

## miR-145 对大鼠静脉桥血管内膜增生的影响

叶 岩 张成鑫 张士兵 葛圣林

**摘要** 目的 探讨微 RNA-145 (miR-145) 对自体静脉桥内膜增生的影响。方法 18 只雄性 SD 大鼠均分为慢病毒处理组、慢病毒对照组和未处理组。移植前,慢病毒处理组将移植静脉浸入慢病毒介导的 miR-145 溶液中(病毒滴度为  $1.0 \times 10^9$  pfu/ml) 15 min,慢病毒对照组将移植静脉浸入空载慢病毒溶液(病毒滴度为  $1.0 \times 10^9$  pfu/ml) 浸泡 15 min,未处理组在生理盐水中浸泡 15 min。术后 2 周取出移植血管,应用 HE 染色和 Masson 染色观察血管内膜的病理学改变,以及荧

光定量 RT-PCR 法检测移植血管中单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、增殖细胞核抗原(PCNA)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)及血管内皮生长因子(VEGF)的表达。结果 慢病毒处理组移植血管内膜厚度和管腔狭窄度均较慢病毒对照组和未处理组明显减少,MCP-1、PCNA、 $\alpha$ -SMA 及 VEGF 的表达水平明显低于慢病毒对照组和未处理组。结论 miR-145 可以有效抑制移植静脉内膜的增生。

**关键词** microRNA-145; 慢病毒; 静脉桥; 基因治疗

**中图分类号** R 615; R 318.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2014)07-0917-06

2014-04-08 接收

基金项目:安徽省科技厅年度重点科研项目(编号:1301043025)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院心脏外科,合肥 230022

作者简介:叶 岩,男,硕士研究生;

葛圣林,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: aydgs1@sina.com

冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG)中采用大隐静脉(great saphenous vein, GSV)作为材料已有30多年历史,而乳内动脉

[13] Klionsky D J, Meijer A J, Codogno P. Autophagy and p70S6 kinase [J]. Autophagy, 2005, 1(1): 59-60.

[14] Arsikin K, Kravic-Stevovic T, Jovanovic M, et al. Autophagy-dependent and -independent involvement of AMP-activated protein kinase in 6-hydroxydopamine toxicity to SH-SY5Y neuroblastoma

cells [J]. Biochim Biophys Acta 2012, 1822 (11): 1826-36.

[15] Wu X, Kihara T, Akaike A, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling regulates glutamate transporter 1 in astrocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(3): 514-8.

## The process and signal pathway of eliminating $\beta$ -amyloid protein by *Polygala Tenuifolia* extract

Zhao Huan<sup>1</sup>, Chen Xiaoyu<sup>1</sup>, Ji Feihong<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup> Dept of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup> Shanghai GenHouse Technology Co Ltd, Shanghai 201203)

**Abstract Objective** To discuss the way of eliminating  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) protein by traditional Chinese medicine *Polygala Tenuifolia* extract (PTE) as well as its possible signal pathway. **Methods** MTT assay was used to observe the toxicity of different concentration of PTE (100, 40, 20, 10, 5, 0  $\mu$ g/ml) on SH-SY5Y cells.  $A\beta$  peptide level in the supernatant of CHO cells overexpressing  $\beta$ -amyloid pro-protein (APP) and  $\beta$ -secretase (BACE1) after treated with PTE was detected by ELISA method. Autophagic vacuoles in SH-SY5Y were observed by MDC staining, and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) was detected by Western blot. mTOR, p70s6k, Raptor, Akt, AMPK as well as their phosphorylated protein were tested by Western blot to investigate the possible signaling pathway of autophagy which induced by PTE. **Results** MTT result showed that PTE had no significant toxicity on SH-SY5Y. After treated with drug, CHO cells had significantly decreased the secretion of  $A\beta$ , and with dose independent. We observed that autophagic vacuoles boosted in drug treatment group by fluorescence microscopy, in addition, LC3 II/LC3 I, the marker protein of autophagy also increased. **Conclusion** PTE may induce autophagy via enhancing AMPK/Raptor pathway, and inhibit mTOR phosphorylation as well as p70s6k, then strengthen the capacity of cellula to eliminate  $A\beta$ , and decrease its secretion.

