

二叶式主动脉瓣中 miRNA-195 调控瓣膜钙化的机制研究

郑 蕤,堵俊杰,何珂帅,邵永丰*

(南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探究二叶式主动脉瓣中 miRNA-195 调控瓣膜钙化的可能机制。方法:收集 35 例接受主动脉瓣置换术患者狭窄的二叶式或三叶式主动脉瓣,通过 PCR 及 Western blot 分别检测 miRNA-195 的表达量、果蝇母源抗皮肤生长因子(drosophila mothers against decapentaplegic 7, SMAD7)的 mRNA 及蛋白表达量。双荧光素酶法预测 miRNA-195 的靶基因。在猪瓣膜间质细胞中分别沉默和过表达 miRNA-195,检测 SMAD7 的 mRNA 表达水平并探究两者的相互关系。在人类瓣膜组织上通过免疫组化染色检测基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9 蛋白水平,通过天狼星红染色检测胶原蛋白水平,通过 Von Kossa 染色比较钙化程度差异,进而研究钙化相关的功能改变。结果:与狭窄的三叶式主动脉瓣相比,狭窄的二叶式主动脉瓣中 miRNA-195 表达降低,SMAD7 的 mRNA 和蛋白水平升高。双荧光素酶实验提示 SMAD7 是 miRNA-195 的直接靶标。在猪瓣膜间质细胞中沉默 miRNA-195 引起 SMAD7 mRNA 水平升高,过表达 miRNA-195 引起 SMAD7 mRNA 水平降低。狭窄钙化的二叶式主动脉瓣组织中 MMP-2、MMP-9 及胶原的表达较狭窄钙化的三叶式主动脉瓣升高。结论:在二叶式主动脉瓣中,下调的 miRNA-195 促进了 SMAD7 表达,进而促进细胞外基质的纤维化并最终促进其钙化。

[关键词] 二叶式主动脉瓣;瓣膜钙化;miRNA-195; SMAD7;瓣膜间质细胞

[中图分类号] R542.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)09-1086-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20170904

Calcification mechanism regulated by miRNA-195 in bicuspid aortic valve

Zheng Rui, Du Junjie, He Keshuai, Shao Yongfeng*

(Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the calcification mechanism of bicuspid aortic valve(BAV) which involves the microRNA-195. **Methods:** Stenotic BAV or degenerative tricuspid aortic valve(DTV) samples were collected from 35 patients undergoing aortic valve replacement. The mRNA expression of miRNA-195 and SMAD7, and protein expression of SMAD7 were determined by RT-PCR and Western blot, respectively. Dual-luciferase assay was performed to determine putative target of miRNA-195. In porcine valve interstitial cells(VIC), we down-regulated and up-regulated the microRNA-195 level, and examine the mRNA expression of SMAD7 to explore the relationship between miRNA-195 and SMAD7. Moreover, in human leaflet samples, immunohistochemistry staining was carried out to test the protein expression of MMP-2 and MMP-9, and Sirius Red staining was done to investigate the expression of collagen, and the Von Kossa staining was implemented to explore the mineralization nodes. All of these were done to compare the functional alteration associated with cellular calcification. **Results:** Compared with TAV, the expression of miRNA-195 was remarkably lower in BAV with higher expression of SMAD7. Luciferase experiments validated that miRNA-195 directly targeted SMAD7. Overexpression of miRNA-195 inhibited the mRNA expression of SMAD7, while miRNA-195 inhibitor treatment resulted in increased SMAD7 expression in VIC. Finally, more MMP-2 and MMP-9 expression and more collagen distribution were observed in BAV than in DTV. **Conclusion:** Our study has demonstrated that miRNA-195 is much more down-regulated in stenotic BAV than that in DTV. The downregulation of miRNA-195 promotes valvular calcification via targeting SMAD7, which involves the fibrosis of extracellular matrix.

[Key words] bicuspid aortic valve; valvular calcification; miRNA-195; SMAD7; valvular interstitial cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1086-1092]

二叶式主动脉瓣(bicuspid aortic valve, BAV)是人群中常见的先天性心脏病,发病率为 1%~2%。主

动脉瓣狭窄是 BAV 患者很常见和极严重的后果^[1-2]。在成人中,除外有着特殊病因的风湿性心脏瓣膜病,二叶式和退行性三叶式主动脉瓣(degenerative tricuspid aortic valve, DTV)一样,狭窄大多由钙化导致,但 BAV 的钙化速度明显快于 DTV^[3]。因此,有必

[基金项目]江苏省自然科学基金(BK20151590)

