

Runx2 相关微 RNAs 在慢性肾脏病血管钙化中作用的研究进展

鲁杨杨 白亚玲 徐金升

河北医科大学第四医院肾内科, 石家庄 050011

通信作者: 徐金升, Email: xjs5766@126.com



开放科学
(资源服务)
标识码(OSID)

【摘要】 血管钙化是慢性肾脏病患者心血管病死亡的主要原因。目前研究认为慢性肾脏病血管钙化不仅仅是磷酸钙晶体在血管壁的异位沉积,其形成与骨矿化具有相似的机制,平滑肌细胞在血管钙化中起关键作用。充分的证据表明 runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2) 是血管平滑肌细胞成骨分化和钙化的必需调节因子。近年来,多种微 RNAs 被确定为血管钙化过程中血管平滑肌细胞分化、表型转换、增殖、凋亡、细胞因子产生和基质沉积的关键调节因子。因此,本综述主要讨论调控 Runx2 表达的相关微 RNAs 在平滑肌细胞成骨分化中的作用。由于血管钙化的确切机制仍未完全阐明,更好地理解微 RNAs 参与血管钙化可能推动治疗血管钙化的新型疗法。

【关键词】 平滑肌细胞;血管钙化;微 RNAs;runt 相关转录因子 2

DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2022.11.012

Research advances on the role of Runx2-related miRNAs in vascular calcification of chronic kidney disease

Lu Yang-yang, Bai Ya-ling, Xu Jin-sheng

Department of Nephrology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding author: Xu Jin-sheng, Email: xjs5766@126.com

【Abstract】 Vascular calcification (VC) is a major cause of cardiovascular mortality in patients with chronic kidney disease (CKD). Current studies suggest that VC of CKD is not simply an ectopic deposition of calcium phosphate crystals in vascular wall. Formation of calcification has a similar mechanism to bone mineralization and smooth muscle cells play a key role in VC. Sufficient evidence suggested that Runx2 is an essential regulator of osteogenic differentiation and calcification in vascular smooth muscle cells. In recent years, multiple microRNAs have been identified as key regulators for differentiation of vascular smooth muscle cell, phenotypic switching, proliferation, apoptosis, cytokine production and matrix deposition during VC. This review focused upon the role of relevant microRNAs regulating Runx2 expression in osteogenic differentiation of smooth muscle cells. Since the exact mechanism of VC has remained largely elusive, a better understanding of microRNA involvement in VC may help to design novel therapies for VC.

【Key words】 Smooth muscle cell; Vascular calcification; MicroRNAs; Runt-related transcription factor 2

DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2022.11.012

血管钙化是慢性肾脏病、高血压、糖尿病血管病患者中普遍存在的病理现象,是心血管疾病发生和死亡的主要危险因素之一^[1]。随着疾病的进展,慢性肾脏病患者长期处于钙磷代谢失衡、微炎症及氧化应激等微环境紊乱状态,体内多种因素相互交叉作用促进血管钙化的发生与发展。慢性肾脏病患

者常见的血管钙化以内膜钙化和中膜钙化为主。内膜钙化与动脉粥样硬化斑块相关,是慢性动脉炎症引起动脉管壁脂质蓄积、巨噬细胞侵袭、平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖和细胞外基质蛋白功能障碍的综合结果^[2]。中膜钙化好发于大、中动脉的平滑肌肌层,其钙化的形成与骨矿化具有相

似的机制,常导致血管硬度、收缩压、脉压及脉率增加等,最终引起心力衰竭等严重后果^[3]。目前关于慢性肾脏病血管钙化的研究聚集于中膜钙化,研究证实慢性肾脏病血管钙化其关键事件是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)从分化/收缩表型向去分化/增殖表型进行表型转换。一些研究已经证明,蛋白质和非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)的复杂网络控制表型转换过程。在这篇综述中,我们简要总结了目前 VSMCs 表型转换过程中调控 runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2) 表达的微RNAs(miRNAs, miRNAs)的相关研究,特别关注于 miRNAs 对这一过程贡献的发现。

一、慢性肾脏病血管钙化的病理特点

慢性肾脏病血管钙化的具体发生机制尚未完全阐明,主要涉及 VSMCs 向成骨表型转分化。多项研究发现,VSMCs 表型转换以收缩标志物如 α -平滑肌肌动蛋白、钙调蛋白的丢失,以及采用间充质干细胞样的可塑性为特征,显示出其他间充质谱系细胞类型的特征,包括成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞^[4-6]。Patel 等^[7]进行的一项研究通过比较小鼠成骨细胞与对照和钙化的 VSMCs 来评价骨形成和钙化之间的相似性,研究发现成骨细胞和钙化的 VSMCs 之间的钙沉积量相似,但成骨细胞形成许多大的骨结节,而钙化的 VSMCs 形成小的离散钙化区域。与对照 VSMCs 相比,钙化的 VSMCs 早期成骨细胞标志物 Runx2 和 Sp7 增加了 6 倍,但与成骨细胞相比,仍减少了 3 倍。该研究得出结论,钙化的 VSMCs 在健康的 VSMCs 和骨形成成骨细胞之间具有过渡表型,但与之不同。

