

· 基础研究 ·

## SMOC2 促进低氧诱导的肺血管平滑肌细胞表型转换

朱天帆, 陈峰\*, 黄惠结\*

南京医科大学基础医学院法医学系, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的: 探讨分泌型模块化钙结合蛋白2(secreted modular calcium-binding protein 2, SMOC2)是否参与肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)形成时miR-125a/miR-150介导的肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cell, PASM)表型转换。方法: 收集PH患者和正常对照者的肺组织及其切片, 慢性缺氧诱导小鼠PH模型, SU5416联合慢性缺氧诱导大鼠PH模型, 通过Western blot检测PH患者及PH动物模型肺组织SMOC2的表达水平, 免疫荧光染色检测SMOC2在肺动脉中细胞定位。转染SMOC2 siRNA、添加SMOC2重组蛋白以及转染miR-125a/miR-150模拟物至人源PASM, Western blot检测PASM增殖标志物以及收缩标志物的蛋白表达, 利用EdU掺入实验及划痕实验评估PASM增殖和迁移。双荧光素酶报告基因实验验证SMOC2作为miR-125a/miR-150的靶基因, 并检测miR-125a/miR-150对低氧诱导PASM增殖和迁移的影响。结果: 在PH患者、PH模型小鼠和PH大鼠肺组织, 以及低氧诱导的PASM中SMOC2表达显著升高。敲低SMOC2可显著抑制低氧诱导的PASM增殖与迁移; SMOC2重组蛋白处理则促进PASM增殖与迁移。双荧光素酶报告基因实验证实SMOC2是miR-125a/miR-150的共同靶基因。过表达miR-125a/miR-150后, PASM中SMOC2蛋白水平下降。挽救实验表明, SMOC2重组蛋白可部分逆转miR-125a/miR-150过表达对PASM增殖与迁移的抑制作用。结论: miR-125a/miR-150通过靶向SMOC2调控低氧诱导的PASM表型转换, 为以抑制PASM表型转换为核心的肺动脉重构治疗提供了潜在新靶点。

**[关键词]** 肺动脉高压; 分泌型模块化钙结合蛋白2; 肺动脉平滑肌细胞; 表型转换; miR-125a; miR-150

**[中图分类号]** R544.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2026)06-820-12

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN260249

## SMOC2 drives hypoxia-induced phenotypic switching in pulmonary vascular smooth muscle cells

ZHU Tianfan, CHEN Feng\*, HUANG Huijie\*

*Department of Forensic Medicine, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China*

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether secreted modular calcium-binding protein 2 (SMOC2) participates in miR-125a/miR-150-mediated phenotypic switching of pulmonary artery smooth muscle cell (PASM) in pulmonary hypertension (PH). **Methods:** Human lung tissues and lung sections were collected from pulmonary hypertension (PH) patients and healthy controls. PH animal models were established in mice exposed to chronic hypoxia and in rats treated with SU5416 combined with chronic hypoxia. SMOC2 expression levels in lung tissues from PH patients, mice, and rats were assessed by Western blot, while its cellular localization was determined by immunofluorescence staining. Human PASM were transfected with SMOC2 siRNA and miRNA mimics, or treated with recombinant SMOC2 protein. PASM proliferation and migration were evaluated using EdU incorporation and wound healing assays. Dual-luciferase reporter assays was performed to validate SMOC2 as a direct target of miR-125a/miR-150. **Results:** SMOC2 expression was significantly upregulated in the lung tissues from human and animal PH samples, thus in hypoxic PASM. Inhibition of SMOC2 attenuated proliferation, migration, and phenotype switching in PASM, whereas treatment with recombinant SMOC2 protein promoted PASM proliferation and migration. miR-125a and miR-150 recognized and inhibited SMOC2 mRNA translation in PASM. miR-125a and miR-150 mimics inhibited hypoxia-induced proliferation and phenotype switch of PASM. **Conclusion:** miR-125a/miR-150 regulate hypoxia-induced PASM phenotypic switching by directly targeting SMOC2, providing a potential therapeutic target for PH treatment.

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82500069); 江苏省自然科学基金(BK20161034)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fchen@njmu.edu.cn(ORCID: 0000-0003-3508-8834); huijieh@njmu.edu.cn(ORCID: 0000-0002-4534-9260)

[Key words] pulmonary hypertension; secreted modular calcium-binding protein 2; pulmonary artery smooth muscle cell; phenotype switching; miRNA-125a; miRNA-150

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(06): 820-831]

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种以进行性肺血管重构和持续肺动脉压力升高为特征的致命性临床综合征,可导致患者右心室肥厚、衰竭乃至死亡,临床预后极差<sup>[1]</sup>。目前,PH的确切发病机制尚未完全阐明,且缺乏有效的早期诊断生物标志物及根治性治疗手段<sup>[2]</sup>。研究表明,PH的核心病理改变是肺血管的结构与功能重塑,这一过程涉及内皮细胞功能障碍,肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cell, PASM)异常增殖与迁移,以及血管周围慢性炎症微环境形成等多种复杂因素<sup>[3-4]</sup>。其中,PASM由正常的收缩表型向增殖/迁移合成表型转化即“表型转换”,是驱动肺血管壁增厚、管腔狭窄的关键细胞生物学事件<sup>[5]</sup>。尽管已知多种细胞因子、生长因子信号通路、氧化应激及代谢重编程参与其中<sup>[6]</sup>,但调控PASM表型转换的精确分子网络,尤其是其上游“开关”分子,仍是亟待探索的前沿领域。

细胞外基质与细胞相互作用的复杂调控网络中,分泌型酸性富含半胱氨酸蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)家族成员扮演着重要作用。分泌型模块化钙结合蛋白2(secreted modular calcium-binding protein 2, SMOC2)作为该家族一员,是重要的细胞基质蛋白,通过与细胞表面受体、生长因子及蛋白酶等生物活性效应分子相互作用,广泛调节细胞-基质交互及细胞功能<sup>[7]</sup>。既往研究提示,SMOC2参与血管损伤修复、新生内膜形成及心肌缺血再灌注损伤<sup>[8-9]</sup>,同时SMOC2低表达与肺功能降低显著相关<sup>[10]</sup>,SMOC2促进内皮细胞增殖,进而发挥促进血管生成的作用<sup>[11]</sup>。以上研究均提示SMOC2在血管疾病和肺功能调控中发挥重要作用。然而,SMOC2在PH发生发展中的具体功能及其是否参与调控PASM的表型转换尚不清楚。

近年来研究显示微小核糖核酸(miRNA, miRNA)作为基因转录后调控的关键介质,是PH血管重构的重要调控分子<sup>[12-13]</sup>。miRNA是一类长22~24个核苷酸的内源性非编码RNA,主要通过结合靶基因mRNA的3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR),诱导其降解或翻译抑制,从而精细调控基因表达。多项研究已证实,包括miR-17-92

簇、miR-143/145、miR-204、miR-21及miR-130/301在内的多个miRNA,通过调控PH相关信号通路参与PH发生发展<sup>[14]</sup>。值得注意的是,早期基于血浆的微阵列分析发现,miR-150在PH患者血浆中表达显著降低,且其低表达与患者不良生存率密切相关<sup>[15-16]</sup>;miR-125a在低氧诱导的PH模型中也呈现下调趋势,并可能通过靶向增殖相关信号通路参与PH发生发展<sup>[17]</sup>。然而,这两种miRNA在PASM表型转换调控中的具体分子机制,尤其是其下游直接作用靶点及功能轴,尚未完全阐明。