*通信作者(corresponding author),E-mail:shaoyongfeng2010@aliyun.com

要探讨 BAV 是否有着独特的钙化机制,进而尝试寻找 BAV 钙化的防治手段。

普遍认为,瓣膜钙化的关键过程,包含了瓣膜间质细胞(valve interstitial cell, VIC)向成骨样表型细胞分化的过程^[4-5],然而 BAV 的 VIC 究竟通过何种方式发生钙化目前还不明确,目前研究表明 microRNA 是调节心血管系统钙化的关键因素^[6-7],也有很多证据表明 microRNA 能调节 VIC 的钙化过程^[8-11],然而 BAV 中 microRNA 如何参与瓣膜钙化进程尚不得而知。

本研究选取了一些与血流剪切力有关的或与瓣膜狭窄相关的 microRNA(包括 miRNA-139、miRNA-192、miRNA-195、miRNA-486)作为研究目标^[8, 11-12],通过 PCR 方法检测了人狭窄钙化的 BAV 瓣膜组织和人狭窄钙化的 DTV 组织的相应 microRNA 表达水平,筛选出差异表达的 microRNA 并探究了该 microRNA 的下游及其与钙化相关功能改变的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2012—2016 年在南京医科大学第一附属医院接受主动脉瓣膜置换手术的患者瓣膜(经本院伦理委员会批准,所有患者都签署了知情同意书)。在手术时每个 BAV 手术标本($n=21$)都经检查具有典型的左冠瓣和右冠瓣融合的二叶式形态。根据术前心脏超声的结果选择出 DTV 中的退行性变瓣叶($n=14$)。每例瓣膜被都被切成两部分,一部分液氮保存并用于 RT-PCR 或 Western blot 实验,另一部分 10% 多聚甲醛浸泡并石蜡包埋用于免疫组化染色等实验。

从 8 个猪心脏(4~6 个月大)中获取主动脉 VIC。方法简述:小心切下主动脉瓣,避免引入任何非瓣叶组织。轻刮瓣叶的主动脉和心室面以除去内皮层,然后将组织切成约 2 mm×2 mm 的薄片,并将外植体置于生长培养基(DMEM 基本培养基,含青霉素、链霉素、两性霉素 B 和 10% 胎牛血清)中,在 5% CO₂ 培养箱内培养 10 d。将从外植体生长出的细胞传代培养,研究用培养第 3~4 代的细胞。

1.2 方法

1.2.1 PCR 检测 microRNA 和 SMAD7 表达水平

使用 miRNeasy Mini Kit (Qiagen 公司,美国)试剂盒从人类瓣膜组织和猪的 VIC 中提取 RNA, TaKaRa PrimeScript™ RT Master (Cat.# RR037A)试剂盒将其逆转录。使用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ II (Cat.# 820A) 试剂盒和基因引物

(Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR 引物,广州瑞博生物公司,表 1)在 ABI384 孔 PCR 仪(7900HT Fast Real-Time PCR systems,ABI 公司,美国)上进行 PCR 反应。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers of RT-PCR

名称		序列(5'→3')
U6	上游	GTGGGGAGAAGAGGACAGGAC
	下游	GTGGTACCCACTTTTCGCACA
hsa-SMAD7	上游	TTCCTCCGCTGAAACAGGG
	下游	CCTCCCAGTATGCCACCAC
ssc-SMAD7	上游	CCAGAACCTATTTCCCATGC
	下游	GCCACTGGGTGAGCAATACT
hsa-GAPDH	上游	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG
	下游	AGGGGCCATCCACAGTCTTC
ssc-GAPDH	上游	CCTCAACGACCACTTCGTCA
	下游	TGTGTTGGGGGATCGAGTTG

1.2.2 免疫组化和其他组织学染色方法

对石蜡包埋的切片进行 Von kossa 染色和天狼星红染色,并进行半定量分析。其中 Von Kossa 染色使用试剂盒 Von Kossa Kit (24633, Polysciences 公司,美国),并根据其说明指南检测钙化程度。天狼星红染色使用试剂盒 Picro-Sirius Red Stain Kit (ab150681, Abcam 公司,美国),并根据其说明书检测胶原增生情况。另外,切片也用来进行免疫组化染色,检测指标包括 SMAD7、MMP-2、MMP-9。具体方法是:首先用 Tris-buffered saline/0.1% Tween-20 洗液洗涤切片;然后 5% 奶粉溶液封闭;接着一抗(1:5 000)孵育过夜,洗涤;二抗(1:10 000)孵育 30 min。其中所有抗体都购于美国 Abcam 公司。最后使用 Image-Pro Plus 软件对免疫组化图片进行半定量分析。

1.2.3 Western blot 实验

Western blot 实验为化学发光法。SMAD7 抗体(Abcam 公司,美国)作为一抗,浓度为 1:1 000,辣根过氧化物酶标记兔源抗体(GE Healthcare Life Sciences 公司,美国)为二抗,浓度为 1:10 000,内参为 α -tublin。

