

miR-34a在低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用

马 兰^{1,2}, 刘川川¹, 杨全余^{1,2}, 马 燕^{1,2}

(1. 青海大学医学院高原医学研究中心, 2. 青海省高原医学应用基础重点实验室, 青海 西宁 810001)

摘要:【目的】观察 miR-34a 在低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用并探讨其可能的机制。【方法】原代分离和培养大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMC), 并给予 3% 低氧处理后, 用 Real-time PCR 法检测 miR-34a 和 *Notch1* mRNA 在大鼠 PASMC 中的表达; 低氧条件下用细胞转染法过表达和抑制 miR-34a、沉默 *Notch1* 基因的表达后用 EDU 法观察细胞增殖情况, 并用 Real-time PCR 和 Western blot 法检测细胞核增殖抗原 PCNA 的表达。【结果】分离和培养大鼠 PASMC 并给予 3% 低氧处理后, 大鼠 PASMC 中 miR-34a 表达明显降低, 且低氧 48 h 降低较明显, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 *Notch1* 的表达明显增高, 且 48 h 增高较明显, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 过表达 miR-34a 和沉默 *Notch1* 后会显著抑制低氧引起的细胞增殖, 抑制 miR-34a 的表达后则会促进细胞增殖, 且组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。【结论】在低氧诱导的 PASMC 细胞增殖过程中 miR-34a 参与了 PASMC 的增殖过程, 且可能是通过上调 *Notch1* 引起了细胞增殖。

关键词: miR-34a; 肺动脉平滑肌细胞; 低氧

中图分类号: R363 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2019)04-0525-07

Effect of miR-34a on Proliferation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells in Rats Induced by Hypoxia

MA Lan^{1,2}, LIU Chuan-chuan¹, YANG Quan-yu^{1,2}, MA Yan^{1,2}

(1. Research Center for High Altitude Medicine, Qinghai University Medical School, 2. The Key Laboratory of High Altitude Medical Application of Qinghai Province, Xining, 810001)

Correspondence to: MA Lan; E-mail: judym1-325@163.com

Abstract: 【Objective】To observe the effect of miR-34a on the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells in rats induced by hypoxia and explore its possible mechanism. 【Methods】Rat pulmonary artery smooth muscle cells were primarily isolated from pulmonary arteriole and cultured. After 3% O₂ treatment, the expression of miR-34a and *Notch1* mRNA in rat PASMC were detected by real time PCR. The cell proliferation was detected by EDU after over-expression and inhibition of miR-34a and silencing *Notch1* by cell transfection under hypoxia, and the expression of PCNA was detected by real time PCR and western blot method. 【Results】We successfully isolated and cultured rat PASMC. And after 3% O₂ treatment, the expression of miR-34a in rat PASMC was significantly decreased after 48 h compared with 24 h ($P < 0.05$). However, the expression of *Notch1* mRNA increased significantly after 48 h compared with 24 h ($P < 0.05$). In addition, over-expression of miR-34a and silencing *Notch1* significantly inhibited hypoxia-induced cell proliferation, while inhibition of miR-34a significantly promoted the PASMC proliferation ($P < 0.05$). 【Conclusion】miR-34a participates in the proliferation of PASMC induced by hypoxia, and it may be through up-regulation of *Notch1* to induce cell proliferation.

Key words: miR-34a; pulmonary artery smooth muscle cell; hypoxia

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(4): 525-531]

收稿日期: 2019-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(31560292); 青海省自然科学基金(2015-ZJ-939Q)