目前研究支持微环境驱动 VSMCs 成为钙化细胞,钙化抑制剂和诱导剂之间的失衡被认为是血管钙化病理的关键特征^[8]。常见钙化抑制剂有胎球蛋白 A 和焦磷酸等,钙化诱导剂有骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)等。循环和局部触发因素引起钙化抑制剂受到抑制时,诱导 VSMCs 转分化,导致 VSMCs 从收缩表型转换为骨软骨表型。高磷环境下诱导大鼠 VSMCs 发生钙化,是目前公认的模拟慢性肾脏病患者血管钙化的常用模型。目前研究发现,高磷可抑制钙化抑制剂的表达。此外,高磷可激活核因子 κ B^[9]、Wnt/ β -catenin 信号通路^[10]、Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路^[11]及转化生长因子 β /Smad 信号^[12]通路。上述通路相互交错促进 VSMCs 钙化,表现为 Runx2、骨钙素、骨桥蛋白和碱性磷酸酶表达增加,及 α -平滑肌肌动蛋白、平滑肌肌球蛋白表达降低,促进成骨分化。Lin 等^[13]构建 SMC 特异性 Runx2 缺失的小鼠,发现从 Runx2 特异性缺失的小鼠中分离的 SMC 完全没有 Runx2 蛋白,在体外不能对高磷酸盐诱导的钙化作出反应,证明 SMC 中 Runx2 敲除阻止了成骨表型的改变。

二、Runx2 在血管钙化中的作用

诱导 VSMCs 发生钙化的细胞信号通路,如 BMP-2、细胞外调节蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases/mitogen-activated protein kinase, ERK/

MAPK)和 PI3K/AKT 信号通路,共同汇聚在调控 Runx2 的表达和转录活性中,进而调控血管钙化^[14]。Runx2 是 runt 家族成员之一,它们含有共同的 DNA 结合 runt 结构域,能与核心结合因子 β 形成异二聚体,并与共有序列 TGPYGGPyPy 结合,是调控成骨细胞分化的重要因子^[15]。充分的证据表明 Runx2 是 VSMCs 成骨分化和钙化的必需调节因子。Tanaka 等^[16]证明 Runx2 地过表达导致 SM22 a 和 α -平滑肌肌动蛋白的基因表达显著降低,同时诱导成骨细胞标记基因表达。通过小干扰 RNA 抑制内源性 Runx2 可促进与分化标志物增加相关的 SMC 分化。首次报道确定 Runx2 作为 VSMCs 表型从 SMC 向成骨表型转换的调节因子。Lin 等^[17]利用条件性 Runx2 敲除小鼠模型,探讨 SMC 特异性 Runx2 缺失在动脉粥样硬化血管钙化中的作用,发现 SMC 特异性敲除 Runx2 不仅抑制血管 SMC 的成骨细胞分化,而且抑制 SMC 来源的软骨细胞成熟,导致动脉内膜钙化减少 50%。Sun 等^[18]从 SMC Runx2 特异性缺失小鼠模型的研究中,证明 SMC 特异性 Runx2 缺失并不影响基础 VSMC 表型和正常血管发育。Runx2 敲除对体外 VSMC 钙化以及体内血管钙化的强效抑制作用支持了 VSMC 和 SMC 特异性表达 Runx2 在血管钙化发生中的确切作用。

三、Runx2 介导 miRNAs 调控 VSMCs 钙化

细胞命运和随后的谱系进展是由主调节转录因子介导的。表观基因组超越转录因子和它们在基因启动子中的同源元件之间的基因组相互作用,有效地控制基因表达^[19]。ncRNA 参与染色体重构、基因转录及转录后修饰等途径来调控多种重要的生命活动^[20]。ncRNA 虽不翻译为蛋白质,但其可调控合成蛋白质的数量,充当多种细胞功能的调节器。有研究显示 ncRNA 主要通过调控成骨转录因子的表达来参与 VSMCs 成骨样表型转化^[21]。miRNAs 作为 ncRNA 的一种,长度约为 20~24 个核苷酸。miRNAs 通过与靶基因 3'-UTR 完全或不完整的识别方式来诱导目的基因的沉默或降解,从而在转录后负性调控靶基因的表达^[22]。当特定 miRNAs 分子同时与多个相关的转录因子结合时,可以激活细胞中的多条信号通路,让机体或细胞迅速对外界刺激产生反应。在血管钙化方面,miRNAs 靶向调控成骨相关转录因子的表达,在调节 VSMCs 成骨样表型转化中起着不可或缺的作用。研究发现,miRNAs 参与了多种控制 VSMCs 骨/软骨表型转换的细胞内途径的调控,包括 Wnt/ β -catenin 途径、PI3K 信号传导、STAT3 途径或转化生长因子 β 1/Smad 信号传导^[23]。miRNAs 导致血管钙化的途径及机制众多,其中,miRNAs 通过调节 Runx2 的表达在 VSMCs 转分化过程中及血管钙化过程发挥重要作用。

(一)调控 Runx2 表达促进 VSMCs 成骨样表型转化的相关 miRNAs

1. miR-125 Mizuno 等^[24]首次探讨 miRNAs 在成骨细胞分化调控中的作用,提出 miR-125b 在小鼠骨髓间充质干细胞成骨细胞分化过程中调节细胞增殖。在高磷诱导的大