**Key words** Alzheimer disease;  $\beta$ -amyloid protein; autophagy; LC3

等因长度短、取材困难受到限制,虽然 GSV 相比动脉缺乏内弹力层,但其具有容易获取、无排斥反应、来源丰富等优点,仍作为 CABG 最常用的移植血管。但动静脉吻合后发生血管内膜增生,出现再狭窄,影响了 CABG 的近、远期通畅率<sup>[1]</sup>。近年来,转基因技术成为一种新的治疗手段,基因治疗心血管疾病也已经成为研究的热点。Cheng et al<sup>[2]</sup>发现微 RNA-145 (microRNA-145, miR-145) 是一种新型的血管平滑肌细胞的表型标记并且能够控制血管新生内膜的病变,很可能成为血管增殖性疾病的一个新的治疗靶点。因此,该研究设计 miR-145 慢病毒表达载体,将其感染大鼠静脉壁,然后行动静脉吻合术,饲养 2 周后,再观察 miR-145 能否抑制大鼠移植静脉壁的内膜增生。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 18 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,300 ~ 350 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,饲养于恒温 (22 ± 2) °C,恒湿 (55 ± 5) % ,人工光照明暗各 12 h 的屏障系统中,大鼠均适应环境饲养 2 周以上行造模手术,实验过程符合国家《关于善待实验动物的指导性意见》。

**1.1.2 试剂和主要仪器** DMEM 细胞培养基、胎牛血清、Lipofectamin 2000 转染试剂及 TRIzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; DL2000 DNA Ladder、BamH I、EcoR I、T4 DNA Ligase、One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 和 Taq DNA Polymerase 均购自日本 TaKaRa 公司; 293T 细胞购自中国科学院上海细胞库; 慢病毒载体购自美国 Clontech 公司; miRNA 检测试剂盒购自上海吉玛制药技术有限公司。PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司; ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; 引物和 DNA oligo 由上海生工生物工程技术有限公司合成,见表 1。

**1.2 慢病毒载体构建** 搜索 mirbase 数据库 (<http://www.mirbase.org>) ,得到 Rno-miR-145 成熟体序列: GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT,利用 DNAS-TART6.0 软件设计含有 BamH I 和 EcoR I 酶切位点黏端的 miR-145shDNA 双链模板序列。将合成好的含有酶切位点黏端 miR-145shDNA 单链退火,和经 BamH I 和 EcoR I 双酶切的 pLV-shRNA2 慢病毒表达载体在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接,

转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌,挑单克隆菌落,摇菌提取质粒,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,并通过 NCBI 数据库比对分析测序结果,同时以相同方法,建立无关序列阴性对照 (Scramble-NC: TTCTCCGAACGTGTCACGT),送生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)
U6 snRNA	F: 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3' R: 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'	70
Rno-miR-145	F: 5'-ATTATATTGTCCAGTTTTCCAGG-3' R: 5'-AAAGTTGTCTCCACTCTCTCTC-3'	84
GAPDH	F: 5'-GATGACATCAAGAAGGTGGTGA-3' R: 5'-ACCTGTGTGCTGTAGCCATATTC-3'	194
PCNA	F: 5'-TCCCAGACAAGCAATGTTGATAAAG-3' R: 5'-TTTCCTCTAGCCGGGCGATC-3'	61
MCP-1	F: 5'-CAGTCTCTGTCACGCTTCT-3' R: 5'-AGTATTCATGGAAGGGAATAG-3'	243
$\alpha$ -SMA	F: 5'-TGTGCTGGACTCTGCAGATG-3' R: 5'-CTTCTGCATCCTGTGACAA-3'	493
VEGF	F: 5'-CCTGGCTTACTGCTGTACTCT-3' R: 5'-GCTGCTAGACGTCCATGA-3'	110

**1.3 慢病毒的包装和滴度测定** 将构建好的 pLV-shRNA2-miR-145 与慢病毒包装辅助质粒共转染细胞密度在 70% ~ 80% 的 293T 细胞。将转染慢病毒质粒的 293T 细胞系正常培养 72 h 后,收集细胞上清液,于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,除去细胞碎片。在无菌条件下将收集的培养上清液进行超速离心收集慢病毒,再用适量 PBS 进行重悬。

