

王瑞青, 郑彩虹, 朱巍, 等. 血小板微粒介导 miR-4306 调控糖尿病大鼠主动脉血管内皮细胞损伤的作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 105-112.

Wang RQ, Zheng CH, Zhu W, et al. Effects and mechanisms of miR-4306, mediated by platelet microparticles, on vascular endothelial cell injury in the aorta of diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 105-112.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 016

血小板微粒介导 miR-4306 调控糖尿病大鼠主动脉血管内皮细胞损伤的作用及机制研究

王瑞青¹, 郑彩虹², 朱巍¹, 郭彩虹¹

(1.北京航天总医院内分泌科, 北京 100076; 2.山西白求恩医院内分泌科, 太原 030000)

【摘要】 目的 探讨分析糖尿病大鼠血小板微颗粒(platelet microparticles, PMPs)在主动脉血管内皮损伤的作用及机制。**方法** 将 SD 大鼠随机分为对照组(NC 组)和糖尿病组(DM 组),分离纯化血小板微颗粒,原代培养内皮细胞,免疫荧光激光共聚焦检测内皮型一氧化氮合酶、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3),流式细胞术检测内皮细胞凋亡情况,qRT-PCR 检测 miR-4306 表达,蛋白免疫印迹法检测 VEGFA/ERK1/2/NF-κB 信号通路相关蛋白。**结果** DM 组 eNOS、Caspase-3 阳性表达率及细胞凋亡率,与 NC 组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。mimic-M 组、inhibitor-M 组 miR-4306 相对表达量与 miR-M 组比较,差异有统计学意义($t=3.821/4.597, P<0.05$ 或 $P<0.01$)。mimic-M 组 miR-4306 相对表达量与 inhibitor-M 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。M 组 miR-4306 相对表达量与 Ctrl 组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。mimic-M 组、inhibitor-M 组 VEGFA、NF-κBp65、p-IκBα 及 p-ERK 相对表达量与 M 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),M 组 VEGFA、NF-κBp65、p-IκBα 及 p-ERK 相对表达量与 Ctrl 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 糖尿病大鼠分泌 PMPs 导致主动脉血管内皮细胞损伤,其作用机制可能与激活 miR-4306/VEGFA/ERK1/2/NF-κB 信号通路有关。

【关键词】 糖尿病;动脉粥样硬化;血小板微颗粒;血管内皮细胞;miR-4306

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0105-08

Effects and mechanisms of miR-4306, mediated by platelet microparticles, on vascular endothelial cell injury in the aorta of diabetic rats

WANG Ruiqing¹, ZHENG Caihong², ZHU Wei¹, GUO Caihong¹

(1. Department of Endocrinology, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China.
2. Department of Endocrinology, Shanxi Bethune Hospital, Taiyuan 03000)

【Abstract】 Objective To investigate the role and mechanisms of platelet microparticles (PMP) sin vascular endothelial injury of the diabetic aorta. **Methods** SD rats were randomly divided into the normal (NC) and diabetic (DM) groups. PMPs were isolated and purified. Next, primary cultured endothelial cells were transfected with microRNA (miR) -4306 to detect PMPs in vascular endothelial cells. The effects of activity and the effects on the miR-4306/vascular endothelial growth factor A (VEGFA)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2/nuclear factor κB (NF-κB) signaling pathway were evaluated. **Results** The positive expression and apoptosis rates of endothelial nitric oxide synthase

[作者简介]王瑞青(1980—),女,硕士主治医师,研究方向:内分泌。E-mail: wangrq11@163.com

(eNOS) and caspase-3 in the DM group were significantly different from those in the NC group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The relative expression of miR-4306 in the mimic-M group and inhibitor-M group was significantly different from that in the miR-M group ($t = 3.821, 4.597, P < 0.05$ or $P < 0.01$). Moreover, the relative expression of miR-4306 in the mimic-M group was significantly different from that in the inhibitor-M group ($P < 0.01$). The relative expression of miR-4306 in M group was significantly different from that in Ctrl group ($P < 0.01$). In addition, the relative expression of VEGFA, NF- κ Bp65, p-I κ B α and p-ERK in the mimic-M group and inhibitor-M group was significantly different from that in M group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The relative expression of VEGFA, NF- κ Bp65, p-I κ B α and p-ERK in the M group was significantly different from that of Ctrl group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** PMPs may cause endothelial damage in the diabetic aorta, the underlying mechanism may be related to the activation of miR-4306/VEGFA/ERK1/2/NF- κ B signaling.