鼠血管钙化模型和体外损伤刺激大鼠 VSMCs 模型中, miR-125b 靶向 Ets1, 并下调 Ets1、Runx2 的表达, 抑制 β -甘油磷酸诱导的 VSMCs 表型转换和钙化^[25-26]。Ets1 是一种有效的转录因子, 通过调节编码细胞外基质蛋白的基因促进 VSMCs 重塑, 如骨形成蛋白。Goettsch 等^[27]发现, 在成骨培养基培养的钙化人冠状动脉 SMC 和载脂蛋白 E 缺陷小鼠的钙化主动脉中, miR-125 b 的表达显著降低, Runx2、SP7 和碱性磷酸酶的表达增加, 提出 miR-125 b 至少部分是通过靶向 SP7 在体外和体内参与 SMC 钙化。

2. miR-30 家族成员 Wu 等^[28]通过体外培养 MC3T3-E1、小鼠骨髓间充质干细胞转染 BMP-2, 证明 miR-30 家族成员通过靶向 Smad1 和 Runx2 负性调节 BMP-2 诱导的成骨细胞分化。研究揭示了 miR-30 家族成员是 BMP-2 介导的成骨分化的关键负调控因子。此外, Zhang 等^[29]在研究 BMP-9 诱导 C3H10T1/2 的成骨分化过程中, 发现只有一个 miR-30 家族成员 miR-30a 的表达首先下降, 随后增加。细胞增殖实验发现 miR-30a 对 C3H10T1/2 细胞的增殖无影响。然而, miR-30a 的过度表达导致早期成骨标志物的表达和 Runx2 的表达减少。Eguchi 等^[30]利用 miRNA PCR 阵列对小鼠间充质干细胞系 KUSA-A1 细胞成骨细胞/骨细胞分化过程中 90 种 miRNA 进行定量, 发现 miR-30 家族成员控制成骨细胞白血病抑制因子受体 (leukemia inhibitory factor receptor, LIFR) 和 Runx2 的表达, 负性调控成骨细胞分化。另发现敲低 miR-541 可增加人间充质干细胞成骨细胞分化中骨桥蛋白表达和钙化, 表明 miR-541 是成骨细胞分化的负调控因子。LIFR 也称为白血病抑制因子受体, 在骨祖细胞和成骨细胞的增殖分化、破骨细胞的大小和分化中起调控作用。Balderman 等^[31]利用 BMP-2 处理人冠状动脉 SMC, 通过 miRNAs 微阵列和靶标预测数据库分析确定 miR-30b 和 miR-30c 为调节 Runx2 表达的 miRNAs, 过表达 miR-30b/c 阻止 SMC 的 Runx2 表达的增加和矿化。

3. miR-34 研究发现 BMP-2 诱导的鼠成骨细胞分化中, miR-34 通过靶向 Notch 信号通路抑制特异性周期蛋白 D1、周期蛋白依赖性激酶 4 和周期蛋白依赖性激酶 6 的积累, 显著抑制成骨细胞增殖。它还通过抑制特殊的富含 AT 的序列结合蛋白 2 (special AT-rich sequence binding protein 2, SATB2) 和增加破骨细胞生成来减少成骨细胞的终末分化^[32-33]。SATB2 在骨形成过程中通过促进 Runx2 转录正调节成骨细胞分化。Hao 等^[34]发现, 在醛固酮处理的 VSMCs 中, 过表达 miR-34 b/c 通过 SATB2/Runx2 途径减轻醛固酮诱导的 VSMCs 钙化。Lin 等^[35]阐明了 miR-34 b 在高磷处理的小鼠 VSMCs 中显著下调。miR-34 b 的下调与其上游 DNA 甲基化相关, 并受 DNA 转甲基酶 3a (DNA methyltransferases 3 a, DNMT3 a) 的调控。此外, Notch1 被证实是 miR-34 b 的直接靶点, 在体外和体内 VSMCs 成骨细胞分化过程中作为负调控因子发挥作用。

4. miR-204 Cui 等^[36]发现 miR-204 靶向 Runx2 调节 β -甘油磷酸盐诱导的小鼠 VSMCs 成骨细胞分化, 通过转染 miR-204 抑制剂抑制 miR-204 表达, 显著升高 Runx2 蛋白水

平, 增强 VSMCs 成骨细胞分化。小鼠体内注射 miR-204 agomirs 过表达 miR-204 可减弱维生素 D3 诱导的中膜动脉钙化。Ruffenach 等^[37]体外培养肺动脉高压患者肺小动脉 SMC, 抑制 miR-204 的表达, 发现 Runx2 的表达上调, Runx2 的持续表达激活缺氧诱导因子 1 α 多肽的活化, 导致 VSMCs 异常的增殖, 抵抗凋亡和转分化为成骨细胞样细胞。此外, Yu 等^[38]在成骨诱导培养基体外诱导人瓣膜间质细胞钙化, 发现沉默 TUG1 增加 miR-204-5p 的表达, 随后在转录后水平抑制了 Runx2 的表达。TUG1 正调控 Runx2 的表达, 通过海绵 miR-204-5p 促进瓣膜间质细胞成骨分化。与 miR-34b 相似, Lin 等^[39]发现钙化主动脉中 miR-204 的下调也是 DNMT3a 调控的上游 DNA 甲基化的结果, 恢复 miR-204 的表达通过 Notch 减弱了体外血管钙化。

