

# 奥美沙坦酯通过上调 miR-3133 抑制衰老相关血管平滑肌细胞的迁移和侵袭

两字姓名中间有一空格

作者单位必须精确到科室/处室/学院等二级单位,后面需写清省、市及邮编

张艺, 盛帅, 梁庆阳, 张莉  
广东药科大学附属第一医院心血管内科, 广东 广州 510080

中英文摘要包括目的、方法、结果及结论四部分。

摘要中方法部分需用简练的文字写出分组依据、分组方法及相应的处理方法。

**摘要:**目的 探讨奥美沙坦酯(OMST)抑制衰老相关人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMCs)迁移和侵袭能力的作用及微小RNA(miRNA)参与的机制。方法 HA-VSMCs体外培养,分别经博莱霉素(BLM)诱导衰老、OMST干预及瞬时转染miR-3133 NC/miR-3133 inhibitor。分别设置对照组:HA-VSMCs正常培养;BLM组:HA-VSMCs+BLM;OMST组:HA-VSMCs+BLM+OMST;OMST+miR-3133 NC组:HA-VSMCs转染miR-3133 NC+BLM+OMST;OMST+miR-3133 inhibitor组:HA-VSMCs转染miR-3133 inhibitor+BLM+OMST。划痕实验和Boyden小室侵袭实验分别测定HA-VSMCs迁移和侵袭力。明胶酶谱分析测定HA-VSMCs中金属基质蛋白酶-2(MMP-2)分泌。MiRNA生物芯片测定差异表达miRNA并行qRT-PCR验证。结果 与对照组相比,BLM组划痕实验和侵袭实验显示细胞迁移和侵袭力增加[(78.43±12.76)% vs (42.47±7.22)%;33.33±5.51 vs 13.00±4.36, P<0.05],MMP-2分泌水平增加[1.66±0.27 vs 0.87±0.13, P<0.05],而OMST干预可抑制增加的细胞迁移/侵袭力和MMP-2分泌。生物芯片检测显示,以上3组存在差异miRNAs表达。qRT-PCR证实BLM组miR-3133表达下调,而OMST组miR-3133表达上调。与OMST组相比,OMST+miR-3133 inhibitor组HA-VSMC迁移和侵袭能力增加[(85.87±7.39)% vs (49.77±3.05)%;34.67±2.31 vs 20.00±4.58, P<0.05];MMP-2分泌水平也增加(1.76±0.19 vs 0.94±0.10, P<0.05)。结论 OMST能抑制衰老HA-VSMC的迁移和侵袭能力,这一过程可能是通过上调miR-3133表达实现的。

**关键词:**奥美沙坦酯;血管平滑肌细胞;衰老;迁移;侵袭;微小RNA

关键词用分号隔开

结果部分需在文字描述后写清关键数据及统计值。

## Olmесartan inhibits age-associated migration and invasion of human aortic vascular smooth muscle cells by upregulating miR-3133 axis

英文姓氏大写,名首字母大写

ZHANG Yi, SHENG Shuai, LIANG Qingyang, ZHANG Li  
Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China

“目的、方法、结果、结论”的英文统一使用“Objective, Methods, Results, Conclusion”

**Abstract:** **Objective** To explore the effects of olmesartan on age-associated migration and invasion capacities and microRNA(miRNA) axis in human aortic vascular smooth muscle cells (HA-VSMCs). **Methods** Cultured HA-VSMCs were divided into control group, bleomycin-mediated senescence (BLM) group and bleomycin + olmesartan treatment group. Wound-healing assay and Boyden chambers invasion assay were used to assess the changes in migration and invasion of the cells, gelatin zymography was used to analyze matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activation in the cells. The differentially expressed miRNAs were identified by miRNA microarray assay and validated by quantitative real-time PCR. MiR-3133 inhibitor was used to examine the effects of molecular manipulation of olmesartan on age-associated migration and invasion and MMP-2 activation in the cells. **Results** Compared with those of the control group, the percentage of the repopulated cells and the number of cells crossing the basement membrane increased significantly in BLM group [(78.43±12.76)% vs (42.47±7.22)%, P<0.05; 33.33±5.51 vs 13.00±4.36, P<0.05]. A significant increase of MMP-2 activation was found in BLM group as compared with the control group (1.66±0.27 vs 0.87±0.13, P<0.05). Olmesartan significantly inhibited BLM-induced enhancement of cell migration and invasion and MMP-2 secretion in the cells. MiR-3133 was significantly downregulated in BLM group and upregulated in olmesartan group. Transfection with miR-3133 inhibitor significantly reversed the effects of olmesartan on age-associated migration and invasion of the cells [(85.87±7.39)% vs (49.77±3.05)%; 34.67±2.31 vs 20.00±4.58, P<0.05] and MMP-2 activation in the cells (1.76±0.19 vs 0.94±0.10, P<0.05). **Conclusion** Olmesartan inhibits the migration and invasion of age-associated HA-VSMCs probably by upregulating of the miR-3133 axis.

**Keywords:** olmesartan; vascular smooth muscle cells; aging; migration; invasion; microRNA

英文标题、作者名、作者单位、摘要和关键词部分应与中文完全一致

血管老化是全身衰老的基石,伴随分子和细胞功能紊乱的血管衰老被认为是心血管疾病的一个特殊危险

因素,可导致动脉粥样硬化和高血压等<sup>[1-2]</sup>。报道指出近似85%的心血管疾病死亡患者发生于65岁或以上<sup>[3]</sup>。血管平滑肌细胞(VSMCs)是血管壁中的主要细胞,在维持血管结构和稳定血管功能中起着不可或缺的作用<sup>[2]</sup>。衰老时血管壁发生重构,这一过程中VSMCs的不正常迁移和侵袭可引起血管内膜弥漫性增厚,进一步促进心血管疾病的发生和发展<sup>[2,4]</sup>。研究发现,干预衰老相关的VSMC迁移和侵袭可减少及延缓严重心血管疾病的

收稿日期:2019-11-08

基金项目:国家自然科学基金(81774241);广东省医学科学技术研究基金(A2017029);广东省科技计划项目(2017ZC0207)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81774241).