[Keywords] diabetes mellitus; atherosclerosis; platelet microparticles; vascular endothelial cells; miR-4306

糖尿病患者所引起的心血管疾病风险大约是正常人群的 3 倍,动脉粥样硬化是糖尿病性心血管疾病的主要病理疾病,其中主动脉血管内皮功能损伤在糖尿病所致的早期动脉粥样硬化中起关键作用^[1],一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平降低及内皮通透性增加等是糖尿病致心血管病变的重要原因。以往研究糖尿病与内皮功能损伤之间机制多集中于炎症、氧化应激、高血糖及胰岛素抵抗等。近年来,研究发现糖尿病 (diabetic mellitus, DM)、冠心病等疾病血小板激活明显增强,激活的血小板具有促凝作用,导致血管内皮损伤;血小板激活后能够产生血小板微颗粒 (platelet microparticles, PMPs), PMPs 黏附到血管壁释放花生四烯酸,介导炎症因子和黏附分子附着于内皮细胞,减少一氧化氮的合成和一氧化氮合酶的活性,损伤内皮功能,此外 PMPs 与低密度脂蛋白、脂肪酸相关,加重对内皮损伤,加速动脉粥样硬化的进展^[2-3]。DM 患者血浆中 PMPs 表达量明显升高,但 DM 合并早期动脉粥样硬化患者血浆中 PMPs 是否参与 DM 主动脉血管内皮损伤,其具体的作用机制是什么尚不清楚。本研究通过探讨分析 PMPs 在 DM 主动脉血管内皮损伤的作用及机制研究,以期为临床治疗糖尿病大血管并发症提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只 8~12 周龄健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重 (200 $\pm$ 20) g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2015-0123],所有实验动物均饲养于中国医学科学院实验动物研究所屏障动物房 SYXK 号 (京) 2019-0023],饲养环境为:温度 20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C,内外环境气压差 ≥ 10 Pa,相对湿度在 40% ~ 70%,照明强度在 15~20 lx,动物自由取食饮水。本

实验经过北京航天总医院 IACUC 的批准 (MAM17039);本研究依照 3R 原则 (the rules of 3R) 实施。

1.2 主要试剂与仪器

CD61 流式抗体 (美国 BD 公司);凝血酶、阿司匹林、Hepes (美国 Sigma 公司);RNA 提取试剂盒 Biozol、脱氧核糖核酸 (dNTP)、VEGFA、ERK、p-ERK、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ Bp65 及 GAPDH 鼠抗人单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司);鼠抗人单克隆抗体 eNOS、兔抗人多克隆抗体 Caspase-3 (Cell Signaling technology 公司)。FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司);HT7700 透射电镜 (日本 Hitachi 公司);实时定量 PCR 仪 (德国 eppendorf 公司);LKB-Bromma 2197 型电泳仪 (瑞典 LKB 公司);microlab 300 半自动化分析仪 (荷兰威图公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物造模及分组

60 只大鼠随机分为对照组 (NC 组, $n = 30$) 和 DM 组 (DM 组, $n = 30$)。其中 NC 组、DM 组均给予等体积的生理盐水。DM 组大鼠造模:高脂高糖饲料 (普通饲料中加入 10% 蔗糖、5% 蛋黄及 10% 炼猪油) 喂养,4 周后禁食 12 h,按照 45 mg/kg 经腹腔注射 STZ (溶于 pH = 4.4、浓度为 0.1 mmol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中),NC 组腹腔注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。于注射第 3 天通过尾静脉取血测定各组随机血糖。注射 STZ 后随机血糖仍高于 16.7 mmol/L 表明造模成功^[4]。所有动物待造模成功后,继续饲养 8 周。

1.3.2 PMPs 分离提取及鉴定

造模成功 8 周后,禁食 12 h,于第 2 天按照 50 mg/kg 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉处理,将收集的血液置于含有柠檬酸盐的 BD 管中,采用渐进性离心法制备无血小板血浆,以缺乏血小板血浆校准富

血小板血浆,调整血小板计数在 $10.0 \times 10^{10}/L$ 。采用 ADP ($10 \mu\text{mol}/L$) $20 \mu\text{L}$ 刺激富血小板血浆 15 min , $3700 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min 。弃去上清液,加入 PBS $80 \mu\text{L}$ 后将 PMPs 进行重悬,制得 PMPs 悬液。取 $20 \mu\text{L}$ PMPs 液和 $20 \mu\text{L}$ 富血小板血浆液于 2 个流式管中,分别加入 $5 \mu\text{L}$ APC-FITC-CD61 鼠抗人抗体。震荡摇匀后,室温避光孵育 30 min ,采用 1% 多聚甲醛进行固定。流式细胞术检测之前加入 $0.82 \mu\text{m}$ 标准微球 $5 \mu\text{L}$ 进行定位。每组 PMPs 通过分光光度计法测定 PMPs 中蛋白含量,调整每组 PMPs 蛋白含量在 $0.25 \text{ mg}/L$,用于后续各项实验。

1.3.3 大鼠主动脉 VECs 培养、鉴定

选取正常 SD 大鼠 3 只,无菌条件下打开胸腔,取胸主动脉置于无菌 D-Hanks 液中,取出外周结缔组织、残留血液。制备 VECs,将获得主动脉组织置于含有 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,培养 6 d 左右,弃去主动脉并换液。细胞原代培养至融合 80%,即传代,每隔 1 d 换液 1 次。细胞传第 2 代后,待细胞爬片生长融合至 70% 左右,用 4% 多聚甲醛固定,加入 3% 过氧化氢室温孵育, PBS 冲洗后加入非免疫山羊血清封闭 1 h,滴加 VIII 因子抗体 (1:100 稀释), 4°C 过夜。冲洗掉一抗后加入辣根过氧化物标记的兔抗鼠 IgG (1:500 稀释),经乙醇梯度洗脱,二甲苯透明后,中性树脂封片,采用 PBS 代替一抗作为阴性对照。每张盖玻片随机选择 5 个视野计数细胞。