本研究综合小鼠、大鼠PH模型,PH患者以及体外细胞模型,通过分子生物学、细胞功能学及报告基因等技术,深入探究SMOC2在PASM表型转换中的作用,并验证其是否受miR-125a与miR-150的转录后调控,从而构成一个新型的“miRNA-SMOC2”调控轴,揭示PH血管重构中PASM表型转换调控新机制,为开发基于该调控轴的早期诊断标志物及靶向治疗策略提供重要的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究所用样本包括5例健康供体和5例特发性肺动脉高压(idiopathic pulmonary hypertension, IPAH)患者的肺组织及切片,均来自无锡市人民医院肺移植中心。5例IPAH患者中,男2例,女3例,年龄19~37岁,均通过右心导管检查确诊为PH,肺动脉收缩压 $\geq 80$  mmHg。5例正常对照组为肺移植不适用的器官捐献者,男3例,女2例,年龄48~58岁。本研究方案已通过南京医科大学伦理委员会的审查(伦理号:2019-452)。

雄性C57BL/6小鼠(6~8周龄)及雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(8~10周龄,200~250 g)均购自南京医科大学实验动物中心,饲养于SPF级屏障环境中,保持标准12 h光暗循环,室内温湿度恒定可控,并可自由获取经高压灭菌处理的饲料与饮用水。所有动物实验操作均严格遵循实验动物护理与使用指南进行,并通过南京医科大学动物伦理委员会的审查(批准号:IACUC-2109019)。

HEK293T细胞系(ATCC公司,美国),人肺动

脉血管平滑肌细胞(human pulmonary artery smooth muscle cell, HPASMC)(Lonza公司,美国);血管内皮生长因子受体抑制剂SU5416、I型胶原酶、III型弹性蛋白酶(Sigma公司,美国);DMEM培养基、Lipofectamine™ 3000、Lipofectamine™ RNAiMAX(Invitrogen公司,美国);SmGM-2 BulletKit培养基(Lonza公司,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国);人SMOC2重组蛋白(R&D Systems公司,美国);EdU细胞增殖检测试剂盒、SMOC2双链小干扰RNA(siS1和siS2)、miR-125a和miR-150模拟物(miR-125a mimic和miR-150 mimic)(广州锐博公司);pGL3-Promoter载体、荧光素酶报告基因检测系统(Promega公司,美国);TRIzol试剂(Takara公司,日本);SMOC2抗体(Santa Cruz公司,美国); $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体、钙调蛋白-1(Calponin1)抗体、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体、微管蛋白(Tubulin)抗体(CST公司,美国); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(bioworlde公司,美国);山羊抗兔IgG二抗、山羊抗小鼠IgG二抗(巴傲得公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 慢性缺氧诱导PH小鼠模型

将8周龄雄性C57BL/6小鼠置于常压低氧舱中持续饲养4周,舱内氧浓度维持在10%。同期设置匹配的对照组,在常氧条件下(21%O<sub>2</sub>)饲养相同时长。低氧混合气体以约1 L/min的流速持续通入舱内,全程监测舱内温湿度。实验结束时,对小鼠实施安乐死并采集组织样本。

### 1.2.2 SU5416联合低氧诱导PH大鼠模型

Su/Hx大鼠模型采用药物抑制联合慢性低氧的方法构建。雄性SD大鼠单次皮下注射血管内皮生长因子受体抑制剂SU5416(20 mg/kg)后,随即置于低氧舱(10% O<sub>2</sub>)中持续暴露3周,以启动肺血管重构过程。随后,将大鼠移回常氧环境继续饲养3周,以促进严重且不可逆的PH病变成形。对照组大鼠则在整个6周实验期间,于常氧条件下饲养,并接受等体积溶剂注射。实验结束时,对大鼠实施安乐死并采集组织样本。

### 1.2.3 Western blot分析

使用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA裂解液,低温裂解、提取培养的细胞或肺组织样品中的蛋白质,裂解产物经4℃、12 000 g离心15 min,取上清,并使用BCA法定量上清液中的蛋白质浓度,调整蛋白终浓度为2 mg/mL,加入6×SDS上样缓冲液,

高温变性。使用7.5%~12.5%梯度范围的SDS-PAGE电泳分离约30  $\mu$ g蛋白质,随后转移至NC膜或甲醇活化的0.45  $\mu$ m PVDF膜上。转膜结束后,置于含5%脱脂牛奶的TBST(含0.1%Tween 20的Tris缓冲液,pH 7.4)中室温封闭1 h。在4℃下,将膜与相应的一抗孵育过夜。次日,使用TBST洗涤3次,每次10 min。在室温下,孵育相应种属的二抗溶液1 h。TBST洗涤3次,每次10 min,随后基于HRP的化学发光法检测免疫印迹。

### 1.2.4 免疫荧光染色分析

将组织切片置于10 mmol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中,于98℃加热10 min进行抗原修复。待切片自然冷却至室温后,使用含0.3% TritonX-100的PBS穿透10 min, PBS洗涤3次,每次5 min,然后用3%牛血清白蛋白封闭液室温封闭1 h,以阻断非特异性结合位点。随后,切片在4℃条件下与用封闭液稀释的种属特异性一抗过夜孵育。一抗孵育结束后,用含0.05% Tween 20的PBS溶液洗涤切片3次,随后在室温避光条件下与Alexa Fluor标记的二抗孵育2 h,弃二抗,使用PBS洗涤3次,每次10 min。细胞核采用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)进行复染,并用奥林巴斯显微镜采集荧光图像。实验全程设置了严格的阴性对照,包括未加一抗的空白对照及同型抗体对照。

### 1.2.5 细胞分离、培养和转染

小鼠、大鼠PASC的分离与培养:取6~8周龄的大、小鼠经异氟醚麻醉后,颈椎脱位实施安乐死。全身用75%乙醇消毒。随后于无菌条件下逐层剪开皮肤,暴露胸腔,完整地分离心肺组织,置于预冷的无菌PBS中。使用显微镊向远端分离肺动脉并去除血管外膜,随后将肺动脉切成小块,使用1 mg/mL I型胶原酶和0.125 mg/mL III型弹性蛋白酶消化30 min,经45  $\mu$ m细胞筛过滤,500 g离心5 min,弃上清。使用含20%胎牛血清的DMEM培养基重悬细胞,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,3 d后换液。等细胞长满传代后更换为含10%胎牛血清的DMEM培养基,持续至第3次传代,进行后续实验。体外低氧诱导实验中,将已接种PASC的培养皿置于含有3% O<sub>2</sub>及5% CO<sub>2</sub>的密闭培养箱内进行处理。

人PASC细胞培养于含5%胎牛血清、生长因子及抗生素的SmGM-2 BulletKit培养基。常氧实验条件下,细胞置于37℃恒温、持续供应空气(21% O<sub>2</sub>)及5% CO<sub>2</sub>的湿润培养箱中培养。体外低氧诱导

实验中,将已接种PASC MC的培养皿置于含有3% O<sub>2</sub>及5% CO<sub>2</sub>的密闭培养箱内进行处理。HEK293T细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基。本研究使用Lipofectamine™ 3000与Lipofectamine™ RNAiMAX进行转染,操作严格遵循产品说明书进行。

### 1.2.6 PASC MC增殖实验

细胞增殖检测:采用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)掺入法,使用EdU细胞增殖检测试剂盒(RiboBio)测定。将2×10<sup>4</sup>个PASC MC接种于24孔板中,利用RNAiMax转染SMOC2 siRNA(SiS1、SiS2)或者miR-125a、miR-150模拟物(miR-125a mimic和miR-150 mimic)36 h,随后进行血清饥饿过夜处理,再置于21%或者3% O<sub>2</sub>条件下继续培养24 h,更换培养基,加入含50 μmol/L EdU的新鲜培养基。孵育4 h后,PBS洗涤细胞2次,并用4%(W/V)多聚甲醛/PBS固定,后续步骤按试剂说明书进行。通过荧光显微镜拍摄图片,Image J软件计算EdU阳性细胞百分比。

