

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.12.1309

· 论 著 ·

微RNA-141靶向*Dlx5*基因对骨形态发生蛋白2诱导人主动脉瓣钙化的调控作用

杨潜[△], 王俊男[△], 凌新宇, 薛小飞, 肖健, 奚望*, 王志农
海军军医大学(第二军医大学)长征医院胸心外科, 上海200003

[摘要] **目的** 探讨miRNA-141对骨形态发生蛋白2(BMP-2)诱导人主动脉瓣钙化的调控作用及机制。

方法 收集24例人退行性主动脉瓣,用qRT-PCR及蛋白质印迹法检测miRNA-141和BMP-2的mRNA及蛋白表达水平。在人主动脉瓣膜间质细胞(HAVIC)中上/下调miRNA-141表达,通过Von Kossa染色比较细胞钙化,并比较远端缺失同源盒5(*Dlx5*)mRNA和BMP-2蛋白表达;双荧光素酶报告基因实验验证*Dlx5*是否为miRNA-141的靶基因。在主动脉瓣钙化小鼠和*Dlx5*基因敲除主动脉瓣钙化小鼠中,上/下调miRNA-141表达,通过Von Kossa染色比较主动脉瓣钙化,并检测BMP-2蛋白表达。**结果** 与正常主动脉瓣膜组织相比,人退行性主动脉瓣miRNA-141的表达降低(1.00 ± 0.02 vs 0.35 ± 0.06 , $P=0.01$),BMP-2的mRNA及蛋白表达增加(P 均=0.01)。在HAVIC中,上调/下调miRNA-141可抑制/促进钙化($P=0.02$ 或 $P=0.01$),并降低/升高*Dlx5*mRNA表达(P 均=0.01)及BMP-2蛋白的表达($P=0.02$ 或 $P=0.01$)。双荧光素酶报告基因实验验证了*Dlx5*为miRNA-141的靶基因。上调/下调主动脉瓣钙化小鼠miRNA-141可抑制/促进钙化(P 均=0.01),并降低/升高*Dlx5*、BMP-2 mRNA及蛋白的表达(P 均<0.05);*Dlx5*基因敲除小鼠中,上/下调miRNA-141不影响瓣膜钙化和BMP-2的表达。**结论** miRNA-141靶向*Dlx5*基因抑制BMP-2蛋白诱导的人主动脉瓣钙化。

[关键词] 主动脉瓣;瓣膜钙化;微RNA-141;远端缺失同源盒5;骨形态发生蛋白2

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)12-1309-05

Regulatory effect of microRNA-141 targeting *Dlx5* on bone morphogenetic protein-2 induced-calcification of human aortic valve

YANG Qian[△], WANG Jun-nan[△], LING Xin-yu, XUE Xiao-fei, XIAO Jian, XI Wang*, WANG Zhi-nong

Department of Cardiothoracic Surgery, Changzheng Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the regulating effects and mechanism of microRNA (miRNA)-141 on bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced calcification of human aortic valve. **Methods** Twenty-four samples of human degenerative aortic valve were collected, and the mRNA and protein expression levels of miRNA-141 and BMP-2 were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction and Western blotting. miRNA-141 was up/down-regulated in human aortic valve interstitial cells (HAVICs), Von Kossa staining was used to show cellular calcification, and mRNA expression of distal-less homeobox 5 (*Dlx5*) and protein expression of BMP-2 were compared. Dual luciferase experiment was used to verify whether *Dlx5* was the target gene of miRNA-141. miRNA-141 was up/down-regulated in aortic valve calcification mouse models with or without *Dlx5* knockout, Von Kossa staining was used to compare aortic valve calcification, and BMP-2 protein expression was detected. **Results** Compared with normal aortic valve tissues, the expression of miRNA-141 was significantly decreased in degenerative aortic valves (1.00 ± 0.02 vs 0.35 ± 0.06 , $P=0.01$), while the mRNA and protein expression levels of BMP-2 were significantly increased (both $P=0.01$). In HAVICs, the up/down regulation of miRNA-141 could inhibit/promote calcification ($P=0.02$ or $P=0.01$), and decrease/increase the mRNA expression of *Dlx5* (both $P=0.01$) and the protein expression of BMP-2 ($P=0.02$ or $P=0.01$). Dual luciferase experiment validated that miRNA-141 directly targeted *Dlx5*. In aortic valve calcification mouse model, up/down-regulation of miRNA-141 could inhibit/promote calcification (both $P<0.05$), and decrease/increase the mRNA and protein expression levels of *Dlx5* and BMP-2 (all $P<0.05$); while in mouse model