5. miR-205 Qiao 等^[40]发现 β -甘油磷酸盐诱导人主动脉平滑肌细胞 (human aortic smooth muscle cells, HASMCs) 钙化过程中, 内源性 miR-205 的表达降低。研究表明, miR-205 至少部分是通过靶向 Runx2 和 Smad1, 负性调节 β -甘油磷酸盐诱导的 HASMCs 钙化, 表现为碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌和 Runx2 表达的降低。Hu 等^[41]在分化培养基诱导大鼠骨髓间充质干细胞过程中, 发现 miR-205 可以调节 SATB2 和 Runx2 的蛋白表达, SATB2 的过表达激活 Runx2 并逆转 miR-205 对成骨细胞分化的负面影响。另外发现 miR-205 可能至少部分通过改变 ERK 和 P38MAPK 的磷酸化对大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化发挥负性功能。Huang 等^[42]体外转染 BMP-2 刺激人骨髓间充质干细胞, 证明 miR-205-5p 靶向 Runx2 负性调节 BMP-2 诱导的成骨细胞分化。

6. miR-221/222 Davis 等^[43]发现 miR-221 在血小板源性生长因子处理的原代 VSMCs 中, 导致靶标 c-Kit 和 p27Kip1 的下调, c-Kit 的下调通过减少 Myocardin (一种强效 SMC 特异性核共激活因子) 的表达抑制 SMC 特异性收缩基因转录。另有研究发现 miR-221 和 miR-222 作用于 p27 (Kip1) 和 p57 (Kip2), 促进大鼠 VSMC 的增殖。miR-221/222 具有促 VSMC 增殖、促迁移和抗凋亡的作用^[44-45]。随着研究进展, 发现 miR-221/222 作为 Runx2 的重要内源性负调控因子, 抑制间充质干细胞的成骨分化。其中 miR-222 通过调节 Smad5-Runx2 信号发挥抑制成骨分化作用^[46-47]。此外, 在小鼠 VSMCs 和人骨髓间充质干细胞联合过表达 miR-221 和 miR-222 观察到钙沉积和成骨分化标志物增加了两倍^[48-49], 过表达 miR-221 和 miR-222 诱导了核苷酸外切磷酸二酯酶 1 和 Pit-1 表达的显著变化, 这表明 miR-221 和 miR-222 协同通过细胞无机磷酸盐和焦磷酸水平调节 VSMC 钙化^[49]。

7. miR-133 Li 等^[50]通过分析 BMP-2 诱导 C2C12 间充质细胞成骨过程中的 miRNAs, 发现 miR-133 直接靶向 Runx2, miR-135 靶向 Smad5, 协同减弱促进骨形成的 Runx2 和 Smad5 通路, 抑制骨祖细胞的分化。此外, Torella 等^[51]阐明大鼠 VSMC miR-133 的表达受细胞外信号调节激酶 1/2 的激活调节, 并与 VSMC 的生长呈负相关。miR-133 在体内外特异性抑制转录因子 Sp1 的表达, 调节平滑肌基因的表达

达。Qadir 等^[52]在肌源性培养基中培养的人间充质干细胞、小鼠间充质干细胞和 C2C12 细胞中,发现 *Dlx3* 的表达水平下调。进一步实验表明 miR-133a 和 miR-133b 部分是通过直接靶向 *Dlx3* 抑制 *Dlx3* 表达,增强肌源性分化。Liao 等^[53]通过建立 β -甘油磷酸盐诱导小鼠动脉 SMC 钙化,阐明 miR-133 靶向 *Runx2* 负性调节 β -甘油磷酸盐诱导的 VSMCs 钙化。此外, Panizo 等^[54]通过正常喂食或高磷饲料喂食肾切除大鼠诱导不同水平尿毒症大鼠主动脉钙化,发现与对照组和正常饮食的尿毒症大鼠相比,高磷饮食的尿毒症大鼠 miR-133b 和 miR-211 水平较低,miR-29b 水平较高,体外血管钙化模型(尿毒症血清和高钙磷培养基)中也得到了类似的结果。进一步体外实验表明 miR-133b 和 miR-211 促进 *Runx2* 的表达,抑制血管平滑肌钙化。miR-29b 下调钙化抑制剂,如激活素 A 受体 II A 型、 β -catenin 相互作用蛋白 1 和组蛋白去乙酰化酶 4,增加血管平滑肌钙化。

(二)调控 *Runx2* 表达抑制 VSMCs 成骨样表型转化的相关 miRNAs

1. miR-29 在不同的研究中,miR-29 的表达模式存在差异。如上文所述,miR-29b 在尿毒症小鼠和高磷处理的 VSMCs 模型成骨细胞转分化过程中显著上调,促进血管平滑肌钙化^[54]。此外,有研究者报道在 HASMCs 钙化模型中,miR-29b 能显著减弱 *Wnt7b*/ β -catenin 蛋白的过度表达,抑制 *Runx2* 成骨信号和骨桥蛋白的表达^[55]。然而另有研究表明,在高磷、高钙或胆钙化醇诱导的大鼠血管钙化模型和 VSMCs 钙化模型中,miR-29 a/b 表达显著降低,而血小板反应蛋白基序 7(recombinant A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 7, ADAMTS-7)和基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)显著增加,下调 miR-29a/b 导致 ADAMTS-7 过表达,过量软骨寡聚基质蛋白降解,增强 BMP-2 成骨信号,加重 VSMCs 的钙沉积^[56-58]。