1.3.4 VECs 与 PMPs 共培养

在 12 孔板中培养 VECs 至细胞融合 80% 左右,经 PBS 冲洗后,每孔加入 1 mL 不含抗生素的高糖 DMEM/F12,将不同组别的 PMPs 加入到细胞中,摇匀后放置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中,分别共培养 2、4、8、12 h 后收集细胞。采用 CCK-8 法检测不同时间 VECs 细胞增殖活性,以细胞活性抑制率达到 50% 左右 [(某一作用时间点-刚加药后)/刚加药后] 为最佳作用时间。

1.3.5 免疫荧光激光共聚焦检测内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 表达

取对数生长的 VECs,调整细胞数 $5 \times 10^4/L$ 并接种于置有盖玻片的 12 孔培养板中,待细胞贴壁以后按照各组别分别给予 PMPs 预处理,根据 1.3.4 项所确定的最佳作用时间孵育细胞后,经 3.5% 的多聚甲醛固定 10 min, 0.2% Triton X-100 冰上破膜 15 min,采用 3.0% 牛血清蛋白封闭抗原封闭 30 min,冲

洗后加入鼠抗人单克隆抗体 eNOS、兔抗人多克隆抗体 Caspase-3 后 4°C 孵育过夜,次日采用 FITC 二抗孵育 1 h,再经 DAPI 染核后在激光共聚焦显微镜下随机选取视野进行拍照,实验重复 3 次。

1.3.6 流式细胞术检测 VECs 凋亡情况

取对数生长的 VECs,调整细胞数为 $5 \times 10^4/L$ 并接种于置有盖玻片的 6 孔培养板中,待细胞贴壁以后按照各组别分别给予 PMPs 预处理,根据 1.3.4 项确定的最佳作用时间孵育细胞,培养结束后消化细胞,将细胞转移至 EP 管中离心 ($12000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min), PBS 冲洗后加入 binding buffer,调整细胞为每 mL 10^6 个,从中吸取 $500 \mu\text{L}$ 并加入 $2.5 \mu\text{L}$ AnnexinV 和 $5.0 \mu\text{L}$ PI,孵育 5 min 后,过 300 目筛上机检测。

1.3.7 qRT-PCR 检测 miR-4306 表达情况

将 $0.5 \mu\text{L}$ Has-micro-4306-mimics、microRNA-inhibitor-NC 以及 Has-micro-4306-inhibitor 分别与 $100 \mu\text{L}$ DMEM/F12 以及 $2 \mu\text{L}$ Lipofectamine 混合,将混合液按照每孔 $15 \mu\text{L}$ 接种于培养有 VECs 的 12 孔板上,培养 6 h 后更换培养基。加入不同组别 PMPs 后,后续按照 1.3.4 项中最佳最用时间继续培养细胞。按照处理方式不同分为正常 PMPs 组 (Ctrl 组)、正常 PMPs+MicroRNA-inhibitor-NC 组 (miR-NC 组)、正常 PMPs+Has-micro-4306-mimics 组 (mimic-NC 组)、正常 PMPs+Has-micro-4306-inhibitor 组 (inhibitor-NC 组)、模型 PMPs 组 (M 组)、模型 PMPs+MicroRNA-inhibitor-NC 组 (miR-M 组)、模型 PMPs+Has-micro-4306-mimics 组 (mimic-M 组)、模型 PMPs+Has-micro-4306-inhibitor 组 (inhibitor-M 组)。培养结束后,收集细胞。按照试剂盒要求提取各组细胞中总 RNA,严格按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit 逆转录 cDNA。反应体系: SYBR Premix Ex TaqTM II $10 \mu\text{L}$, PCR 引物 $2 \mu\text{L}$, DNA 模板 $2 \mu\text{L}$, DEPC 水 $6 \mu\text{L}$,总反应体系为 $20 \mu\text{L}$ 。每个样本设置 3 个复孔,PCR 反应条件: 95°C 预变性 20 s , 94°C 变性 5 s , 55°C 退火 45 s ,共进行 40 个循环。以 U6 作为内参,反应结束后计算每个基因的循环阈值 (Ct),同时与内参基因 U6 比较,确定各组基因表达水平。miR-4306 上游引物序列: $5' \text{-GCTAACCCGCCGACACTTTTCACCTTA-3'}$; 下游引物序列: $5' \text{-CGGTTTCGACAACCTATTTAGCTACA-3'}$, 基因片段大小 212 bp。内参 U6 上游引物序列: $5' \text{-GTCGCATCAGCTAGCTTTTCAGGCTA-3'}$; 下游引物

序列: 5'-GCCTATACGCTCGTCATCGGTAGT-3', 基因片段大小 124 bp。

1.3.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 VEGFA/ERK1/2/NF- κ B 信号通路相关蛋白