[收稿日期] 2020-07-04 **[接受日期]** 2020-12-08

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研课题(201640172),上海市领军人才计划(2015044). Supported by Scientific Research Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (201640172) and the Leading Talents Project of Shanghai (2015044).

[作者简介] 杨潜,博士,主治医师. E-mail: yangqiandoc@163.com; 王俊男,硕士生,助教、住院医师. E-mail: wangjunns@smmu.edu.cn

[△]共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885905, E-mail: xiwangdoc@163.com

with *Dlx5* knockout, there were no correlation between miRNA-141 expression and valvular calcification or BMP-2 expression. **Conclusion** miRNA-141 can inhibit human aortic valve calcification via regulating BMP-2 by targeting *Dlx5*.

[Key words] aortic valve; valvular calcification; micro RNA-141; distal-less homeobox 5; bone morphogenetic protein-2
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(12): 1309-1313]

钙化性主动脉瓣疾病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 指各种原因引起的、以主动脉瓣钙化为主要病理改变的疾病。CAVD 好发于老年人, 随着各国人口老龄化程度加剧, 其发病率正逐年增加^[1]。CAVD 发生过程涉及及内皮损伤、脂质浸润、慢性炎症、基质重塑、纤维化、细胞分化、进展性钙化及新生血管形成等复杂变化^[2-6], 其病理改变早期与动脉粥样硬化相似、晚期与骨形成类似^[7]。在晚期的进展性钙化过程中, 骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 起着重要作用。研究发现, BMP-2 可受 miRNA-141 调控^[3,8-9], 但 miRNA-141 调控 BMP-2 诱导主动脉瓣钙化的具体机制尚不明确。本研究通过人钙化主动脉瓣检测、人主动脉瓣膜间质细胞 (human aortic valve interstitial cell, HAVIC) 实验及主动脉瓣钙化小鼠模型实验, 探讨 miRNA-141 通过靶向作用远端缺失同源盒 5 (distal-less homeobox 5, *Dlx5*) 基因, 继而调控 BMP-2 蛋白诱导的人主动脉瓣钙化的可能机制。

1 材料和方法

1.1 组织标本 收集 2018 年 9 月至 2019 年 3 月在海军军医大学 (第二军医大学) 长征医院接受主动脉瓣膜置换术的 24 例 CAVD 患者的退行性主动脉瓣膜, 并通过尸检获得 24 例正常人主动脉瓣膜。标本使用经海军军医大学 (第二军医大学) 伦理委员会审批, 患者家属均已签署知情同意书。

1.2 正常人主动脉瓣膜 HAVIC 的原代培养及分组 瓣膜经冷 PBS 清洗、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化, 刮擦瓣膜内皮细胞层, 再将瓣膜剪成 3 mm×3 mm 大小薄片, 置于 II 型胶原酶溶液中, 37 °C 培养箱孵育 2 h。滤去瓣膜残渣, 移入离心管, 377.3×g 离心 5 min, 取沉淀。加入 1 mL 高糖 DMEM 培养液, 混匀, 移入培养皿, 常规培养, 2 d 后换液。细胞生长铺满培养瓶底 80% 左右时传代, 每 2 d 换液 1 次。选用培养第 3~4 代细胞进行研究。空白对照组 (Con) 以标准培养液培养 1 周; 实验组以含 10 mmol/L 地塞米松、50 mg/L 维生素 C 和 10 mmol/L β-甘油磷酸钠 (美国 Sigma

