

· 论 著 ·

## miR-29a 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化形成的作用及分子机制

李永辉<sup>1</sup>, 赵培<sup>2</sup>, 聂婵娟<sup>3</sup>

(1. 河北省疾病预防控制中心职业病所, 石家庄 050000; 2. 河北省人民医院检验科, 石家庄 050051; 3. 石家庄市妇幼保健院检验科 050051)

**摘要:**目的 探讨 miR-29a 对载脂蛋白(Apo)E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化(AS)形成的作用及分子机制。方法 将实验动物分为 5 组, B6 组 C57BL/6J 小鼠 3 只, 正常饮食; AD 组载脂蛋白 E(ApoE)敲除小鼠 3 只, 正常饮食; AG 组 ApoE 敲除小鼠 3 只, 高脂饮食; AP 组 ApoE 敲除小鼠 3 只, 尾静脉注射 pAd-GFP 腺病毒, 高脂饮食; AM 组 ApoE 敲除小鼠 3 只, 尾静脉注射 pAd-miR-29a 病毒, 高脂饮食。高脂饲养 ApoE 基因缺陷小鼠快速形成 AS 模型, 高分辨力超声检查 miR-29a 对脂质斑块形成的影响, HE 染色检查动脉斑块形成情况, 免疫组织化学检测 miR-29a 对斑块血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖及锌指蛋白转录因子 5(KLF5)表达的影响。结果 ApoE 敲除小鼠经 miR-29a 转染可见低回声脂质斑块, miR-29a 转染可以促进斑块组织内 VSMCs 的增殖, 并上调 KLF5 的表达。结论 miR-29a 促进了 ApoE 基因缺陷小鼠动脉斑块内 VSMCs 的增殖, 其分子机制可能与上调增殖相关转录因子 KLF5 的表达有关。

**关键词:** miR-29a; 血管平滑肌细胞; 增殖; 动脉粥样硬化**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.023 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2016)19-2758-03**The effects and molecular mechanisms of atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice by miR-29a**LI Yonghui<sup>1</sup>, ZHAO Pei<sup>2</sup>, NIE Chanjuan<sup>3</sup>

(1. Department of Occupation Disease, Center for Disease Control and Prevention of Hebei, Shijiazhuang, Hebei 050000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Hebei, Shijiazhuang, Hebei 050051, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the role of miR-29a in atherosclerosis and its possible molecular mechanism. **Methods** The experimental animals were divided into five groups. Three C57BL/6 mice in B6 group with normal diet. Three ApoE<sup>-/-</sup> mice in AD group with normal diet. Three ApoE<sup>-/-</sup> mice in AG group with a high-fat diet. Three ApoE<sup>-/-</sup> mice in AP group with a high-fat diet, whose virus of tail injected with pAd-GFP; three ApoE<sup>-/-</sup> mice in AM group with a high-fat diet, whose virus of tail were injection with pAd-miR-29a virus. All ApoE<sup>-/-</sup> mice were fed by atherogenic diet to formed AS model rapidly. The influence of miR-29a on formation of lipid plaque were examined by high resolution ultrasonography. Atherosclerotic plaque formation were examined by HE staining. Immunohistochemical staining was used to study the effect of miR-29a on the proliferation of vascular smooth muscle cells(VSMCs), and its effects on the expression of Zinc finger protein transcription factor 5(KLF5). **Results** ApoE<sup>-/-</sup> mice by miR-29a transfection showed lipid plaque formation, miR-29a transfection could promote the proliferation of VSMCs in plaque tissue, and increased expression of KLF5. **Conclusion** MiR-29a promotes the proliferation of VSMCs in the plaque, its molecular mechanism might be associated with the increased expression of proliferation transcription factor KLF5.

