

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170255

myocardin 通过激活 miR-93-5p 促进人主动脉 血管平滑肌细胞分化

史丹阳, 刘美玲, 刘翔, 张健, 张同存, 王楠

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: myocardin 是促进平滑肌细胞分化的重要转录因子。微小 RNA (microRNAs, miRNA) 在近年来已经证实参与多种生物学过程, 包括平滑肌的表型转化。然而在平滑肌分化过程中 myocardin 与哪些 microRNA 具有相关性仍有待于阐明。通过将外源性 myocardin 转入人主动脉血管平滑肌细胞 (human aortal vascular smooth muscle cells, HA-VSMCs) 中, 利用免疫印迹 (Western blot) 检测分化标志基因肌动蛋白 $\alpha 2$ (actin $\alpha 2$, ACTA2) 和肌动蛋白相关蛋白 (smooth muscle 22 α , SM22 α) 的表达; 利用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测过表达或敲低 myocardin 对 miR-93-5p 水平的影响; 构建 miR-93-5p 启动子的荧光素酶报告质粒, 利用荧光素酶报告分析证实 myocardin 对 miR-93-5p 启动子的转录激活作用。上述结果证实 myocardin 可能通过激活 miR-93-5p 的转录, 上调其表达, 进而促进血管平滑肌细胞的分化。

关键词: myocardin; 人主动脉血管平滑肌细胞; 表型转化; miR-93-5p

中图分类号: Q28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2019)02-0019-06

Myocardin Promoting Differentiation of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells by Activating miR-93-5p

SHI Danyang, LIU Meiling, LIU Xiang, ZHANG Jian, ZHANG Tongcun, WANG Nan

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Myocardin is an important transcription factor, which promotes the differentiation of vascular smooth muscle cells. It has been reported that microRNAs are involved in multiple biological processes, including smooth muscle cell phenotypic switching. However, what microRNAs are associated with myocardin during smooth muscle cell differentiation process is still unclear. In this research, exogenous myocardin was transfected into human aortal vascular smooth muscle cells (HA-VSMCs), and then the expression of contractive genes actin $\alpha 2$ (ACTA2) and smooth muscle 22 α (SM22 α) were detected by Western blot. By using function gain or loss approach, the effect of myocardin on the level of miR-93-5p was investigated and its level was tested with Real-time PCR. By constructing luciferase reporter plasmid containing promoter miR-93-5p, the effect of myocardin on the activity of miR-93-5p promoter was detected by luciferase assay. These data showed that myocardin promoted the differentiation of VSMCs by activating the transcription of miR-93-5p and upregulating its level.

Key words: myocardin; human aortic vascular smooth muscle cells; phenotypic switching; miR-93-5p

动脉粥样硬化等许多心血管系统疾病作为危害人类健康的危重疾病一直受到广泛关注。成熟血管

壁的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 在血管损伤后由收缩表型向去分化表型的

收稿日期: 2017-09-21; 修回日期: 2017-12-04

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (17JCZDJC33600); 天津市高等学校创新团队培养计划资助项目 (TD13-5015)

作者简介: 史丹阳 (1992—), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生; 通信作者: 王楠, 教授, wn929@tust.edu.cn

转化在动脉粥样硬化和血管再狭窄等血管疾病发生过程中有重要作用^[1]。研究表明血清反应因子 (serum response factor, SRF) 与其顺式作用元件 CarG [CC(A/T)6GG]-box 的相互作用是启动血管平滑肌细胞标志性基因表达的核心机制^[2]。myocardin 是 2001 年发现的核蛋白 (stress associated protein, SAP) 结构域家族的一个成员,可在多种非肌细胞中与 SRF 结合形成三聚体,并进一步显著激活 CarG box 依赖的平滑肌和心肌特异表达基因的启动子,包括 α 平滑肌肌动蛋白 (α smooth muscle-actin, α -SMA)、平滑肌肌球蛋白重链 (SM-myosin heavy chain, SM-MHC)、肌动蛋白 $\alpha 2$ (actin $\alpha 2$, ACTA2) 基因等^[3]。从而在分子水平上影响着血管平滑肌细胞的表型转化。