作者简介: 马兰, 通信作者, 博士, 副教授, 研究方向: 高原低氧适应与损伤, E-mail: judym1-325@163.com

低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary artery hypertension, HPH)是由于长期低氧引起肺血管收缩和肺血管重建从而导致肺动脉压力持续升高的一种常见的慢性高原病^[1]。在缺氧早期,HPH主要以肺血管收缩为主,随着缺氧时间的延长,肺血管重建参与其中^[2]。在低氧引起的肺血管重建中血管平滑肌细胞的增殖发挥着重要的作用。但是目前引起肺动脉压升高和血管重建的分子机制尚不清楚。缺氧环境下 miRNA 表达的改变可以调节肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC)的增殖、凋亡、迁移等功能,并参与 HPH 的形成^[3]。miR-34a 是一类对细胞增殖具有正调或负调作用的 miRNAs,通过调控许多靶蛋白,参与细胞周期,细胞凋亡及分化^[4]。Notch1 是与细胞增殖密切相关的基因,已被证实为是 miR-34a 的靶基因之一,miR-34a 通过与 Notch1 基因 3'-UTRs 区的结合位点相结合来发挥负性调控作用^[5]。然而,miR-34a 是否也参与调节缺氧诱导的 PASMC 的增殖报道较少。本课题通过细胞转染过表达和抑制 miR-34a 及沉默 Notch1 的表达后观察低氧诱导的 PASMC 的增殖情况,旨在探讨 miR-34a 在低氧诱导的大鼠低氧性 PASMC 增殖中的作用及其可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司(动物合格证号:11400700292756),体质量为 140~160 g。本动物实验经青海大学实验动物伦理委员会批准,并根据青海大学动物实验中心的实验动物操作标准进行。

1.2 实验试剂

DMEM 培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司,增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)引物由生工生物工程有限公司合成;Trizol RNA 提取试剂盒和 lipofectimin RNAiMax 细胞转染试剂盒均购自 Thermo Fisher 公司;miR-34a mimics (MSY0000815)、miR-34a inhibitor (MIN0000815)、si-Notch1 (SI01920744)、All star negative control (SI03650318)、Rn-miR-34a primer (MS00000224)、Rn-U6 primer (MS00033740)、Notch1 primer (QT00400036)、18srRNA primer (QT00199374)、miScript®

II RT kit、miScript SYBR Green PCR kit 及 QuantiFast SYBR Green PCR kit 均购自 Qiagen 公司;Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒购自 TIANGEN 公司;Anti-PCNA antibody、Anti- α -tubulin 及二抗均购自 Abcam 公司。EDU 细胞增殖检测试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒和 ECL 发光试剂盒均购自 Pierce 公司。7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),AI 600 成像仪(美国 GE 公司)。

1.3 大鼠 PASMC 的原代培养

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠腹腔注射 0.6 mL/100 g 的乌拉坦麻醉后断颈处死、体积分数 75% 酒精消毒胸腹部,无菌条件下打开胸腔并迅速取出心肺组织,并置于预冷灭菌的 PBS 中将血液洗净。在体视显微镜下小心分离出左右肺中小动脉后用眼科剪沿着动脉管纵行方向剪开,再用小刀片在内壁轻轻刮几次以除去内皮细胞,然后将血管壁剪成 1×1 mm² 的组织小片,培养瓶内加入含体积分数 20% FBS 的 DMEM 培养基,采用组织贴块法原代培养大鼠 PASMC。待细胞生长融合达 80% 左右后,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代培养,用免疫组化法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)对培养的 PASMC 进行细胞纯度的鉴定,并取第 3~5 代的细胞作为实验用细胞。

1.4 大鼠 PASMC 低氧处理及分组

取已培养的 3~5 代大鼠 PASMC,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞并计数后,按 1×10⁵ 细胞密度将细胞接种在 6 孔培养板中,并加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,常氧组置于常氧培养箱中(37℃,体积分数 5%CO₂、21% O₂ 和 74% N₂),低氧组置于低氧培养箱中(37℃,体积分数 5%CO₂、3% O₂ 和 92% N₂)培养 24、48 h。

1.5 细胞转染

在 6 孔细胞培养板中按照 1×10⁵ 密度接种细胞,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h,观察细胞待融合到 80% 左右,换为 0.5% FBS 的 DMEM 培养基细胞同步化 12 h 后开始细胞转染,将 miR-34a mimic (20 nmol/L)、miR-34a inhibitor (20 nmol/L)、Si-Notch1 (40 nmol/L) 及 All star negative control (20 nmol/L) 分别和 lipofectimin RNAiMax (9 μ L/孔) 严格按照 Thermo Fisher 公司的 lipofectimin RNAiMax 转染试剂盒说明书配制混匀后室温孵育 5 min,加入细胞中并置于低氧培养箱中继续