作者简介:张艺,硕士研究生,E-mail: 651193780@qq.com

通信作者:张莉,教授,硕士生导师,E-mail: zhangli4029@126.com

作者简介需写明第一作者和通信作者的职称、学历及E-mail

基金需写明项目名称及项目编号,国家级及以上基金需添加项目的英文名称

发生和发展<sup>[4]</sup>。但目前研究仅能量限制具明确延缓衰老及抑制衰老相关的VSMCs迁移和侵袭作用<sup>[5-6]</sup>。寻求其他干预手段以抑制衰老相关的VSMCs迁移和侵袭,进而减少严重心血管疾病的发生率和死亡率具有重要的意义。

血管紧张素 II(Ang II)信号在血管衰老相关的重构中起重要作用,可诱导动脉血管壁重构,包括内膜-中膜增厚、介导衰老相关的VSMCs迁移/侵袭能力等<sup>[7-8]</sup>。另外,衰老VSMCs分泌金属基质蛋白酶-2(MMP-2)活性增强,MMP-2能够在VSMC周围裂解细胞基底膜和弹性纤维,从而导致细胞外基质降解,使VSMC发生迁移、侵袭和扩散<sup>[9-10]</sup>。研究发现,激活的Ang II信号通过增加MMP-2的活性诱导VSMCs衰老,且增加VSMCs的迁移/侵袭能力<sup>[11-13]</sup>。Ang II水平的升高对血管重构的影响是衰老相关心血管疾病的重要表现,因此抑制Ang II信号可能成为抑制衰老相关VSMCs迁移/侵袭的新手段。奥美沙坦酯(OMST)是Ang II受体拮抗剂,其抗血管重构作用已被证实,但目前无OMST对血管衰老及衰老相关VSMCs迁移/侵袭影响的研究。

小分子RNA中的微RNA(miRNAs)是目前在不同状态不同疾病中研究较多的非编码RNAs,研究发现miRNAs功能的改变(其表达上调或下调)通过调节关键分子通路影响衰老相关基因表达,与衰老引起的各种心血管疾病的发生与发展密切相关<sup>[14-15]</sup>。那么,通过基因芯片技术获得的特定的miRNA是否参与衰老相关的VSMC迁移和侵袭?本研究拟通过在VSMCs中改变特定的miRNA表达初步研究OMST对衰老相关的VSMCs迁移/侵袭的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMCs)(ATCC,美国)。F-12K培养基(ATCC)。博莱霉素(BLM)(美国Selleckchem),OMST(美国Selleckchem),衰老相关β半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色液(C0602,碧云天生物科技),24孔板伤口愈合实验试剂盒(深圳欣博盛生物科技),BD基底胶(356234,北京索莱宝科技有限公司),10% Novex 明胶酶谱实验预制胶(美国Invitrogen),Qiagen RNeasy mini 试剂盒(上海宾智生物科技有限公司),Exiqon miRCURY™ LNA microRNA 芯片(康成生物),GeneChip Scanner 3000 扫描仪(美国Affymetrix)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HA-VSMCs在含10%胎牛血清的F-12K培养基中培养。培养基中补充0.05 mg/mL抗坏血酸,0.01 mg/mL胰岛素,0.01 mg/mL转铁蛋白,10 ng/mL亚硒酸钠、0.03 mg/mL内皮细胞生长添加剂、10 mmol/L羟乙基哌嗪乙磺酸和10 mmol/L三(羟甲基)-甲基氨基-

乙基磺酸。研究分为3组:BLM组:HA-VSMCs培养、传代(少于3~5代),用BLM(0.5 μg/mL)处理48 h,诱导衰老。OMST组:OMST(2 mmol/L)在BLM干预前预处理2 h。未干预的为对照组。培养基每2 d更换1次。

1.2.2 SA-β-gal 染色 SA-β-gal是鉴定衰老细胞的生物学标志物。HA-VSMCs接种于6孔板中,待细胞生长至50%时,用PBS清洗两次后,4%多聚甲醛固定5 min,然后用SA-β-gal染色液染色。随机选取4个视野在显微镜下观察,计数阳性细胞(SA-β-gal阳性)。

1.2.3 伤口愈合/细胞迁移实验 3~5代2×10<sup>4</sup>经各种干预措施处理的HA-VSMCs接种于预先放置好用于产生伤口 gap 插槽的24孔培养板中,细胞生长至100%融合形成单层后移动插槽,从而形成1个均一的0.9 mm伤口。随后细胞生长48 h后,经染色观察伤口周围细胞的愈合及转移现象。通过计算再填充细胞面积占初始无细胞伤口面积的百分比,评价伤口愈合程度。

1.2.4 改良 Boyden 小室侵袭实验 用改良的 Boyden 小室测定血清趋化的侵袭实验。8.0 μm 孔径的聚碳酸酯膜 Boyden 小室的上室用 BD 基底胶包被形成基质屏障。将3~5代2×10<sup>5</sup>经各种干预措施处理的无血清F-12K培养基培养的HA-VSMCs悬液100 μL加入 Boyden 小室的上室。下室则加入600 μL含10% FBS的F-12K培养基。将 Boyden 小室置于37 ℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4 h后,干棉签吸附上室内液体、湿棉签轻轻擦去BD基底胶上室面的细胞,穿过基质屏障且迁移至BD基底胶下室面的细胞进行4%甲醛固定及0.02%结晶紫染色。高倍镜下计数随机选取的4个视野,取平均值代表细胞侵袭力。