**Key words:** miR-29a; vascular smooth muscle cells; proliferation; atherosclerosis

动脉粥样硬化(AS)是导致心血管疾病的主要病理基础<sup>[1]</sup>,而心血管疾病病死率高于肿瘤和其他疾病,居各种疾病之首。AS的病理过程大致分为血管内皮功能受损、血管内膜增厚和斑块形成三个阶段<sup>[2]</sup>。其中以斑块血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和脂质沉积为主要特征的血管内膜增厚阶段是AS形成的主要环节,因此对于这部分的研究一直是热点问题。miRNA是新近发现的一种内源性非编码区域转录的小分子RNA<sup>[3]</sup>,其在细胞内具有多种重要的调节功能。miR-29a是一个与细胞增殖紧密相关的小分子RNA,是miR-29家族成员之一,研究发现miR-29a广泛参与了细胞增殖、分化、凋亡、癌基因调控等多种生物学过程<sup>[4]</sup>。本实验以载脂蛋白(Apo)E基因敲除小鼠为研究对象,旨在探讨miR-29a在AS形成中的作用及其分子机制。

**1 材料与方法**

**1.1 实验动物** C57BL/6J小鼠3只,由河北省实验动物中心提供,SPF级,雄性,体质量(20.0±0.9)g。ApoE基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠12只由南京医科大学实验动物中心提供,SPF级,雄性,体质量约25g。所有小鼠饲于SPF级环境中,环境温度23~25℃,分为以下5组:(1)B6组,C57BL/6J小鼠3只,正常饮食;(2)AD组,ApoE基因敲除小鼠3只,正常饮食;(3)AG组,ApoE基因敲除小鼠3只,高脂饮食;(4)AP组,ApoE基因敲除小鼠3只,高脂饮食,分别于高脂饮食第1、4、7天尾静脉注射pAd-GFP腺病毒(1×10<sup>9</sup> pfu);(5)AM组,ApoE基因敲除小鼠3只,高脂饮食,分别于高脂饮食第1、4、7天尾静脉注射pAd-miR-29a腺病毒(1×10<sup>9</sup> pfu)。实验期间记录小鼠日常饮食、精神状态等一般情况。于6周后处死动物,

迅速分离胸腹主动脉标本用于下述实验。

### 1.2 检测方法

**1.2.1 高分辨力超声检查血管 AS 斑块** 小鼠用 3% 戊巴比妥钠麻醉,仰卧位固定于实验台上,高分辨力超声检查。小鼠主动脉弓部,采集图像。

**1.2.2 形态学分析** 各组小鼠均于实验 6 周后处死,迅速分离胸腹主动脉标本,取胸腹主动脉血管 3 mm 洗净残留血液,10% 中性甲醛中固定,脱水、常规石蜡包埋,4 μm 厚度连续切片后进行伊红(HE)染色。镜下观察、照相,进行图像学分析。

**1.2.3 免疫组织化学染色** 各组小鼠实验 6 周后处死,取胸腹主动脉制备组织切片,标本经 10% 中性甲醛固定,脱水、常规石蜡包埋,4 μm 厚度连续切片,按免疫组织化学步骤进行链菌素亲生物素-过氧化酶连接(SP)法染色。所使用的一抗包括:兔抗人增殖细胞核抗原(PCNA)多克隆抗体(1:50)、兔抗锌指蛋白转录因子 5(KLF5)多克隆抗体(1:50)。染色完成后镜下观察、照相,进行图像学分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理及统计学分析,所有数据进行方差齐性检验及正态性分布检验,正态分布变量以  $\bar{x} \pm s$  表示,非正态性分布的变量转换成正态性分布数据进行统计。应用独立样本 *t* 检验比较各组变量之间的差异,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物基本情况** 基础状态实验小鼠体质量为  $(20.0 \pm 1.1)g$ ,6 周末 5 组小鼠体质量分别增至  $(25.0 \pm 1.4)$ 、 $(26.0 \pm 1.5)$ 、 $(25.0 \pm 1.4)$ 、 $(25.0 \pm 1.3)$ 、 $(26.0 \pm 1.4)g$ ,5 组间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 高分辨力超声检查血管动脉硬化斑块形成** B6 组、AD 组小鼠经正常饮食 6 周后主动脉弓内膜光滑完整、连续、内膜不厚,彩色充盈佳。AG、AP 和 AM 组 ApoE 敲除小鼠经高脂饮食 6 周后,主动脉弓内膜渐粗糙不完整,回声有间断,内膜增厚,彩色充盈尚可,可见低回声脂质斑块,见图 1。