培养4 h后换成含10% FBS的DMEM培养基继续培养24、48 h。

1.6 EDU检测细胞增殖

按照EDU细胞增殖检测试剂盒,对各组细胞按照说明逐步进行EDU标记、固定、Apollo染色,用Hoechst 33342进行DNA染色后,在激光共聚焦显微镜下进行观察和拍照,随机选取10个视野计数并统计。

1.7 细胞总RNA提取

按照Trizol试剂盒说明书一步法提取各组细胞总RNA,用NanoDrop 2000超微量分光光度计测定A260和A280纯度及浓度、甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析检测完整性。

1.8 RT-QPCR检测miR-34a及PCNA的表达

microRNA的反转录按照miScript® II RT kit试剂盒说明书合成cDNA第一链。并以此cDNA链为模板,按照miScript SYBR Green PCR kit试剂盒说明书,建立miR-34a和内参U6的反应体系,在ABI7500荧光定量PCR上进行PCR反应,条件为95℃,5 min;95℃,10 s,55℃,15 s,60℃30 s,40个循环;普通基因的反转录按照FastQuant cDNA第一链合成试剂盒说明书进行cDNA第一链的合成。并以此cDNA第一链为模板,严格按照QuantiFast SYBR Green PCR kit试剂盒说明书,建立PCNA及内参18 s rRNA的反应体系,然后在ABI 7500荧光定量PCR上进行PCR反应,条件为95℃,5 min;95℃,10 s,60℃,30 s,40个循环;以上每个样本均设3个复孔。熔解曲线的采集在以上PCR反应结束后,以每10 s上升0.5℃的速度从60℃到95℃来记录线。

1.9 Western-blot法检测蛋白表达

收集各组处理细胞,严格按照碧云天公司的RIPA总蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,然后用Pierce公司的BCA蛋白定量试剂盒对所提取的总蛋白定量后,加入含β巯基乙醇的上样缓冲液煮沸蛋白变性,取15 μg样品上样,用5%浓缩胶和10%聚丙烯酰胺分离胶进行电泳,待电泳结束后用Bio-Rad半干电转仪(恒压10 V,20~30 min)转到PVDF膜上。室温下用5%的脱脂奶粉封闭2 h后,在含相应蛋白大小的PVDF膜中分别加入PCNA的兔多克隆抗体(1:2 000)和内参α-tubulin多克隆抗体(1:2 000)4℃过夜。用TBST洗膜后加入羊抗兔HRP标记的二抗,在室温下孵育1 h后用TBST再次洗膜后ECL发光液发光,并用

AI 600成像仪进行荧光成像并拍照。用PCNA目的蛋白的条带与内参α-tubulin蛋白条带的灰度值之比作为PCNA蛋白的相对表达量,并用Quantity one分析软件进行灰度值分析。

1.10 统计学方法

用SPSS 21.0软件对数据进行统计学分析,数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理两样本间比较,数据呈正态分布且方差齐时采用 t 检验;多组间比较先进行正态分布和方差齐性检验,数据呈正态分布且方差齐时采用单因素方差分析(one way ANOVA),多组间比较有差异时,组间两两比较用Tukey检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 大鼠PASMCM培养和鉴定

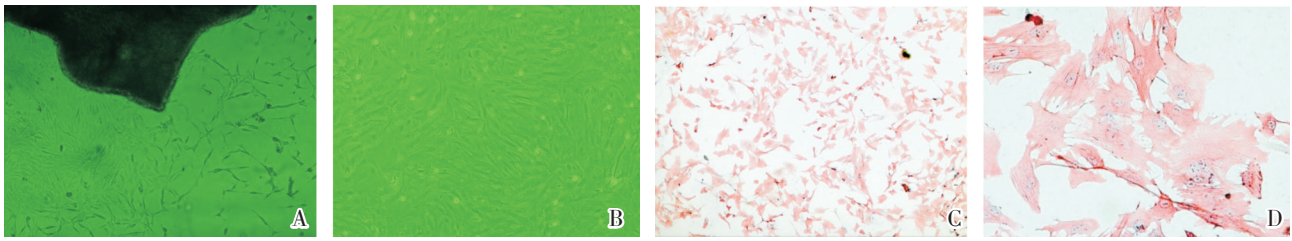
如图所示,我们采用组织贴块法成功分离并原代培养了大鼠PASMCM,在贴块培养的第3~5天,可以观察到平滑肌细胞从组织块周围爬出,并贴壁生长,细胞形态多呈长梭形,胞质丰富,细胞生长致密时呈束状平行排列(图1A),7~10 d后呈典型的“峰-谷”状(图1B)。用免疫组化法检测α-SMA对培养的PASMCM进行细胞纯度鉴定,可见在视野下大多数细胞均呈阳性染色(图1C、D)。