1.2.5 明胶酶谱分析 3~5代HA-VSMCs经各种干预措施处理后,收集上清液,将上清液移入离心管500×g离心10 min,-70 ℃储存备用。同等量蛋白上样于10% Novex 明胶酶谱实验预制胶在4 ℃进行电泳(90 V,3 h)。电泳后取下凝胶,用蒸馏水冲洗干净后浸入复性缓冲液,振荡30 min(以去除SDS及使MMP2酶复性,期间可更换1次缓冲液)倒掉复性缓冲液加入改为孵育缓冲液,37 ℃温浴约3 h或过夜。孵育结束后经0.2%的考马斯蓝染色3 h后脱色,显示出MMP-2(72 kD)为位于蓝色背景上的透亮带,拍摄凝胶的照片,并用ImageJ进行量化。

1.2.6 miRNA 生物芯片及数据分析 首先用TRIzol从HA-VSMCs中提取总RNA,进一步用RNeasy 试剂盒高效纯化。紫外分光光度仪上测RNA浓度。按照miRCURY™ LNA microRNA Array (Ex 标记试剂盒检测方法,使用by miRCURY Power labeling kit对细胞样品的总RNA进行标记,杂交后,芯片结果采用GeneChip Scanner 3000 系统进行扫描,用Command Console software(version 4.0; Affymetrix)读取原始数

血管紧张素 II(Ang II)信号在血管衰老相关的重构中起重要作用,可诱导动脉血管壁重构,包括内膜-中膜增厚、介导衰老相关的VSMCs迁移/侵袭能力等<sup>[7-8]</sup>。另外,衰老VSMCs分泌金属基质蛋白酶-2(MMP-2)活性增强,MMP-2能够在VSMC周围裂解细胞基底膜和弹性纤维,从而导致细胞外基质降解,使VSMC发生迁移、侵袭和扩散<sup>[9-10]</sup>。研究发现,激活的Ang II信号通过增加MMP-2的活性诱导VSMCs衰老,且增加VSMCs的迁移/侵袭能力<sup>[11-13]</sup>。Ang II水平的升高对血管重构的影响是衰老相关心血管疾病的重要表现,因此抑制Ang II信号可能成为抑制衰老相关VSMCs迁移/侵袭的新手段。奥美沙坦酯(OMST)是Ang II受体拮抗剂,其抗血管重构作用已被证实,但目前无OMST对血管衰老及衰老相关VSMCs迁移/侵袭影响的研究。

1、名词在文中出现3次以上的,需附英文缩写,后面可直接使用缩写;  
2、仅出现3次及以下的名词则使用中文全称;  
3、对于一些公认的名词(如MRI、DNA等),可直接使用英文缩写形式,不需要全称。

二级标题与正文间应另起一行

三级标题及以下,与正文之间空两格,不另起一行

据。归一化处理后,两组间差异表达 miRNAs 筛选采用 Fold-change(表达差异倍数>2.0)以及 t-test 检验方法进行。将筛选得到的不同组间的差异表达 miRNAs 通过聚类图进行直观的图形展示。

1.2.7 实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测差异表达之 miRNAs 表达水平,用 TRIzol 从 HA-VSMCs 中提取总

RNA。紫外分光光度仪上测 RNA 浓度,500 ng RNA 用第一链合成试剂盒反转录成 cDNA。采用染料法 (SYBR Green I)用 ABI Prism 7900 实时定量 PCR 系统 (Applied Biosystems)进行 Real-time 定量 PCR 分析, U6 用作内参。所有引物由引物设计软件 3.0(Applied Biosystems)设计并由 Invitrogen 公司合成(表 1)。

表 1 qRT-PCR 对差异表达 miRNA 的引物序列

Tab.1 Primer sequence of qRT-PCR for differentially expressed miRNAs

Gene	Primer sequence 5'-3'
miR-665	F: ACACTCCAGCTGGGACCAGGAGGCTGAGG RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGAGATCGGCAATTCAGTTGAGAGGGGG
miR-1267	F: ACACTCCAGCTGGGCCTGTTGAAGTGTAAT RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGAGATCGGCAATTCAGTTGAGTGGGGATT
miR-4742-3p	F: ACACTCCAGCTGGGTCTGTATTCTCCTTTGC RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGAGATCGGCAATTCAGTTGAGCTGCAGGCA
miR-193a-3p	F: ACACTCCAGCTGGGAACTGGCCTACAAAGTC RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGAGATCGGCAATTCAGTTGAGACTGGGAC
miR-5579-3p	F: ACACTCCAGCTGGGTTAGCTTAAGGAGTACC RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGAGATCGGCAATTCAGTTGAGGATCTGGT
miR-3133	F: ACACTCCAGCTGGGTAAAGAACTCTTAAAC RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGAGATCGGCAATTCAGTTGAGATTGGGTT
miR-4517	F: ACACTCCAGCTGGGAAATATGATGAAACTCACAG RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGAGATCGGCAATTCAGTTGAGCTCAGCTG
miR-942p	F: ACACTCCAGCTGGGCACATGGCCGAAACAGA RT: CTCAACTGGTGTCTGTTGAGATCGGCAATTCAGTTGAGACTTCTC
All	R: CTCAACTGGTGTCTGTTG
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT

F: Forward primer; R: Reverse primer; RT: Reverse transcription.