1.2.4 双荧光素酶报告基因测定

在 37 °C、5% CO₂ 的环境中,将 293T 细胞接种在装有 10% FBS、1% 非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、青霉素与链霉素的杜尔贝科改性依格乐培养基(Invitrogen 公司,美国)的 12 孔板中。

含有萤火虫荧光素酶基因和 Renilla 荧光素酶基因的 pmirGLO 双荧光素酶 miRNA 靶向表达载体 (pmirGLO) 购自美国 Promega 公司。通过 RT-PCR 扩增包含有 miRNA-195 预测结合位点的人 SMAD7 3'-UTR, 并使用 *Xba* I 和 *Sac* I 限制性位点插入 pmirGLO 载体 (pmirGLO-UTR) 的萤火虫荧光素酶基因的 3'-UTR 下游。使用位点导向基因诱变试剂盒 (QuikChange XL, Agilent Technologies 公司, 美国) 构建突变型 miRNA-195 结合位点载体 (pmirGLO-UTR-MUT, 表 2)。通过限制性酶消化和测序验证, Lipofectamine™ (Invitrogen 公司, 美国) 进行瞬时转染。48 h 后, Dual-Glo 荧光素酶测定系统测量荧光素酶活性。实验分 3 个平行样进行, 重复 2 次。

表 2 荧光素酶反应相关序列

Table 2 Sequences of primers for Smad7 luciferase reporter assay

名称		序列(5'→3')
3'-UTR-WT	上游	GTGGGGAGAAGAGGACAGGAC
	下游	GTGGTACCCACTTTCGCACA
3'-UTR-MUT	上游	CAGGCCACACTTCAAACACTTTCTGCTAATATTTTCTCCTGAG
	下游	CTCAGGAGGAAAATATTAGCAGGA AAGTAGTTTGAAGTGTGGCCTG

1.2.5 VIC 的转染

选用 50 nmol/L 的 miRNA-195 模拟物, miRNA-195 抑制物及阴性对照以 Lipofectamine 3000 转染试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 加拿大) 转染 VIC 单层细胞培养物 (7.5×10^4 个/cm²)。用生长培养基 (含有 10% 胎牛血清的 DMEM) 进一步培养转染后细胞 24 h。

1.3 统计学方法

使用 SPSS10.0 统计软件, 分类变量资料使用校正卡方检验, 对于数值变量使用双尾 *t* 检验、皮尔逊相关分析。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 钙化性 BAV miRNA-195 表达变化

选择几个可能参与调控 BAV 疾病早期钙化进展的 microRNA (miRNA-195, miRNA-486, miRNA-139 和 miRNA-192) 作为可能的靶标, 进行 RT-PCR 分析^[8-11-12]。与 DTV 瓣叶相比, BAV 瓣叶中的 miRNA-195 表达降低 10.9 倍 (图 1A), 且 BAV 瓣叶中 miRNA-486 的表达量降低 7.6 倍 (图 1B)。而所有组中 miRNA-139 和 miRNA-192 的表达水平差异没有统计学意义