### 1.2.7 PASC MC迁移实验

采用划痕愈合实验评估PASC MC的迁移能力。将PASC MC培养于6孔板中,通过RNAiMax转染SMOC2 siRNA(siS1、siS2)或者miR-125a、miR-150模拟物(miR-125a mimic和miR-150 mimic)36 h,随后进行血清饥饿处理过夜。使用移液器吸头在单

层细胞上制造划痕,并于初始时刻拍摄图像记录。随后将细胞置于21%或者3% O<sub>2</sub>条件下继续培养24 h,再次拍摄图像以量化细胞迁移率。

### 1.2.8 双荧光素酶报告基因检测

将含有miR-125a与miR-150潜在结合位点的SMOC2 cDNA 3'UTR片段及其种子序列突变体分别克隆至pGL3-Promoter载体的荧光素酶基因下游(报告基因质粒均由金斯瑞公司构建),构建的重组荧光素酶报告质粒分别命名为SMOC2-WT与SMOC2-mut。使用Lipofectamine 3000将上述报告质粒与miR-125a、miR-150 mimic或其对照共转染至HEK293T细胞。转染48 h后,采用双荧光素酶报告基因检测系统检测萤火虫荧光素酶活性,并以海肾荧光素酶活性作为内参进行标准化处理。

### 1.2.9 实时荧光定量PCR分析

采用TRIzol试剂提取细胞或组织中的总RNA,随后使用NanoDrop分光光度计测定RNA浓度与纯度。取1 μg总RNA,按照逆转录试剂盒说明书将其逆转录为cDNA。实时荧光定量PCR反应使用SYBR Green预混液,在CFX Connect实时荧光定量PCR检测系统上进行。每个样本均设置3个复孔。目标基因的相对mRNA表达水平采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法进行计算,并以内参基因进行标准化。引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

Gene	Primer sequence(5'→3')
miR-125a	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCACAGGT
	Forward:TCCCTGAGACCCCTTTAAC
	Reverse:GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-150	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCACTGGT
	Forward:TCTCCCAACCCCTTGTACCA
	Reverse:GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAATATGG
	Forward:ATTGGAACGATACAGA
	Reverse:GTGCAGGGTCCGAGGT

### 1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism 8.0软件进行图表绘制与统计分析。所有数据均以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,实验至少独立重复3次。使用Shapiro-Wilk检验评估数据的正态性,并且通过Brown-Forsythe检验评估组方差的同质性。对于方差相等的两组之间的比较,使用Student's *t*检验,而Welch校正应用于涉及方差不等的两组的分析。两组间比较采用*t*检验,多

组间比较采用单因素方差分析,并用Tukey's检验进行组间差异比较。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SMOC2在PH肺组织中高表达且富集于PASC MC

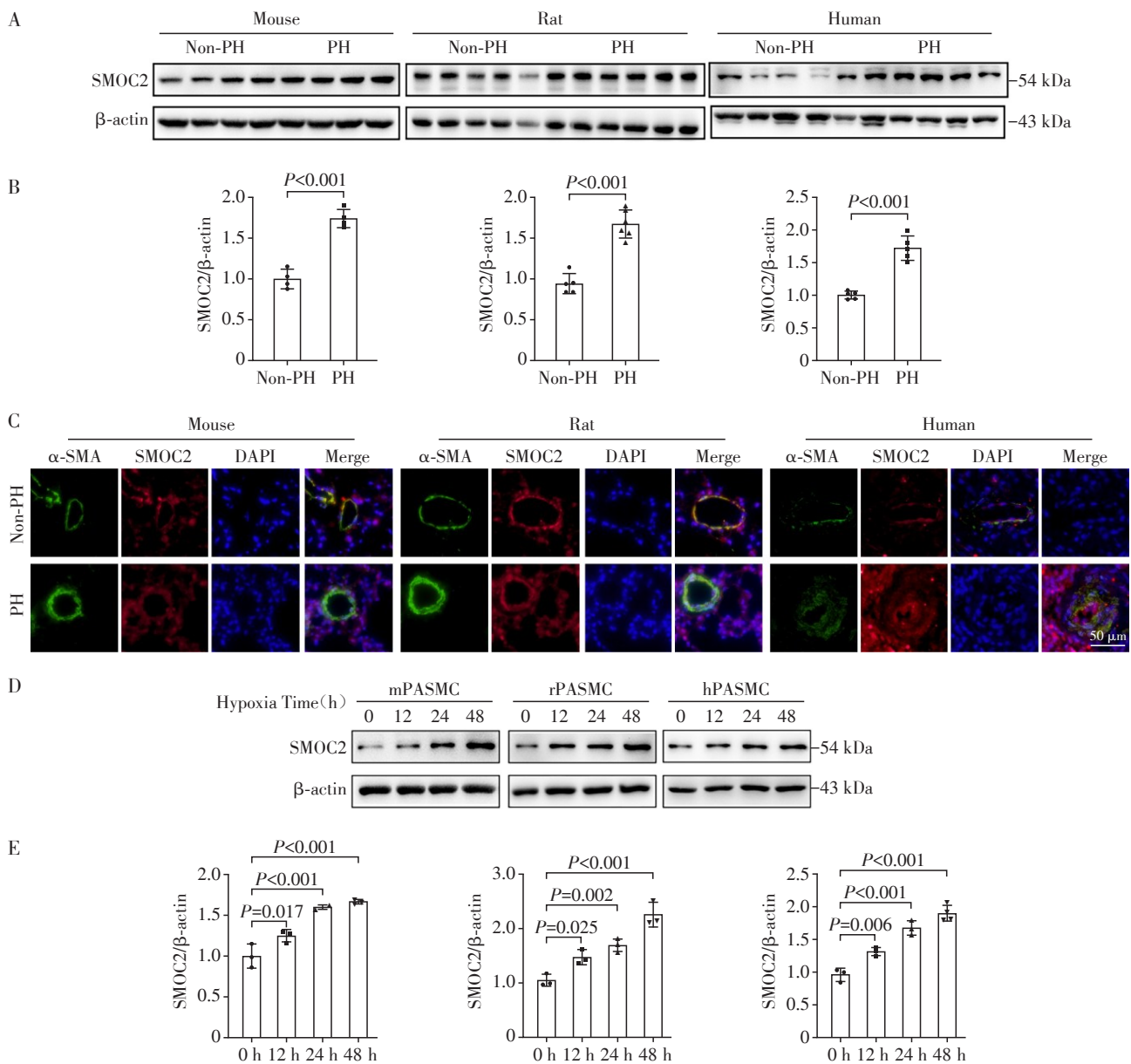
与对照组相比,慢性缺氧诱导的PH小鼠、SU5416联合低氧诱导的PH大鼠以及PH患者肺组织中,SMOC2蛋白表达均显著升高(图1A、B)。免

疫荧光实验进一步证实,啮齿类PH模型以及PH患者的肺小动脉中SMOC2表达增强且与PASMCM标志蛋白 $\alpha$ -SMA共定位(图1C)。此外,低氧处理的PASMCM中SMOC2蛋白表达量呈时间依赖性上升(图1D、E)。