2.2 低氧诱导大鼠PASMCM中miR-34a的表达

大鼠PASMCM经体积分数3%的低氧处理24和48 h后,用Real-time PCR分别检测了各组PASMCM中miR-34a的表达。结果显示,在低氧处理24 h后,与同时常氧对照组相比,PASMCM中miR-34a的表达降低,但是差异无统计学意义($t = 2.167$, $P = 0.096$;图2),而在低氧处理48 h后,PASMCM中miR-34a表达显著降低,差异有统计学意义($t = 9.450$, $P = 0.001$;图2)

2.3 低氧诱导大鼠PASMCM中Notch1的表达

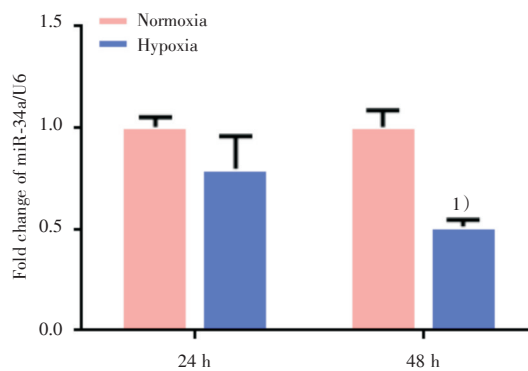
大鼠PASMCM分别给与体积分数3%的低氧处理24和48 h后,用Real-time PCR分别检测了各组细胞中Notch1 mRNA水平的表达。分别与各时间段的常氧对照组相比,低氧处理24 h后,PASMCM中Notch1 mRNA的表达水平明显增高,差异有统计学意义($t = -4.006$, $P = 0.016$;图3)。低氧处理48 h后,与其常氧对照组相比,PASMCM中Notch1 mRNA的表达水平也明显增高,差异有统计学意义($t = -4.624$, $P = 0.01$;图3)。



A, B: tissue patch culture of PASM; A: cultured for 3~5 days; B: cultured for 7~10 days (100 \times); C, D: primary cultured PASM were detected with alpha-SMA by immunohistochemistry. C: at low magnification (100 \times), spindle cells were densely packed, and almost all of cells were positive for PASM; D: red stained myofilaments were clearly observed in the cytoplasm at high magnification (200 \times).

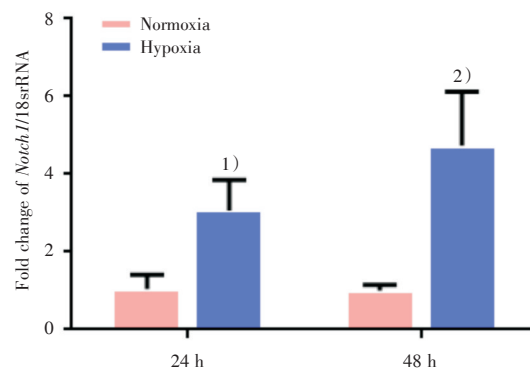
图1 PASM培养和鉴定结果

Fig.1 Cell culture and identification of PASM



The expression of miR-34a was decreased in PASM when exposed to 3% oxygen for 24 h and 48 h. Student's *t*-test was used for different test of miR-34a expression between normoxia and hypoxia. 1) $t = 9.450$, $P = 0.001$ compared with normoxia 48 h. Data are shown as mean \pm SD, $n = 3$.

图2 低氧处理后大鼠PASM中miR-34a的表达
Fig.2 Expression of miR-34a in rat PASM after hypoxia



The expression of *Notch1* mRNA was increased in PASM when exposed to 3% oxygen for 24 h and 48 h. Student's *t*-test was used for different test of *Notch1* mRNA expression between normoxia and hypoxia. 1) $t = -4.006$, $P = 0.016$ compared with normoxia 24 h. 2) $t = -4.624$, $P = 0.01$ compared with normoxia 48 h. Data are shown as mean \pm SD, $n = 3$.