所有图表需在正文部分相对应处用括号标识,如“(表1)”、“(图1)”等

1、表格应使用三线表;  
2、数据较少时(如只有不足5个数据)请改用文字描述而不要罗列表格;  
3、涉及统计内容时,表格下方以表注的形式说明主要的统计量值,表中相应数据加以标记。  
4、表题采用中英文双语书写。

表格中涉及的名词缩写需在表注处附英文全称。

1.2.8 细胞转染 3~5代2×10<sup>5</sup>HA-VSMCs转染前1 d传代至6孔板,第2天细胞生长约50%~60%,用Lipofectamin 2000进行 has-miR-3133 inhibitor 及 has-miR-3133 NC (阴性对照)序列(上海英骏生物)转染,转染终浓度为50 nmol/L。转染48 h后,进行细胞相关测定。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS17.0软件进行统计处理,各指标以均数±标准差表示,多组采用单因素方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义。所有的实验都是独立重复3次。

## 2 结果

### 2.1 OMST 对衰老相关 HA-VSMC 迁移和侵袭能力的影响

应用BLM诱导建立 HA-VSMC 衰老模型,结果显示,与对照组相比,BLM组可使 SA-β-Gal 蓝染阳性细胞增多[(84.00±11.23)% vs (12.83±2.91)% ,P<0.05,图 1A]。划痕实验和侵袭实验证实,与对照组相比,BLM组增加

力 vs  
“统计学分析”部分应写明使用的统计学软件、采用的详细统计学方法(包括统计描述和统计推断)以及检验水准。以本文为例:采用SPSS17.0软件分析处理,计量资料中符合正态分布的以均数±标准差进行统计描述(不符合正态分布的以中位数和四分位数间距描述);计数资料以相对数进行统计描述。多组比较采用单因素方差分析(以\*\*法进行组间两两比较)。以P<0.05(双侧)为差异有统计学意义。所有实验都是独立重复3次。

13.00±4.36,  $P<0.05$ 。而与BLM组相比,OMST组伤口周围再填充细胞面积百分比和细胞侵袭力减少

[(53.23±9.20)% vs (78.43±12.76)%; 18.67±2.52 vs 33.33±5.51,  $P<0.05$ ,图1B,C]。

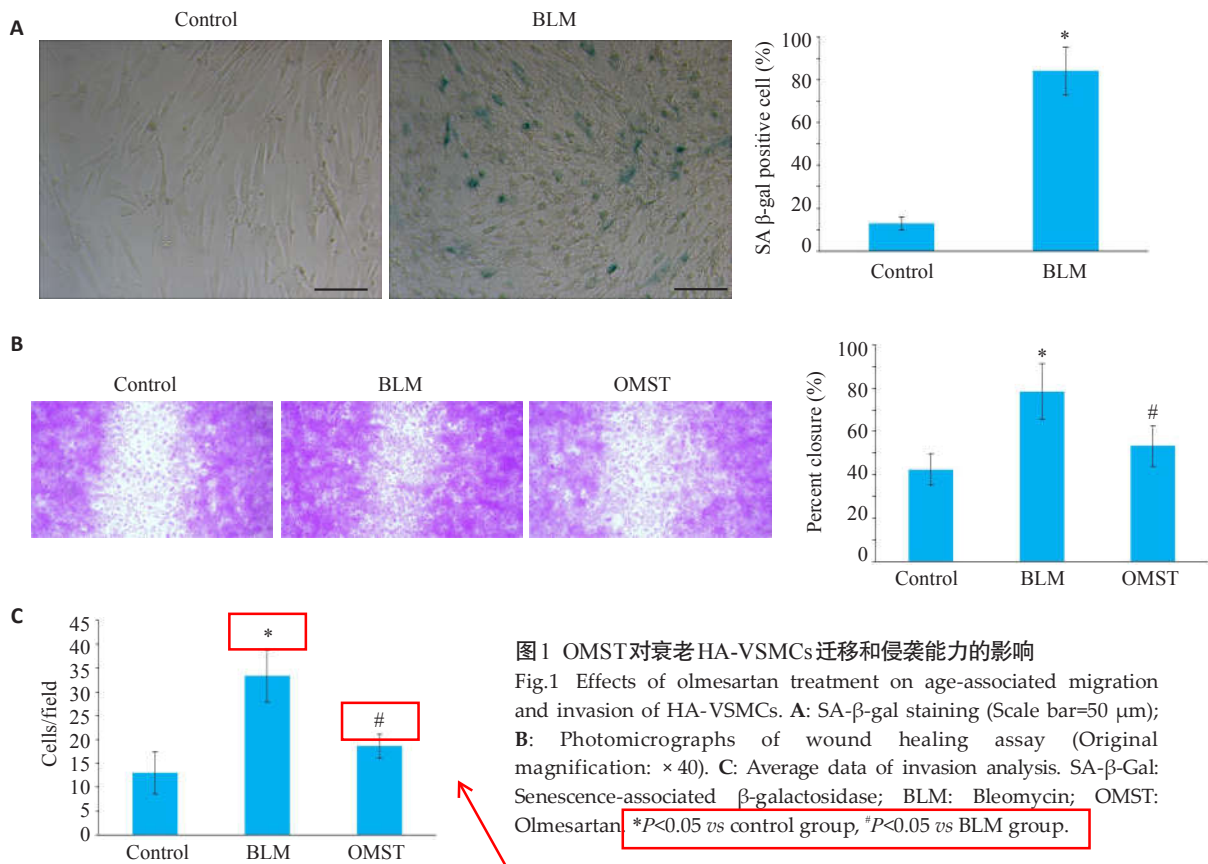


图1 OMST对衰老HA-VSMCs迁移和侵袭能力的影响

Fig.1 Effects of olmesartan treatment on age-associated migration and invasion of HA-VSMCs. A: SA-β-gal staining (Scale bar=50 μm); B: Photomicrographs of wound healing assay (Original magnification: ×40). C: Average data of invasion analysis. SA-β-Gal: Senescence-associated β-galactosidase; BLM: Bleomycin; OMST: Olmesartan. \* $P<0.05$  vs control group, # $P<0.05$  vs BLM group.