在 96 孔细胞培养板中每孔接种  $1 \times 10^4$  个 293T 细胞,培养过夜,次日将慢病毒液 10 倍系列稀释后接种到 293T 细胞上,每个稀释度接种 6 个孔,感染 24 h 后,取可以数清荧光细胞数的稀释度,通过荧光显微镜计数荧光细胞,结合稀释倍数计算病毒滴度,荧光细胞数  $\times$  有效稀释倍数 = 病毒滴度 (pfu/ml)。

**1.4 动物模型建立** 18 只雄性 SD 大鼠随机均分为慢病毒处理组、慢病毒对照组和未处理组,10% 水合氯醛 (0.03 ml/kg) 腹腔注射麻醉,以肌力消失为满意,将已麻醉好的大鼠四肢头部仰卧位固定在解剖台上,剔除颈部皮毛并消毒铺巾,用稀释肝素盐水 (50 U/ml, 1 ml/kg) 再进行腹腔注射。在颈部正中做切口长约 5 cm,逐层分离皮下组织,显露右颈外静脉 1 ~ 2 cm,并用无接触方法分离颈外静脉,同时结扎细小分支静脉,后进行两端结扎,剪下约 2 cm

的静脉血管,用肝素水冲洗。用溶液浸泡法<sup>[3]</sup>将慢病毒处理组中的移植静脉浸入慢病毒介导的 miR-145 溶液中 15 min,慢病毒对照处理组行空载慢病毒溶液浸泡 15 min,未处理组在生理盐水中浸泡 15 min。于同侧气管、食管沟内解剖出颈总动脉,注意保护迷走神经。预留动脉段约 2 cm,用动脉阻断钳阻断颈总动脉两段,从中剪断,用肝素盐水冲洗动脉断端及内腔,清除血凝块,随后用 8-0 聚丙烯缝线将取下的静脉端与同侧颈总动脉行端端连续吻合,每个吻合口 8 针,吻合完毕后再检查血管通畅度,先撤去远心端的动脉阻断钳,如果在吻合口处血管充盈而不出血,表示通畅度良好,吻合时随时用 1/1 000 罂粟碱溶液冲洗。逐层缝合切口,并用金霉素外涂切口,同时肌注青霉素  $40 \times 10^4$  U。术后常规饲养 2 周。

**1.5 取材** 术后 2 周,麻醉大鼠后切取移植血管,生理盐水中洗净残血,滤纸吸干。每根血管分成两段,一段置于 4% 多聚甲醛中固定;另一段置于无菌冻存管( DEPC 液浸泡除 RNA 酶)冻存于液氮中用于提取 RNA。

**1.6 病理组织学检测** 将固定 24 h 的标本依次脱水、透明、浸蜡后制成蜡块,每份蜡块标本行连续切片,并进行非连续切片 3 次,间隔 2 mm,分别作 HE 及 Masson 染色。Masson 染色判定标准:胶原纤维染成蓝色,弹力纤维、平滑肌纤维呈红褐色,细胞核呈蓝褐色。在 Nikon eclipse 80i 型显微镜下观察 HE、Masson 染色结果。应用 Motic Images Advanced 3.0 图像分析系统测量分析血管内膜厚度及狭窄情况。

**1.7 荧光定量 RT-PCR** 将组织于液氮中研碎,用 TRIzol 法提取总 RNA,其后取 5  $\mu$ l RNA 按照反转录试剂盒步骤制备 cDNA 后,以 U6 mRNA 为内参,通过 miRNA 检测试剂盒用 SYBRGreen 法检测各组大鼠血管中 miR-145 的含量;同时以内参 GAPDH 为内参,用 SYBRGreen 法检测各组大鼠血管中单核细胞趋化蛋白-1 ( monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、增殖细胞核抗原( proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(  $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 及血管内皮生长因子( vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达水平,所有指标均重复实验 3 次。定量反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min,然后以 95  $^{\circ}$ C 30 s、60  $^{\circ}$ C 40 s 进行 40 个循环。各组 PCR 均重复 3 次。相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法来表示,其中  $\Delta Ct = Ct_{\text{目标mRNA}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{处理}} - \Delta Ct_{\text{对照}}$ 。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用方差分析及两样本  $t$  检验进行比较。