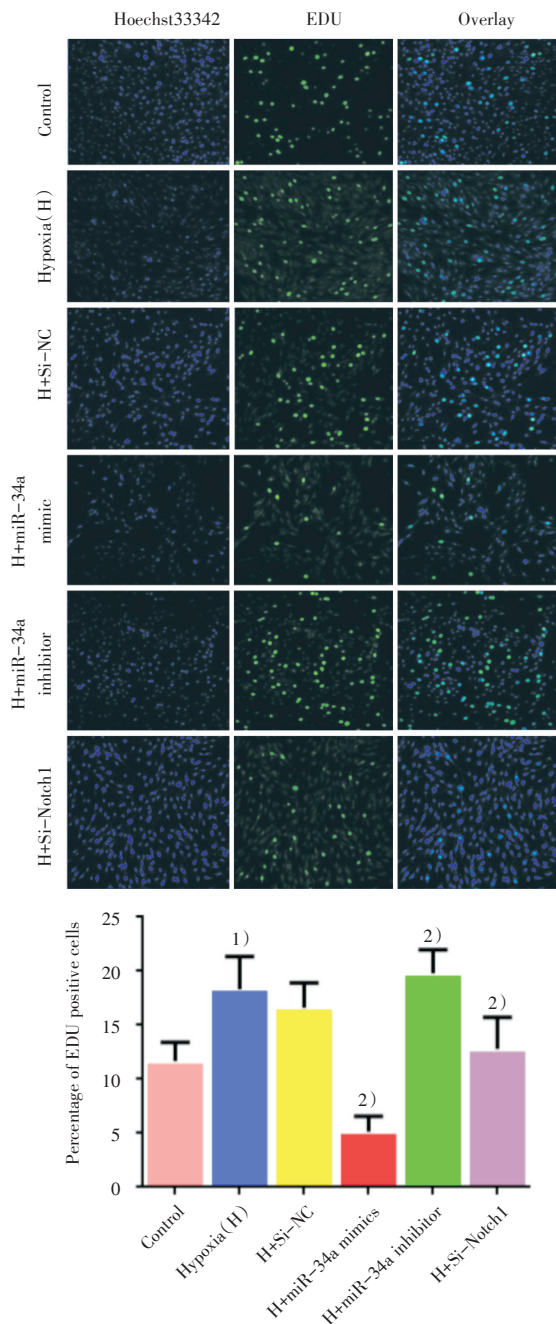
图3 低氧处理后PASM中Notch1的mRNA表达水平
Fig.3 Expression of *Notch1* mRNA in rat PASM after hypoxia

2.4 过表达和抑制miR-34a对低氧诱导的细胞增殖的影响

为了观察miR-34a对低氧引起的PASM增殖的影响,我们用miR-34a模拟物和抑制剂及Si-*Notch1*分别转染大鼠PASM,并给予体积分数3%的低氧刺激48 h后用EDU检测细胞增殖情况。结果如图4所示显示,常氧组、低氧组及低氧各转染组间比较差异有统计学意义($F = 26.097$, $P = 0.000$)。与常氧对照组相比较,低氧48 h会显著刺激PASM细胞增殖,差异有统计学意义($P = 0.002$)。而在低氧条件下与转染阴性对照相比,过表达miR-34a或者抑制*Notch1*后会显著抑制低氧引起的细胞增殖,抑制miR-34a的表达后则会促进细胞增殖,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 过表达和抑制miR-34a对PCNA表达的影响

用miR-34a模拟物和抑制剂分别转染大鼠PASM,并给予低氧刺激48 h后,用RT-qPCR和Western blot进一步检测细胞增殖核抗原PCNA的表达。RT-qPCR检测结果如图5所示,常氧组、低氧组及低氧各转染组间比较差异有统计学意义($F = 38.312$, $P = 0.000$)。与常氧对照组相比,单纯低氧组PCNA mRNA水平表达明显增高,差异有统计学意义($P = 0.008$)。与阴性对照组相比,过表达miR-34a或者抑制*Notch1*后,PASM中的PCNA mRNA的表达水平显著降低,而抑制miR-34a后,PASM中的PCNA mRNA的表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在蛋白水平的检测结果如图6所示,常氧组、低氧组及低氧各