2. miRNA-2861、miRNA-3960 多项研究表明 miRNA-2861、miRNA-3960 构成 *Runx2*/miR-3960/miR-2861 正反馈环,正向调节血管钙化。在 β -甘油磷酸盐诱导的 VSMC 成骨转分化过程中,miR-2861 及 miR-3960 表达明显升高。miR-2861 及 miR-3960 促进 *Runx2* 蛋白表达及成骨分化。此外,过表达 *Runx2* 诱导 miR-3960/miR-2861 转录,阻断 *Runx2* 表达可减弱 BMP-2 诱导的 miR-3960/miR-2861 转录。进一步研究表明 miR-3960 靶向 *Homeobox A2*,miR-2861 靶向组蛋白去乙酰化酶 5 增加 *Runx2* 表达和乙酰化,*Runx2* 反式激活 miR-3960/miR-2861 并诱导成骨细胞分化^[59-60]。

(三)调控 *Runx2* 表达与氧化应激相关的 miRNAs

Runx2 是成骨分化转录因子,调控成骨样细胞的成骨基因的表达。目前 *Runx2* 在慢性肾脏病血管钙化中的研究多集中在调控 VSMCs 成骨样表型分化。在慢性肾脏病血管钙化其他方面,如氧化应激的相关研究如下:Hu 等^[61]对氧化应激在血管钙化中的作用就目前的研究发现进行综述,指出 H_2O_2 通过增加 *Runx2* 表达和激活 P38MAPK 信号通路加速 VSMC 成骨分化和钙化;活性氧相关氧化应激激活核因子-

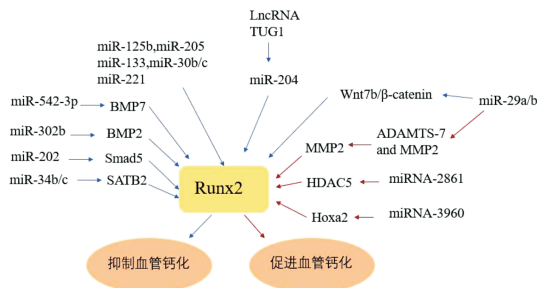
κ B-破骨细胞分化因子通路,刺激前钙化细胞因子肿瘤坏死因子 α 的表达。肿瘤坏死因子 α 通过 *MSX2*/*Wnt*/ β -catenin 信号通路加速 *MSX2*、*Runx2* 等促钙化因子的表达,促进成骨细胞分化;氧化型低密度脂蛋白通过 Toll 样受体 4/核因子- κ B/神经酰胺途径参与 VSMC 钙化。关于 *Runx2* 在氧化应激介导的血管钙化中的进一步作用,Byon 等^[62]证明 *Runx2* 在氧化应激诱导的 VSMC 钙化中具有重要的直接作用,进一步实验表明 H_2O_2 抑制 SMC 标记基因的表达并没有被 *Runx2* 敲除完全挽救,这表明独立于 *Runx2* 的额外信号通路可能调节 H_2O_2 抑制 VSMC 标记基因的表达。miRNAs 在氧化应激调控的 VSMCs 钙化中,Wu 等^[63]表明 TUG1 通过敲低 miR-148 b/*IGF2* 轴调节减弱氧化型低密度脂蛋白诱导的 VSMC 增殖和凋亡。尚未找到足够证据支持调控 *Runx2* 表达的相关 miRNAs 在氧化应激中的作用。

(四)调控 *Runx2* 表达与自噬、凋亡相关的 miRNAs

如上文所述,miR-30b、miR-34c 负性调控 *Runx2* 的表达,抑制 VSMCs 钙化。Wang 等^[64]发现高磷酸盐体外培养 VSMCs,可激活 VSMCs 中 LC3 II 的表达并促进自噬通量,miR-30b 过表达降低了高磷诱导的自噬相关标记基因,如 *BECN1*、*ATG5* 和 *LC3b* 的表达,研究表明 miR-30b 通过调节哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路抑制 β -甘油磷酸盐诱导的 VSMC 中的血管钙化。Lin 等^[65]在高糖诱导的人主动脉 VSMCs 模型中,发现过表达 miR-34c-5p 时 p16 和 p21 的表达明显下降,证明 miR-34c-5p 抑制人主动脉 VSMCs 的钙化/衰老过程。综上所述,我们可以认为调控 *Runx2* 表达的相关 miRNAs 可能在血管钙化除表型转化外其他形成机制方面发挥作用。但仍需更多的研究去探讨其相关的联系及相互作用。

四、小结

本综述主要讨论慢性肾脏病血管钙化的病理特点及调节 *Runx2* 表达相关的 miRNAs 在成骨分化中的作用的发现及重要意义。目前关于调节血管平滑肌成骨分化的相关 miRNAs 众多,本文仅列出了部分研究较多的调节 *Runx2* 表达相关的 miRNAs,其他如 miRNA-202 在成骨分化中调节 *Runx2* 的表达也有研究,见图 1。本综述一方面显示 miRNAs 以细胞类型特异性方式调节内源性 *Runx2* 蛋白表达水平进而调节成骨分化。相关研究显示部分 *Runx2* 靶向的 miRNAs 在间充质细胞类型中以与谱系相关的模式表达,*Runx2* 靶向的 miRNAs 差异性地调节成骨细胞和软骨细胞中 *Runx2* 蛋白的表达,进而影响成骨细胞分化^[66]。miRNAs 不仅通过靶向共激活因子抑制成骨细胞分化,而且通过靶向共抑制因子激活成骨细胞分化。组蛋白去乙酰化酶是协调 *Runx2* 负调控的特异性蛋白^[67]。ADAMTS-7 和 MMP2 是金属蛋白酶家族的成员。ADAMTS-7 和 MMP2 分别通过介导损伤血管软骨低聚基质蛋白的降解、抑制 BMP-2 表达和抑制骨/软骨转分化来抑制 VSMCs 钙化^[68-69]。例如上文所述 miR-2861 靶向组蛋白去乙酰化酶 5 增加 *Runx2* 表达和乙酰化,诱导成骨细胞分化。本综述另一方面显示多种 miRNAs 通过靶向特定的基因来调节成骨细胞分化,*Runx2*