微小 RNA (microRNAs, miRNA) 是新近发现的非编码 RNA,具有调节基因表达的功能,在细胞的生长、分化和迁徙等过程中具有重要作用,是调控诸多病理生理现象的关键小分子^[4]。Gareri 等^[5]研究表明,miRNA 在血管平滑肌表型转化中起到重要作用,miR-125a-5p 通过靶向 ETS-1 (erythroblast transformation specific-1, ETS-1) 调控血管平滑肌的表型转化。但在 VSMCs 表型转化过程中 myocardin 与哪些 miRNA 相关目前尚未完全阐明。通过对 miRNA 的启动子分析发现 miR-93-5p 的启动子上有 myocardin/SRF 的结合位点 CarG box,因此推测 myocardin 可能是调控 miR-93-5p 的关键转录因子。本研究旨在通过功能获得或缺失实验验证在人主动脉血管平滑肌细胞分化过程中 myocardin 对 miR-93-5p 的转录激活作用。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌种与质粒

人主动脉血管平滑肌细胞 (human aortic vascular smooth muscle cells, HA-VSMCs) 由本实验室保藏, ATCC[®] 编号为 CRL-1999。大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、pGL3-Basic、pcDNA3.1-myocardin 表达质粒、pRI-GFP/Neo-Myocd (RNAi-myocardin) 干扰质粒、pRI-GFP/Neo-Control (RNAi-control) 质粒均为本实验室保存。

1.2 主要试剂

myocardin 一抗 (rabbit), 天津赛尔生物技术有限公司; ACTA2 一抗 (rabbit)、SM22 一抗 (rabbit), Abcam 公司; 小鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)

一抗, Santa Cruz 公司; 山羊抗兔荧光二抗、山羊抗鼠荧光二抗, Li-cor 公司; M-MLV 逆转录酶、Trizol 试剂, 北京索莱宝科技有限公司; Taq DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司; *Nhe* I 限制性内切酶、*Xho* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, Promega 公司; SYBR Green q PCR Mastermix, DBI Bioscience 公司; dNTPs、D2000 DNA ladder、DM 2000 plus DNA marker、通用型柱式基因组提取试剂盒 (Universal Genomic DNA Kit), 北京康为世纪生物科技有限公司; 荧光素酶检测试剂盒, Promega 公司; X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转染试剂, Roche 公司。

1.3 细胞培养与转染

HA-VSMCs 用含有 10% 胎牛血清 (无噬菌体, 低内毒素) 和 1% 100 $\times$ 青链霉素双抗溶液的 DMEM-HG 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 当细胞生长至 70% 时, 用脂质体介导法分别转染空载对照质粒 (pcDNA3.1)、myocardin 过表达质粒 (pcDNA3.1-myocardin)、pRI-GFP/Neo-Control (RNAi-control) 质粒和 pRI-GFP/Neo-Myocd (RNAi-myocardin) 干扰质粒。所用质粒浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 操作按 X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent 转染试剂说明书进行。在转染后 48 h 收集不同条件处理的 HA-VSMCs, 分别收集细胞总蛋白或总 RNA, 进行后续实验。

1.4 免疫印迹 (Western blot) 分析

收集各组细胞, SDS 蛋白裂解液冰上裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 考马斯亮蓝法测定蛋白含量。100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min 后, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 通过电转移将蛋白胶转移至 NC 膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 分别用 ACTA2 抗体 (1 : 500)、SM22 α 抗体 (1 : 1000)、myocardin 抗体 (1 : 1000) 在孵育袋中孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗膜 3 次, 每次 10 min。随后加入相对应的二抗 (山羊抗兔荧光二抗、山羊抗鼠荧光二抗) 室温避光孵育 2 h, PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min。Oddysey 远红外成像系统扫膜, 用 Image J 软件对 Western blot 结果进行定量分析。

1.5 总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

先用 Trizol 法提取总 RNA, 参照 M-MLV 逆转录方法进行逆转录。每组取 2 μg 总 RNA 分别用 miR-93-5p 的反转录引物作为特异性逆转录引物进行逆转录反应, 得到相应的逆转录产物 cDNA。miR-93-

