Modern Practical Medicine, April 2024, Vol.36, No.4

·论 著·

微小RNA-26a-5p对氧化型低密度脂蛋白处理的血管平滑肌细胞增殖、迁移和泡沫化的影响

赵妙惠，周佳妮，吴超群

【摘要】目的　探究微小RNA-26a-5p（miR-26a-5p）对动脉粥样硬化（AS）过程中血管平滑肌细胞（VSMCs）增殖、迁移和泡沫化的影响。方法　使用氧化型低密度脂蛋白（ox-LDL）处理VSMCs，模拟AS过程中的VSMCs细胞模型，向细胞中转染miR-26a-5p模拟物（miR-26a-5p mimic）及其阴性对照（NC mimic），将细胞分为对照组、ox-LDL组、ox-LDL+NC mimic组、ox-LDL+miR-26a-5p mimic组。通过qRT-PCR检测细胞miR-26a-5p表达水平，采用CCK-8和EDU染色检测细胞活力和增殖，通过划痕实验和Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力，使用油红O染色观察细胞中脂滴聚集情况，采用免疫荧光实验检测细胞中α-SMA的表达。结果　VSMCs中miR-26a-5p水平随着ox-LDL浓度的增加和作用时间的延长而降低。与对照组比较，ox-LDL组VSMCs细胞增殖、迁移、侵袭能力显著增强，脂滴聚集增多，α-SMA信号减弱，泡沫化程度增强。与ox-LDL+NC mimic组比较，ox-LDL+miR-26a-5p mimic组细胞增殖、迁移、侵袭能力显著减弱，脂滴聚集减少，α-SMA信号增强，泡沫化程度减弱。结论　过表达miR-26a-5p可以下调血管平滑肌细胞的增殖、迁移和泡沫化，miR-26a-5p可能成为AS治疗的新靶点。

【关键词】 动脉粥样硬化；miR-26a-5p；ox-LDL；VSMCs；泡沫细胞
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.04.003
【中图分类号】 R543　　【文献标志码】 A　　【文章编号】 1671-0800(2024)04-0428-05

Effects of microRNA-26a-5p on proliferation, migration and bubbling of vascular smooth muscle cells treated with oxidized low-density lipoprotein

ZHAO Miaohui, ZHOU Jiani, WU Chaoqun (Ningbo Medical Center Li Huili Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective　To investigate the effect of microRNA-26a-5p on vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation, migration and foaminess during atherosclerosis (AS). **Methods**　VSMCs were treated with oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to construct a VSMCs model during AS simulation. The miR-26a-5p mimic and its negative control mimic(NC mimic) were transfected into the cells, and the cells were divided into the control group, ox-LDL group, ox-LDL + NC mimic group, and ox-LDL + miR-26a-5p mimic group. Quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-26a-5p. Cell Countingkit-8 (CCK-8) and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EDU) staining were used to assess cell viability.Transwell and wound healing assay was used to analyze cell migration, and oil red O staining (ORO) was performed to observe the lipid droplet accumulation in cells. Immunofluorescence(IF) assay was used to observe the α-SMA expression in cells. **Results**　The miR-26a-5p level in VSMCs decreased with increasing ox-LDL treatment concentration and time. Compared with the control group, the proliferation, migration, and invasion ability of VSMCs cells in the ox-LDL group were significantly enhanced, and lipid droplet aggregation increased, α- SMA signal weakened and foam degree increased. The proliferation, migration and foaminess were up-regulated by ox-LDL, while miR-26a-5p mimic effectively reversed these changes. **Conclusions**　Over-expression of miR-26a-5p downregulates proliferation, migration and foaming of VSMCs, and miR-26a-5p may be a new target for AS therapy.