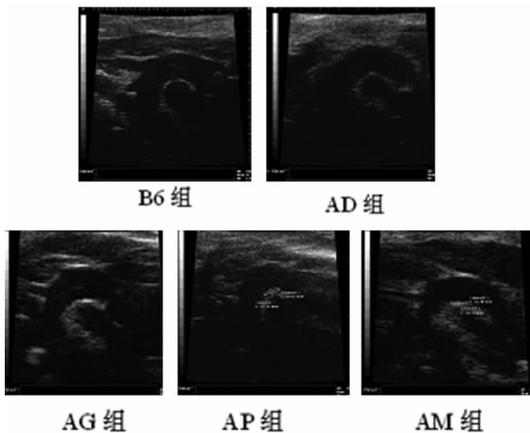
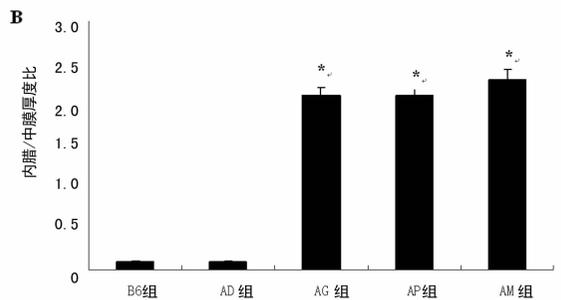
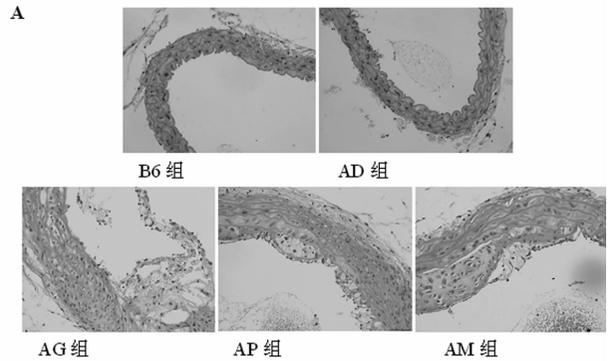


图 1 各组 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血管动脉硬化斑块形成情况的比较(高分辨力超声)

**2.3 HE 染色检查 AS 斑块形成情况** 各组小鼠实验 6 周后处死,取胸腹主动脉制备组织切片,HE 染色后,光镜下观察。B6 组和 AD 组小鼠血管内膜光滑,弹力层完整,中膜未变化;AG 组、AP 组、AM 组内膜增厚并有较大斑块形成,可见泡沫样细胞;AG 组和 AP 组无区别;AM(miR-29a 转染)组可见增殖内膜中新增 VSMCs 明显增多。见图 2。

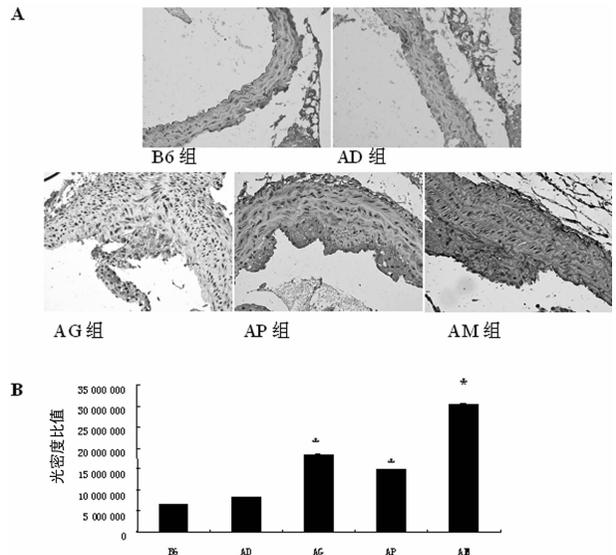
**2.4 免疫组织化学染色检测 miR-29a 对斑块组织中 VSMCs 增殖的影响** 各组小鼠实验 6 周后处死,取胸腹主动脉制备组