## 2 结果

**2.1 载体构建及测序** 将合成好的含有酶切位点黏端 miR-145 shDNA 单链退火连接到 pLV-shRNA2 慢病毒穿梭载体中,测序证明得到的序列与 mirbase 数据库中的 Rno-miR-145 序列完全一致。

**2.2 慢病毒滴度的测定** 将收集的慢病毒液接种至 293T 细胞 24 h 后,在  $10^4$  稀释度孔内取可以数清荧光细胞数,6 孔的平均数为 250 个荧光细胞,则该慢病毒的滴度为  $250 \times 4 \text{ 个视野} \times 10^4 \times 100 = 10^9$  pfu/ml,见图 1。

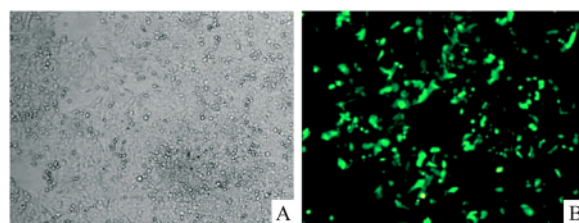


图 1 病毒原液稀释  $10^4$  倍感染 293T 细胞 24 h 后显微镜下观察到的结果  $\times 200$   
A: 明视野下; B: 荧光视野下

**2.3 手术及术后大鼠的一般状况** 大鼠手术均成功,手术过程中无大出血、休克、严重麻醉反应等并发症,术后切口愈合良好,并在正常饮食饲养下生长良好至取材结束。

**2.4 移植两周后血管中 miR-145 的表达水平** 荧光定量 PCR 结果显示,移植两周后表达 miR-145 的慢病毒处理组移植血管中 miR-145 的表达水平仍较高,而慢病毒对照组和未处理组几乎检测不到 miR-145 的表达,见图 2。

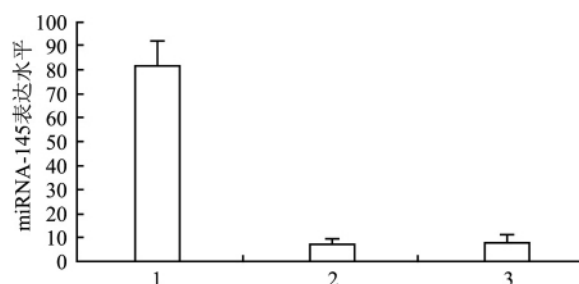


图 2 移植两周后血管中 miR-145 表达水平  
1: 慢病毒处理组; 2: 慢病毒对照组; 3: 未处理组

**2.5 病理组织学检测结果** HE 染色和 Masson 染色可见移植两周后慢病毒对照组和未处理组大鼠移植血管的内膜均明显增厚,显著高于慢病毒处理组,且出现了再狭窄现象,未处理组与慢病毒处理组相比差异有统计学意义 ( $F = 59.53, P < 0.01$ ),见图 3、4。