5p 的反转录引物: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGGATACGACCTACCTG-3'。取 2 μ L 产物进行 Real-time PCR 扩增, 扩增体系为 20 μ L: master mix 10 μ L, 无菌蒸馏水 7.6 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 50 $\times$ ROX 0.4 μ L。PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s 终止反应。检测 miR-93-5p 的表达水平(U6 为内参), U6 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; miR-93-5p 上游引物为 5'-GAGTGTCAAAGTGCTGTTCGTG-3', 下游引物为 5'-GCAGGGTCCGAGGTATTC-3'。

1.6 人基因组的提取

按通用型柱式基因组提取试剂盒(Universal Genomic DNA Kit)提取基因组, 先将人主动脉血管平滑肌细胞用胰酶消化处理为细胞悬液离心后弃上清液, 加 200 μ L GTL, 震荡样品至悬浮; 加入 20 μ L Proteinase K、200 μ L Buffer GL, 震荡混匀, 56 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 离心后加入 200 μ L 无水乙醇并混匀。按照基因组试剂盒说明书将上述步骤中所得溶液加入收集管的吸附柱中, 离心弃废液, 向吸附柱中依次加入 500 μ L Buffer GW1、500 μ L Buffer GW2, 离心后弃废液并将吸附柱彻底晾干。最后向吸附柱的中间部位悬空加入 50 ~ 200 μ L Buffer GE 或灭菌水, 室温放置 2 ~ 5 min, 离心 1 min, 收集 DNA 溶液, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.7 miR-93-5p 的启动子质粒构建和荧光素酶报告实验

在 NCBI 上查找 miR-93-5p 的启动子序列, 根据文献查出与 myocardin 结合的 CArG(CCTTAAAGG)结合位点。根据其序列以及 pGL3 载体确定酶切位点为 *Nhe* I 和 *Xho* I, 运用 Primer 5.0 设计引物, 上游引物为 5'-GTAGCTAGCCAGGTGAATTTTCATGTTT AGACTGGAGT-3'(*Nhe* I), 下游引物为 5'-ATTCTC GAGCCAAGACGGGAGGACAGAAAGGAA-3'(*Xho* I), 片段为 1 028 bp。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 热启动 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。以人基因组为模板, 按上述 PCR 条件扩增后, 纯化 PCR 产物。用相应的限制性内切酶进行酶切, 将酶切产物与用同样限制性内切酶酶切的 pGL3-Basic 质粒用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 孵育器连接 24 h。转化 DH5 α , 在氨苄霉素抗性平板上挑选单克隆后, 在氨

苄霉素抗性液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 扩大培养 14 h 后, 提取质粒进行双酶切验证并测序。

随后在 24 孔板中进行质粒转染实验。过表达 myocardin 实验组为启动子(pGL3-Basic-p-miR-93-5p)0.5 μ g、pcDNA3.1-myocardin 表达质粒 0.5 μ g, 对照组为启动子(pGL3-Basic-p-miR-93-5p)0.5 μ g、pcDNA3.1 对照质粒 0.5 μ g; 干扰 myocardin 实验组为启动子(pGL3-Basic-p-miR-93-5p)0.5 μ g、pRI-GFP/Neo-Myocd(RNAi-myocardin)干扰质粒 0.5 μ g, 对照组为启动子(pGL3-Basic-p-miR-93-5p)0.5 μ g、pRI-GFP/Neo-Control(RNAi-control)对照质粒 0.5 μ g; 2 μ L 脂质体。实验步骤参考荧光素酶检测试剂盒说明书进行, 转染 24 h 后加入 Luc 裂解物冰上裂解细胞 30 min, 吸取 50 μ L 裂解物, 加入至预冷的白色 96 孔板中; 在酶标仪上设置程序。随后采用考马斯亮蓝染色法进行蛋白质含量的测定。