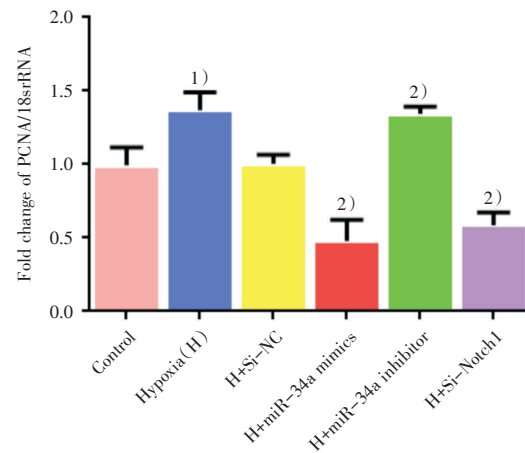


Primary PASM were transfected with miR-34a mimics (20 nmol/L), inhibitor (20 nmol/L), si-Notch1 (40 nmol/L) and all star negative control (Si-NC, 20 nmol/L) respectively, and cultured in hypoxia for 48 h, proliferating PASM were determined by EDU assays. H represents hypoxia. Representative pictures are shown from three independent experiments. One-Way ANOVA was used for different test of EDU positive cells percentage between six groups ($F = 26.097$, $P = 0.000$). Tukey-test was used for multiple comparison. 1) $P = 0.002$ compared with control. 2) $P < 0.05$ compared with H+Si-NC. Data are shown as mean±SD, $n = 10$.

图4 低氧下过表达和抑制miR-34a对PASM细胞增殖的影响

Fig.4 Effects of over expression and inhibition of miR-34a on proliferation of PASM under hypoxia

转染组间比较差异有统计学意义 ($F = 55.480$, $P = 0.000$)。与常氧对照组相比,单纯低氧48 h后PASM中PCNA蛋白表达明显增高,差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。低氧处理后,与转染阴性对照组(H+Si-NC)相比,过表达miR-34a后,PASM中的PCNA蛋白的表达水平显著降低,而抑制miR-34a的表达后,PASM中的PCNA蛋白的表达水平显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),这一结果与mRNA水平相一致。



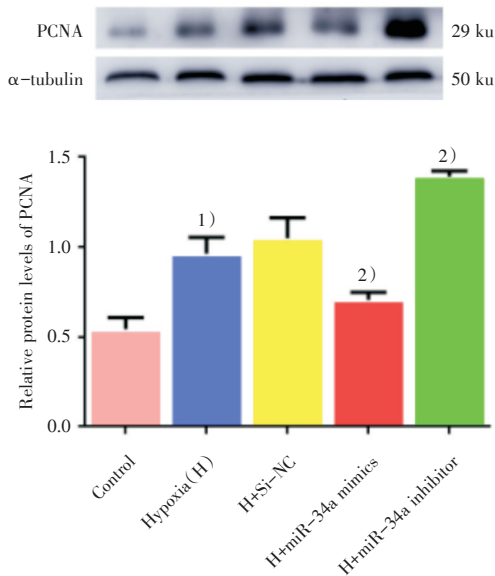
Primary PASM were transfected with miR-34a mimics (20 nmol/L), inhibitor (20 nmol/L), si-Notch1 (40 nmol/L) and all star negative control (Si-NC, 20 nmol/L) respectively, and cultured in hypoxia for 48 h, mRNA levels of PCNA were assessed by qRT-PCR. One-Way ANOVA was used for different test of PCNA mRNA expression between six groups ($F = 38.312$, $P = 0.000$). Tukey-test was used for multiple comparison. 1) $P = 0.008$ compared with control. 2) $P < 0.05$ compared with H+Si-NC. Data are shown as mean±SD, $n = 3$.