取各组细胞悬液经离心沉淀后, 收集细胞后加入 200 μ L 细胞裂解液 (含有蛋白酶抑制剂) 至冰上裂解 45 min, 再以 12000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 采用考马斯亮蓝进行总蛋白质定量。上清液中加入 1/4 倍量 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混合, 煮沸 7~8 min, 以 10% SDS-PAGE 胶体, 在 120 V 电压, 200 mA 恒定电流下电泳 2 h, 湿转至硝酸纤维素膜上。采用 5% 的脱脂奶粉 TBST 缓冲液封闭 (4 $^{\circ}$ C 过夜), 洗去封闭液, 加入鼠抗人 VEGFA、ERK、p-ERK、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ Bp65, TBST 洗膜 3 次后, 加入标记有辣根过氧化物酶二抗 (山羊抗小鼠 IgG) 室温孵育 1 h, 经 TBS 洗膜 3 次后, 将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面, 置于曝光试剂盒中曝光, 显影、定影等, 采用凝胶图像处理系统分析条带灰度值。扫描目标蛋白灰度值与 GAPDH 比较所得的灰度值比进行定量分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行分析处理。正态分布资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 Bonferroni's post t 检验, 基因检测结果 Δ Ct 值作图, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 行非参数检验, Δ Ct 值 = $Ct_{(miR-4306 \text{ 均值})} - Ct_{(U6 \text{ 均值})}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 中的 $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{(实验样本 miR-4306 \text{ 均值})} - Ct_{(实验样本 U6 \text{ 均值})})] - [(Ct_{(对照样本 miR-4306 \text{ 均值})} - Ct_{(对照样本 U6 \text{ 均值})})]$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMPs 与 VECs 分离、鉴定

采用 Western blot 及流式细胞检测法分析鉴定, 结果显示, 与富血小板血浆比, PMPs 中 CD61 表达明显升高 ($P < 0.05$), 见图 1A、1B。原代培养 VECs 结果显示, 细胞为“铺路石”样结构, 细胞经免疫组化染色后, 细胞质颜色明显加深, VIII 因子呈高表达, 因此鉴定细胞为 VECs, 见图 1C。

2.2 CCK-8 法检测 PMPs 对 VECs 细胞增殖活性的影响

研究结果显示, DM 组在 PMPs 作用 2 h 后, 与 0 h 比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), VECs 与 PMPs

共培养 4 h 后, 细胞出现明显的固缩变形, 细胞形态不完整, 有内陷, 结构破坏严重。当作用 4、8、12 h, 细胞抑制率分别为 48.44% (40.27% ~ 54.37%)、63.41% (57.69% ~ 72.33%)、66.26% (58.60% ~ 74.24%), 与 0 h 比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 因此选择作用 4 h 为最佳作用时间, 见图 2。

2.3 细胞凋亡情况分析

研究结果显示, DM 组细胞凋亡率 (51.23 ± 12.14)%, 与 NC 组 (9.27 ± 3.04)% 比差异有统计学意义 ($t = 12.547, P < 0.01$), 见图 3。

2.4 免疫荧光激光共聚焦检测 eNOS、Caspase-3 表达

免疫荧光激光共聚焦结果显示, DM 组 eNOS 阳性表达率 (82.54 ± 19.58)%, 与 NC 组 (42.55 ± 19.58)% 比差异有统计学意义 ($t = 12.336, P < 0.01$)。DM 组 Caspase-3 阳性表达率 (26.39 ± 7.91)%, 与 NC 组 (54.32 ± 11.07)% 比差异有统计学意义 ($t = 8.034, P < 0.01$), 见图 4。

2.5 Western blot 检测 VEGFA/ERK1/2/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达

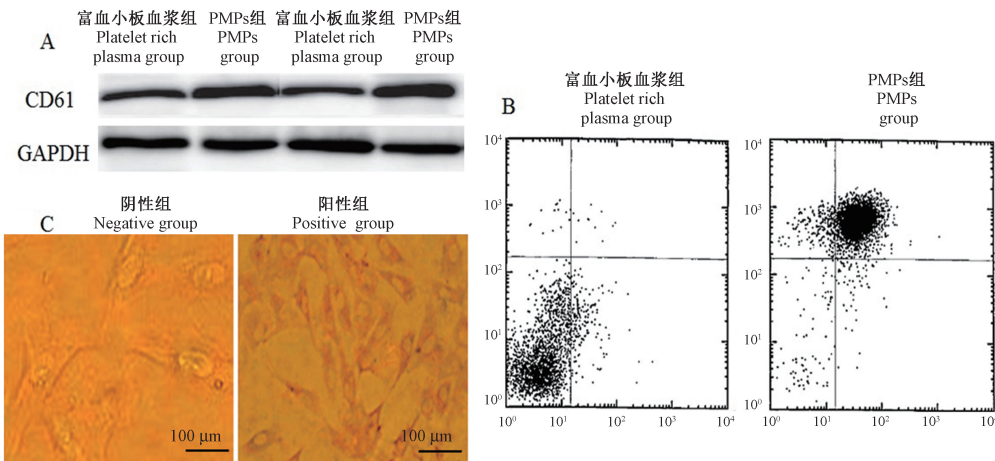
研究结果显示, mimic-NC 组、inhibitor-NC 组、M 组、miR-M 组、mimic-M 组 VEGFA、NF- κ Bp65、p-I κ B α 及 p-ERK 相对表达量与 Ctrl 组比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。mimic-M 组、inhibitor-M 组 VEGFA、NF- κ Bp65、p-I κ B α 及 p-ERK 相对表达量与 M 组比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 5。