公司) 的钙化培养液进行钙化诱导培养 1 周, 并进一步分为单纯钙化培养液组 (Cal)、阴性对照组 (miR-NC)、miRNA-141 模拟组 (M-miR-141) 和 miRNA-141 抑制组 (I-miR-141), 每组 5 个样本。**1.3 小鼠模型构建与分组** 选取雄性 *Dlx5*^{-/-} *ApoE*^{-/-} 小鼠 45 只、雄性 *Dlx5*^{+/+} *ApoE*^{-/-} 小鼠 45 只 [SPF 级, 海军军医大学 (第二军医大学) 动物实验中心, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0003], 给予 0.2% 高胆固醇、高脂饮食喂养 24 周, 构建主动脉瓣钙化小鼠模型, 并分为空白对照组 (Con)、miRNA-141 下调 (miR-141⁻) 组和 miRNA-141 上调 (miR-141⁺) 组, 每组 15 只。培养 3 个月后以颈椎脱臼法处死小鼠, 收集小鼠主动脉瓣组织。

1.4 qRT-PCR 检测 miRNA-141、*Dlx5* mRNA 和 BMP-2 mRNA 的表达 采用 miRNA 反转录试剂盒进行反转录, 利用特异引物进行 qRT-PCR 检测。反应条件: 50 °C 2 min、95 °C 10 min; 95 °C 15 s、60 °C 1 min、72 °C 34 s, 共 40 个循环。miRNA-141 的表达以 *U6* 为内参, *Dlx5*、BMP-2 的表达以 β -actin 为内参, 基因的相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行分析。引物序列: *U6* 上游引物 5'-CGCTTCGGCAGCACATATACT-3', 下游引物 5'-GAATTTGCGTGTTCATCCTTGC-3'; miRNA-141 引物 5'-GCAGTGTTGGATGGTTGAAGTATG-3'; β -actin 上游引物 5'-AGGCTGTGTTGTCCTGTA-3', 下游引物 5'-ATGTCACGCACGATTTCC-3'; *Dlx5* 上游引物 5'-GCAAGATCACTAGACGGGAATCA-3', 下游引物 5'-GCATTGTGCGAAGTCGGATACAGAG-3'; BMP-2 上游引物 5'-TCATAAAACCTGCAACAGCCAACTCG-3', 下游引物 5'-GCTGTACTAGCGACACCCAC-3'。

1.5 蛋白质印迹法检测 *Dlx5* 和 BMP-2 蛋白的表达 使用 RIPA 裂解液 (美国 Thermo Fisher 公司) 裂解细胞并提取细胞总蛋白, 将蛋白质样品进行凝胶电泳后转膜、封闭, 再分别加入工作浓度为 1 : 1 000 的一抗 (BMP-2 抗体, 英国 Abcam 公司; *Dlx5* 抗体, 美国 Abgent 公司) 和工作浓度为 1 : 5 000 的二抗 (辣根过氧化物酶标记的兔源抗

体, 美国 Cell Signaling Technology 公司) 进行免疫反应。反应完成后使用 ECL 工作液 (美国 Thermo Fisher 公司) 显色, 观察目的蛋白的表达情况。以 β -actin 为内参。

1.6 HAVIC 转染 选用 50 nmol/L 的 miRNA-141 模拟物、miRNA-141 抑制物及阴性对照, 以 DharmaFect 转染试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 转染单层 HAVIC 培养物 (细胞密度为 $7.5 \times 10^4/\text{cm}^2$); 用生长培养液 (含有 10% FBS 的 DMEM) 进一步培养转染后细胞 24 h。

1.7 Von Kossa 染色及结果判定 使用 Von Kossa 试剂盒 (美国 Polysciences 公司) 对细胞及组织进行 Von Kossa 染色, 并进行半定量分析。细胞染色后, 综合考虑染色强度和阳性百分比, 采用染色指数法计算钙化得分。(1) 染色阳性细胞标记指数计分: 随机计数 500 个细胞 (高倍镜下), 根据标记指数 (labeling index, LI; 阳性细胞数目所占百分比) 分 4 个等级, 完全无着色为 0 分, $LI < 25\%$ 为 1 分, LI 在 $25\% \sim 50\%$ 之间为 2 分, $LI > 50\%$ 为 3 分。(2) 细胞着色强度计分: 按细胞染色后着色的深浅程度计 0~3 分, 与背景色基本一致、细胞没有着色计 0 分, 着色为浅黄色计 1 分, 着色呈棕色计 2 分, 着色为棕褐色计 3 分。以 LI 计分和着色强度计分的乘积作为最终得分。