(图 1C, D)。据此选择变化最明显的 miRNA-195 作进一步研究。

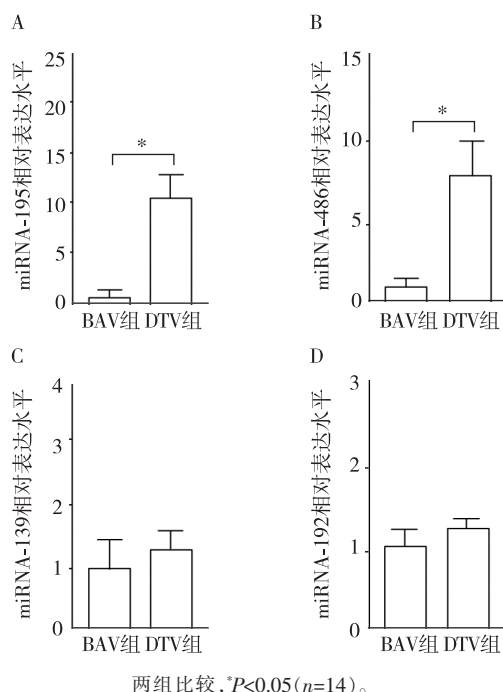


图 1 miRNA-195 (A)、miRNA-486 (B)、miRNA-139 (C) 和 miRNA-192 (D) 在钙化的人类瓣叶中的表达

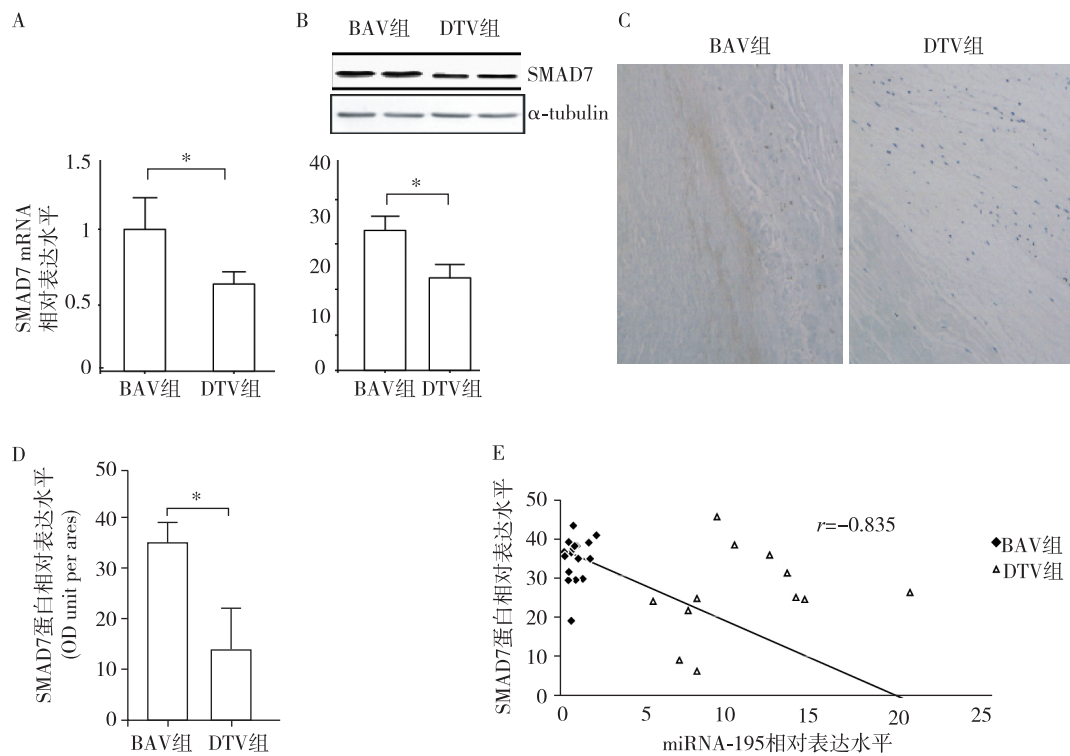
Figure 1 miRNA-195 (A), miRNA-486 (B), miRNA-139 (C) and miRNA-192 (D) expression in calcified leaflets

2.2 BAV SMAD7 蛋白与 miRNA-195 表达变化

使用在线生物信息学分析软件 (TargetScan 和 <http://www.microRNA.org>) 预测 miRNA-195 的靶基因, 发现钙化相关基因 SMAD7 是 miRNA-195 的 1 个潜在靶标。为了探究 miRNA-195 参与调节 SMAD7 表达的情况, 首先通过 PCR 检测了瓣膜组织中 SMAD7 的 mRNA 表达, 发现 BAV 组织中 SMAD7 的 mRNA 表达量比 DTV 组织高出 1.6 倍 (图 2A)。通过 Western blot 检测两组中 SMAD7 蛋白表达水平。结果表明, BAV 组织中 SMAD7 的蛋白表达量比 DTV 组织高出 1.5 倍 (图 2B)。另外对所有组织样品进行 SMAD7 免疫组织化学染色, 定量分析表明, 与 DTV 瓣叶相比, 来自 BAV 的瓣叶组织 SMAD7 蛋白表达量升高 12.2 倍 (图 2C, D)。Pearson 相关分析显示 SMAD7 蛋白表达量与 miRNA-195 呈负相关 ($r = -0.835, P < 0.05$, 图 2E)。

2.3 确认 miRNA-195 的直接靶标

为了验证 SMAD7 作为 miRNA-195 靶标的可能性, 首先根据生物信息学分析找到 miRNA-195 的潜在结合位点。miRNA-195 的种子序列与 SMAD7 mRNA 中 3'-UTR 的 56~62 核苷酸互补 (图 3A)。然



A, B: BAV 组织瓣膜组织中 SMAD7 的 mRNA 和蛋白表达量高于 DTV 组; C, D: 代表性的免疫组化染色图片($\times 200$)以及半定量的免疫组化分析显示 BAV 组 SMAD7 的蛋白表达高于 DTV 组($n=14$); E: Pearson 相关分析显示 SMAD7 的蛋白表达水平与 miRNA-195 呈负相关($r=-0.835, P<0.01$)。两组比较, $*P<0.05$ 。