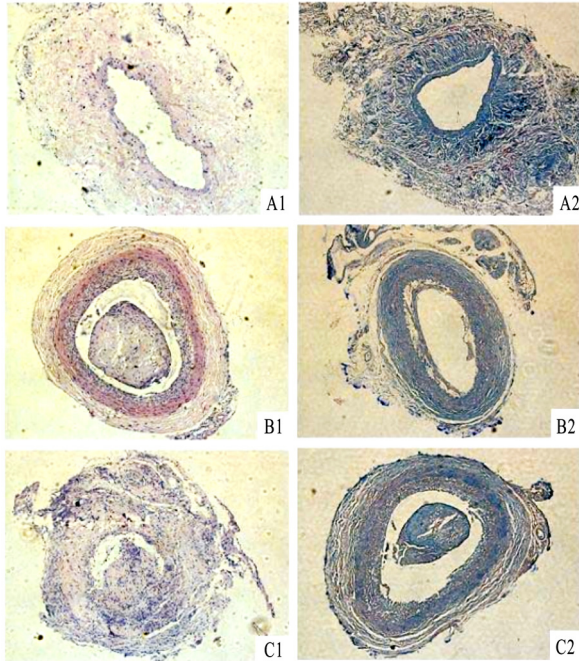


图3 移植两周后 HE 染色和 Masson 染色观察移植血管的内膜厚度变化 ×200

1: HE 染色; 2: Masson 染色; A: 慢病毒处理组; B: 慢病毒对照组; C: 未处理组

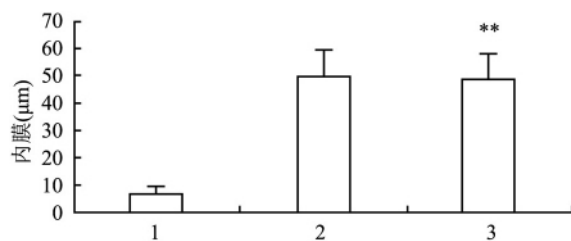


图4 移植 2 周后 3 组大鼠移植血管的内膜厚度比较

1: 慢病毒处理组; 2: 慢病毒对照组; 3: 未处理组; 与慢病毒处理组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.6 移植两周后血管中 MCP-1、PCNA、 $\alpha$ -SMA 及 VEGF 的 mRNA 表达水平** 荧光定量 RT-PCR 检测显示移植 2 周后慢病毒处理组大鼠移植血管中 MCP-1 ( $F = 94.11, P < 0.01$ )、PCNA ( $F = 104.01, P < 0.01$ )、 $\alpha$ -SMA ( $F = 124.36, P < 0.01$ ) 及 VEGF ( $F = 92.13, P < 0.01$ ) mRNA 的表达水平均显著低于

慢病毒对照组和未处理组,而未处理组与慢病毒对照组大鼠血管中这些基因的表达水平相似且处于较高的水平,见图 5。

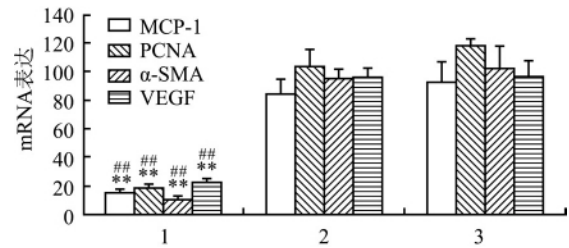


图5 移植两周后血管中 MCP-1、PCNA、 $\alpha$ -SMA 及 VEGF 的 mRNA 表达水平

1: 慢病毒处理组; 2: 慢病毒对照组; 3: 未处理组; 与慢病毒对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与未处理组比较: ##  $P < 0.01$

### 3 讨论

当前 CABG 成为外科治疗冠心病的有效方法,但术后桥血管内膜增生等问题使桥血管再狭窄,影响桥血管的远期通畅率。Umesh et al<sup>[4]</sup> 研究发现 CABG 术后桥血管的 10 年通畅率: 乳内动脉桥 90.3%, 大隐静脉桥只有 60.4%。一些基础研究<sup>[5]</sup> 表明 桥血管内膜增生可以直接造成血管再狭窄,血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的增生和迁移使血管内膜增厚,这是导致桥血管再狭窄的病理学基础。因此,抑制 VSMC 的增殖,对于防治静脉桥再狭窄是非常重要的。近年来基因治疗成为炙手可热的研究方向,可将特异性基因通过载体精确地定位转染至血管壁上的靶基因,调控靶基因的抑制和增值,在局部发挥生物学效应,减少全身不良反应。近几年 miR-145 成为一种新的研究基因,它是一类内源性的长 18~25 个核苷酸的非蛋白编码 RNA 分子,通过促进 mRNA 的降解或抑制翻译来调节基因的表达。在治疗血管疾病中,miR-145 通过调控 VSMC 的表型转化以减少静脉桥的再狭窄,提供了新的治疗策略<sup>[6]</sup>。miR-145 在 VSMC 的表型调控中有着重要的作用。MCP-1 是一种趋化激动剂,可以将血液中的单核细胞迁移至血管内皮下,形成泡沫细胞,对发展成动脉粥样硬化产生重要影响<sup>[7]</sup>。Fina et al<sup>[8]</sup> 研究发现 miR-145 能够降低血浆中的 MCP-1,从而达到抑制 VSMC 的增殖。PCNA 作为各种细胞增殖的指标可敏感反映细胞增殖活性,其表达量可客观反映细胞增殖的数量及分布。王泽慧等<sup>[9]</sup> 在利用 miR-145 慢病毒载体感染大鼠