### 2.2 OMST对衰老HA-VSMC中MMP-2分泌的影响

与对照组比, BLM组中MMP-2分泌水平增加(1.66±0.27 vs 0.87±0.13,  $P<0.05$ ,图2)。然而,与BLM组相比,OMST组的MMP-2分泌水平则降低(1.01±0.08 vs 1.66±0.27,  $P<0.05$ )。

### 2.3 miR-3133为OMST干预衰老HA-VSMC的差异表达miRNAs

对照组、BLM组和OMST组HA-VSMCs行生物芯片检测,分析差异miRNAs表达,选取Top 8差异表达miRNAs,结果显示,3组差异表达miRNAs包括has-miR-1267、has-miR-665、has-miR-4742-3p、has-miR-

193a-3p、has-miR-5579-3p、has-miR-3133、has-miR-

45  
1、图题采用中英文双语书写;  
2、组合图片(如包括两张及以上图片)中的各张图片依次用大写字母编号(A、B、C等)。上传图片时,每个图片(包括组合图片中的各个图片)要分别保存在同一个文件夹内,文件夹命名采用“稿件编号+作者姓名+图片编号”的形式(如“201110111 宋建武 Fig.1”);  
3、请务必保证所有图片清晰、完整,分辨率要求:单个的图片文件一般在600 kb以上即可,最好不要超过2 M;  
4、图中若需要使用箭头、文字等进行标示,请分别提供标示后的图片和未经标示的原始照片(我们会按照作者提供的标示样式对图片进行后期加工);  
5、涉及统计内容时,在图下以图注的形式说明主要的统计量值,图中相应数据加以标记。

qRT-PCR结果显示,与对照组及miR-3133 NC组相比,miR-3133 inhibitor组miR-3133表达水平下调( $P<0.05$ )。检测联合miR-3133 inhibitor和OMST后

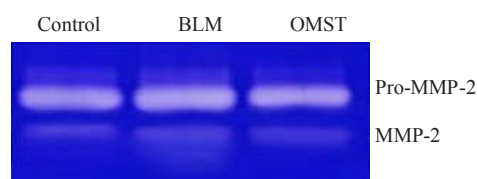
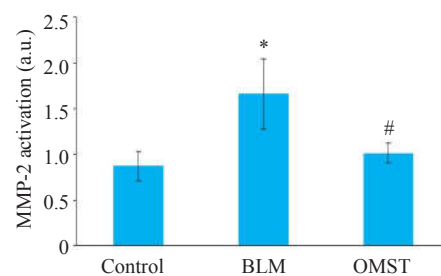


图2 OMST抑制衰老HA-VSMC中MMP-2的分泌

Fig.2 Olmesartan treatment reduces MMP-2 secretion in senescent HA-VSMC. BLM: Bleomycin; OMST: Olmesartan. \* $P<0.05$  vs control group, # $P<0.05$  vs BLM group.



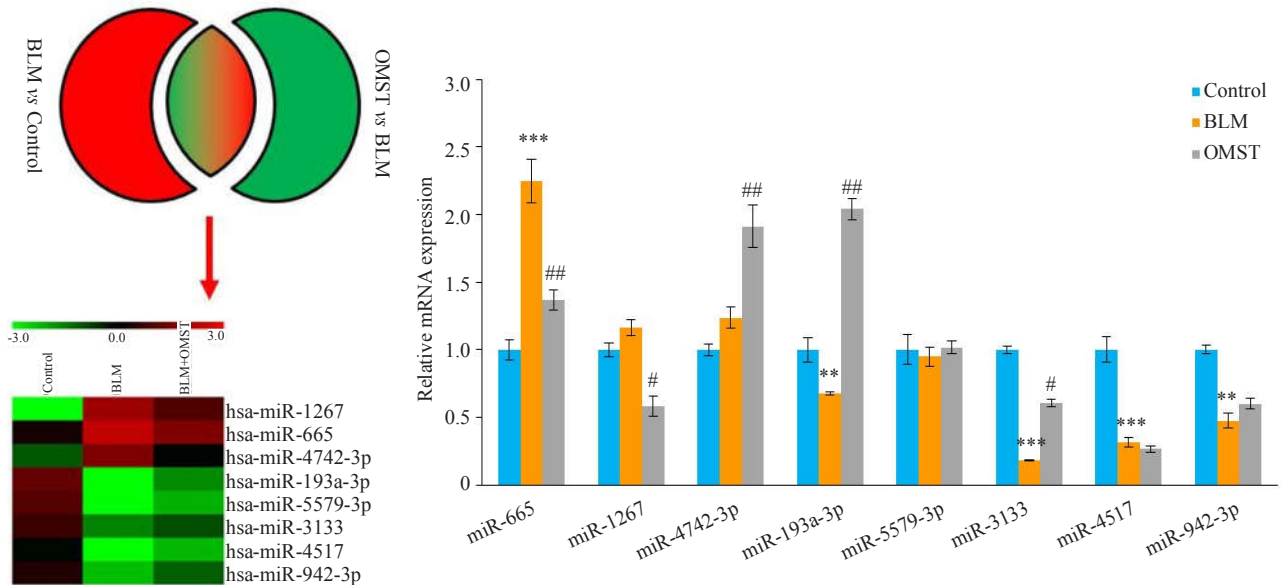


图3 miRNA芯片及qRT-PCR检测不同干预HA-VSMC的差异表达miRNAs

Fig.3 Differential expression of miRNAs in the 3 groups determined using microarray analysis and qRT-PCR assay. BLM: Bleomycin; OMST: Olmesartan. \*\* $P<0.05$  vs control group, \*\*\* $P<0.01$  vs control group, # $P<0.05$  vs BLM group, ## $P<0.01$  vs BLM group.