图 2 BAV 组织中 miRNA-195 表达量和 SMAD7 蛋白表达量的相关性

Figure 2 Relationship between miRNA-195 and SMAD7 protein levels in BAV tissues

后构建了含有荧光素酶基因和 SMAD7 的 3'-UTR 区域的 pmirGLO-SMAD 3'-UTR-WT 载体以及 1 个 pmirGLO-SMAD 3'-UTR-MUT 载体, 后者用来预测 miRNA-195 结合位点存在点突变。将各种报告基因构建物与 miRNA-195 模拟物或 miRNA 阴性对照一起转染到 293T 细胞中, 分析荧光素酶活性。miRNA-195 模拟物在 3'-UTR-WT 克隆中显著抑制荧光素酶活性, 但在 3'-UTR-MUT 克隆中, 这一抑制并不显著。同时, 用空载体转染的细胞没有显示任何变化(图 3B)。这些结果表明, miRNA-195 通过直接结合 pmirGLO 报告基因质粒中的 SMAD7 3'-UTR 来抑制 SMAD7 的表达, 并导致荧光素酶活性的下调。

2.4 在 VIC 中 miRNA-195 与 SMAD7 的关系

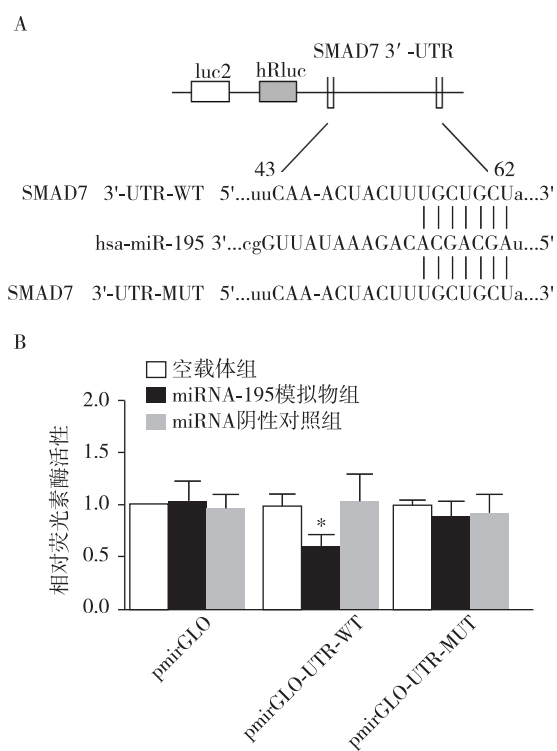
用 miRNA-195 模拟物转染猪 VIC 细胞, 使 miRNA-195 过表达, 用 miRNA-195 抑制剂转染细胞, 使其表达降低。在用 miRNA-195 模拟物转染 24 h 后, miRNA-195 表达量显著增加(图 4A)。miRNA-195 浓度的增加导致 SMAD7 mRNA 表达量降低 1/2(图 4B)。另一方面, 用 miRNA-195 抑制剂转染 VIC 诱导的内源性 miRNA-195 表达量降低导致 SMAD7 mRNA 表达量增高 3.1 倍(图 4C、D)。

2.5 BAV 瓣叶中与钙化相关的功能改变

在 BAV、DTV 瓣叶切片中, Von Kossa 染色显示了类似的钙沉积程度(图 5A)。MMP-2 和 MMP-9 的免疫组织化学研究和图像定量分析显示, 与 DTV 瓣叶相比, 来自 BAV 瓣叶组织的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平显著增加(图 5B、C)。天狼星红染色表明, 与 DTV 组织相比, BAV 中的阳性区域更多(图 5D)。

3 讨论

考虑到常见的风湿性瓣膜钙化有独特的病因, 本研究选择了 DTV 作为对照组, 通过人体瓣膜组织的 RT-PCR 检测了一些 microRNA, 发现了其中最明显、最有代表性的改变: BAV 中 miRNA-195 的表达量较 DTV 明显降低。同时发现 BAV 中 SMAD7 的 mRNA 和蛋白表达水平较 DTV 高, 并且 SMAD7 蛋白的升高与 miRNA-195 的表达降低存在相关关系。在猪 VIC 水平上进行 miRNA-195 沉默处理, 可以导致 SMAD7 mRNA 表达升高。MiRNA-195 是 microRNA-15/16/195/424/497 家族的一员, 后者参与了許多重要疾病的发生发展, 例如肿瘤、心力衰竭、精神