图5 低氧下过表达和抑制miR-34a后PASM中PCNA mRNA的表达情况

Fig.5 Effect of over expression and inhibition of miR-34a on PCNA mRNA expression in PASM under Hypoxia

3 讨论

缺氧性肺血管收缩和肺血管结构重构为HPH的主要病理学变化特点,而PASM是在慢性缺氧过程中参与肺血管结构重建的关键细胞,也是缺氧造成肺血管收缩的主要效应细胞。既往研究表明,PASM的异常增殖、凋亡和迁移是肺血管重建中最重要的病理生理特点。在本研究中,我们首先原代分离和培养了大鼠PASM,并给予体积分数3%



Primary PASCs were transfected with miR-34a mimics (20 nmol/L), inhibitor (20 nmol/L) and all star negative control (Si-NC, 20 nmol/L) respectively, and cultured in hypoxia for 48 h. Protein levels of PCNA were detected by Western blots and quantification of Western blots are shown. One-Way ANOVA was used to test difference of PCNA protein expression between five groups ($F = 55.480$, $P = 0.000$). Tukey-test was used for multiple comparison. 1) $P = 0.000$ compare with control. 2) $P < 0.05$ compared with H+Si-NC. Data are shown as mean \pm SD, $n = 3$.

图6 低氧处理后过表达和抑制 miR-34a 后 PASCs 中 PCNA 蛋白的表达

Fig.6 Effect of overexpression and inhibition of miR-34a on PCNA protein expression in PASCs under Hypoxia

的低氧处理 48 h 后,用 EDU 染色法检测细胞增殖后发现,3%低氧 48 h 后,大鼠 PASCs 的 EDU 阳性染色率显著提高,提示低氧可促使 PASCs 的增殖活性增强,这与众多学者的研究结果是一致的^[6-7]。

miRNA 是近年来发现的一类长度约 21 bp 的内源性非编码小 RNA 分子,可以通过诱导靶基因 mRNA 的降解、抑制等抑制靶基因的表达。在细胞分化、细胞增殖、细胞凋亡和肿瘤的发生及发育中扮演重要角色^[8]。在缺氧环境下,microRNA 的表达改变可以调节 PASCs 的增殖、凋亡、迁移等功能^[9-12],从而参与了 HPH 的形成。有些 microRNA 通过诱导 PASCs 增殖、迁移及抑制凋亡等参与了 HPH 的形成^[13-16],而另外还有一些 microRNA 则是通过抑制 PASCs 增殖、诱导凋亡及抑制平滑肌细胞表型转化的作用防治了 HPH 的发生^[17-18]。因

此,近年来关于 miRNA 在 HPH 的发生发展中的作用成为研究和关注的热点之一。

miR-34 家族是一个保守的 miRNA 家族,为近年来备受关注的 miRNA 之一,包括 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c 三个成员^[19]。已有许多实验证明 miR-34a 通过负调细胞周期蛋白、细胞增殖信号分子和凋亡抑制因子导致细胞周期终止、细胞凋亡和衰老^[4],尤其在肿瘤的发生发展中发挥着重要的调控作用。然而 miR-34a 在低氧性肺血管重建中的研究甚少。因此,在本研究中,我们首先在缺氧条件下观察了大鼠 PASCs 中 miR-34a 的表达情况。结果显示,低氧后大鼠 PASCs 中 miR-34a 的表达明显降低,尤其低氧 48 h 后,降低更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),这与 Wang 等^[20]的研究结果是一致的。因此,我们的结果提示在低氧下 PASCs 中 miR-34a 的下调可能参与了低氧诱导的 PASCs 的增殖。

Notch1 是与细胞增殖密切相关的基因,已被证实为是 miR-34a 的靶基因之一^[5],miR-34a 通过与 *Notch1* 基因 3'-UTRs 区的结合位点相结合来发挥负性调控作用。由此,我们推测 miR-34a 可能在 HPH 肺血管重构调控中发挥着重要的作用,而且是通过负性调控来发挥作用的。我们在缺氧条件下观察了大鼠 PASCs 中 *Notch1* mRNA 水平的表达情况。结果显示,将原代培养的大鼠 PASCs 给予 3%的低氧处理 24 和 48 h 后,PASCs 中 *Notch1* mRNA 的表达水平明显增高,尤其在低氧 48 h 后,*Notch1* 在 PASCs 中的表达增高更明显,统计学有显著性差异($P < 0.05$),说明 *Notch1* 参与了低氧诱导的 PASCs 增殖过程,可能是由 miR-34a 的低表达负性调控了 *Notch1* 的表达,使低氧下 PASCs 中 *Notch1* 的 mRNA 水平表达显著增高从而引起 PASCs 的增殖。为了进一步明确是否通过这一调控通路发挥作用,我们又用 miR-34a 模拟物和抑制剂分别过表达和抑制 miR-34a 及用 RNA 干扰技术沉默靶基因 *Notch1* 后观察低氧诱导下的 PASCs 的细胞增殖情况。我们的研究结果显示,过表达 miR-34a 及沉默 *Notch1* 基因后,低氧诱导的 PASCs 的增殖明显被抑制,而用 miR-34a 抑制剂后 PASCs 细胞则显著增殖。我们又进一步检测了各处理组细胞中 PCNA 的表达,结果发现对大鼠 PASCs 给予 3%的低氧刺激并过表达 miR-34a 或者抑制 *Notch1* 的表达后,细胞中