织切片,采用免疫组织化学的方法检测各组斑块内 PCNA 的表达,B6 组和 AD 组血管壁中可见 PCNA 阳性的细胞,但数量较少;而 AG、AP 和 AM 组 PCNA 阳性细胞数及单细胞染色强度均较 B6 组和 AD 组增高,且主要分布在新生内膜层,其中以 AM 组 PCNA 阳性细胞数最多。说明 miR-29a 可以促进平滑肌细胞的增殖。见图 3。



注:A 为血管斑块 HE 染色( $\times 200$ );B 为内膜/中膜厚度比(I/M),各组与 B6 组比较,\*  $P < 0.05$ 。

图 2 各组 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血管内膜增生情况的比较

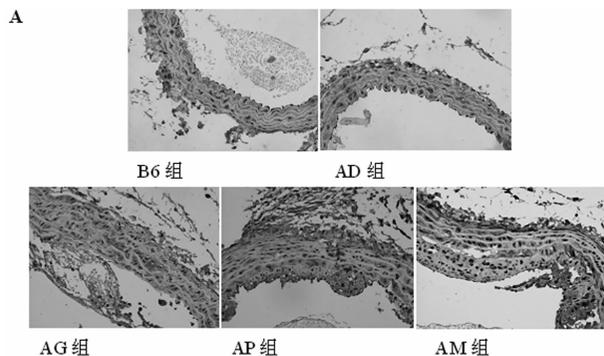


注:A 为免疫组织化学染色( $\times 200$ );B 为光密度扫描(光密度比值),各组与 B6 组比较,\*  $P < 0.05$ 。

图 3 各组 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠斑块组织中 PCNA 的表达情况的比较

**2.5 免疫组织化学染色检测 miR-29a 对斑块组织 KLF5 的影响** 各组小鼠实验 6 周后处死,取胸腹主动脉制备组织切片,采用免疫组织化学的方法检测斑块组织平滑肌细胞内 KLF5 的表达,AG、AP 和 AM 组 KLF5 阳性细胞数较 B6 组和 AD 组明显升高,其中以 AM 组 KLF5 阳性细胞数最多。AM 组

KLF5 阳性的细胞较 B6 和 AD 组增加了近 5 倍。说明 miR-29a 可以促进平滑肌细胞 KLF5 表达的上调。见图 4。



注: A 为免疫组织化学染色( $\times 200$ ); B 为光密度扫描(光密度值), 各组与 B6 组比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 4 各组 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠斑块组织中 KLF5 表达的比较

### 3 讨 论

miR-29 家族由 miR-29a、miR-29b1、miR-29b2、miR-29c 组成, 有研究表明 miR-29a 参与调控 AS 的形成及心血管病的发生、发展, 小鼠心肌梗死发生后 miR-29 在心脏接近梗死区域表达明显下降, 提示 miR-29a/b1 参与调节心肌纤维化<sup>[5-6]</sup>。本研究旨在探讨 miR-29a 在 AS 的发生、发展中的分子机制。VSMCs 是 AS 斑块主要的细胞成分, 斑块形成过程中 VSMCs 转化为增殖的合成表型, 合成分泌多种血管活性物质、生长因子及细胞外基质, 进一步刺激 VSMCs 的增殖。同时活跃地合成胶原纤维、弹力纤维、蛋白多糖等细胞外间质成分, 在斑块中的细胞周围积聚, VSMCs 吞噬胆固醇, 使脂质在平滑肌细胞中积聚, 于是脂质斑块转变纤维脂质斑块, 因此 VSMCs 增殖是 AS 斑块形成的重要阶段。