【Key words】 Atherosclerosis; MiR-26a-5p; Oxidized low-density lipoprotein; Vascular smooth muscle cell; Foam cell

[Modern Practical Medicine,2024,36(4):428-432]

动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）是一种由不稳定斑块的急性破裂或侵蚀导致的慢性、炎症性动脉疾病，其主要临床后果为心肌梗死或脑卒中[1]。血

基金项目：　宁波市科技计划项目（202003N4226）
作者单位：　315040 宁波，宁波市医疗中心李惠利医院
通信作者：　赵妙惠，Email：13819800642@163.com

管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells，VSMCs）作为常见的 AS 斑块细胞类型，是血管壁的主要成分，通过其收缩特性来维持血管张力，调节血压[2]。VSMCs 的迁移、增殖和泡沫化被证明可促进 AS 进展[3-4]。近年来，微小 RNA（MicroRNA，miRNA）及其下游调控基因在 AS 发生发展中的作用成为研究热点[5]。其中，miR-26a-5p 被发现与 AS 密切相关。有研究表明，通过调节 miR-26a-5p/PTEN 轴可抑制氧化型低密度脂蛋白（oxidized low density lipoprotein，ox-LDL）诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡[6]，上调 miR-26a-5p 表达可减轻 ox-LDL 诱导的人主动脉内皮细胞凋亡[7]。然而，很少有关于 miR-26a-5p 对 VSMCs 的影响及其作用机制的研究。本研究拟通过 ox-LDL 处理 VSMCs 来模拟 AS 体外环境，探究 miR-26a-5p 对 VSMCs 的调控作用及其机制，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料　VSMCs 购自武汉普诺赛生命科技有限公司；胎牛血清（Gibco 公司，美国），DMEM 培养基（Gibco 公司，美国），ox-LDL（Sigma 公司，美国），Lipofectamine 2000（Invitrogen 公司，美国），TRIzol 试剂（Thermo 公司，美国），TaqMan MicroRNA 逆转录试剂盒（Applied Bio 公司，美国），实时定量聚合酶链反应试剂盒（Sigma 公司，美国），miR-26a-5p mimic 及其阴性对照（Negative control mimic，NC mimic）购自上海吉玛公司，EDU 试剂（Riobio 公司，中国），人源性红色荧光标记 ox-LDL（YEASEN 公司，中国），Cell Counting 检测试剂盒-8（CCK-8）试剂盒（碧云天公司，中国），α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）抗体（Thermo 公司，美国），光学显微镜（Olympus 公司，日本），荧光显微镜（Leica 公司，德国），酶标仪（Bio-Rad 公司，美国）。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　将 VSMCs 放于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中，置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.2　细胞模型构建　将 VSMCs 置于有无菌盖玻片的 6 孔板内，使用 DMEM 培养 24 h 后，将细胞分为对照组和实验组。实验组分别用 50 μg/ml ox-LDL 处理 6、12、24 h，或使用 25、50、100 μg/ml ox-LDL 处理 24 h；对照组使用 DMEM 培养，未加入 ox-LDL。

1.2.3　细胞转染　在细胞达到 60%～ 80%密度时，使用 Lipofectamine 2000 将 miR-26a-5p mimic 及 miR-NC 分别转染 VSMCs，孵育 24 h 后进行后续实验。细胞分为对照组、ox-LDL 组、ox-LDL+NC mimic 组、ox-LDL+miR-26a-5p mimic 组。通过 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA，根据相应试剂盒说明书合成 cDNA。根据 qRT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应，引物序列见表 1。

1.2.4　细胞活性检测　使用 CCK-8 检测细胞活力，将细胞接种到 96 孔板，并与 ox-LDL 共同孵育。向细胞中加入 10 μl CCK-8 溶液孵育 3 h，使用酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值。

1.2.5　细胞增殖检测　将细胞接种到 96 孔板中（2×10^3 细胞/孔），然后加入 10 nmol/L 的 EDU 处理 12 h，用磷酸盐缓冲盐水（PBS）清洗后，将细胞固定在 4%多聚甲醛中，根据说明书步骤进行染色，在荧光显微镜下观察细胞增殖。

1.2.6　细胞迁移和侵袭检测　（1）划痕实验：将细胞接种到 6 孔板（8×10^5 细胞/孔），在细胞生长至汇合时使用移液管尖端刮擦细胞层并用无血清培养基洗涤去除分离的细胞，在 0、24 h 时观察并拍摄细胞照片。（2）Transwell 实验：将细胞重悬于无血清培养基中，将 100 μl 细胞悬浮液（5×10^4 细胞）添加至 Transwell 培养板的上室，向底部室中加入 500 μl 培养基（含 10 %胎牛血清），随即置于板 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。将细胞在预冷甲醇中固定 30 min。然后加入结晶紫染色 1 min，用 PBS 清洗 3 次后，在