### 2.2 SMOC2敲低抑制低氧诱导PASMCM的增殖、迁移及表型转换

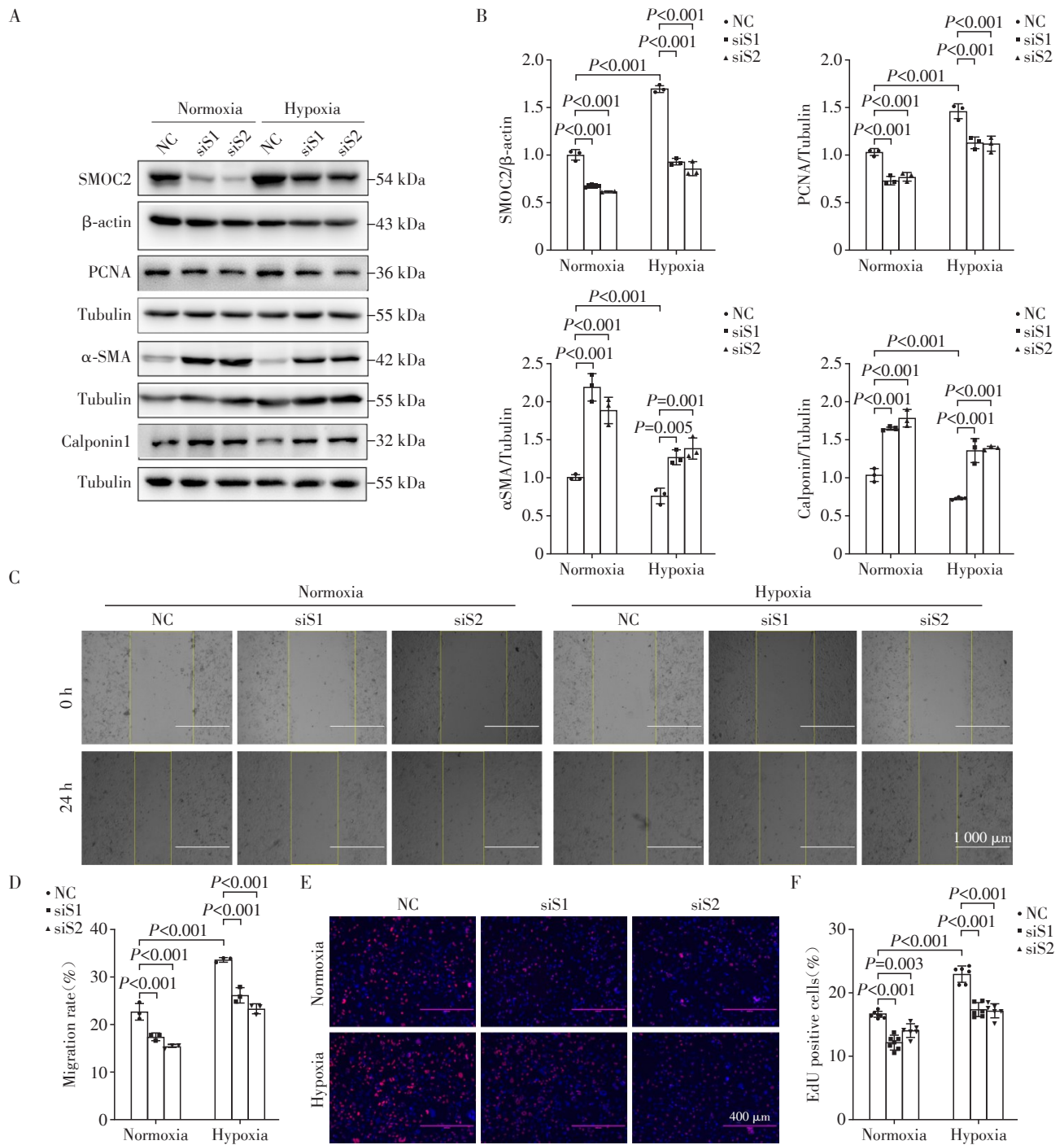
为了进一步研究SMOC2的生物学功能,通过

转染siRNA敲低PASMCM中的SMOC2表达,Western blot结果显示无论是常氧还是低氧条件,siRNA都能下调SMOC2表达;SMOC2低表达升高PASMCM收缩标志物 $\alpha$ -SMA和Calponin1的表达水平,同时降低增殖标志物PCNA的表达水平(图2A、B)。划痕实验和EdU实验结果显示:敲低SMOC2表达能显著抑制PASMCM的细胞迁移(图2C、D)与增殖(图2E、F)。



A, B: Representative immunoblots and relative densitometric analysis of SMOC2 protein expression levels in lung tissues (mouse: Non-PH,  $n=4$ ; PH,  $n=4$ ; rat: Non-PH,  $n=5$ ; PH,  $n=6$ ; human: Non-PH,  $n=5$ ; PH,  $n=5$ ). C: Representative immunofluorescence of SMOC2 (red) and  $\alpha$ -SMA (green) in pulmonary arteries of mouse, rat and human. Nuclei were counterstained with DAPI (blue), scale bars=50  $\mu$ m. D, E: Representative immunoblots and relative densitometric analysis of SMOC2 protein expression levels in PASMCM exposed to hypoxia (3%  $O_2$ ) for the indicated times, normalized to  $\beta$ -actin ( $n=3$ ).

图1 SMOC2在肺动脉高压肺组织中高表达并定位于PASMCM  
Figure 1 SMOC2 was highly expressed in PH and localized in PASMCMs



A, B: Representative immunoblots (A) and densitometric analysis (B) of SMOC2, Calponin1,  $\alpha$ -SMA and PCNA protein levels, normalized to  $\beta$ -actin or Tubulin ( $n=3$ ). C: Representative images of the wound-healing assays showing migration of PASCs. Scale bar=1 000  $\mu$ m. D: Quantification of the relative wound closure area. E: Representative fluorescence microscopic images showing EdU-positive cells (red) with nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bar=400  $\mu$ m. F: Quantitative analysis of EdU incorporation into PASC. At least 5 randomly chosen fields were evaluated. For all experiments, PASCs were transfected with SMOC2 siRNA by RNAiMax for 48 h before exposed to normoxia or hypoxia for 24 h, siS1: SMOC2-siRNA-1; siS2: SMOC2-siRNA-2, NC: negative control.

图2 敲低SMOC2抑制PASC迁移和增殖

Figure 2 Knockdown of SMOC2 inhibited hypoxia-induced proliferation and migration of PASC