2.6 qRT-PCR 检测 miR-4306 转染率情况

研究结果显示, mimic-NC 组、inhibitor-NC 组 miR-4306 相对表达量与 miR-NC 组比, 差异有统计学意义 ($t = 3.792, 4.496, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); mimic-M 组、inhibitor-M 组 miR-4306 相对表达量与 miR-M 组比, 差异有统计学意义 ($t = 3.821, 4.597, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。mimic-NC 组 miR-4306 相对表达量与 inhibitor-NC 组比, 差异有统计学意义 ($t = 6.794, P < 0.01$); mimic-M 组 miR-4306 相对表达量与 inhibitor-M 组比, 差异有统计学意义 ($t = 8.115, P < 0.01$)。M 组 miR-4306 相对表达量与 Ctrl 组比, 差异有统计学意义 ($t = 5.032, P < 0.01$), 见图 6。

3 讨论

DM 及其血管并发症的发病率逐年上升, 已成

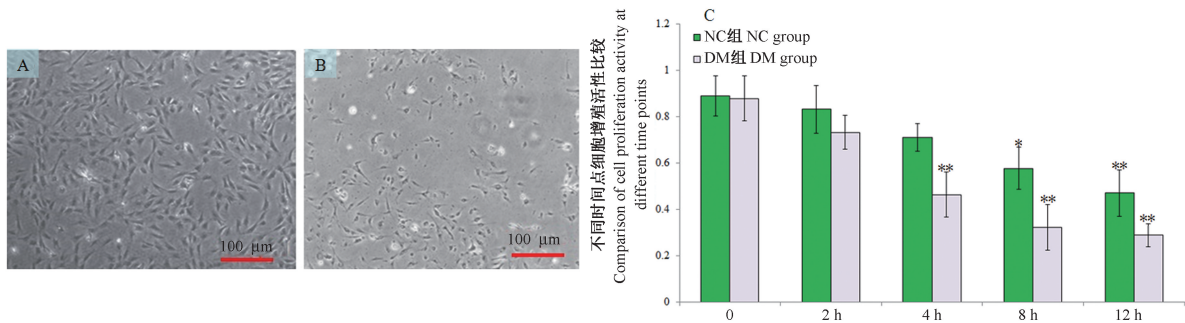


注:A:Western blot 检测 CD61 表达;B:流式细胞术检测 CD61 表达情况;C:免疫组化检测Ⅷ因子表达。

图 1 PMPs 及 VECs 的鉴定结果

Note. A, Western blot to detect CD61 expression. B, CD61 expression detected by flow cytometry. C, Immunohistochemical detection of factor Ⅷ expression.

Figure 1 Identification results of PMPs and VECs



注:A:NC 作用 4 h;B:DM 作用 4 h;C:不同作用时间的直方图。与作用 0 h 相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 CCK-8 法检测不同时间各组 PMPs 对 VECs 细胞增殖活性的影响

Note. A, NC action for 4 h. B, DM action for 4 h. C, Histogram of different action time. Compared with the effect 0 h, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 CCK-8 method to detect the effect of PMPs in each group on the proliferation activity of VECs at different times