注: miRNA 为微 RNA; Runx2 为 runt 相关转录因子 2; LncRNA 为非编码 RNA; TUG1 为牛磺酸上调基因 1; BMP 为骨形态发生蛋白; Smad5 为 Smad 同源物 5; SATB2 为富含 AT 的序列结合蛋白 2; Wnt7b/β-catenin 为人无翅型 MMTV 整合位点家族成员 7 b/β-连环蛋白; ADAMTS-7 为血小板反应蛋白基序 7; MMP2 为基质金属蛋白酶 2; HDAC5 为组蛋白脱乙酰基酶 5; Hoxa2 为同源盒 A2。

图 1 平滑肌细胞成骨分化中调节 runt 相关转录因子 2 表达的相关微 RNAs

靶向 miRNAs 的多样性,表明靶向 Runx2 mRNA 的 3'UTR 的不同 miRNAs 之间可能存在协作作用,例如上文所述 miR-133 与 miR-135,协同减弱 Runx2 和 Smad5 通路,抑制骨祖细胞的分化。但目前研究多针对单一 miRNAs 在成骨分化中的作用,未来有望对靶向 Runx2 的 miRNAs 之间相互作用进行探讨。此外,目前研究表明 miRNAs 还与 SMC 自噬、SMC 氧化应激和(或)内质网应激、磷酸钙稳态丧失有关。本文详述了调控 Runx2 表达的相关 miRNAs 在 VSMCs 成骨样表型转化的作用机制,另扩展了调控 Runx2 表达的相关 miRNAs 在氧化应激、自噬和凋亡方面的作用。总之,miRNAs 参与血管钙化是相当复杂的,因此需要更多的研究来充分探索 miRNAs 和血管钙化之间的关联,并发现血管钙化治疗干预的更多靶点。

利益冲突 所有作者均声明没有利益冲突

参 考 文 献

[1] Paloian NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 307(8): F891-F900. DOI: 10.1152/ajprenal.00163.2014.

[2] Kohn JC, Zhou DW, Bordeleau F, et al. Cooperative effects of matrix stiffness and fluid shear stress on endothelial cell behavior[J]. *Biophys J*, 2015, 108(3): 471-478. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.12.023.

[3] Ossareh S. Vascular calcification in chronic kidney disease: mechanisms and clinical implications[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2011, 5(5): 285-299. DOI: 10.1590/S1677-55382011000500001.

[4] Durham AL, Speer MY, Scatena M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 590-600. DOI: 10.1093/cvr/cvy010.

[5] Rattazzi M, Bertacco E, Puato M, et al. Hypertension and vascular calcification: a vicious cycle? [J]. *J Hypertens*, 2012, 30(10): 1885-1893. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328356c257.

[6] Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(12): 727-744. DOI: 10.1038/s41569-019-0227-9.

[7] Patel JJ, Bourne LE, Davies BK, et al. Differing calcification processes in cultured vascular smooth muscle cells and osteoblasts[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 380(1): 100-113. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.04.020.

[8] Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Vascular calcification-new insights into its mechanism[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): E2685. DOI: 10.3390/ijms21082685.

[9] Voelkl J, Tuffaha R, Luong TTD, et al. Zinc inhibits phosphate-induced vascular calcification through TNFAIP₃-mediated suppression of NF-κB[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(6): 1636-1648. DOI: 10.1681/asn.2017050492.

[10] Yao L, Sun YT, Sun W, et al. High phosphorus level leads to aortic calcification via β-catenin in chronic kidney disease[J]. *Am J Nephrol*, 2015, 41(1): 28-36. DOI: 10.1159/000370250.

[11] Wang Y, Yu Y, Zhang HX, et al. The expression of Akt/mTOR in VSMC calcification induced by high phosphate and its regulation of Cbfa1[J]. *Natl Med J China*, 2018, 98(18): 1446-1451. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.18.016.

[12] Shimokado A, Sun YJ, Nakanishi M, et al. Smad3 plays an inhibitory role in phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(3): 458-464. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.10.005.

[13] Lin ME, Chen T, Leaf EM, et al. Runx2 expression in smooth muscle cells is required for arterial medial calcification in mice[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(7): 1958-1969. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.020.

[14] Chen Y, Zhao X, Wu H. Transcriptional programming in arteriosclerotic disease: a multifaceted function of the Runx2 (runt-related transcription factor 2) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(1): 20-34. DOI: 10.1161/atvbaha.120.313791.

[15] Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 750-755. DOI: 10.1002/jcb.22994.