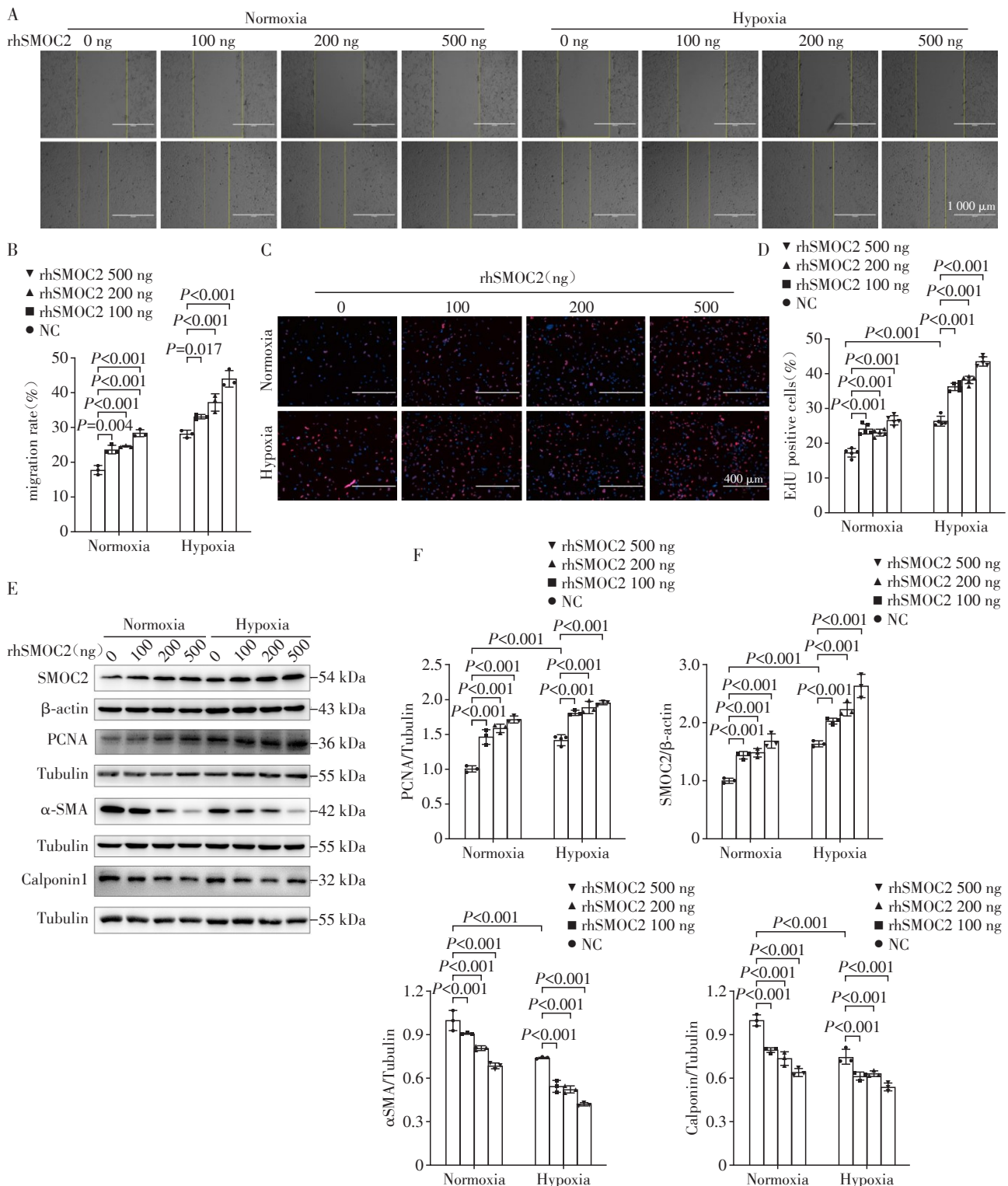
### 2.3 SMOC2重组蛋白促进PASC的增殖、迁移及表型转换

为了进一步验证SMOC2调控PASC表型转换,

利用人源SMOC2重组蛋白处理PASC。划痕实验(图3A、B)和EdU实验(图3C、D)的结果显示,SMOC2重组蛋白可显著促进PASC迁移和增殖。Western

blot 分析显示, PSMC 中增殖标志物 PCNA 蛋白表达增加, 收缩表型标志物表达减少(图 3E、F)。以上

的实验结果显示, SMOC2 是 PSMC 由静息收缩表型向缺氧刺激合成表型转换的关键正性调节因子。



A, B: Representative images(A) and quantification(B) of wound-healing assays in PSMCs. Scale bar=1 000 μm. C, D: Representative images(C) and quantification(D) of EdU(red) staining in PSMCs treat with or without recombinant human SMOC2(rhSMOC2), followed by hypoxia or normoxia exposure. Scale bar=400 μm. E, F: Representative immunoblots(E) and relative densitometric analysis(F) of SMOC2, PCNA, Calponin1, and α-SMA protein expression levels in PSMCs(n=3). For all experiments, PSMCs were treated with rhSMOC2 for 24 h before exposed to normoxia or hypoxia for 24 h.

图3 SMOC2重组蛋白促进PSMC迁移和增殖

Figure 3 Recombinant SMOC2 protein promoted hypoxia-induced proliferation and migration of PSMCs

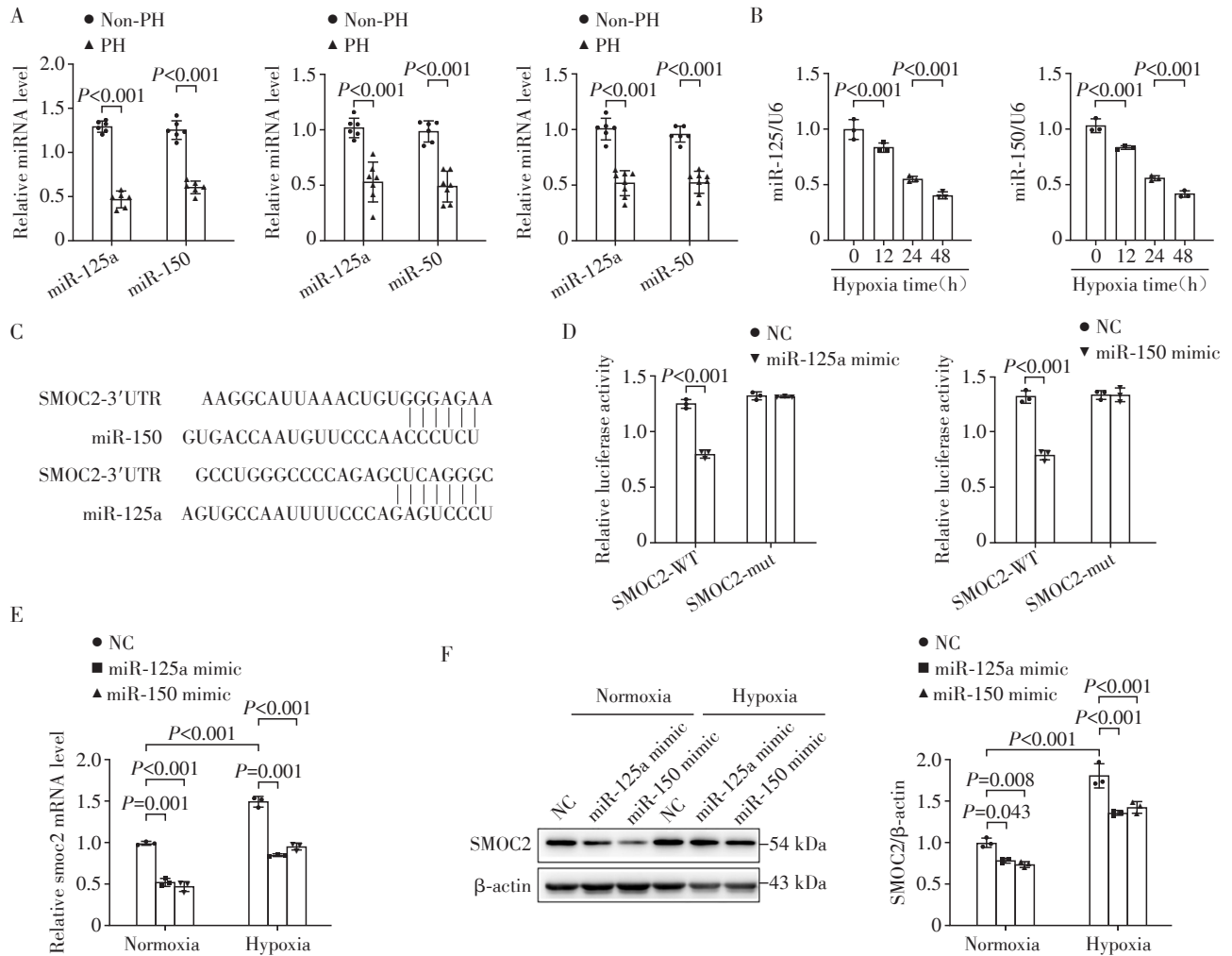
#### 2.4 miR-125a 与 miR-150 在 PH 中表达下调并抑制 SMOC2 表达

利用 miRNA 靶基因预测网站 (TargetScan、miRanda、miRDB) 对调控 SMOC2 的 miRNA 进行预测。预测存在结合的 miRNA 中, 重点关注了 miR-125a 与 miR-150 这两种已被报道在 PH 中低表达并发挥重要作用 miRNA。qRT-PCR 分析显示, 在 PH 动物模型和患者肺组织中, miR-125a 与 miR-150 表达均较正常肺组织显著降低 (图 4A)。PASC 经低氧处理后, 这两种 miRNA 的表达也显著下调 (图 4B)。TargetScan 预测结果显示, SMOC2 的 3'-UTR 存在 miR-125a 与 miR-150 结合