表 1　引物序列

基因	序列（5’-3’）
miR-26a-5p F	CGACGCGATTCAAGTAATCCAGG
miR-26a-5p R	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG
miR-26a-5p RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCCTA
U6 F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6 R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

显微镜下进行观察并拍摄。

1.2.7　细胞泡沫化检测　(1)油红O染色(ORO)实验：细胞固定在含4%多聚甲醛的PBS中，然后用PBS冲洗3次。将细胞在室温下用ORO染色30 min，在荧光显微镜下观察并拍摄。(2)免疫荧光(IF)实验：在4%多聚甲醛中固定细胞，随后用PBS清洗3次。加入0.1% Triton透化30 min，用PBS清洗3次，加入1% BSA封闭1 h。将细胞置于BSA稀释的α-SMA抗体(1∶100)中，4 ℃孵育过夜。用PBST清洗3次，添加荧光二抗，在37 ℃孵育1 h后，用PBST清洗3次，将细胞与DAPI溶液避光孵育5 min，用PBST洗涤后并在荧光显微镜下观察并拍摄。

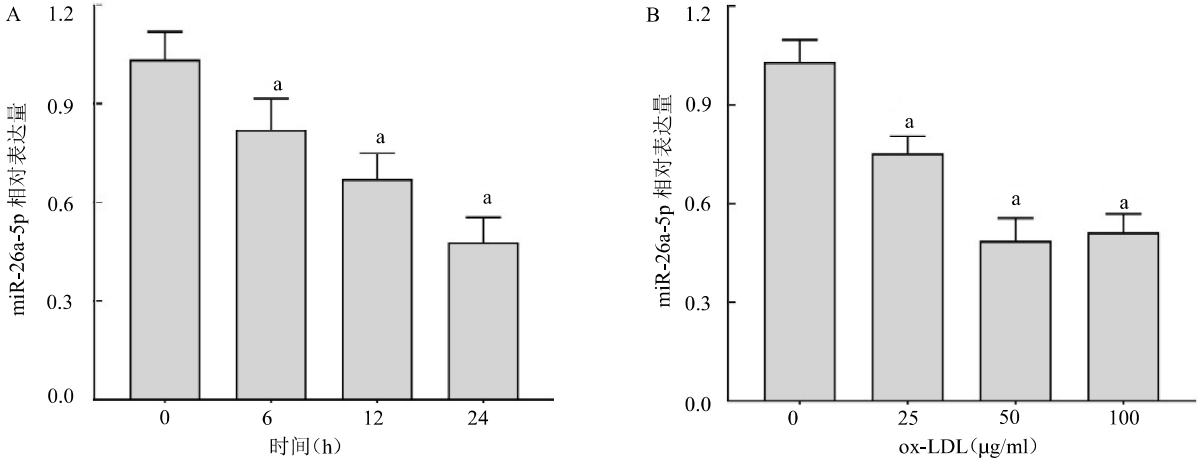
1.3　统计方法　采用GraphPad Prism 8.0统计软件进行分析。正态分布的计量资料以均数±标准差表示，多样本比较采用方差分析，多重比较采用Student's *t* 检验。$P < 0.05$表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　不同ox-LDL处理浓度及时间VSMCs中miR-26a-5p的表达　随着ox-LDL处理VSMCs时间的延长，及ox-LDL浓度的增加，VSMCs中miR-26a-5p的表达水平逐渐降低，见图1。当ox-LDL浓度高于50 μg/ml时，VSMCs中miR-26a-5p表达并未发生明显降低，因此选择50 μg/ml ox-LDL作后续研究。