1.8 双荧光素酶报告基因实验 应用 TargetScan 6.2 软件检索 miRNA-141 靶基因, 结果显示 *Dlx5* 基因可能是其潜在靶基因。收集第 3~4 代 HAVIC 细胞, 按每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板, 利用 PCR 法获取 HAVIC 细胞中的 cDNA 模板, 构建包含 miRNA-141 结合位点的 *Dlx5* 基因 3'-UTR 序列, 插入 pGL3-basic 荧光素酶质粒中, 形成报告基因质粒, 所有构建获得的表达质粒经酶切和测序鉴定。按照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行操作, 将上述重组质粒载体和 miRNA-141 模拟物、miRNA-141 模拟物阴性对照 (美国 Invitrogen 公司) 共转染 HAVIC 24 h 后行双荧光素酶报告基因检测。以荧光素为底物, 检测萤火虫荧光素酶活性; 加入 Stop&Glo 试剂 (美国 Promega 公司) 检测海肾荧光素酶活性, 并以其作为内参照; 同时加入抑制荧光素酶催化荧光素发光物质。计算各组细胞内的相对荧光素酶活性。荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值 / 海肾荧光素酶活性值。实验操作重复 2 次。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用

独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 以最小显著性差异法进行两两比较。计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 人钙化主动脉瓣 miRNA-141 和 BMP-2 表达变化 退行性主动脉瓣膜组 24 例患者中男 14 例 (58.3%), 女 10 例 (41.7%), 平均年龄 (63.7 ± 4.6) 岁; 正常主动脉瓣膜组 24 例中男 13 例 (54.2%)、女 11 例 (45.8%), 平均年龄 (66.8 ± 6.1) 岁; 两组间性别比例、平均年龄的差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。qRT-PCR 及蛋白质印迹法检测结果显示, 与正常瓣膜组织相比, 钙化主动脉瓣组织中 miRNA-141 的表达水平降低 (1.00 ± 0.02 vs 0.35 ± 0.06 , $P = 0.01$)、BMP-2 mRNA 表达水平增高 (1.00 ± 0.01 vs 1.72 ± 0.12 , $P = 0.01$)、BMP-2 蛋白的表达水平增高 (1.00 ± 0.01 vs 2.14 ± 0.17 , $P = 0.01$, 图 1)。

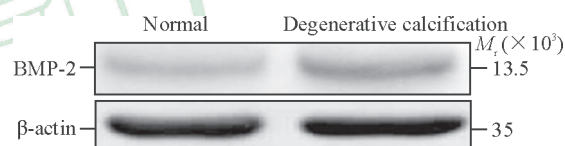


图 1 正常主动脉瓣及退行性钙化性主动脉瓣中 BMP-2 蛋白表达水平

Fig 1 Expression of BMP-2 protein in normal aortic valve and degenerative calcification aortic valve

BMP-2: Bone morphogenetic protein-2

2.2 HAVIC 中 miRNA-141 与 BMP-2、*Dlx5* 的关系 Con 组、Cal 组、miR-NC 组、M-miR-141 组和 I-miR-141 组细胞的钙化得分分别为 1.00 ± 0.05 、 1.54 ± 0.13 、 1.50 ± 0.14 、 1.35 ± 0.14 、 1.96 ± 0.15 , 与 Con 组相比, 4 个实验组的细胞钙化得分均升高 (P 均 < 0.05); Cal 组与 miR-NC 组细胞钙化得分差异无统计学意义 ($P = 0.12$); M-miR-141 组较 Cal 组、I-miR-141 组降低 ($P = 0.02$, $P = 0.01$); I-miR-141 组较 Cal 组升高 ($P = 0.01$)。