位点 (图 4C)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-125a 与 miR-150 mimics 可显著降低 SMOC2 3'UTR 野生型质粒的荧光素酶活性, 而对突变型活性几乎无影响 (图 4D)。此外, 在 PASC 中过表达这两个 miRNA 显著抑制 SMOC2 的 mRNA 和蛋白表达 (图 4E、F)。这些结果表明, miR-125a 和 miR-150 通过靶向 SMOC2 发挥其重要生物学功能。

#### 2.5 miR-125a 与 miR-150 抑制低氧诱导 PASC 迁移和增殖

在 PASC 中转染 miRNA 模拟物过表达 miR-125a 或 miR-150, 划痕实验和 EdU 实验检测 PASC

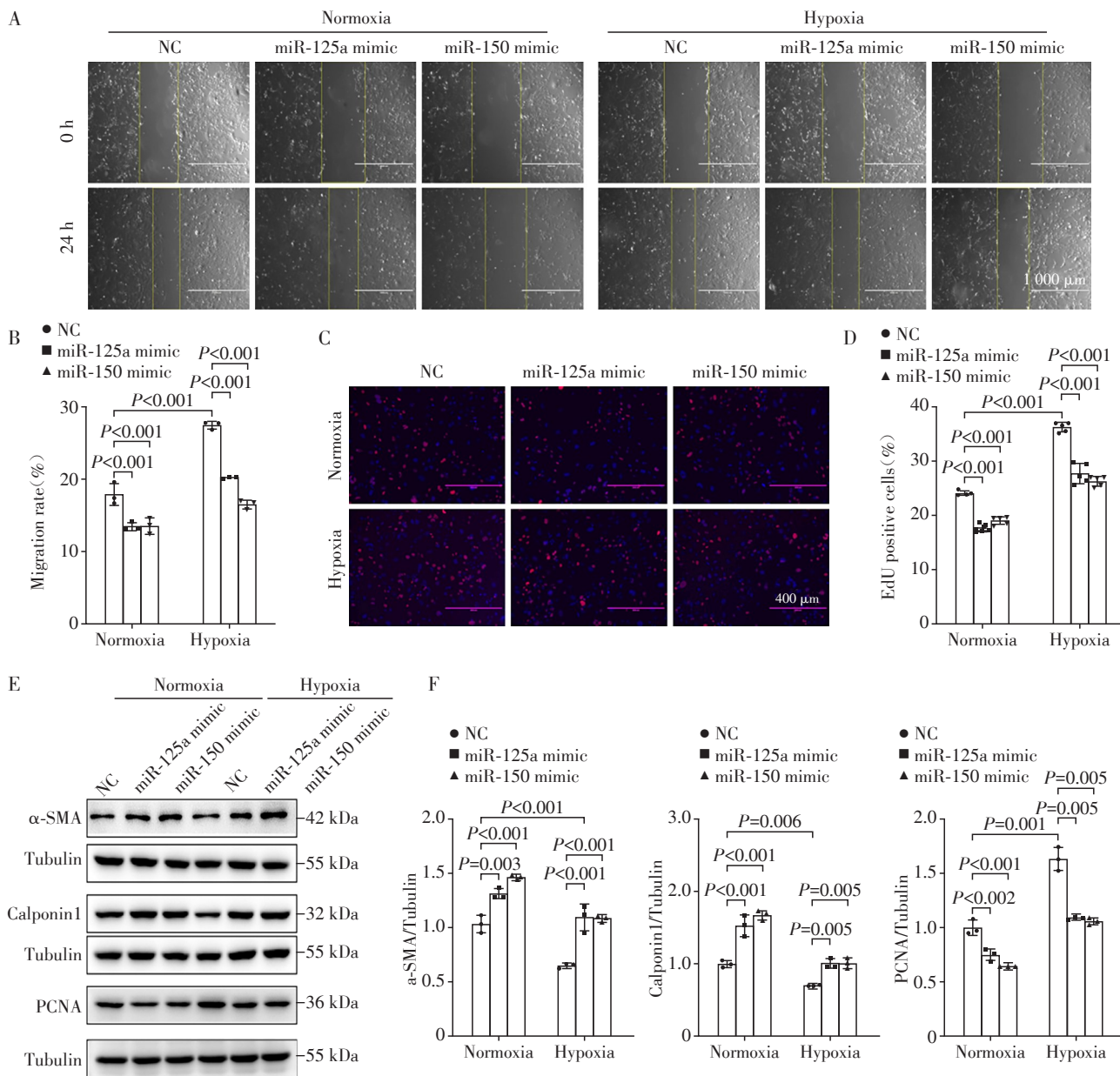


A: qRT-PCR analysis of miR-125a and miR-150 expression in lung tissues from mouse, rat PH models, as well as human PH samples, normalized to U6. B: qRT-PCR analysis of miR-125a and miR-150 expression in PASC exposed to hypoxia. C: Schematic representation of the predicted binding sites for miR-125a and miR-150 within the 3'-UTR of SMOC2, as identified by TargetScan. D: Luciferase reporter assay in HEK293T cells co-transfected with miR-125a or miR-150 mimics (or negative control, NC) and luciferase reporter constructs containing either the SMOC2-WT or mut 3'-UTR ( $n=3$ ). E, F: mRNA (E) and protein (F) expression levels of SMOC2 in PASCs transfected with miR-125a, miR-150 mimic or NC under normoxia or hypoxia conditions ( $n=3$ ).

图4 miR-125a 和 miR-150 调控 SMOC2 表达  
Figure 4 miR-125a and miR-150 regulated SMOC2 expression

功能。结果显示,miR-125a 或 miR-150 过表达可显著抑制 PASC 迁移和增殖(图 5A~D)。Western blot 实验分析显示,过表达 miR-125a 或 miR-150 抑制低

氧诱导的 PASC 增殖标志物 PCNA 蛋白,促进 PASC 收缩表型标志物  $\alpha$ -SMA、Calponin1 表达(图 5E、F)。



A, B: Representative images (A) and quantification (B) of wound-healing assay in PASC transfected with miR-125a, miR-150 mimic, or negative control (NC), followed by exposure to normoxia or hypoxia for 24 h. Scale bar=1 000  $\mu$ m. C, D: Representative images (C) and quantification (D) of EdU (red) staining in PASC transfected with miR-125a, miR-150 mimic or NC, followed by hypoxia or normoxia exposure. Scale bar=400  $\mu$ m. E, F: Representative immunoblots (E) and relative densitometric analysis (F) of  $\alpha$ -SMA, Calponin1, and PCNA protein levels in PASC ( $n=3$ ).