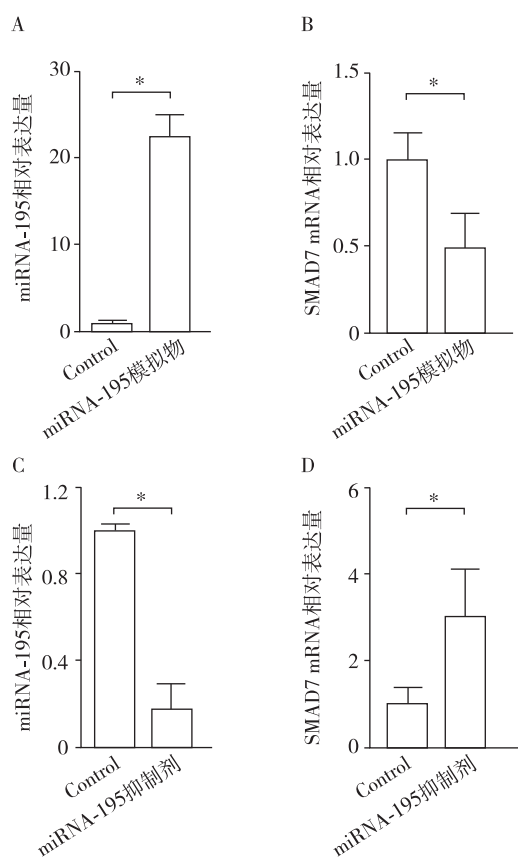
A:miRNA-195 的种子序列与 SMAD7 3' 端互补;B:miRNA-195 模拟物能抑制野生型克隆的荧光素酶反应,但是不能抑制突变型克隆。与 miRNA 阴性对照组比较,* $P<0.05(n=3)$ 。

图 3 确认 miRNA-195 的直接作用目标

Figure 3 Validation of the direct target of miRNA-195

分裂症等^[13]。而 SMAD7 是 SMAD 家族中的抑制型成员,参与了 SMAD 依赖的多种通路的调控,如 TGF- β 通路等^[14]。但是 miRNA-195、SMAD7 在人类 DTV 和 BAV 间的表达差异及在 BAV 早期钙化中的作用机制目前还不清楚,这也是本研究的创新性之处。

miRNA-195 是心脏瓣膜钙化过程中重要的调节因子。Nigam 等^[11]报道 miRNA-195 在狭窄的 BAV 中的表达较关闭不全的 BAV 表达下降 59%,且 miRNA-195 过表达的 VIC 中钙化相关因子表达量增加,例如 BMP2、Runx2 等。普遍认为,BAV 中瓣膜狭窄的比例高于关闭不全,本研究也发现,钙化狭窄的 BAV 中 miRNA-195 的表达量较钙化狭窄的 DTV 低。Chen 等^[15]指出使用 miRNA-195 拮抗剂处理小肠细胞,能增强 SMAD7 的转录,并且在荧光素酶实验中 miRNA-195 能通过与 3'端特定区域结合直接抑制 SMAD7 的表达。Duan 等^[16]指出在胶质瘤多形细胞中,miRNA-195 能抑制 SMAD7 的表达。Guo 等^[17]发现鼠胸腺髓质上皮细胞中 miRNA-195 可以抑制 METC1 的增殖,这种抑制至少是部分地通过下调 SMAD7 表达完成的。以上观点支持本研究中有关



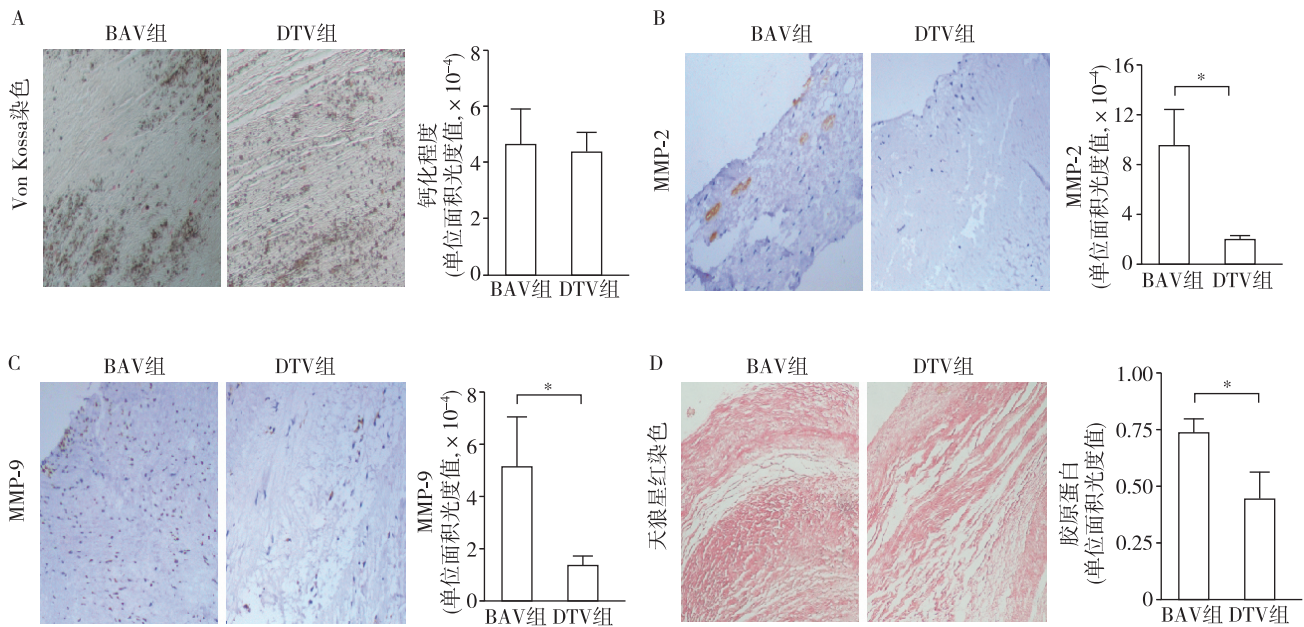
A、B:miRNA-195 模拟物处理后猪 VIC 的 SMAD7 mRNA 水平升高;C、D:miRNA-195 抑制剂处理后猪 VIC 的 SMAD7 mRNA 水平下降。两组比较,* $P<0.05(n=3)$ 。