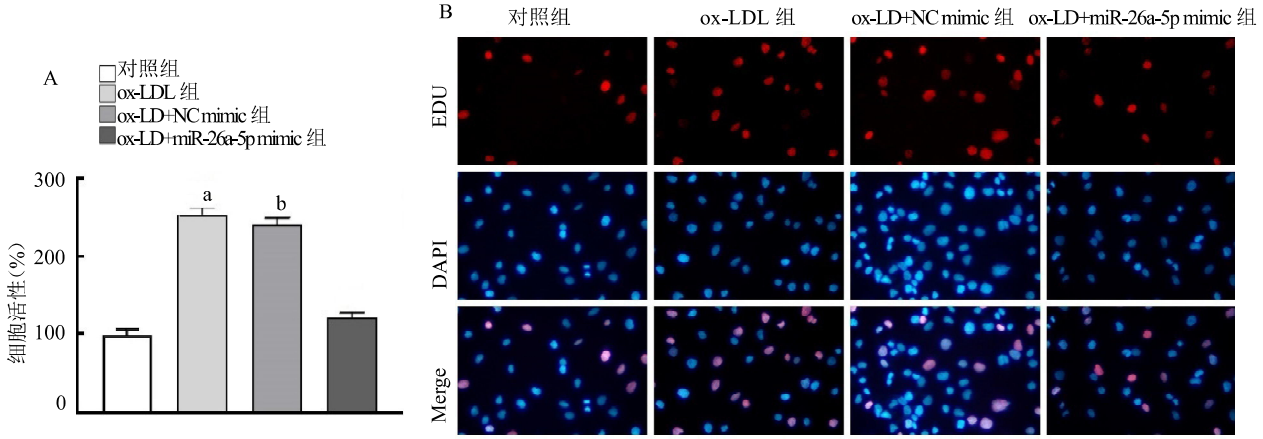
2.2　miR-26a-5p对VSMCs活力和增殖能力的影响　与对照组比较，ox-LDL组VSMCs细胞活力显著上调($P < 0.05$)(图2A)，细胞增殖能力明显增强(图2B)。与ox-LDL+NC mimic组比较，ox-LDL+miR-26a-5p mimic组VSMCs的细胞活力显著降低($P < 0.05$)(图2A)，细胞增殖能力明显减弱(图2B)。

2.3　miR-26a-5p对VSMCs迁移和侵袭能力的影响　与对照组相比，ox-LDL组细胞迁移(图3A)和侵袭



注：A为使用50 μg/ml ox-LDL处理VSMCs不同时间，qRT-PCR检测miR-26a-5p相对表达水平，与0 h组比较，a$P < 0.05$；B为使用不同浓度ox-LDL处理VSMCs 24 h，qRT-PCR检测miR-26a-5p相对表达水平，与0 μg/ml组比较，a$P < 0.05$。ox-LDL：氧化型低密度脂蛋白，VSMCs：血管平滑肌细胞

图1　ox-LDL诱导对VSMCs中miR-26a-5p表达的影响



注：A为细胞活力的CCK-8检测；与对照组比较，a$P < 0.05$，与ox-LDL+NC mimic组比较，b$P < 0.05$；B为VSMCs增殖能力情况(EDU染色，×200)(ox-LDL为50 μg/ml)。ox-LDL：氧化型低密度脂蛋白，VSMCs：血管平滑肌细胞