原代 VSMC 结果显示 miR-145 过表达后可抑制增殖相关基因 PCNA 等的表达。 $\alpha$ -SMA 是 VSMC 的主要细胞成分,皮燕等<sup>[10]</sup>研究发现 miR-145 可抑制 VSMC 中的  $\alpha$ -SMA 进而抑制 VSMC 增殖和迁移的能力。VEGF 作为重要的血管生成因子是早期血管发育过程中必不可少的,而组织缺氧是诱导 VEGF 产生的重要因素,低氧诱导因子可以结合到 VEGF 的启动子区调控 VEGF 的转录<sup>[11]</sup>。Zhang et al<sup>[12]</sup> 研究发现 miR-145 的过表达能抑制低氧诱导因子的活性,从而降低 VEGF 的转录和生成。同时一些研究<sup>[13]</sup> 显示在成熟的 VSMC 中,miR-145 存在最多,并且 miR-145 通过增强 VSMC 中收缩装置的表达能促进血管平滑肌细胞呈收缩状态,从而抑制血管平滑肌细胞的增殖。由此看出可以利用 miR-145 基因治疗桥血管再狭窄是一种可行的方法。

CABG 术后桥血管再狭窄的判定主要是通过内膜厚度和管腔面积等客观指标,因此本实验的病理学检测结果显示 HE 染色和 Masson 染色可见移植两周后慢病毒对照组和未处理组大鼠移植静脉桥血管的内膜均明显增厚,显著高于慢病毒处理组。荧光定量 RT-PCR 检测显示移植两周后慢病毒处理组大鼠移植血管中 MCP-1、PCNA、 $\alpha$ -SMA 及 VEGF 的 mRNA 表达水平均显著低于未处理组与慢病毒对照组,而未处理组与慢病毒对照组大鼠血管中这些基因的表达水平相似,且处于较高的水平,表明 miR-145 可以有效的抑制静脉桥血管内膜的增生。同时本研究存在不足之处:① 基因治疗的时限性和安全性:慢病毒介导的 miR-145 导入靶细胞后是否能长期有效的表达并受生理信号的调控,需进一步研究。② 本研究观察 miR-145 对 MCP-1、PCNA、 $\alpha$ -SMA 及 VEGF 表达的影响,它们之间的分子机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Handa M, Li W, Morioka K, et al. Adventitial delivery of platelet-derived endothelial cell growth factor gene prevented intimal hyperplasia of vein graft [J]. *J Vasc Surg*, 2008, 48(6): 1566 - 74.
- [2] Cheng Y, Liu X, Yang J, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation [J]. *Circ Res*, 2009, 105(2): 158 - 66.
- [3] Zou Y, Dietrich H, Hu Y, et al. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(4): 1301 - 10.
- [4] Umesh N K, Daniel T F, Gosta P, et al. Radial artery bypass grafts have an increased occurrence of angiographically severe stenosis and occlusion compared with left internal mammary arteries and saphenous vein grafts [J]. *Circulation*, 2004, 109(17): 2086 - 91.
- [5] Cable D G, Caccitolo J A, Caplice N, et al. The role of gene therapy for intimal hyperplasia of bypass graft [J]. *Circulation*, 1999, 100(19): 392 - 6.
- [6] Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular disease, inflammation, and angiogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 79(4): 581 - 8.
- [7] 李福生, 王宗立, 许漫, 等. 表达反义单核细胞趋化蛋白 1 的重组逆转录病毒对家兔动脉平滑肌细胞趋化蛋白 1 基因表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7(4): 283 - 7.
- [8] Fina L, Yi P, Adrian Q, et al. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2012, 126(11): 581 - 90.
- [9] 王泽慧, 边云飞, 卫娜, 等. miR-145 对 VSMC 表型转化和增殖的影响及机制探讨 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(5): 424 - 8.
- [10] 皮燕, 张莉莉, 胡子成, 等. miR-145 表达状态对大鼠高血压动脉内膜增生的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(8): 707 - 11.
- [11] Jiang B H, Agani F, Passaniti A, et al. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: Involvement of HIF-1 in tumor progression [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(23): 5328 - 35.
- [12] Zhang H, Pu J, Qi T, et al. MicroRNA-145 inhibits the growth, invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma cells through targeting hypoxia-inducible factor-2alpha [J]. *Oncogene*, 2014, 33(3): 387 - 97.
- [13] Corder K R, Sheehy N T, White M P, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity [J]. *Nature*, 2009, 460(7256): 705 - 10.