PCNA 的表达量明显降低,而给予 miR-34a 抑制剂后细胞中 PCNA 的表达是显著升高。这一结果提示在低氧诱导的 PASM C 细胞增殖过程中 miR-34a

参与了 PASM C 的增殖过程,且可能是通过上调 *Notch1* 引起了细胞增殖,其机制有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG, et al. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms [J]. *Circ Res*, 2006, 99(7): 675-691.
- [2] Cahill E, Rowan SC, Sands M, et al. The pathophysiological basis of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the mouse: vasoconstrictor and structural mechanisms contribute equally [J]. *Exp Physiol*, 2012, 97(6): 796-806.
- [3] Grant JS, White K, MacLean MR, et al. MicroRNAs in pulmonary arterial remodeling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(23): 4479-4494.
- [4] Chen F, Hu SJ. Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2012, 26(2): 79-86.
- [5] Li WB, Ma MW, Dong LJ, et al. MicroRNA-34a targets notch1 and inhibits cell proliferation in glioblastoma multiforme [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(6): 477-483.
- [6] Guo L, Qiu Z, Wei L, et al. The microRNA-328 regulates hypoxic pulmonary hypertension by targeting at insulin growth factor 1 receptor and L-type calcium channel- α 1C [J]. *Hypertension*, 2012, 59(5): 1006-1013.
- [7] Shan F, Li J, Huang QY. HIF-1 α -induced up-regulation of miR-9 contributes to phenotypic modulation in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(10): 1511-1520.
- [8] Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(3): 137-147.
- [9] Mohsenin V. The emerging role of microRNAs in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Sleep Breath*, 2016, 20(3): 1059-1067.
- [10] Yang YZ, Zhang YF, Yang L et al. miR760 mediates hypoxia-induced proliferation and apoptosis of human pulmonary artery smooth muscle cells via targeting TLR4 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5): 2437-2446.
- [11] Courboulin A, Paulin R, Giguère NJ, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(3): 535-548.
- [12] Yang S, Banerjee S, Freitas Ad, et al. miR-21 regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(6): L521-L529.
- [13] Li J, Zhao L, He X, et al. MiR-21 inhibits c-Ski signaling to promote the proliferation of rat vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(4): 724-729.
- [14] Gou D, Ramchandran R, Peng X, et al. miR-210 has an antiapoptotic effect in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(8): L682-L691.
- [15] Zhang Y, Peng B, Han Y. MiR-23a regulates the proliferation and migration of human pulmonary artery smooth muscle cells (HPASMCs) through targeting BMPR2/Smad1 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1279-1286.
- [16] Xu Y, Bei Y, Shen S, et al. MicroRNA-222 promotes the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by targeting P27 and TIMP3 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 282-292.
- [17] Caruso P, Dempsie Y, Stevens HC, et al. A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from mouse models and patient samples [J]. *Circ Res*, 2012, 111(3): 290-300.
- [18] Chen J, Cui X, Li L, et al. MiR-339 inhibits proliferation of pulmonary artery smooth muscle cell by targeting FGF signaling [J]. *Physiol Rep*, 2017, 5(18): e13441.
- [19] Andolina D, Di Segni M, Ventura R. MiRNA-34 and stress response [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 5658-5659.
- [20] Wang P, Xu J, Hou Z, et al. miRNA-34a promotes proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells by targeting PDGFRA [J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(4): 484-493.

(编辑 余 菁)