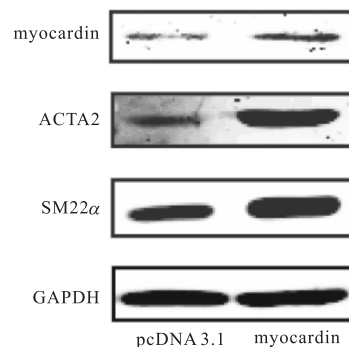
1.8 统计学分析

所有数据均用“平均值 $\pm$ 标准差”表示, 采用 SASV8 软件进行统计学处理分析, 组间比较用单因素方差分析检验。

2 结果与分析

2.1 myocardin 过表达促进 HA-VSMCs 分化

为证实 myocardin 在平滑肌细胞分化过程中的重要作用, 将对照质粒(pcDNA3.1)和 myocardin 表达质粒(pcDNA3.1-myocardin)分别转染入 HA-VSMCs 中 48 h, 利用 Western blot 方法检测 myocardin 的表达情况。已有研究证实 ACTA2 和 SM22 α 是收缩型 VSMCs 的最具特点的标志基因, 通常以二者的表达活性作为判定 VSMCs 分化表型的依据, 因此检测了分化标志性基因 ACTA2 和 SM22 α 的蛋白水平, 结果如图 1 所示。



(a) Western blot 检测

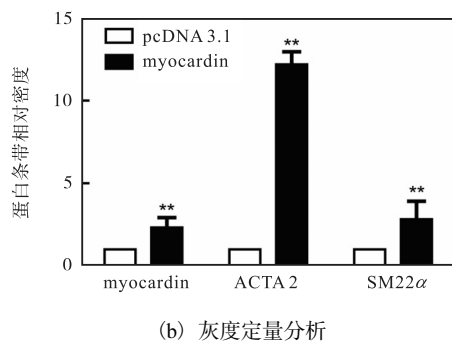


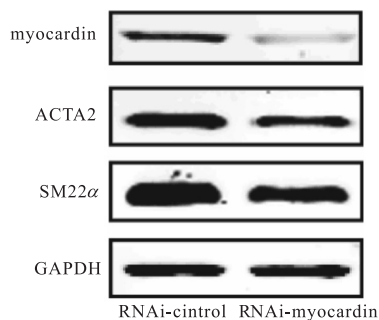
图1 myocardin促进HA-VSMCs特异性基因的表达

Fig.1 Expression of HA-VSMC specific genes upregulated by myocardin

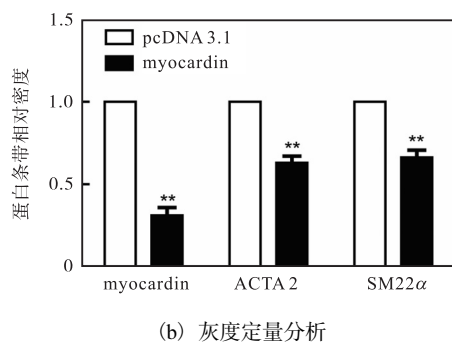
与对照组相比,转染 pcDNA3.1-myocardin 质粒组 myocardin 蛋白水平显著上调,同时分化标志基因 ACTA2 和 SM22α 的蛋白水平也显著升高. 这说明 myocardin 能显著上调人主动脉平滑肌标志基因的表达,促进血管平滑肌细胞分化.

2.2 干扰 myocardin 抑制 HA-VSMCs 分化

为进一步证实 myocardin 对平滑肌细胞分化的影响,将对照质粒(RNAi-control)和 myocardin 干扰质粒(RNAi-myocardin)分别转染入 HA-VSMCs 中 48 h,利用 Western blot 方法检测 myocardin 和分化标志基因 ACTA2 和 SM22α 的蛋白水平,结果如图 2 所示.



(a) Western blot 检测



(b) 灰度定量分析

图2 myocardin抑制HA-VSMCs特异性基因的表达

Fig.2 Expression of HA-VSMC specific genes downregulated by myocardin

与对照组相比,转染 RNAi-myocardin 质粒组 myocardin 蛋白水平显著下调,同时分化标志基因 ACTA2 和 SM22α 的蛋白水平也分别下调 40% 和 35% 左右. 这说明干扰 myocardin 能显著下调人主动脉平滑肌标志基因的表达,抑制血管平滑肌细胞分化.