图5 miR-125a和miR-150抑制PASC迁移和增殖

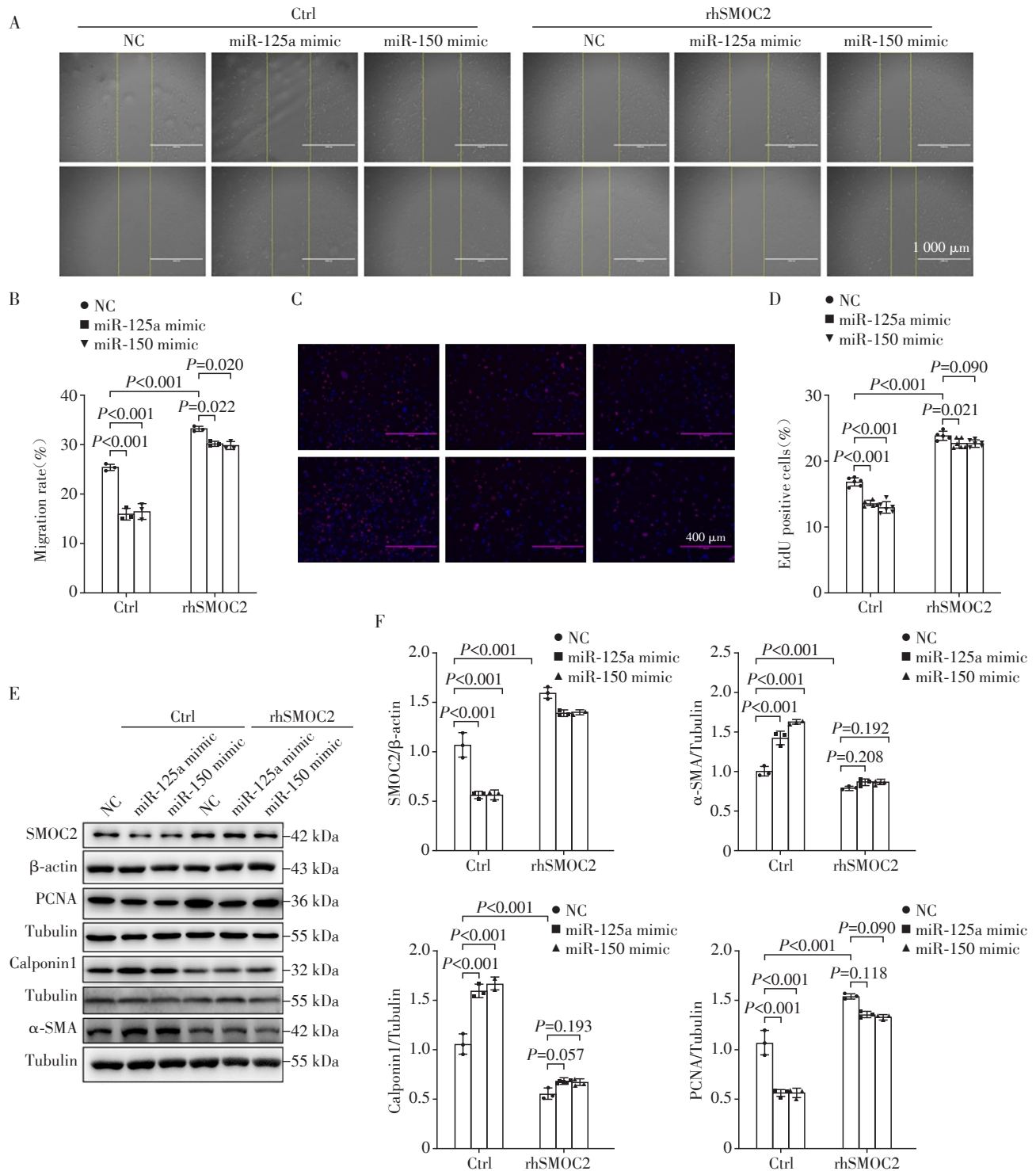
Figure 5 miR-125a and miR-150 suppressed the migration and proliferation of PASC

### 2.6 miR-125a 与 miR-150 调控 SMOC2 抑制 PASC 迁移和增殖

为进一步阐明 miR-125a 和 miR-150 抑制 PASC 表型转换依赖 SMOC2, 利用 SMOC2 重组蛋白处理 PASC, 检测其表型转换的情况。划痕实验

(图 6A、B) 以及 EdU 实验(图 6C、D) 结果显示, SMOC2 重组蛋白可部分逆转 miR-125a 与 miR-150 对 PASC 迁移和增殖的抑制作用。进一步 Western blot 实验分析显示, SMOC2 重组蛋白部分逆转 miR-125a 和 miR-150 过表达介导的 PASC 增殖标志物

PCNA 蛋白下调以及收缩表型标志物  $\alpha$ -SMA、Calponin1 蛋白升高(图 6E、F)。以上的结果证实 miR-125a 和 miR-150 通过抑制 SMOC2 表达参与 PASMCM 迁移和增殖调控。



A, B: Rescue of miR-125a- and miR-150-overexpression-induced suppression of PASC migration by recombinant human SMOC2(rhSMOC2) treatment, assessed by wound-healing assay( $n=3$ ). Scale bar=1 000  $\mu$ m. C, D: Rescue of miR-125a- and miR-150-overexpression-induced inhibition of PASC proliferation by rhSMOC2 treatment, assessed by EdU assays. Scale bar=400  $\mu$ m. E, F: Rescue of miR-125a- and miR-150-overexpression-induced downregulation of PCNA and upregulation of Calponin1 and  $\alpha$ -SMA in PASC by rhSMOC2 treatment( $n=3$ ).

图6 SMOC2重组蛋白缓解miR-125a和miR-150抑制PASC迁移和增殖

Figure 6 Recombinant SMOC2 protein alleviated the inhibitory effects of miR-125a and miR-150 on PASCs migration and proliferation

### 3 讨论

本研究揭示了SMOC2在PH病理因素缺氧刺激下PASM C表型转换中的关键作用,并阐明了其受miR-125a与miR-150转录后调控的分子机制。研究不仅证实了SMOC2在PH患者及动物模型肺组织中异常高表达,更深入地论证了SMOC2促进了肺动脉平滑肌细胞的表型转换。在分子机制层面,明确了SMOC2作为miR-125a与miR-150的直接靶基因参与PASM C表型转换的调控,梳理出一条“miRNA-SMOC2-PASM C表型转换”的清晰信号轴,为理解肺动脉高压时PASM C异常增殖的复杂病理机制提供了新的理论框架以及潜在治疗靶点。

SMOC2作为SPARC家族重要成员,既往研究已提示其在血管损伤修复、内皮细胞功能紊乱及肺功能调控中扮演重要角色<sup>[18-19]</sup>。本研究将其功能拓展至表型转换领域。研究发现在小鼠/大鼠PH模型、PH患者肺组织以及低氧刺激的PASM C中,均显示SMOC2蛋白表达显著上调。免疫荧光染色进一步显示,SMOC2特异性富集于重构肺动脉的中膜层,并与平滑肌细胞标志蛋白 $\alpha$ -SMA共定位,提示其在PASM C功能调控中发挥重要作用。功能获得与缺失实验互为印证:外源性SMOC2重组蛋白上调PASM C增殖标志物PCNA,下调收缩标志物 $\alpha$ -SMA和Calponin1,并促进细胞迁移和增殖;反之,利用siRNA敲低PASM C中SMOC2表达则产生完全相反的表型。这些实验结果提示,SMOC2是PASM C由收缩表型向合成表型转换的关键正性调节因子。

研究表明,SMOC2通过与整合素结合并磷酸化ILK,持续活化Akt促使Smad3磷酸化,进而激活下游的ERK和MAPK,促进细胞的增殖与迁移<sup>[20]</sup>。SMOC2通过其整合素结合域(特别是通过RGD基序或类似位点)与整合素相互作用,促进TGF- $\beta$ 1活化,参与心肌细胞的纤维化过程<sup>[21]</sup>。ILK和TGF- $\beta$ 1被证实是调控PASM C表型转换的关键因子。PH患者PASM C分泌的纤连蛋白通过整合素信号激活ILK,活化的ILK抑制LATS1,形成Yap-纤连蛋白-ILK-LATS1正反馈环路,促进PASM C的增殖和凋亡抵抗<sup>[22]</sup>;TGF- $\beta$ 1通过Smad2/3通路促进PASM C的增殖、迁移以及向合成表型的转换<sup>[23]</sup>。因此,SMOC2可能通过ILK或者TGF- $\beta$ 1信号通路,作为“内源性增殖增强子”调控PASM C表型转换。

越来越多的证据表明,miRNA的失调是PH中PASM C表型转换的重要驱动力<sup>[12]</sup>。本研究聚焦于

两个在PH血浆或组织中表达显著降低的miRNA:miR-150和miR-125a,证实在PH大鼠/小鼠、PH患者的肺组织以及缺氧诱导PASM C中,两者表达均显著降低。功能上,过表达miR-125a和miR-150能够有效抑制PASM C的增殖和迁移,促进其向收缩型转换,这些实验结果验证了miR-125a、miR-150作为PASM C增殖“刹车”分子的功能。