图 4 VIC 中 miRNA-195 与 SMAD7 mRNA 表达量的关系
Figure 4 Relationship between miRNA-195 and SMAD7 mRNA expression in VIC

miRNA-195 和 SMAD7 相互关系的结果。

SMAD7 的激活是调控钙化进程的关键步骤。Mohan 等^[18]认为在人类小肠巨噬细胞中,升高的 SMAD7 蛋白能通过升高 IKK- β 进而促进 NF- κ B 的表达。Zorzi^[19] 和 Ardizzone 等^[20]都指出,在人类炎症性肠病组织中,阻遏 SMAD7 的激活能抑制炎症的发展。而 NF- κ B 等炎症相关因子最终可导致钙化的发生。

在本研究之前,一些基于人类钙化性瓣膜组织和在体外培养的 VIC 实验已经指出,许多基因通路参与了心脏瓣膜钙化的过程,这些通路包括 TGF- β 通路、BMP2 通路、NOTCH1 通路、SMAD 通路等^[21-23]。其中,Kim^[24] 和 Miyazawa 等^[25]都报道 SMAD7 对 TGF- β 和 BMP2 通路介导的钙化具有抑制作用。Matsunobu 等^[26]提出在小鼠成骨细胞中 TGF- β 能够抑制成骨细胞向骨细胞分化,提示 TGF- β 在钙化形成过程中起着负向调控作用。总之,SMAD7 最终通过抑制 TGF- β 通路而发挥了促进钙化的作用,表明 miRNA-195 对 SMAD7 介导的钙化过程的调控可能



A: Von Kossa 显示 BAV 和 DTV 的钙化程度相近; B~D: 与 DTV 瓣叶组织相比, BAV 瓣叶组织中 MMP-2(B)、MMP-9(C)、胶原表达量(D)增加。两组比较, $P < 0.05 (n = 14)$ 。

图 5 BAV 瓣叶的钙化相关的功能性改变 ($\times 400$)

Figure 5 Functional alteration associated with calcification in BAV leaflets ($\times 400$)

是使 BAV 发生早期钙化的原因。

最后, 在人类瓣膜组织上检测了 BAV 较 DTV 发生的功能变化。尽管两类瓣膜有着相似的钙化程度, 但 BAV 中 MMP-2、MMP-9、胶原纤维的表达却较 DTV 升高, 这提示了 BAV 中的细胞外基质功能紊乱。至此提出假设: 在 BAV 中, 下调的 miRNA-195 促进了 SMAD7 表达, 进而促使细胞外基质的纤维化并最终表现为钙化。Zampetaki 等^[27]报道使用 miRNA-195 拮抗剂的小鼠表现出弹性蛋白表达增高和 MMP-2、MMP-9 的表达增高。Pardali 等^[28]发现 MMP-2、MMP-9 能促进激活 TGF- β 结合蛋白, 进而抑制其功能, 以上观点与本研究相似。但 Liu 等^[29]报道在小鼠肾脏中敲除 SMAD7 能促进炎症反应的发生, 这似乎与本文提到的 SMAD7 表达升高可以通过 NF- κ B 最终导致钙化不一致。这可能与不同种系、不同组织、不同方法进行研究有关。

本文研究了 miRNA-195 对 SMAD7 的作用机制, 但并没有阐明 SMAD7 是否确实通过抑制 TGF- β 通路加速 BAV 钙化进程, 值得进一步研究。

综上所述, 本研究发现狭窄的 BAV 中 miRNA-195 的表达较狭窄的 DTV 低, 而在 BAV 中下调的 miRNA-195 促进了 SMAD7 表达, 进而促进细胞外基质的纤维化并最终促进其钙化。这为探究 BAV 早期钙化发生机制提供了新线索。

[参考文献]