HA-VSMC 迁移和侵袭能力,实验分为4组:对照组、OMST组、OMST+miR-3133 NC组(OMST联合转染 miR-3133 NC 干预 BLM 诱导的衰老 HA-VSMCs)和 OMST+miR-3133 inhibitor 组(OMST 联合转染 miR-3133 inhibitor 干预 BLM 诱导的衰老 HA-VSMCs)。与 OMST 组相比,OMST+miR-3133 inhibitor 组 HA-VSMC 迁移和侵袭能力增加 [(85.87±7.39)% vs (49.77±3.05)%;34.67±2.31 vs 20.00±4.58, $P<0.05$ ];而 OMST+miR-3133 NC 组与 OMST 相比 HA-VSMC 迁移和侵袭能力差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图4)。

最后检测联合 miR-3133 inhibitor 和 OMST 后 MMP-2 水平变化。与 OMST 组相比,OMST+miR-3133 inhibitor 组 MMP-2 分泌水平增加(1.76±0.19 vs 0.94±0.10,  $P<0.05$ );而 OMST+miR-3133 NC 组与 OMST 组相比 HA-VSMC 中 MMP-2 分泌水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图4)。

### 3 讨论

药物干预衰老相关迁移和侵袭的细胞过程很难通过体内实验研究来实现。BLM 是一种常用的硬化剂,其生物化学作用包括诱导细胞周期 G2/M 期阻滞和降解细胞 DNA。BLM 可剂量依赖地增加 VSMC 的 SA- $\beta$ -Gal 活性,诱导细胞衰老<sup>[16]</sup>。因此,我们利用 BLM 诱导的 HA-VSMCs 衰老模型进行 OMST 对这一细胞过程影响的体外研究。本研究结果显示,OMST 能显著改善衰老增加的 HA-VSMC 的迁移和侵袭能力,同时可抑制

讨论部分不能只是对研究结果的罗列和总结,还需加强本文与他人文献的比较,分析不同之处,突出本文的研究意义。

MMP-2 的分泌,这一过程可能是通过上调 miR-3133 表达实现的。研究发现动脉内膜增厚与年龄呈线性相关,主要是由于 VSMCs 从血管中膜向内膜的迁移和侵袭<sup>[2,17]</sup>。虽然有研究表明衰老 VSMCs 表现为其迁移和侵袭能力下降<sup>[18-19]</sup>,但本研究用 BLM 诱导的衰老模型发现衰老 HA-VSMCs 迁移和侵袭能力增强,这与之前的研究报道衰老 VSMCs 较年轻 VSMCs 迁移/侵袭能力增加一致<sup>[7-8,11,20]</sup>。年轻 VSMCs 经多次传代后侵袭能力增加,可达衰老 VSMCs 水平,这一过程由激活的 Ang II 信号通过增加 MMP-2 活性所致<sup>[13]</sup>。不受控制的 MMPs 能够在 VSMC 周围裂解细胞基底膜和弹性纤维,从而导致细胞外基质降解,使 VSMC 发生衰老相关的迁移、侵袭和扩散。而衰老相关的迁移/侵袭特性可被 MMP 抑制剂 GM6001 逆转<sup>[11,13]</sup>。衰老 VSMCs 中 MMP-2 和 MMP-9 的产生增加,且均与 VSMCs 的迁移和侵袭有关<sup>[21-22]</sup>。而研究发现 MMP-2 是一衰老相关的标志物,在老化的动脉壁内,MMP-2 的表达明显增加,尤其是在增厚的内膜中<sup>[21]</sup>。此外,有研究发现 MMP-9 在体外诱导冠状动脉环内膜增厚的作用明显低于 MMP-2<sup>[23]</sup>。故本研究用 MMP-2 作为与细胞迁移/侵袭相关的 MMPs。当然需进一步应用特异的 MMP-2/MMP-9 抑制剂,及联合观察 MMP-2 和 MMP-9 以确定不同 MMPs 在衰老相关 VSMCs 迁移和侵袭中的作用。

虽然 OMST 的抗动脉粥样硬化和降压作用已被充分证实,OMST 也呈现抗炎作用及抗氧化特性<sup>[24]</sup>,但其影响衰老相关 VSMCs 迁移和侵袭的作用及机制仍未被