研究同时通过一系列分子生物学实验证实SMOC2是miR-125a与miR-150的共同靶基因。两者通过结合SMOC2 mRNA的3'-UTR,负调控其蛋白表达。当缺氧刺激时miR-125a、miR-150表达缺失,其对SMOC2的抑制作用解除SMOC2蛋白升高,进而驱动PASM C的增殖、迁移与表型转换。这些实验结果阐释了miR-125a、miR-150作为PASM C增殖“刹车”分子的机制。

研究阐述的“miR-125a/miR-150-SMOC2-PASM C表型转换”调控轴,具有临床转化潜力。首先,SMOC2可作为PASM C异常增殖的潜在生物标志物。其次,该轴提供了多层次的潜在干预靶点:恢复miR-125a/miR-150的表达或直接抑制SMOC2,理论上均可阻断这一致病通路,从而抑制PASM C的表型转换。尤其是在当前PH治疗手段主要集中于血管舒张、而对逆转重构疗效有限的背景下,针对PASM C表型转换的疗法代表了极具前景的新方向。

本研究仍存在一些不足:SMOC2促进PASM C增殖的具体下游信号通路仍不清楚。是否可通过其调控的经典信号通路,如整合素连接激酶ILK等发挥作用,仍有待深入探索;虽有研究显示血浆中SMOC2可作为临床诊断指标,SMOC2的表达水平可提示心衰严重程度以及再住院率;SMOC2血浆浓度也可作为阿尔茨海默病严重程度的提示,但是由于本课题PH患者样本数量较少,后期需要继续收集PH患者血液样本进一步分析其作为循环标志物的可行性。

综上所述,本研究揭示了SMOC2促进低氧诱导的PASM C表型转换,并阐明了其表达受miR-125a与miR-150转录后抑制的精细调控机制。这一发现不仅深化了对PASM C表型转换分子机制的理解,还以“miR-125a/miR-150-SMOC2轴”为靶点的、旨在逆转PASM C表型转换的新型治疗策略奠定了坚实的理论基础。

**利益冲突声明:**

所有作者声明无利益冲突。

**Conflict of Interests:**

All authors declare no conflict of interests.

#### 作者贡献声明:

朱天帆负责实验方法设计、实验操作、实验数据收集与分析;黄惠结负责研究构思、协助数据分析、论文初稿撰写及修订,提供研究资金支持;陈峰负责研究构思、研究课题监管与指导、论文审阅与修订。

#### Author's Contributions:

ZHU Tianfan was responsible for methodology, investigation and analysis. HUANG Huijie was responsible for methodology, investigation, data curation, analysis, writing and revising original draft, funding acquisition. CHEN Feng was responsible for conceptualization, supervision, writing, reviewing and revising the manuscript.

#### [参考文献]

- [1] GHOFRANI H A, GOMBERG-MAITLAND M, ZHAO L, et al. Mechanisms and treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2025, 22(2): 105-120
- [2] MOCUMBI A, HUMBERT M, SAXENA A, et al. Pulmonary hypertension[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2024, 10: 1
- [3] MU T T, GUO B S, XIANG C Q, et al. Hypoxic microenvironment and pulmonary hypertension [J]. *Respir Res*, 2025, 27(1): 22
- [4] NAVARRO-LLINARES L, GARCÍA-LEÓN B, DE LA BASTIDA-CASERO L, et al. The vascular-immune cells crosstalk and microenvironment in pulmonary hypertension[J]. *Compr Physiol*, 2026, 16: e70110
- [5] BOUCHERAT O, BONNET S, PROVENCHER S, et al. Anti-remodeling therapies in pulmonary arterial hypertension[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2025, 46(7): 674-691
- [6] ADU-AMANKWAAH J, SHI Y, SONG H Q, et al. Signaling pathways and targeted therapy for pulmonary hypertension[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2025, 10: 207
- [7] TAKAHATA Y, URUSHIZAKI M, WAKAMORI K, et al. The Runx2-SMOC axis in skeletal development: expanding roles of Smc1 and Smc2 in development and disease[J]. *J Oral Biosci*, 2026, 68(1): 100738
- [8] WANG X W, WANG M, ZHOU Z X, et al. SMOC2 promoted vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and extracellular matrix degradation by activating BMP/TGF- $\beta$ 1 signaling pathway [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2023, 73(2): 116-123
- [9] CHEN X, ZHONG X, LUO D, et al. Plasma SMOC2 predicts prognosis in patients with heart failure: a prospective cohort[J]. *Int J Gen Med*, 2024, 17: 1651-1664
- [10] WILK J B, HERBERT A, SHOEMAKER C M, et al. Secreted modular calcium-binding protein 2 haplotypes are associated with pulmonary function[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(6): 554-560
- [11] LI C Q, YIN L X, ZHAO D Q, et al. SMOC2 promotes peritoneal metastasis of gastric cancer involving Wnt/ $\beta$ -catenin pathway modulation and inducing angiogenesis[J]. *Clin Exp Med*, 2025, 25(1): 372
- [12] FANG J D, CHEN H Y, JIA Z Z, et al. miRNAs in pulmonary hypertension: mechanistic insights and therapeutic potential[J]. *Biomedicines*, 2025, 13(8): 1910
- [13] POLINI B, GHELARDONI S, CAPONE G, et al. Circulating microRNAs in pulmonary arterial hypertension: biomarkers for diagnosis, prognostic stratification, and treatment[J]. *GeroScience*, 2026, 48(2): 2243-2266
- [14] XU J H, LINNEMAN J, ZHONG Y F, et al. MicroRNAs in pulmonary hypertension, from pathogenesis to diagnosis and treatment[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(4): 496
- [15] LI Y, REN W D, WANG X, et al. MicroRNA-150 relieves vascular remodeling and fibrosis in hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1740-1749
- [16] RUSSOMANNO G, JO K B, ABDUL-SALAM V B, et al. miR-150-PTPMT1-cardiolipin signaling in pulmonary arterial hypertension[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23: 142-153
- [17] HWANG S J, AHN B J, SHIN M W, et al. miR-125a-5p attenuates macrophage-mediated vascular dysfunction by targeting Ninjurin1[J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(6): 1199-1210
- [18] WANG L N, REN L, LI L, et al. Role of SMOC2 in adenomyosis: implications for ECM remodeling and EMT pathogenesis[J]. *BMC Women's Health*, 2025, 25(1): 155
- [19] HE Y R, PAN X D, LIU Z Y, et al. METTL3 silencing suppresses cardiac fibrosis post myocardial infarction via m6A modification of SMOC2[J]. *J Cellular Molecular Medi*, 2025, 29(17): e70829
- [20] WANG Y B, YANG H K, SU X, et al. TGF- $\beta$ 1/SMOC2/AKT and ERK axis regulates proliferation, migration, and fibroblast to myofibroblast transformation in lung fibroblast, contributing with the asthma progression[J]. *Hereditas*, 2021, 158(1): 47
- [21] REN Y, WU Y, HE W S, et al. SMOC2 plays a role in heart failure via regulating TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway-mediated autophagy[J]. *Open Med*, 2023, 18: 20230752
- [22] KUDRYASHOVA T V, GONCHAROV D A, PENA A, et al. HIPPO-integrin-linked kinase cross-talk controls self-sustaining proliferation and survival in pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 194(7): 866-877
- [23] GAO R J, AIKEREMU N, CAO N, et al. Quercetin regulates pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension by downregulating TGF- $\beta$ 1-Smad2/3 pathway[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1): 535

(收稿:2026-03-02;修回:2026-04-22;录用:2026-04-23)

(本文编辑:戴王娟)