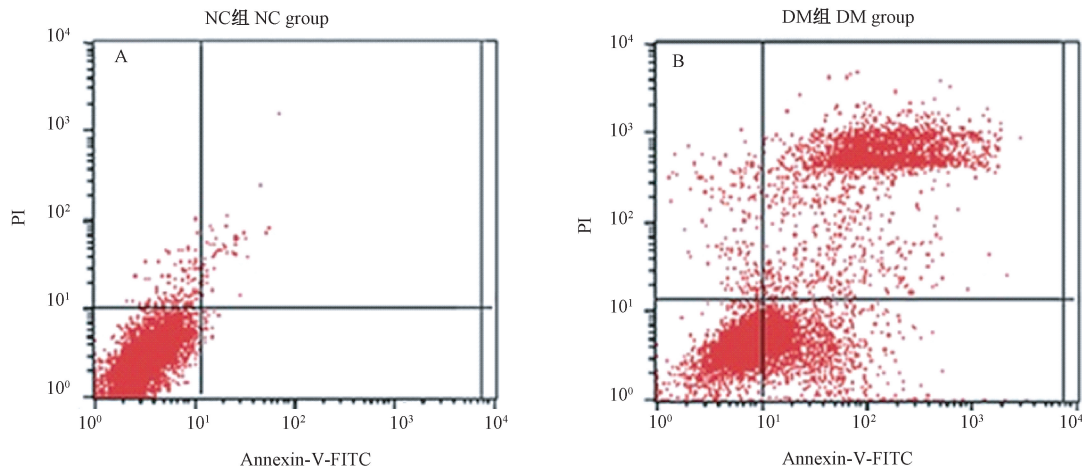


图 3 流式细胞术检测不同组别细胞凋亡情况

Figure 3 Flow cytometry to detect cell apoptosis in different groups

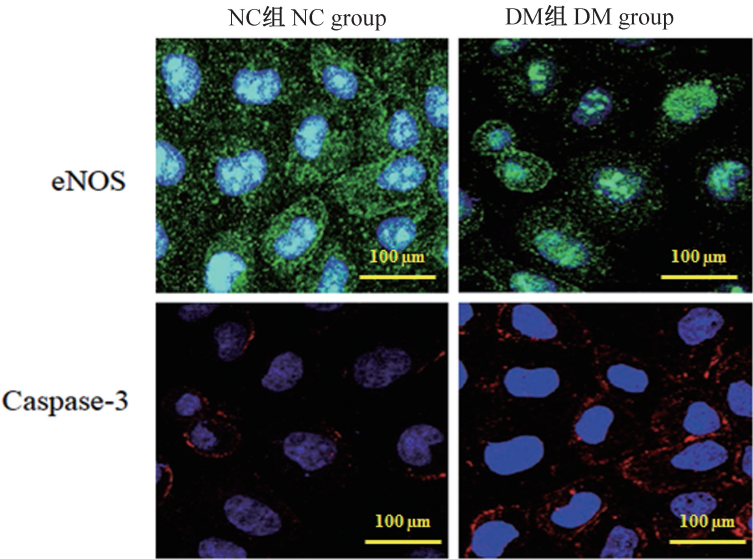
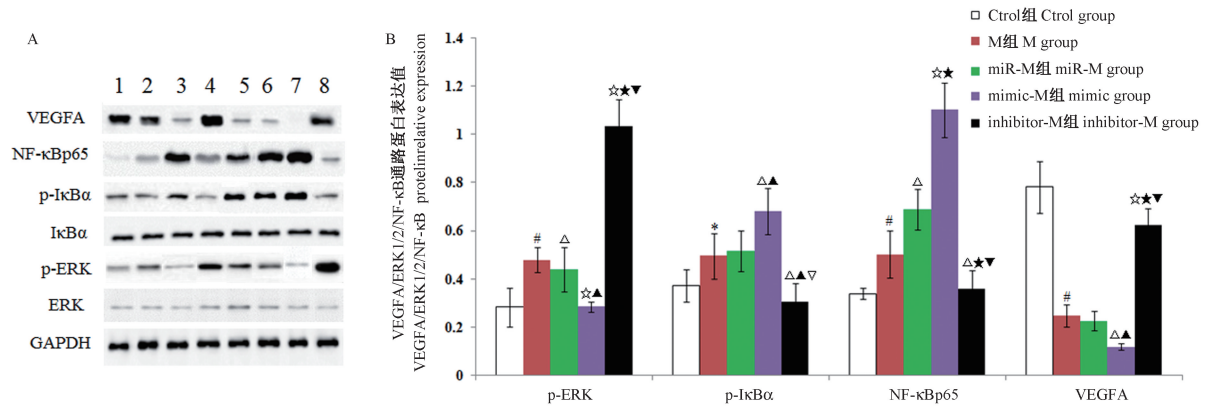


图 4 免疫荧光激光共聚焦显微镜检测 eNOS、Caspase-3 表达情况

Figure 4 Expression of eNOS and Caspase-3 detected by immunofluorescence laser confocal microscope



注:A:蛋白表达电泳图(1:Ctrl 组;2:miR-NC 组;3:mimic-NC 组;4:inhibitor-NC 组;5:M 组;6:miR-M 组;7:mimic-M 组;8:inhibitor-M 组);B:不同组别 p-ERK、p-IκBα、NF-κBp65、VEGFA 表达结果相比。与 Ctrl 组相比,* $P<0.05$,# $P<0.01$;与 M 组相比,Δ $P<0.05$,☆ $P<0.01$;与 miR-M 相比,▲ $P<0.05$,★ $P<0.01$;与 mimic-M 组相比,▽ $P<0.05$,▼ $P<0.01$ 。

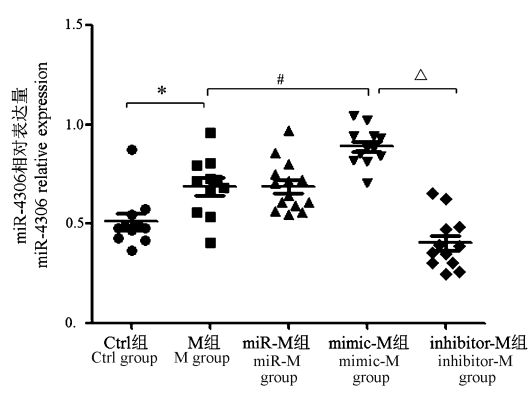
图 5 Western blot 检测 VEGFA/ERK1/2/NF-κB 信号通路相关蛋白表达

Note. A, Electrophoresis diagram (1, Ctrl group. 2, miR-NC group. 3, mimic-NC group. 4, inhibitor-NC group. 5, M group. 6, miR-M group. 7, mimic-M group. 8, inhibitor-M group.). B, Comparison of the expression results of p-ERK, p-IκBα, NF-κBp65 and VEGFA in different groups. Compared with Ctrl group, * $P<0.05$, # $P<0.01$. Compared with M group, Δ $P<0.05$, ☆ $P<0.01$. Compared with miR-M group, ▲ $P<0.05$, ★ $P<0.01$. Compared with mimic-M group, ▽ $P<0.05$, ▼ $P<0.01$.