Con 组、Cal 组、miR-NC 组、M-miR-141 组和 I-miR-141 组细胞中 *Dlx5* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.02 、 0.96 ± 0.02 、 0.97 ± 0.02 、 0.76 ± 0.14 、 1.89 ± 0.16 ; Con 组、Cal 组、miR-NC 组 *Dlx5* mRNA 表达差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05); 与 Con 组比较, M-miR-141 组的 *Dlx5* mRNA 表达水

平降低 ($P=0.02$), 而 I-miR-141 组 *Dlx5* mRNA 表达水平升高 ($P=0.01$), I-miR-141 组 *Dlx5* mRNA 表达水平较 M-miR-141 组升高 ($P=0.01$)。

Con 组、Cal 组、miR-NC 组、M-miR-141 组和 I-miR-141 组细胞中 BMP-2 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.02 、 0.97 ± 0.02 、 0.99 ± 0.02 、 0.71 ± 0.10 、 1.99 ± 0.16 ; Con 组、Cal 组、miR-NC 组 BMP-2 蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Con 组比较, M-miR-141 组的 BMP-2 蛋白表达水平降低 ($P=0.02$), 而 I-miR-141 组 BMP-2 蛋白表达水平升高 ($P=0.01$); I-miR-141 组 BMP-2 蛋白表达水平较 M-miR-141 组升高 ($P=0.01$)。见图 2。

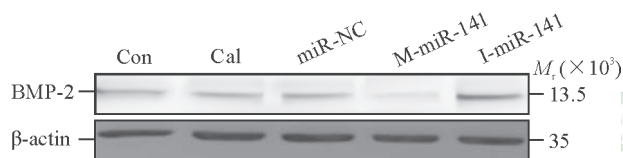


图 2 各组原代人主动脉瓣膜间质细胞中 BMP-2 蛋白表达水平

Fig 2 Expression level of BMP-2 protein in human aortic valve interstitial cells of each group

BMP-2: Bone morphogenetic protein-2; Con: Control group; Cal: Calcification group; miR-NC: Negative control group; M-miR-141: miRNA-141 mimic group; I-miR-141: miRNA-141 inhibitor group

2.3 双荧光素酶报告基因实验确认 miRNA-141 的直接靶标 与阴性对照 (pGL3-2 空载体) 相比, 应用 miRNA-141 模拟物和 pGL3-3' UTR 转染细胞后重组质粒的荧光素酶活性降低 (0.90 ± 0.04 vs 0.50 ± 0.09 , $P=0.02$), 提示 miRNA-141 通过与 *Dlx5* 的 3' UTR 相互作用并抑制其表达, 验证了 *Dlx5* 为 miRNA-141 的靶基因。

2.4 小鼠主动脉瓣中 miRNA-141 与 BMP-2、*Dlx5* 的关系 Von Kossa 染色显示, Con 组、miR-141⁻ 组及 miR-141⁺ 组小鼠主动脉瓣膜钙化得分分别为 1.00 ± 0.02 、 1.89 ± 0.10 及 0.62 ± 0.10 , miR-141⁻ 组钙化得分较 Con 组增高 ($P=0.01$), miR-141⁺ 组钙化得分较 Con 组降低 ($P=0.01$)。Con 组、miR-141⁻ 组及 miR-141⁺ 组 *Dlx5* mRNA 表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 1.98 ± 0.27 及 0.54 ± 0.07 , BMP-2 mRNA 表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、 1.83 ± 0.23 及 0.43 ± 0.16 , miR-141⁻ 组 *Dlx5* 和 BMP-2 mRNA 表达水平较 Con 组均升高 ($P < 0.05$), 而 miR-141⁺