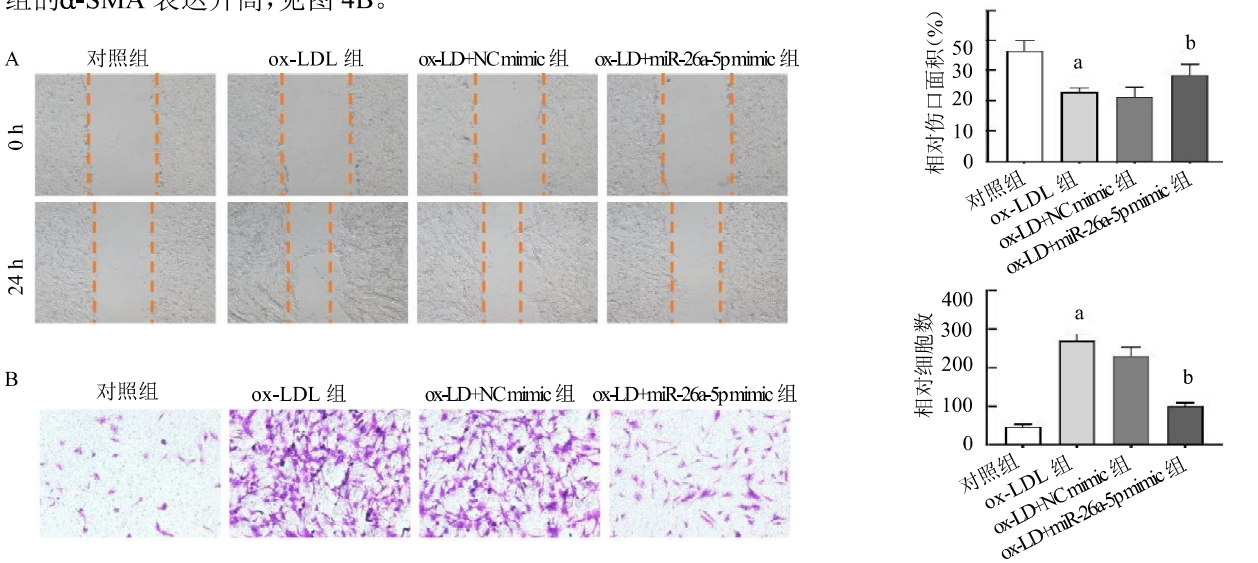
图2　miR-26a-5p对VSMCs活力和增殖能力的影响

（图 3B）能力显著增强。与 ox-LDL+NC mimic 组相比，miR-26a- 5p mimic 组细胞迁移（图 3A）和侵袭（图 3B）能力减弱。

2.4　miR-26a-5p 对 VSMCs 泡沫化的影响　与对照组相比，ox-LDL 组内脂质聚集增加，相对泡沫化程度增加；与 ox-LDL+NC mimic 组相比，ox-LDL+miR-26a-5p mimic 组有效地逆转了该变化，见图 4A。与对照组相比，ox-LDL 组α-SMA 表达降低；与 ox-LDL+NC mimic 组相比，ox-LDL+miR-26a-5p mimic 组的α-SMA 表达升高，见图 4B。