[16] Tanaka T, Sato H, Doi H, et al. Runx2 represses myocardin-mediated differentiation and facilitates osteogenic conversion of vascular smooth muscle cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(3): 1147-1160. DOI: 10.1128/mcb.01771-07.

[17] Lin ME, Chen TM, Wallingford MC, et al. Runx2 deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation[J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 112(2): 606-616. DOI: 10.1093/cvr/cvw205.

[18] Sun Y, Byon CH, Yuan KY, et al. Smooth muscle cell-specific Runx2 deficiency inhibits vascular calcification[J]. *Circ Res*, 2012, 111(5): 543-552. DOI: 10.1161/circresaha.112.267237.

[19] Dostal V, Churchill MEA. Cytosine methylation of mitochondrial DNA at CpG sequences impacts transcription factor A DNA binding and transcription[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(5): 598-607. DOI: 10.1016/j.bbgrm.2019.01.006.

[20] Coll-Bonfill N, de la Cruz-Thea B, Pisano MV, et al. Non-coding RNAs in smooth muscle cell homeostasis: implications in phenotypic switch and vascular disorders[J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(6): 1071-1087. DOI: 10.1007/s00424-016-1821-x.

[21] Gupta SK, Kumari S, Singh S, et al. Non-coding RNAs: regulators of valvular calcification[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 142: 14-23. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2020.03.015.

- [22] Metzinger-Le Meuth V, Burtey S, Maitrias P, et al. microRNAs in the pathophysiology of CKD-MBD: Biomarkers and innovative drugs[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis*, 2017, 1863(1): 337-345. DOI: 10.1016/j.bbdis.2016.10.027.
- [23] Tyson J, Bundy K, Roach C, et al. Mechanisms of the osteogenic switch of smooth muscle cells in vascular calcification: WNT signaling, BMPs, mechanotransduction, and EndMT [J]. *Bioengineering (Basel)*, 2020, 7(3): 88. DOI: 10.3390/bioengineering7030088.
- [24] Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368(2): 267-272. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.01.073.
- [25] Wen P, Cao HD, Fang L, et al. miR-125b/Ets1 axis regulates transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells in a high-phosphate environment[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 322(2): 302-312. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.01.025.
- [26] Hultgårdh-Nilsson A, Cercek B, Wang JW, et al. Regulated expression of the ets-1 transcription factor in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro[J]. *Circ Res*, 1996, 78(4): 589-595. DOI: 10.1161/01.res.78.4.589.
- [27] Goettsch C, Rauner M, Pacyna N, et al. miR-125b regulates calcification of vascular smooth muscle cells[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(4): 1594-1600. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.06.016.
- [28] Wu TT, Zhou HB, Hong YF, et al. miR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(10): 7503-7511. DOI: 10.1074/jbc.M111.292722.
- [29] Zhang RY, Weng YG, Li BL, et al. BMP9-induced osteogenic differentiation is partially inhibited by miR-30a in the mesenchymal stem cell line C3H10T1/2[J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(4/5): 399-407. DOI: 10.1007/s10735-015-9628-1.
- [30] Eguchi T, Watanabe K, Hara ES, et al. OstemiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58796. DOI: 10.1371/journal.pone.0058796.
- [31] Balderman JAF, Lee HY, Mahoney CE, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification[J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(6): e003905. DOI: 10.1161/JAHA.112.003905.
- [32] Bae YJ, Yang T, Zeng HC, et al. miRNA-34c regulates Notch signaling during bone development[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(13): 2991-3000. DOI: 10.1093/hmg/dd129.
- [33] Wei JW, Shi Y, Zheng LH, et al. miR-34s inhibit osteoblast proliferation and differentiation in the mouse by targeting SATB2[J]. *J Cell Biol*, 2012, 197(4): 509-521. DOI: 10.1083/jcb.201201057.
- [34] Hao JB, Zhang L, Cong GT, et al. microRNA-34b/c inhibits aldosterone-induced vascular smooth muscle cell calcification via a SATB2/Runx2 pathway[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 366(3): 733-746. DOI: 10.1007/s00441-016-2469-8.
- [35] Lin X, Li F, Xu F, et al. Aberration methylation of miR-34b was involved in regulating vascular calcification by targeting Notch1[J]. *Aging*, 2019, 11(10): 3182-3197. DOI: 10.18632/aging.101973.
- [36] Cui RR, Li SJ, Liu LJ, et al. microRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(2): 320-329. DOI: 10.1093/cvr/cvs258.
- [37] Ruffenach G, Chabot S, Tanguay VF, et al. Role for runt-related transcription factor 2 in proliferative and calcified vascular lesions in pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194(10): 1273-1285. DOI: 10.1164/rccm.201512-2380OC.
- [38] Yu C, Li LF, Xie F, et al. LncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote osteoblast differentiation through upregulating Runx2 in aortic valve calcification[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(1): 168-179. DOI: 10.1093/cvr/cvx180.
- [39] Lin X, Xu F, Cui RR, et al. Arterial calcification is regulated via an miR-204/DNMT3a regulatory circuit both in vitro and in female mice[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(8): 2905-2916. DOI: 10.1210/en.2018-00320.
- [40] Qiao WW, Chen L, Zhang MX. microRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6): 1945-1953. DOI: 10.1159/000362971.
- [41] Hu N, Feng CZ, Jiang Y, et al. Regulative effect of mir-205 on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs): possible role of SATB2/Runx2 and ERK/MAPK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 10491-10506. DOI: 10.3390/ijms160510491.
- [42] Huang MW, Li XW, Zhou C, et al. Noncoding RNA miR-205-5p mediates osteoporosis pathogenesis and osteoblast differentiation by regulating RUNX2[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(10): 4196-4203. DOI: 10.1002/jcb.29599.
- [43] Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, et al. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3728-3738. DOI: 10.1074/jbc.M808788200.
- [44] Liu XJ, Cheng YH, Yang J, et al. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: molecular mechanism and therapeutic application[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(1): 245-255. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.11.008.
- [45] Liu XJ, Cheng YH, Zhang S, et al. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia[J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 476-487. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.185363.
- [46] Huang J, Zhao L, Xing LP, et al. microRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2): 357-364. DOI: 10.1002/stem.288.
- [47] Yan JH, Guo D, Yang S, et al. Inhibition of miR-222-3p activity promoted osteogenic differentiation of hBMSCs by regulating Smad5-RUNX2 signal axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 470(3): 498-503. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.133.
- [48] MacKenzie NCW, Staines KA, Zhu D, et al. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification[J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(2): 209-216. DOI: 10.1002/cbf.3005.
- [49] Bakhshandeh B, Hafizi M, Ghaemi N, et al. Down-regulation of miRNA-221 triggers osteogenic differentiation in human stem cells[J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(8): 1579-1587. DOI: 10.1007/s10529-012-0934-3.