组 *Dlx5* 和 BMP-2 的 mRNA 表达水平较 Con 组均降低 ($P < 0.05$)。Con 组、miR-141⁻ 组及 miR-141⁺ 组 *Dlx5* 蛋白表达水平分别为 1.00 ± 0.09 、 1.94 ± 0.21 及 0.40 ± 0.11 , BMP-2 蛋白表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 1.90 ± 0.19 及 0.36 ± 0.07 ; 与 Con 组相比, miR-141⁻ 组 *Dlx5* 和 BMP-2 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$), 而 miR-141⁺ 组 *Dlx5* 和 BMP-2 蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

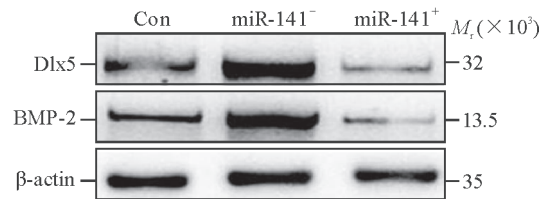


图 3 各组小鼠主动脉瓣中 *Dlx5* 及 BMP-2 蛋白表达水平
Fig 3 Expression level of *Dlx5* and BMP-2 protein in aortic valve in each group

Dlx5: Distal-less homeobox 5; BMP-2: Bone morphogenetic protein-2; Con: Control group; miR-141⁻: miRNA-141 down-regulated group; miR-141⁺: miRNA-141 up-regulated group

将 *Dlx5* 基因敲除的主动脉瓣钙化小鼠模型进行同样的分组及培养, 结果显示 Con 组、miR-141⁻ 组、miR-141⁺ 组 BMP-2 蛋白表达水平分别为 1.00 ± 0.04 、 0.97 ± 0.03 、 1.02 ± 0.03 (图 4), 钙化得分分别为 1.00 ± 0.05 、 0.98 ± 0.04 、 1.03 ± 0.03 , 各组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

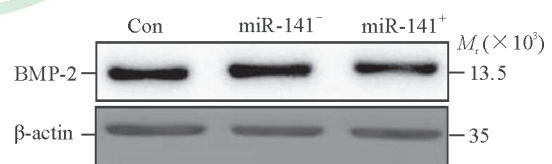


图 4 各组 *Dlx5* 基因敲除小鼠主动脉瓣中 BMP-2 蛋白表达水平

Fig 4 Expression level of BMP-2 protein in aortic valve in each *Dlx5* knockout mouse group

Dlx5: Distal-less homeobox 5; BMP-2: Bone morphogenetic protein-2; Con: Control group; miR-141⁻: miRNA-141 down-regulated group; miRNA-141⁺: miRNA-141 up-regulated group

3 讨论

许多基因通路参与了心脏瓣膜钙化过程, 如胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 通路、BMP-2 通路等^[10-11]。已知经典通路中, BMP-2 受到 *Dlx5* 的调节, 激活一系列下游

蛋白并与其他非经典途径共同诱发钙化发生,如 Laxman 等^[9]发现 miRNA-203 和 miRNA-320b 通过抑制 *Dlx5* 负调控 BMP-2 诱导的成骨细胞分化,而 *Dlx5* 同时抑制下游成骨转录因子 Runx2 和 Osx, 共同抑制成骨细胞分化。

miRNA 是真核生物中一类内源性的具有调控功能的 RNA,可在转录后水平特异性识别靶基因的 3' UTR 上相应靶点并通过碱基互补配对方式与之结合,从而抑制或加速降解特定靶基因而发挥作用。研究表明, HAVIC 高表达或特异表达的 miRNA 参与调控心脏重构^[12]、瓣膜纤维化^[13]、瓣膜钙化^[14]等多种心脏生理和病理过程。

miRNA-141 是 miRNA-200 家族成员,在成骨及钙化过程中发挥重要调节作用。Yanagawa 等^[3]发现先天性二叶瓣畸形患者主动脉标本中 miRNA-141 的表达降低,而 BMP-2 的表达增高。Itoh 等^[8]发现在小鼠成骨前细胞系中, miRNA-141 通过抑制 *Dlx5* 调节 BMP-2 诱导的前成骨细胞分化。但目前尚无研究阐明 miRNA-141 通过 BMP-2 通路调控主动脉瓣钙化的具体机制。