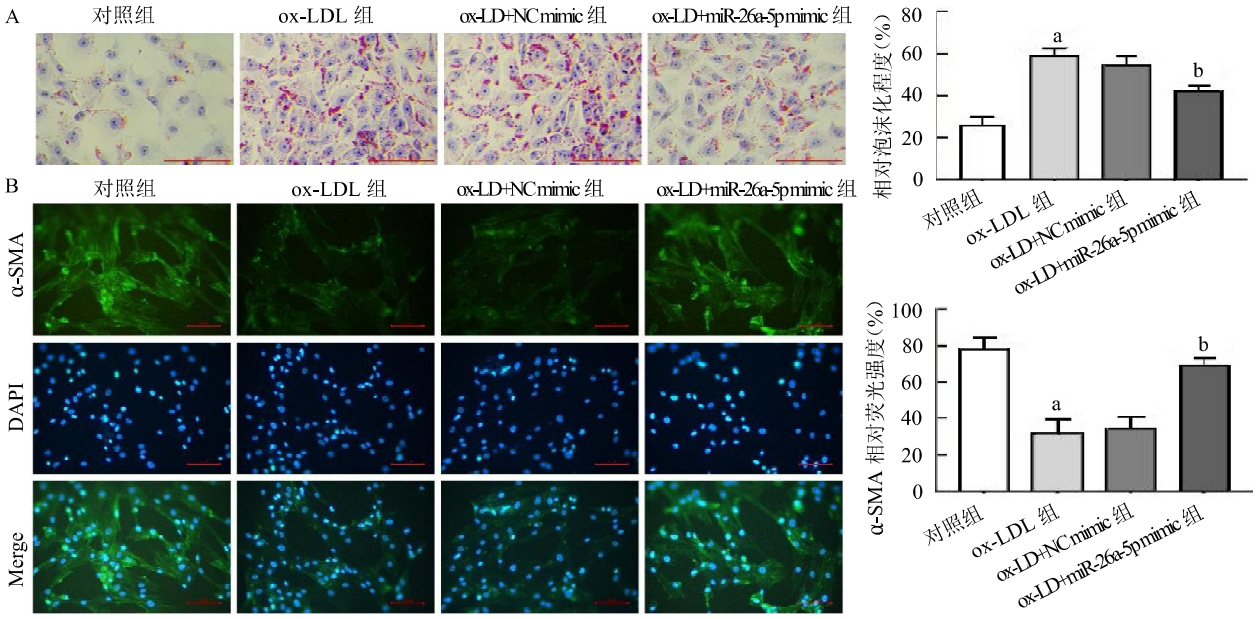
3　讨论

AS 是与氧化应激反应和内皮功能障碍相关的慢性血管炎症性疾病。氧化应激增加在血管内皮功能障碍、炎症和细胞凋亡等发病机制中起着重要作用[8]。ox-LDL 已被证明可促进活性氧的生成，这在 AS 的进展中起着关键作用[9]。ox-LDL 可通过多种机制诱导 AS，如促进内皮细胞激活和功能障碍，泡沫细胞形成，影响 VSMCs 的凋亡、增殖和侵袭[10]。本研究结果也证实，ox-LDL 能使 VSMCs 细胞的增



注：A 为划痕实验（×100），检测 VSMCs 的迁移能力；B 为 Transwell 实验（结晶紫染色，×200），检测 VSMCs 的侵袭能力，与对照组比较，aP ＜ 0.05，与 ox-LDL+NC mimic 组比较，bP ＜ 0.05。ox-LDL：氧化型低密度脂蛋白，VSMCs：血管平滑肌细胞

图 3　miR-26a-5p 对 VSMCs 迁移和侵袭能力的影响



注：A 为油红 O 染色实验（油红 O 染色，×400），观察各组内脂质聚集情况；B 为免疫荧光实验（免疫荧光染色，×400），检测各组α-SMA 的表达（ox-LDL 为 50 μg/ml），与对照组比较，aP ＜ 0.05，与 ox-LDL+NC mimic 组比较，bP ＜ 0.05。ox-LDL：氧化型低密度脂蛋白，α-SMA：α-平滑肌肌动蛋白，VSMCs：血管平滑肌细胞

图 4　miR-26a-5p 对 VSMCs 泡沫化的影响

殖、迁移、侵袭和泡沫化程度明显增强。

有研究发现，miR-21-3p 可以通过促进 VSMCs 的迁移和增殖来加速 AS 的发展[11]。抑制 miRNA-130a 能够起到改善 AS 炎症的效果[12]。还有研究发现通过 AKT/NF-κB 途径靶向 miR-26a-5p 可促进 AS 的进展[13]。本研究发现，miR-26a-5p 在 ox-LDL 处理的 VSMCs 中的表达随 ox-LDL 处理浓度升高和时间增加而降低。此外，过表达 miR-26a-5p 可显著抑制 VSMCs 的细胞活性，提示 miR-26a-5p 参与 AS 疾病发展过程。

VSMCs 的增殖和迁移是 AS 发生发展的重要步骤[14]。在某些病理情况下，VSMCs 被激活并恢复其高度增殖的特性，从而促成了动脉壁的增厚和僵化，增强 VSMCs 迁移可以促进 AS 的进展，而阻断 VSMCs 在体外的增殖和迁移并诱导其凋亡可以抑制 AS 的发展[15]。本研究发现，在 ox-LDL 诱导的 VSMCs 中过表达 miR-26a-5p 可以降低细胞增殖、迁移和侵袭能力，这表明 miR-26a-5p 可以通过抑制 VSMCs 的增殖和迁移达到改善 AS 的作用。

泡沫细胞会导致 AS 斑块破裂，加速 AS 的发展，因此被视作为 AS 斑块病理特征和发展关键[16]。AS 斑块中的大多数泡沫细胞可能来源于 VSMCs[14]。有研究表明，抑制 VSMCs 形成泡沫细胞可以有效改善 AS[17]。α-SMA 是血管平滑肌的特异性标志蛋白，与 VSCMs 细胞泡沫化呈负相关。本研究发现，ox-LDL 能抑制α-SMA 表达，促进 VSCMs 泡沫化；而过表达 miR-26a-5p 后α-SMA 表达升高，VSCMs 的泡沫化程度降低。