## Effect of microRNA-145 on intimal hyperplasia of vein graft in rat model

Ye Yan, Zhang Chengxin, Zhang Shibing, et al

(Dept of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To study the function of miR-145 on intimal hyperplasia in autogenous vein grafts rats.

**Methods** Eighteen male SD rats were divided into three groups: lentivirus treatment group, lentivirus control

group and untreated group. Every group has six rats. Before transplantation, the graft which was from lentivirus treatment group was treated in a solution of miR-145 lentivirus (virus titer was  $1 \times 10^9$  pfu/ml) at 15 min, the graft which was from lentivirus control group was treated in a solution of lentivirus (virus titer was  $1 \times 10^9$  pfu/ml) at 15 min, the untreated group was treated in saline at 15 min. The vein grafts were collected two weeks after transplanted, pathological changes of intimal hyperplasia were detected by HE and Masson staining. The expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), proliferating cell nuclear antigen (PCNA),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in vein graft were detected by fluorogenetic quantitation RT-PCR.

**Results** The thickness of intimal and the degrees of restenosis of lumen in lentivirus treatment group were significantly lower than that in lentivirus control group and untreated group, the expression level of MCP-1, PCNA,  $\alpha$ -SMA and VEGF was also significantly lower than that in the lentivirus control group and untreated group. **Conclusion** miR-145 can effectively inhibit the proliferation hyperplasia of vein graft.

**Key words** microRNA-145; lentivirus; vein grafts; gene therapy

(上接第 912 页)

- [9] Cherfils V J, Platonova S, Gillard M, et al. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance [J]. *Clin Invest*, 2010, 120(4): 1285-97.
- [10] Shechelyakov D V, Logunov D Y, Tikhvatulin A I. Toll-like receptors (TLRs): the role in tumor progression [J]. *Acta Naturae*, 2010, 2(3): 21-9.
- [11] Atsuo O, Christopher S G, Constantinos P Z, et al. Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 4118-29.
- [12] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(5): 886-92.
- [13] Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, et al. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(12): 3100-11.
- [14] 倪琛琛, 于敏, 张志红. EGFR 与 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其意义 [J]. *安徽医科大学学报* 2011, 46(12): 1264-6.
- [15] Geest C R, Coffey P J. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis [J]. *J Leukoc Biol* 2009, 86(2): 237-50.
- [16] Yu L, Chen S. Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(9): 1271-8.

## The regulation of the proliferation on activation of TLR7 in HeLa cells

Li Lei, Cheng Fengwei, Wang Fang et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the expression of Toll like receptor 7 (TLR7) on HeLa cells, and the effect of TLR7 agonist-Gardiquimod on the proliferation of activation of TLR7 in HeLa cells and related probable mechanism.

**Methods** Firstly, using Real-time PCR to analyze the expression of TLR7 on HeLa cells. Then, the cells were treated with different concentration of Gardiquimod for different times. MTS were performed to detect the impact of Gardiquimod on the proliferation of HeLa cells. Using Western blot to analyze the variation of phosphorylation of ERK1/2 and AKT when HeLa cells were treated with Gardiquimod. **Results** The constitutive expression of TLR7 on HeLa cells was weak. The activation of TLR7 by its agonist of Gardiquimod could promote the proliferation of HeLa cells apparently, and existing dose and time dependence. The protein level of phosphorylation of ERK1/2 and AKT enhanced after provoking the TLR7 in HeLa cells. **Conclusion** The TLR7 ligand, Gardiquimod can promote proliferation through excitation protein level of phosphorylation of ERK1/2 and AKT of the signal pathway, MAPK-ERK1/2 and PI3K-AKT *in vitro*.

**Key words** Toll like receptor 7; Gardiquimod; HeLa cells; cell proliferation; signaling pathway