本研究发现,与正常主动脉瓣膜组织相比,人退行性钙化主动脉瓣膜组织中 miRNA-141 的表达降低,而 BMP-2 的 mRNA 及蛋白表达水平增高;在 HAVIC 中, miRNA-141 发挥抑制细胞钙化作用,且 *Dlx5*、BMP-2 表达水平与 miRNA-141 表达水平呈负向关系。双荧光素酶报告基因实验显示 *Dlx5* 是 miRNA-141 的直接靶标;在体水平上调 miRNA-141 表达可降低小鼠主动脉瓣钙化程度并减少 BMP-2 表达,下调 miRNA-141 可起到相反作用;而上/下调 miRNA-141 对 *Dlx5* 基因敲除小鼠主动脉瓣钙化及 BMP-2 蛋白表达无影响。

CAVD 作为一种受遗传与环境因素双重影响、涉及复杂细胞分子学机制的慢性进展性疾病,其确切发病机制尚不明确,目前尚无有效的药物可以预防或延缓其进展,因此接受手术或介入瓣膜置换是晚期 CAVD 患者唯一的选择。本研究首次证实了 miRNA-141 通过作用于 *Dlx5* 抑制 BMP-2 诱导主动脉瓣钙化的机制,或可为 CAVD 患者尤其是晚期患者的靶向治疗提供理论依据和新的治疗靶点。

[参 考 文 献]

[1] COFFEY S, COX B, WILLIAMS M J. The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63: 2852-2861.
[2] MAHMUT A, BOULANGER M C, EL HUSSEINI D,

FOURNIER D, BOUCHAREB R, DESPRÉS J P, et al. Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63: 460-469.

- [3] YANAGAWA B, LOVREN F, PAN Y, GARG V, QUAN A, TANG G, et al. miRNA-141 is a novel regulator of BMP-2-mediated calcification in aortic stenosis[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 144: 256-262.
[4] PESCATORE L A, GAMARRA L F, LIBERMAN M. Multifaceted mechanisms of vascular calcification in aging[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39: 1307-1316.
[5] RADDATZ M A, MADHUR M S, MERRYMAN W D. Adaptive immune cells in calcific aortic valve disease[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019, 317: H141-H155.
[6] OHUKAINEN P, RUSKOAHO H, RYSA J. Mechanisms of valvular thickening in early and intermediate calcific aortic valve disease [J]. Curr Cardiol Rev, 2018, 14: 264-271.
[7] BERTAZZO S, GENTLEMAN E. Aortic valve calcification: a bone of contention[J]. Eur Heart J, 2017, 38: 1189-1193.
[8] ITOH T, NOZAWA Y, AKAO Y. MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5[J]. J Biol Chem, 2009, 284: 19272-19279.
[9] LAXMAN N, MALLMIN H, NILSSON O, KINDMARK A. miR-203 and miR-320 regulate bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5 (*Dlx5*) [J]. Genes (Basel), 2016, 8: 4-18.
[10] CHOI B, LEE S, KIM S M, LEE E J, LEE S R, KIM D H, et al. Dipeptidyl peptidase-4 induces aortic valve calcification by inhibiting insulin-like growth factor-1 signaling in valvular interstitial cells [J]. Circulation, 2017, 135: 1935-1950.
[11] WU M, CHEN G, LI Y. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease[J/OL]. Bone Res, 2016, 4: 16009. doi: 10.1038/boneres.2016.9.
[12] WANG Q, YU X, DOU L, HUANG X, ZHU K, GUO J, et al. miR-154-5p functions as an important regulator of angiotensin II -mediated heart remodeling[J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 8768164. doi: 10.1155/2019/8768164.
[13] GOETTSCH C, RAUNER M, PACYNA N, HEMPEL U, BORNSTEIN S R, HOFBAUER L C. miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells[J]. Am J Pathol, 2011, 179: 1594-1600.
[14] LU P, YIN B, LIU L. MicroRNA-138 suppresses osteoblastic differentiation of valvular interstitial cells in degenerative calcific aortic valve disease[J]. Int Heart J, 2019, 60: 136-144.