综上所述，过表达 miR-26a-5p 可以抑制 VSMCs 的增殖、迁移、侵袭和泡沫化，从而改善 AS。miR-26a-5p 可以作为 AS 治疗的潜在靶点。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 赵妙惠：实验设计、文章撰写；周佳妮：实验操作、数据收集与统计分析；吴超群：研究指导、文章修改

参 考 文 献

[1] ZHU F, ZUO L, HU R, et al. A ten-genes-based diagnostic signa1 ture for atherosclerosis[J]. BMC Cardiovasc Disord,2021,21(1):513.

[2] OWENS G K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. Physiol Rev,1995,75(3):487-517.

[3] RUI R, YANG H, LIU Y, et al. Effects of berberine on atherosclerosis [J]. Front Pharmacol, 2021,12:764175.

[4] ZHAO J, NIU X, YU J, et al. Poria cocos polysaccharides attenuated ox-LDL-induced inflammation and oxidative stress via ERK activated Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibited foam cell formation in VSMCs[J]. Int Immunopharmacol,2020,80:106173.

[5] ZHANG X, ROTLLAN N, CANFRAN-DUQUE A, et al. Targeted suppression of miRNA-33 using pHLIP improves atherosclerosis regression [J]. Circ Res,2022,131(1):77-90.

[6] JIA Z, AN L, LU Y, et al. Oxidized low density lipoprotein-induced atherogenic response of human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) was protected by atorvastatin by regulating miR-26a-5p/phosphatase and tensin homolog (PTEN)[J].Med Sci Monit,2019, 25:9836-9843.

[7] ZHONG X, ZHANG L, LI Y, et al. Kaempferol alleviates ox-LDL-induced apoptosis by up-regulation of miR-26a-5p via inhibiting TLR4/NF-κB pathway in human endothelial cells[J]. Biomed Pharmacother,2018,108:1783-1789.

[8] BAI Y, LIU X, CHEN Q, et al. Myricetin ameliorates ox-LDL-induced HUVECs apoptosis and inflammation via lncRNA GAS5 upregulating the expression of miR-29a-3p[J]. Sci Rep,2021,11 (1):19637.

[9] MARCHIO P, GUERRA-OJEDA S, VILA J M, et al. Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation[J]. Oxid Med Cell Longev,2019,2019:8563845.

[10] PIRILLO A, NORATA G D, CATAPANO A L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis[J]. Mediators Inflamm,2013,2013:152786.

[11] ZHU J, LIU B, WANG Z, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation[J]. Theranostics, 2019, 9(23):6901-6919.

[12] LIU F, LIU Y, DU Y, et al. MiRNA-130a promotes inflammation to accelerate atherosclerosis via the regulation of proliferator-activated receptor γ (PPARγ) expression[J]. Anatol J Cardiol,2021,25(9): 630-637.

[13] REN M, WANG T, HAN Z, et al. Long noncoding RNA OIP5-AS1 contributes to the progression of atherosclerosis by targeting miR-26a-5p through the AKT/NF-κB pathway[J]. J Cardiovas Pharmacol,2020,76(5):635-644.

[14] PI S, MAO L, CHEN J, et al. The P2RY12 receptor promotes VSMC-derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced atherosclerosis[J]. Autophagy,2021,17(4):980-1000.

[15] ALLAHVERDIAN S, CHAABANE C, BOUKAIS K, et al. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis[J]. Cardiovasc Res,2018,114(4):540-550.

[16] ALLAHVERDIAN S, CHEHROUDI A C, MC MANUS B M, et al. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis[J]. Circulation,2014,129(15):1551-1559.

[17] ZHANG D D, SONG Y, KONG P, et al. Smooth muscle 22 alpha protein inhibits VSMC foam cell formation by supporting normal LXRα signaling, ameliorating atherosclerosis[J]. Cell Death Dis, 2021,12(11):982.

收稿日期：2023-12-20

（本文编辑：孙海儿）