2.3 myocardin 与 miR-93-5p 的表达水平成正相关

对 miRNA 的启动子分析中发现,miR-93-5p 启动子上含有 myocardin 的结合位点 CArG box,因此 myocardin 可能是上调 miR-93-5p 的关键转录因子. 为证实这一结论,在 HA-VSMCs 中过表达 myocardin. 提取 RNA,逆转后 Real-time PCR 检测 miR-93-5p 的表达量,以 U6 为内参基因,结果如图 3 所示,过表达 myocardin 后,miR-93-5p 的表达显著上调. 这说明在平滑肌分化过程中 myocardin 上调了 miR-93-5p 的水平.

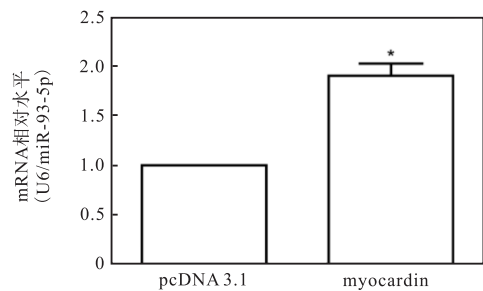


图3 过表达 myocardin 上调 miR-93-5p 水平

Fig.3 Myocardin upregulating the expression of miR-93-5p

2.4 干扰 myocardin 影响 miR-93-5p 的表达

进一步在 HA-VSMCs 中转染 myocardin 的干扰质粒 pRI-GFP/Neo-Myocd (RNAi-myocardin) 降低内源性 myocardin 的表达水平后,检测 miR-93-5p 的表达水平. 提取 RNA,逆转录后进行 RT-PCR 检测 miR-93-5p 的表达量,以 U6 为内参基因,miR-93-5p 的水平也显著下降(图 4). 这些结果进一步说明 miR-93-5p 与 myocardin 的表达成正相关,并且有可能介导 myocardin 对 VSMCs 特异性分化过程的调控.

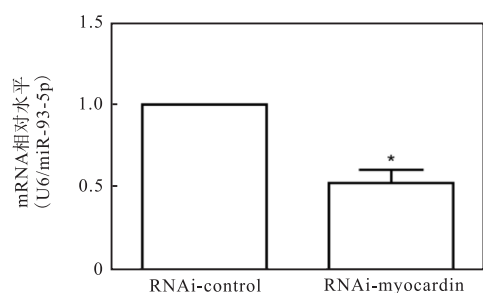


图4 干扰 myocardin 表达下调 miR-93-5p 水平

Fig.4 Myocardin downregulating the expression of miR-93-5p

2.5 miR-93-5p 的启动子质粒构建

为证实 myocardin 能否激活 miR-93-5p 的转录, 构建 miR-93-5p 启动子荧光素酶报告基因质粒. 在 NCBI 上查找 miR-93-5p 的启动子序列, 设计引物, 从人主动脉平滑肌细胞中获得人的基因组序列作为模板, 通过 PCR 法获得所需要的启动子序列 1 028 bp (从 -1 037 bp 到 0 bp), 结果如图 5(a) 所示. 将 pGL3-Basic 载体和纯化后的 PCR 片段分别用 *Nhe* I 和 *Xho* I 两种限制性内切酶双酶切, 获得目的片段和空载的线性片段. 随后将两条线性片段进行连接转化. 当平皿上长出菌落后, 挑取菌落, 小提质粒后进行双酶切鉴定, 结果如图 5(b) 所示. pGL3-p-miR-93-5p-luc 质粒经双酶切后产生两个片段, 大小分别为 4 818 bp 和 1 028 bp, 4 818 bp 片段与载体大小一致, 1 028 bp 片段与 PCR 产物大小一致. 这初步证明质粒构建正确, 进一步通过测序鉴定, 质粒构建成功.