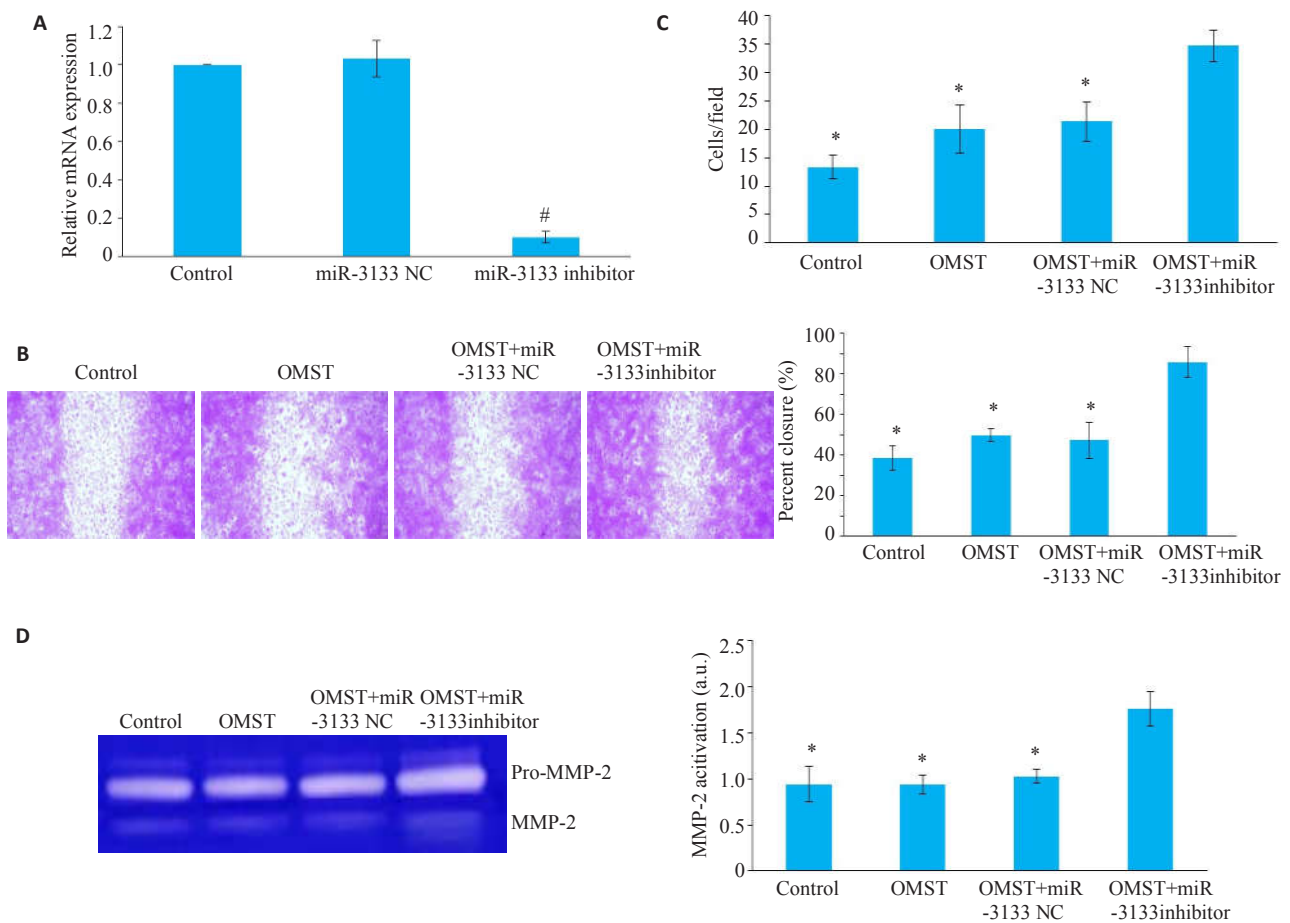


图4 miR-3133 inhibitor 逆转 OMST 抑制 HA-VSMC 迁移/侵袭力及 MMP-2 分泌的作用

Fig.4 MiR-3133 inhibitor reverses the effects of olmesartan on age-associated migration, invasion and MMP-2 secretion of HA-VSMC. A: mRNA expression; B: Photomicrographs of wound healing assay (Original magnification: ×40); C: Average data of invasion analysis; D: MMP-2 activation. \**P*<0.05 vs OMST+miR-3133 inhibitor group.

阐述。本研究发现 OMST 抑制衰老增加的 HA-VSMCs 迁移和侵袭能力。有报道其他 Ang II 受体拮抗剂可影响 VSMCs 迁移和侵袭能力,发现氯沙坦可抑制 Ang II 诱导的 VSMCs 增殖和迁移<sup>[25]</sup>。有学者也发现缬沙坦可激活 AMPK 通路,抑制 VSMCs 增殖和迁移<sup>[26]</sup>。目前没有直接 OMST 调节 MMP-2 水平影响细胞迁移/侵袭的研究,但已有研究发现 OMST 可通过降低 MMP-2 活化抑制内膜新生血管和粥样硬化斑块的形成<sup>[27]</sup>,以及成纤维细胞增殖<sup>[28]</sup>。我们前期研究发现氯沙坦干预可减少衰老 VSMCs 的 MMP-2 活性, MMP-2 活性的下降可减少对 Vasorin 的降解,进而抑制 Ang II 介导的衰老相关 VSMCs 侵袭<sup>[9]</sup>。

miRNAs 在细胞及组织衰老的进程中起关键作用<sup>[29]</sup>。基因芯片可以高通量的研究 miRNAs,对相关疾病发病机制的探讨具有明显的优势。本研究通过观察 OMST 干预后 miRNAs 表达改变,提出差异表达 miRNAs 可能参与衰老相关 HA-VSMC 迁移和侵袭过程的假设。研究发现对照组、BLM 组和 OMST 组经基

因芯片检测存在差异表达 miRNAs;经 qRT-PCR 验证 BLM 组中 miR-665 表达上调、miR-3133 表达下调,而 OMST 组 miR-665 表达下调、miR-3133 表达上调。国内外许多研究也证实,miRNAs 在衰老相关疾病的细胞迁移和侵袭方面发挥重要作用<sup>[30-31]</sup>。因已有研究证实 miR-3133 可影响肾癌细胞迁移和侵袭能力<sup>[32]</sup>,因此选择 miR-3133 进行进一步研究。本研究也发现 miR-3133 影响衰老 VSMCs 迁移/侵袭, miR-3133 抑制可抵销 OMST 减少衰老 VSMCs 迁移/侵袭力及 MMP-2 的作用,提示 OMST 通过 miR-3133 通路影响衰老相关 VSMCs 迁移和侵袭。MiR-3133 是新近发现的一个基因,来源于 2q37.3 号染色体,目前鲜有相关文献报道。唯一相关 miR-3133 的报道就是其与细胞及血管迁移/侵袭的研究。研究发现肾透明细胞癌患者 miR-3133 表达水平下调,其水平与血管侵袭呈负相关<sup>[32]</sup>;同时体外研究发现 miR-3133 过表达或抑制可减弱或增强肾透明细胞癌细胞的侵袭力和迁移力。

综上所述,本研究表明 OMST 干预衰老 HA-VSMCs

不仅可导致细胞迁移和侵袭能力减弱, MMP-2分泌减少,而且可上调miR-3133表达;同时发现抑制miR-3133可逆转OMST对HA-VSMCs迁移和侵袭作用的影响。因此,OMST干预及上调miR-3133可能成为治疗衰老相关血管内膜增厚的手段。