Figure 5 Western blot detects the related proteins expression of VEGFA/ERK1/2/NF-κB signaling pathway

为全球亟待解决的热点课题。研究显示,DM 患者心血管死亡风险发生率较一般人员高三倍^[5]。动脉粥样硬化是糖尿病心血管疾病的病理生理障碍基础,内皮功能损伤在早期动脉粥样硬化中起关键作用^[6]。血小板活化后导致血小板收缩、变形以及形成伪足,变形后的一些细胞膜会以出芽的方式形

成小泡且脱落形成 PMPs^[7]。PMPs 水平异常与冠心病、DM、类风湿性关节炎、肿瘤等多种疾病的发生发展密切相关^[8]。研究显示,PMPs 主要通过 PMPs 携带的 RNA 和膜蛋白发挥免疫调节和生物信息传递作用,降低内皮的增殖、分化及迁移,已证实与动脉粥样硬化有关^[9-10]。DM 模型 PMPs 对血管内皮



注:与 Ctrl 组相比, * $P<0.05$;与 M 组相比, # $P<0.05$;与 mimic-M 组相比, Δ $P<0.05$ 。

图 6 qRT-PCR 检测不同组别 miR-4306 相对表达情况分析

Note. Compared with Ctrl group, * $P<0.05$. Compared with M group, # $P<0.05$. Compared with mimic-M group, Δ $P<0.05$.

Figure 6 Relative expression of miR-4306 in different groups detected by qRT-PCR

细胞增殖的影响及其作用机制如何值得研究。通过本研究发现,DM 模型 PMPs 与内皮细胞共孵育后,增殖活性随着时间明显降低,且在培养 4 h 后出现明显的细胞凋亡,细胞出现固缩边缘,细胞完整性明显被破坏,提示 DM 血浆中 PMPs 可能造成内皮细胞损伤。

研究发现,PMPs 能够降低细胞内一氧化氮表达从而介导炎症因子的表达,而这一作用与 eNOS 表达量显著相关^[11]。为了探讨 DM 模型血浆中 PMPs 造成血管内皮细胞损伤的原因是否与 eNOS 表达量有关,本研究采用激光共聚焦技术显示,经 DM 患者血浆 PMPs 处理的内皮细胞 (DM 组) 中 eNOS 阳性表达率显著低于正常大鼠血浆 PMPs 处理组 (NC 组),提示 DM 模型血浆中 PMPs 可能通过降低主动脉血管内皮细胞中 eNOS 表达量,导致 NO 水平降低,诱发细胞凋亡。已有研究显示,PMPs 能够诱导血管内中性粒细胞活化,而中性粒细胞中释放多种因子引起内皮细胞损伤,进而导致血管内皮通透性升高以及 Caspase-3 高表达,内皮细胞凋亡率则明显升高^[12],Caspase-3 的升高能激活核酸内切酶切割 DNA 并最终诱发细胞死亡。本研究发现,经 DM 患者血浆 PMPs 处理的内皮细胞 (DM 组) Caspase-3 阳性率显著高于正常大鼠血浆 PMPs 处理组 (NC 组),这一结果提示 DM 模型中 PMPs 参与了 DM 动脉血管内皮损伤,其主要原因可能与内皮细胞凋亡因子 Caspase-3 高表达及血管内皮细胞生

长因子低表达存在明显关系。

微小 RNA (miRNAs) 在多种疾病的发生发展中起着重要作用^[13]。miR-4306 是近年来新发现的一种 miRNAs,有研究发现,在冠状动脉疾病中人单核细胞衍生的巨噬细胞中 miR-4306 显著上调,而 miR-4306 表达上调可以通过 Akt/NF-κB 信号通路导致血管内皮损伤^[14-15]。NF-κB 是已经被证实为炎症诱发的关键因子,其调控信号通路被激活后将促进炎症因子等的高表达;VEGFA 是一种具有促进血管内皮细胞增殖作用的细胞因子,其能够激活 ERK 信号通路,促进血管细胞的生长、增殖。为了探讨 DM 模型中 PMPs 引血管内皮细胞凋亡原因是否与 miR-4306 表达有关,本研究采用 RT-PCR 技术检测不同组别中 miR-4306 表达情况。本研究加入了 miR-4306 模型剂和抑制剂,结果显示加入 mimic-4306 后,通过分析研究显示,经 DM 患者血浆 PMPs 处理的内皮细胞 (DM 组) 中 miR-4306 相对表达量显著升高,而 Has-micro-4306-mimics 和 Has-micro-4306-inhibitor 具有促进和抑制 miR-4306 表达的作用,提示 DM 模型血浆 PMPs 可能作用于 miR-4306,且该 miRNAs 对内皮细胞生长、凋亡产生作用。

