascular smooth muscle calcification mediated by high phosphorus. *J Am Soc Nephrol*, 2016, **27**(3): 824-834
- [21] Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, *et al.* miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **368**(2): 267-272
- [22] Wen P, Cao H, Fang L, *et al.* miR-125b/Ets1 axis regulates transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells in a high-phosphate environment. *Exp Cell Res*, 2014, **322**(2): 302-312
- [23] Chao C T, Yuan T H, Yeh H Y, *et al.* Risk factors associated with altered circulating microRNA-125b and their influences on uremic vascular calcification among patients with end-stage renal disease. 2019, **8**(2): e010805
- [24] Chao C T, Liu Y P, Su S F, *et al.* Circulating microRNA-125b predicts the presence and progression of uremic vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, **37**(7): 1402-1414
- [25] Balderman J A, Lee H Y, Mahoney C E, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc*, 2012, **1**(6): e003905
- [26] Ding W, Li J, Singh J, *et al.* miR-30e targets IGF2-regulated osteogenesis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells, aortic smooth muscle cells, and ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc Res*, 2015, **106**(1): 131-142
- [27] Vasuri F, Ciavarella C, Fittipaldi S, *et al.* Different histological types of active intraplaque calcification underlie alternative

- miRNA-mRNA axes in carotid atherosclerotic disease. *Virchows Arch*, 2020, **476**(2): 307-316
- [28] 李莎, 胡明亮. MiR-133a 调控 BMP-2 诱导的血管平滑肌细胞向成骨样细胞分化的机制. *南昌大学学报(医学版)*, 2018, **58**(5): 21-25, 39
- Li S, Hu M L. *Acta Academiae Medicinae Jiangxi*, 2018, **58**(5): 21-25, 39
- [29] Liao X B, Zhang Z Y, Yuan K, *et al.* MiR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 2013, **154**(9): 3344-3352
- [30] Cui R R, Li S J, Liu L J, *et al.* MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification *in vitro* and *in vivo*. *Cardiovasc Res*, 2012, **96**(2): 320-329
- [31] Qiao W, Chen L, Zhang M. MicroRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem*, 2014, **33**(6): 1945-1953
- [32] Liu H, Wang H, Yang S, *et al.* Downregulation of miR-542-3p promotes osteogenic transition of vascular smooth muscle cells in the aging rat by targeting BMP7. *Hum Genomics*, 2019, **13**(1): 67
- [33] Vacante F, Denby L, Sluimer J C, *et al.* The function of miR-143, miR-145 and the MiR-143 host gene in cardiovascular development and disease. *Vascul Pharmacol*, 2019, **112**: 24-30
- [34] Chen N X, Kiattisunthorn K, O'neill K D, *et al.* Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease (CKD). *PLoS One*, 2013, **8**(5): e64558
- [35] Zhang Y N, Xie B D, Sun L, *et al.* Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the 'normal region' of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145. *J Cell Mol Med*, 2016, **20**(6): 1049-1061
- [36] Lee C-T, Lee Y-T, Tain Y-L, *et al.* Circulating microRNAs and vascular calcification in hemodialysis patients. *Journal of International Medical Research*, 2019, **47**(7): 2929-2939
- [37] Chen N X, Kiattisunthorn K, O'neill K D, *et al.* Decreased microRNA is involved in the vascular remodeling abnormalities in chronic kidney disease (CKD). *Plos One*, 2013, **8**(5): e64558
- [38] Gui T, Zhou G, Sun Y, *et al.* MicroRNAs that target Ca(2+) transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification. 2012, **92**(9): 1250-1259
- [39] M'baya-Moutoula E, Louvet L, Metzinger-Le Meuth V, *et al.* High inorganic phosphate concentration inhibits osteoclastogenesis by modulating miR-223. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1852**(10 Pt A): 2202-2212
- [40] 胡铭阳, 明佳. lncRNA 与 miRNA 相互调控机制的研究进展. *转化医学电子杂志*, 2017, **4**(2): 71-76
- Hu M Y, Ming J. *E-Journal of Translational Medicine*, 2017, **4**(2): 71-76
- [41] Thomson D W, Dinger M E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat Rev Genet*, 2016, **17**(5): 272-283
- [42] Jeong G, Kwon D H, Shin S, *et al.* Long noncoding RNAs in vascular smooth muscle cells regulate vascular calcification. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 5848
- [43] Liu Z C, Xu Y L, Jiang Y, *et al.* Low-expression of lncRNA-ANCR promotes tibial fracture healing *via* targeting RUNX2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, **23**(3 Suppl): 60-66
- [44] Cai N, Li C, Wang F. Silencing of lncRNA-ANCR promotes the osteogenesis of osteoblast cells in postmenopausal osteoporosis *via* targeting EZH2 and RUNX2. *Yonsei Med J*, 2019, **60**(8): 751-759
- [45] 陈秀鹏, 孙琳, 张正军, *et al.* 长链非编码 RNA-ANCR 对小鼠血管平滑肌细胞成骨样分化的影响. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2017, **10**(3): 252-259
- Chen X J, Sun L, Zhang Z J, *et al.* *Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research*, 2017, **10**(3): 252-259
- [46] Gan X, Liu S, Liang K. MicroRNA-19b-3p promotes cell proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs by interacting with lncRNA H19. *BMC Med Genet*, 2020, **21**(1): 11
- [47] Gong Y Y, Peng M Y, Yin D Q, *et al.* Long non-coding RNA H19 promotes the osteogenic differentiation of rat ectomesenchymal stem cells *via* Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, **22**(24): 8805-8813
- [48] Liu F, Yang X C, Chen M L, *et al.* lncRNA H19/Runx2 axis promotes VSMCs transition *via* MAPK pathway. 2020, **12**(4): 1338-1347
- [49] Yu C, Li L, Xie F, *et al.* lncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote osteoblast differentiation through upregulating Runx2 in aortic valve calcification. *Cardiovasc Res*, 2018, **114**(1): 168-179
- [50] Zhang L, Cheng H, Yue Y, *et al.* TUG1 knockdown ameliorates atherosclerosis *via* up-regulating the expression of miR-133a target gene FGF1. *Cardiovasc Pathol*, 2018, **33**: 6-15
- [51] Lin X, Zhan J, Zhong J, *et al.* lncRNA-ES3/miR-34c-5p/BMF axis is involved in regulating high-glucose-induced calcification/senescence of VSMCs. *Aging (Albany NY)*, 2019, **11**(2): 523-535
- [52] Zhong J Y, Cui X J, Zhan J K, *et al.* lncRNA-ES3 inhibition by Bhlhe40 is involved in high glucose-induced calcification/senescence of vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, **1474**(1): 61-72
- [53] Li J, Sun D, Pu W, *et al.* Circular RNAs in cancer: biogenesis, function, and clinical significance. *Trends Cancer*, 2020, **6**(4): 319-336
- [54] Ryu J, Kwon D H, Choe N, *et al.* Characterization of circular RNAs in vascular smooth muscle cells with vascular calcification. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, **19**: 31-41