## 参考文献:

- 1、在正文中,依照其出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号、上标标出;  
2、参考文献的作者超过三位的只写前三位,后加“等”或“et al”,未超过的三位的应全部列出;  
3、以美国国立医学图书馆编辑的《Index Medicus》格式为准,可参考我刊过刊格式。
- [1] Harvey A, Montezano AC, Touyz RJ. Molecular Implications in hypertension [J]. *J Hypertens*, 2011, 29(12): 112-21.
- [2] Wang M, Jiang L, Monticone RE, et al. Proinflammation: the key to arterial aging [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(2): 72-9.
- [3] Karuppagounder V, Giridharan VV, Arumugam S, et al. Modulation of macrophage polarization and HMGB1-TLR2/TLR4 cascade plays a crucial role for cardiac remodeling in senescence-accelerated prone mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152922-33.
- [4] Lakatta EG. So what's aging? Is cardiovascular aging a disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 83(10): 1-13.
- [5] Al-Regaiey KA. The effects of calorie restriction on aging: a brief review [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(11): 2468-73.
- [6] Wang M, Zhang L, Zhu W, et al. Calorie restriction curbs proinflammation that accompanies arterial aging, preserving a youthful phenotype [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(18): e009112-20.
- [7] Chiang HY, Chu PH, Lee TH. MFG-E8 mediates arterial aging by promoting the proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells [J]. *J Biomed Sci*, 2019, 26(1): 61-72.
- [8] Zhang L, Wei C, Ruan Y, et al. Serum containing Buyang Huanwu decoction prevents age-associated migration and invasion of human vascular smooth muscle cells by up regulating SIRT1 expression [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(3): 282-90.
- [9] Pintus G, Giordo R, Wang Y, et al. Reduced vasorin enhances angiotensin II signaling within the aging arterial wall [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(43): 27117-32.
- [10] Jiang L, Zhang J, Monticone RE, et al. Calpain-1 regulation of matrix metalloproteinase 2 activity in vascular smooth muscle cells facilitates age-associated aortic wall calcification and fibrosis [J]. *Hypertension*, 2012, 60(5): 1192-9.
- [11] Fu Z, Wang M, Gucek M, et al. Milk fat globule protein epidermal growth factor-8: a pivotal relay element within the angiotensin II and monocyte chemoattractant protein-1 signaling cascade mediating vascular smooth muscle cells invasion [J]. *Circ Res*, 2009, 104(12): 1337-46.
- [12] Wang M, Khazan B, Lakatta EG. Central arterial aging and angiotensin II signaling [J]. *Curr Hypertens Rev*, 2010, 6(4): 266-81.
- [13] 张莉,王宇石,刘彧,等.炎症与血管老化炎症与血管老化[J]. *中华老年医学杂志*, 2016, 10(35): 1038-41.
- [14] Li Y, Zhu Y, Li G, Xiao J. Noncoding RNAs in cardiovascular aging [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1086(2): 37-53.
- [15] Lee S, Choi E, Cha MJ, et al. Impact of miRNAs on cardiovascular aging [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2015, 12(5): 569-74.
- [16] Gardner SE, Humphry M, Bennett MR, et al. Senescent vascular smooth muscle cells drive inflammation through an interleukin-1 $\alpha$ -dependent senescence-associated secretory phenotype [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(9): 1963-74.
- [17] Schmidt-Trucksass A, Grathwohl D, Schmid A, et al. Structural, functional, and hemodynamic changes of the common carotid artery with age in male subjects [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(4): 1091-7.
- [18] Johnson AM, Wagner R, Rzedzic EM. Age-related loss of SirT1 expression results in dysregulated human vascular smooth muscle function [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(4): H1401-11.
- [19] Zhao W, Zheng XL, Peng DQ, et al. Myocyte enhancer factor 2A regulates hydrogen peroxide-induced senescence of vascular smooth muscle cells via microRNA-143 [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(9): 2202-11.
- [20] Wang M, Spinetti G, Monticone RE, et al. A local proinflammatory signalling loop facilitates adverse age-associated arterial remodeling [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16653-63.
- [21] Wang M, Monticone RE, McGraw KR. Proinflammation arterial stiffness syndrome: a signature of large arterial aging [J]. *J Vasc Res*, 2018, 55(4): 210-23.
- [22] Wang M, Kim SH, Monticone RE, et al. Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis [J]. *Hypertension*, 2015, 65(4): 698-703.
- [23] Louis SF, Zahradka P. Vascular smooth muscle cell motility: from migration to invasion [J]. *Exp Clin Cardiol*, 2010, 15(3): e75-85.
- [24] Takiguchi S, Ayaori M, Uto-Kondo H, et al. Olmesartan improves endothelial function in hypertensive patients: link with extracellular superoxide dismutase [J]. *Hypertens Res*, 2011, 34(6): 686-92.
- [25] Dong X, Yu LG, Sun R, et al. Inhibition of PTEN expression and activity by angiotensin II induces proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(1): 174-82.
- [26] Zhao Y, Shang F, Shi W, et al. Angiotensin II receptor type 1 antagonists modulate vascular smooth muscle cell proliferation and migration via AMPK/mTOR [J]. *Cardiology*, 2019, 143(1): 1-10.
- [27] Wang X, Fan YZ, Yao L, Wang JM. Anti-proliferative effect of olmesartan on Tenon's capsule fibroblasts [J]. *Int J Ophthalmol*, 2016, 9(5): 669-76.
- [28] Cheng XW, Song H, Sasaki T, et al. Angiotensin type 1 receptor blocker reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Hypertension*, 2011, 57(5): 981-9.
- [29] 梁景南,朱文思,张灼,等. miR-199a-3p靶向Smad1促进小鼠心肌纤维化相关基因的表达[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(10): 1203-8.
- [30] Yu C, Wang Y. MicroRNA-19a promotes cell viability and migration of chondrocytes via up-regulating SOX9 through NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 9(12): 746-53.
- [31] Li X, Song Y, Liu D, et al. MiR-495 promotes senescence of mesenchymal stem cells by targeting Bmi-1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 780-96.
- [32] Chen X. Expression of microRNA-3133 correlates with the prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(24): e16008-17.

(编辑:林萍)