本研究取 15 周龄雄性 ApoE 基因敲除小鼠并给予高脂饲料喂养 6 周后, 与野生 C57BL/6J 小鼠对照组比较, 所有 ApoE 基因敲除小鼠均有 VSMCs 增生, 泡沫细胞及斑块形成, 而尾静脉注射 pAd-miR-29a 病毒的 ApoE 基因敲除小鼠内膜增厚并有较大斑块形成, 增殖内膜中新增 PCNA 阳性的 VMSC 数量明显增多, 且 KLF5 的表达明显增加。

PCNA 是评估细胞增殖状态的重要指标, 其变化与 DNA 的合成速度一致。检测 PCNA 在细胞中的表达水平可作为评价细胞增殖状态的可靠指标<sup>[7]</sup>。本实验检测了不同实验组 PCNA 的表达变化。结果显示, B6 组、AD 组血管壁 VSMCs 中 PCNA 阳性细胞数很少, 说明细胞处于分化状态, 不具有增殖活性; AG 组、AP 组、AM 组血管新生内膜中 PCNA 阳性细胞明显增多, 表明细胞增生活跃; AM 组中 PCNA 阳性细胞数高于 AG 组、AP 组。提示尾静脉注射 miR-29a 促进了斑块组织中 VSMC 的增殖。

Kruppel 样 KLF5 蛋白是一种转录调控因子<sup>[8]</sup>, 是 KLFs 家族成员之一, 能够促进多种组织器官细胞的正常生长及分

化<sup>[9]</sup>。研究发现, KLF5 在胚胎中活跃表达, 而在成年平滑肌细胞中不表达, 但当血管受损时, KLF5 表达明显升高。缺失突变分析发现 KLF5(-/-) 小鼠胚胎期死亡, 但血管周围纤维化减少, 说明 KLF5 在血管损伤后重塑中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。本实验发现, B6 组、AD 组血管壁中只有极少 KLF5 阳性细胞; AG 组、AP 组和 AM 组血管新生内膜和斑块中 KLF5 阳性细胞明显增多, 表明此时细胞处于损伤后重塑的增生活跃状态, 而 AM 组中 KLF5 的表达要高于 AG 组、AP 组。提示小鼠尾静脉注射 miR-29a 能够上调 KLF5 的表达。

综上所述, 本研究证实 miR-29a 参与了 AS 的发生、发展过程, 其分子机制与上调转录因子 KLF5 的表达, 促进斑块内 VSMCs 的增殖有关。

### 参考文献

- [1] Tricoli JV, Jacobson JW. MicroRNA: potential for cancer detection, diagnosis, and prognosis[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(10): 4553-4555.
- [2] Qi XF, Li YJ, Chen ZY, et al. Involvement of the FoxO3a pathway in the ischemia/reperfusion injury of cardiac microvascular endothelial cells[J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 95(2): 242-247.
- [3] Fichtlscherer S, de Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease[J]. *Circ Res*, 2010, 107(5): 677-684.
- [4] Zheng B, Bernier M, Zhang XH, et al. MiR-200c-SUMO1-mediated KLF4 feedback loop acts as a switch in transcriptional programs that control VSMC proliferation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 82(1): 201-212.
- [5] Mott JL, Kurita S, Cazanave SC, et al. Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(5): 1155-1164.
- [6] Li G, Xie N, Yao Y, et al. Identification of PI3K regulatory subunit p55gamma as a novel inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation and Neointimal formation[J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 105(1): 75-85.
- [7] Liao XH, Lu DL, Wang N, et al. Estrogen receptor alpha mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway[J]. *Febs J*, 2014, 281(3): 927.
- [8] Lv XR, Zheng B, Li SY, et al. Synthetic retinoid Am80 up-regulates Apelin expression by promoting interaction of RARalpha with KLF5 and Sp1 in vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem J*, 2013, 456(1): 35-46.
- [9] Shi HJ, Wen JK, Miao SB, et al. KLF5 and hhlIM cooperatively promote proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 367(1): 185-194.
- [10] Lu Y, Zhang L, Liao X, et al. Kruppel-like factor 5 is critical for vascular inflammation[J]. *J Clin Investig*, 2013, 123(1): 4232-4241.