Research Progress of Non-coding RNA Regulates Osteoblast-like Phenotype Transformation of Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Ke-Ke¹⁾, ZENG Gao-Feng¹⁾, JIANG Ting²⁾, WANG Yan^{1)*}, ZHAO Guo-Jun^{2)*}

¹⁾The Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 477200, China;

²⁾The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan 511500, China)

Abstract The main functions of terminally differentiated vascular smooth muscle cells are contracting vessel, regulating vessel diameter and blood pressure, *etc.* Under the action of hyperphosphatemia, hyperglycemia, vitamin D₃, inflammation and other factors, vascular smooth muscle cells are transformed into osteoblast-like cells to participate in vascular calcification, which induce cardiovascular and cerebrovascular adverse events. Non-coding RNA is a general term for a variety of RNA types that transcribed from the human genome but lacking the ability to encode proteins. Non-coding RNA participates in the body's physiological and pathological processes by regulating various cell activities. Studies have shown that non-coding RNA can affect the occurrence and development of vascular calcification by regulating the osteoblast-like phenotype transformation of vascular smooth muscle cells. This article reviews the regulatory role of non-coding RNA in osteoblast-like phenotypic transformation of vascular smooth muscle and vascular calcification from the aspects of microRNA, long non-coding RNA and circular RNA, which is helpful to further understand the molecular mechanism of vascular calcification and find new targets for the prevention and treatment of vascular calcification.

Key words non-coding RNA, vascular smooth muscle cells, osteoblast-like phenotype transformation, osteogenic transcription factor

DOI 10.16476/j.pibb.2020.0153

* Corresponding author.

ZHAO Guo-Jun. Tel: 86-13535987467, E-mail: zzhsu@163.com

WANG Yan. Tel: 86-13973402796, E-mail: wangyannhfe@163.com

Received: July 29, 2020 Accepted: September 15, 2020