- [50] Li ZY, Hassan MQ, Volinia S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 13906-13911. DOI: 10.1073/pnas.0804438105.
- [51] Torella D, Iaconetti C, Catalucci D, et al. microRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo [J]. *Circ Res*, 2011, 109(8): 880-893. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.240150.
- [52] Qadir AS, Lee J, Lee YS, et al. Distal-less homeobox 3, a negative regulator of myogenesis, is downregulated by microRNA-133 [J]. *J Cell Biochem*, 2018: 2018Sep11. DOI: 10.1002/jcb.27533.
- [53] Liao XB, Zhang ZY, Yuan K, et al. miR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(9): 3344-3352. DOI: 10.1210/en.2012-2236.
- [54] Panizo S, Naves-Díaz M, Carrillo-López N, et al. microRNAs 29b, 133b, and 211 regulate vascular smooth muscle calcification mediated by high phosphorus [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(3): 824-834. DOI: 10.1681/ASN.2014050520.
- [55] Zhang H, Chen J, Shen ZY, et al. Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 284: 29-36. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.11.033.
- [56] Jiang WH, Zhang ZM, Yang H, et al. The miR-29b/matrix metalloproteinase 2 axis regulates transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells in a calcified environment [J]. *Blood Purif*, 2020, 49(5): 524-534. DOI: 10.1159/000505571.
- [57] Jiang WH, Zhang ZM, Yang H, et al. The involvement of miR-29b-3p in arterial calcification by targeting matrix metalloproteinase-2 [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 6713606. DOI: 10.1155/2017/6713606.
- [58] Du YY, Gao C, Liu ZY, et al. Upregulation of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7 by miR-29 repression mediates vascular smooth muscle calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(11): 2580-2588. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300206.
- [59] Hu R, Liu W, Li H, et al. A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(14): 12328-12339. DOI: 10.1074/jbc.M110.176099.
- [60] Xia ZY, Hu Y, Xie PL, et al. Runx2/miR-3960/miR-2861 positive feedback loop is responsible for osteogenic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 624037. DOI: 10.1155/2015/624037.
- [61] Hu CT, Shao YD, Liu YZ, et al. Oxidative stress in vascular calcification [J]. *Clin Chimica Acta*, 2021, 519: 101-110. DOI: 10.1016/j.cca.2021.04.012.
- [62] Byon CH, Javed A, Dai Q, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(22): 15319-15327. DOI: 10.1074/jbc.M800021200.
- [63] Wu XG, Zheng XH, Cheng J, et al. LncRNA TUG1 regulates proliferation and apoptosis by regulating miR-148b/IGF₂ axis in ox-LDL-stimulated VSMC and HUVEC [J]. *Life Sci*, 2020, 243: 117287. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117287.
- [64] Wang J, Sun YT, Xu TH, et al. microRNA-30b regulates high phosphorus level-induced autophagy in vascular smooth muscle cells by targeting BECN1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 530-536. DOI: 10.1159/000477602.
- [65] Lin X, Zhan JK, Zhong JY, et al. lncRNA-ES3/miR-34c-5p/BMF axis is involved in regulating high-glucose-induced calcification/senescence of VSMCs [J]. *Aging*, 2019, 11(2): 523-535. DOI: 10.18632/aging.101758.
- [66] Zhang Y, Xie RL, Croce CM, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(24): 9863-9868. DOI: 10.1073/pnas.1018493108.
- [67] Vishal M, Ajeetha R, Keerthana R, et al. Regulation of Runx2 by histone deacetylases in bone [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2016, 17(4): 343-351. DOI: 10.2174/1389203716666150623104017.
- [68] Fu Y, Kong W. Cartilage oligomeric matrix protein: matricellular and matricrine signaling in cardiovascular homeostasis and disease [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(3): 186-196. DOI: 10.2174/1570161115666170201121232.
- [69] Jiang LQ, 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): 1192-1199. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.196840.

(收稿日期:2021-11-30)