为了进一步分析 PMPs 介导的 miR-4306 是否对下游 VEGFA/ERK1/2/NF-κB 信号通路中相关蛋白产生作用,本研究通过 Western blot 检测分析显示,与正常 PMPs 组 (Ctrl 组) 比较,DM 组 (M 组) 中 p-IκBα、NF-κBp65 表达量显著升高,而 p-ERK 及 VEGFA 则显著降低,加入 mimic-micro-4306 后,无论是正常 PMPs 组还是 DM 中 PMPs 组 p-IκBα、NF-κBp65 升高量更高,而加入 inhibitor-micro-4306 后 p-IκBα、NF-κBp65 降低明显、p-ERK 及 VEGFA 升高显著,同时 inhibitor-M 组与 inhibitor-NC 组具有统计学差异,提示 DM 血浆中 PMPs 能够通过 miR-4306 诱导 p-IκBα、NF-κBp65 升高,而降低 p-ERK 及 VEGFA 的作用,进而引起内皮细胞凋亡损伤,诱发动脉粥样硬化的发生发展,以上提示 DM 模型血浆 PMPs 可能一方面引起 miR-4306 高表达,进而促进 p-IκBα、NF-κBp65 水平升高,诱导炎症反应、引起细胞凋亡,另一方面降低促进血管内皮细胞生长因子表达量的降低,进而导致细胞生长受阻,引起细胞凋亡。

综上,DM 模型血浆中 PMPs 具有引起动脉血管内皮损伤的作用,其作用机制可能为 PMPs 作用于 miR-4306,进而激活 VEGFA/ERK1/2/NF-κB 信

号,从而诱导细胞凋亡、引起内皮细胞生长因子表达下降。

参考文献:

- [1] Zeinalova NV, Kurbanov YZ, Mirzazade VA, et al. The risk of cardiovascular death in type 2 diabetes [J]. *Klin Med (Mosk)*, 2017, 95(1):57-59.
- [2] Kyselova A, Hinrichsmeyer H, Zukunft S, et al. Association between arginase-containing platelet-derived microparticles and altered plasma arginine metabolism in polycystic ovary syndrome [J]. *Metabolism*, 2019, 90: 16-19.
- [3] Abbasian N, Herbert KE, Pawluczyk I, et al. Vesicles bearing gifts: the functional importance of micro-RNA transfer in extracellular vesicles in chronic kidney disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(5): F1430-F1443.
- [4] 宋军营, 贾亚泉, 吕靖, 等. 糖尿病对大鼠脑组织超微结构及微血管内皮相关因子表达的影响 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(10): 940-944.
- [5] 张健. 2 型糖尿病心血管疾病风险管理及利拉鲁肽的潜在优势 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(12): 1145-1148.
- [6] 洪天配, 母义明, 纪立农, 等. 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化性心血管疾病患者降糖药物应用专家共识 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2017, 2(6): 481-502.
- [7] Chen F, Liao Z, Peng D, et al. Role of platelet microparticles in blood diseases: future clinical perspectives [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2019, 49(2): 161-170.
- [8] Chen X. Rac1 regulates platelet microparticles formation and rheumatoid arthritis deterioration [J]. *Platelets*, 2019, 31(1): 112-119.
- [9] Bao H, Chen YX, Huang K, et al. Platelet-derived microparticles promote endothelial cell proliferation in hypertension via miR-142-3p [J]. *FASEB J*, 2018, 32(7): 3912-3923.
- [10] Christersson C, Thulin A, Siegbahn A. Microparticles during long-term follow-up after acute myocardial infarction. Association to atherosclerotic burden and risk of cardiovascular events [J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(8): 1571-1581.
- [11] Ye S, Shan XF, Han WQ, et al. Microparticles from patients undergoing percutaneous coronary intervention impair vasodilatation by uncoupling endothelial nitric oxide synthase [J]. *Shock*, 2017, 48(2): 201-208.
- [12] Wang GH, Ma KL, Zhang Y, et al. Caspase 3/ROCK1 pathway mediates high glucose-induced platelet microparticles shedding [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(2): 596-602.
- [13] Chang W, Wang J. Exosomes and their noncoding RNA cargo are emerging as new modulators for diabetes mellitus [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 853.
- [14] Yang Y, Luo H, Liu S, et al. Platelet microparticles-containing miR-4306 inhibits human monocyte-derived macrophages migration through VEGFA/ERK1/2/NF- κ B signaling pathways [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2019, 41(5):481-491.
- [15] 赵永波, 岳月红, 王彦芝, 等. miR-4306 通过 MAPK/ERK 信号通路抑制血管紧张素 II 诱导的主动脉夹层的形成 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(4): 405-410.

[收稿日期] 2020-10-22