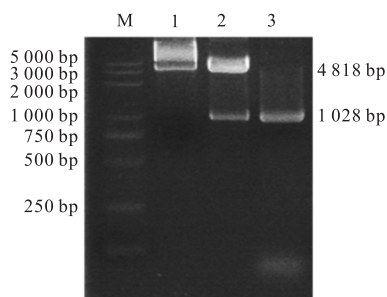
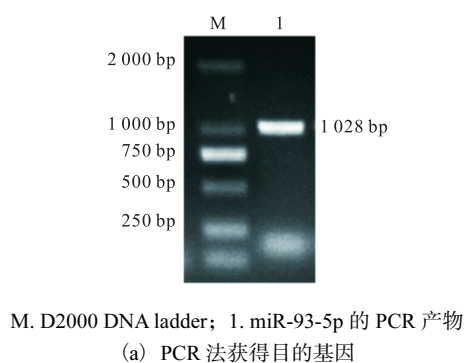


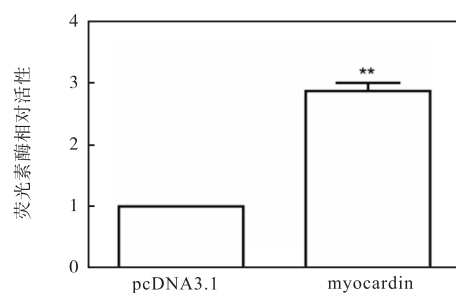
图 5 构建 miR-93-5p 启动子荧光素酶报告质粒

Fig. 5 Luciferase reporting the construction of plasmid containing promoter miR-93-5p

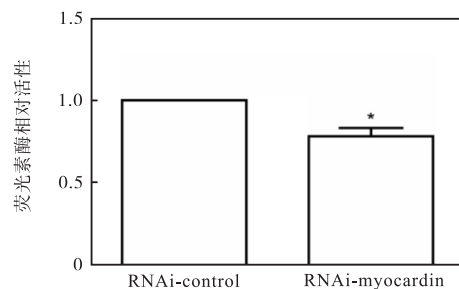
2.6 myocardin 增强 miR-93-5p 的启动子活性

利用成功构建的 miR-93-5p 启动子荧光素酶报告基因质粒, 进行荧光素酶报告分析. 在 HA-VSMCs 中共同转染 myocardin 质粒和 miR-93-5p 启动子质

粒, 以 myocardin 的空载质粒 pcDNA3.1 和 miR-93-5p 启动子质粒的共转作为对照, 进行荧光素酶活性检测分析, 结果如图 6 所示. myocardin 能够显著增强 miR-93-5p 启动子活性(图 6(a)), 而敲低 myocardin 的表达后, miR-93-5p 的活性也显著降低(图 6(b)). 这表明 myocardin 能增强 miR-93-5p 的启动子活性, 促进其转录.



(a) 过表达 myocardin 激活 miR-93-5p 启动子活性



(b) 干扰 myocardin 表达抑制 miR-93-5p 启动子活性

图 6 myocardin 增强 miR-93-5p 的启动子活性

Fig. 6 Myocardin enhancing the promoter activity of miR-93-5p

3 讨论

miRNA 是近年来发现的能够在转录后水平调节基因表达的一组非蛋白编码小分子, 广泛存在于从病毒、线虫、植物到动物体内. 成熟后能够通过核酸序列互补识别特定的目标, 使之降解或抑制其翻译, 从而抑制蛋白质的合成, 达到调控基因表达的目的. 研究表明: 其参与了细胞分裂增殖、分化与发育以及代谢等许多重要的生物学过程, 因此有可能成为疾病诊断、预后判断的指标及治疗靶点. 此外, 在不同效应细胞亚群的分化中起重要作用. 已有报道在 VSMCs 中 miRNA 在细胞多种功能中都起到了十分重要的作用^[6]. 目前已经有多篇文献报道了 miR-125a-5p、miR-145^[7]、miR-23b^[8]、miR-18a-5p^[9]等都能够直接或者间接影响 VSMCs 的表型转化. Li 等^[10]证实 myocardin 可以通过上调 miR-206 促进平滑肌向分化

表型转化. 但对于平滑肌分化过程中受到 myocardin 调控的 miRNA 的了解仍然有限.