- [1] Siu SC, Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(25):2789-2800
- [2] Girdauskas E, Borger MA. Bicuspid aortic valve and associated aortopathy: an update[J]. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 25(4):310-316
- [3] Wirrig EE, Yutzy KE. Conserved transcriptional regulatory mechanisms in aortic valve development and disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(4):737-741
- [4] Farrar EJ, Pramil V, Richards JM, et al. Valve interstitial cell tensional homeostasis directs calcification and extracellular matrix remodeling processes via RhoA signaling[J]. Biomaterials, 2016, 105():25-37
- [5] Wang Y, Wu B, Farrar E, et al. Notch-TNF signalling is required for development and homeostasis of arterial valves[J]. Eur Heart J, 2017, 38(9):675-686
- [6] Oury C, Servais L, Bouznad N, et al. MicroRNAs in valvular heart diseases: Potential role as markers and actors of valvular and cardiac remodeling[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7):1120
- [7] Leopold JA. MicroRNAs regulate vascular medial calcification[J]. Cells, 2014, 3(4):963-980
- [8] Rathan S, Ankeny CJ, Arjunon S, et al. Identification of side-and shear-dependent microRNAs regulating porcine aortic valve pathogenesis[J]. Sci Rep, 2016, 6:25397
- [9] Patel V, Carrion K, Hollands A, et al. The stretch respon-

- sive microRNA miR-148a-3p is a novel repressor of IKK β , NF- κ B signaling, and inflammatory gene expression in human aortic valve cells[J]. *Faseb J*, 2015, 29(5):1859–1868
- [10] Wang Y, Chen S, Deng C, et al. MicroRNA-204 targets Runx2 to attenuate BMP-2-induced osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66(1):63–71
- [11] Nigam V, Sievers HH, Jensen BC, et al. Altered microRNAs in bicuspid aortic valve: a comparison between stenotic and insufficient valves[J]. *J Heart Valve Dis*, 2010, 19(4):459–465
- [12] Holliday CJ, Ankeny RF, Jo H, et al. Discovery of shear- and side-specific mRNAs and miRNAs in human aortic valvular endothelial cells[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(3):H856–H867
- [13] He JF, Luo YM, Wan XH, et al. Biogenesis of miRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011, 25(6):404–408
- [14] Li Q. Inhibitory SMADs: potential regulators of ovarian function[J]. *Biol Reprod*, 2015, 92(2):50
- [15] Chen G, Cao S, Liu F, et al. miR-195 plays a role in steroid resistance of ulcerative colitis by targeting Smad7[J]. *Biochem J*, 2015, 471(3):357–367
- [16] Duan Y, Chen Q. TGF- β 1 regulating miR-205/miR-195 expression affects the TGF- β signal pathway by respectively targeting SMAD2/SMAD7 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4):1837–1844
- [17] Guo D, Ye Y, Qi J, et al. MicroRNA-195a-5p inhibits mouse medullary thymic epithelial cells proliferation by directly targeting Smad7[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(3):290–297
- [18] Mohan K, Namachivayam K, Chapalamadugu KC, et al. Smad7 interrupts TGF- β signaling in intestinal macrophages and promotes inflammatory activation of these cells during necrotizing enterocolitis[J]. *Pediatr Res*, 2016, 79(6):951–961
- [19] Zorzi F, Angelucci E, Sedda S, et al. Smad7 antisense oligonucleotide-based therapy for inflammatory bowel diseases[J]. *Dig Liver Dis*, 2013, 45(7):552–555
- [20] Ardizzone S, Bevivino G, Monteleone G. Mongersen, an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in patients with active Crohn's disease[J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016, 9(4):527–532
- [21] Garg V. Molecular genetics of aortic valve disease [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2006, 21(3):180–184
- [22] Kurabayashi M. Vascular Calcification-pathological mechanism and clinical application: role of vascular smooth muscle cells in vascular calcification[J]. *Clin Calcium*, 2015, 25(5):661–669
- [23] Wu M, Chen G, Li Y. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease[J]. *Bone Research*, 2016, 4:16009
- [24] Kim CR, Kim YM, Lee MK, et al. Pyropia yezoensis peptide promotes collagen synthesis by activating the TGF- β /Smad signaling pathway in the human dermal fibroblast cell line Hs27 [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(1):31–38
- [25] Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF- β family signaling by inhibitory smads[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(3):a022095
- [26] Matsunobu T, Torigoe K, Ishikawa M, et al. Critical roles of the TGF- β type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development[J]. *Dev Biol*, 2009, 332(2):325–338
- [27] Zampetaki A, Attia R, Mayr U, et al. Role of miR-195 in aortic aneurysmal disease[J]. *Circ Res*, 2014, 115(10):857–866
- [28] Pardali E, Ten DP. TGF β signaling and cardiovascular diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2):195–213
- [29] Liu GX, Li YQ, Huang XR, et al. Smad7 inhibits Ang II-mediated hypertensive nephropathy in a mouse model of hypertension[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2014, 127(3):195–208

[收稿日期] 2017-02-27

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnmn.njmu.edu.cn>