本研究发现 myocardin 可以通过上调平滑肌分化标志基因 SM22 α 和 ACTA2 的表达, 促进人主动脉平滑肌细胞向分化表型转化, 在此过程中 miR-93-5p 的水平上调. 而 myocardin 的功能缺失实验证实, 在人主动脉平滑肌细胞中敲低 myocardin 的表达可以显著降低 miR-93-5p 的水平. 这些结果证实, 在平滑肌分化过程中 myocardin 与 miR-93-5p 的相关性. 目前对于 miR-93-5p 的功能知之甚少, 已有报道大多集中于肿瘤细胞中. miR-93-5p 在肿瘤细胞中的作用也不尽相同, 已经证实 miR-93-5p 促进胃癌转移^[11]、子宫内膜癌上皮间质转化过程^[12], 但却抑制乳腺癌细胞的上皮间质转化过程^[13]. 目前尚未发现有关 miR-93-5p 在血管平滑肌细胞中功能的相关报道, 而本研究则证实了 miR-93-5p 可能参与 myocardin 调控的血管平滑肌细胞分化过程, myocardin 可以激活 miR-93-5p 的启动子活性, 进而促进 miR-93-5p 的转录.

综上所述, myocardin 很可能通过上调 miR-93-5p 参与对 VSMCs 分化的调节. 本研究所得结果为发现 myocardin 功能的新机制提供初步实验证据, 并且发现 miR-93-5p 可能参与血管平滑肌分化表型的调控作用. 这对于心血管疾病病理机制的研究及新临床治疗靶标的研发提供参考.

参考文献:

- [1] Wagenseil J E, Mecham R P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics[J]. *Physiological Reviews*, 2009, 89(3): 957-989.
- [2] Xie W B, Li Z, Shi N, et al. Smad2 and myocardin-related transcription factor B cooperatively regulate vascular smooth muscle differentiation from neural crest cells[J]. *Circulation Research*, 2013, 113(8): E76-E86.
- [3] Joung H, Kwon J S, Kim J R, et al. Enhancer of polycomb1 lessens neointima formation by potentiation of myocardin-induced smooth muscle differentiation[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 222(1): 84-91.
- [4] Xie C, Zhang J, Chen Y E. MicroRNA and vascular smooth muscle cells[J]. *Vitamins & Hormones*, 2011, 87(87): 321-329.
- [5] Gareri C, Iaconetti C, Sorrentino S, et al. miR-125a-5p modulates phenotypic switch of vascular smooth muscle cells by targeting ETS-1[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429(12): 1817-1828.
- [6] Yu X, Li Z. MicroRNAs regulate vascular smooth muscle cell functions in atherosclerosis (review) [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, 34(4): 923-933.
- [7] Guo X, Li D, Chen M, et al. miRNA-145 inhibits VSMC proliferation by targeting CD40[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35302.
- [8] Iaconetti C, Rosa S D, Polimeni A, et al. Down-regulation of miR-23b induces phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo[J]. *Cardiovascular Research*, 2015, 107(4): 522-533.
- [9] Kee H J, Kim G R, Cho S N, et al. miR-18a-5p microRNA increases vascular smooth muscle cell differentiation by downregulating syndecan4[J]. *Korean Circulation Journal*, 2014, 44(4): 255-263.
- [10] Li H, Xiang Y, Fan L J, et al. Myocardin inhibited the gap protein connexin 43 via promoted miR-206 to regulate vascular smooth muscle cell phenotypic switch[J]. *Gene*, 2017, 616: 22-30.
- [11] Ma D H, Li B S, Liu J J, et al. miR-93-5p/IFNAR1 axis promotes gastric cancer metastasis through activating the STAT3 signaling pathway[J]. *Cancer Letters*, 2017, 408: 23-32.
- [12] Chen S, Chen X, Sun K X, et al. MicroRNA-93 promotes epithelial-mesenchymal transition of endometrial carcinoma cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165776.
- [13] Xiang Y, Liao X H, Yu C X, et al. MiR-93-5p inhibits the EMT of breast cancer cells via targeting MKL-1 and STAT3[J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 357(1): 135-144.

责任编辑: 郎婧