

本文引用: 张松闯, 杨光辉, 张增辉, 等. 沉默 CDKN2B-AS1 调控 miR-98-5p、STAT3 对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(12): 1025-1032. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.12.003

[文章编号] 1007-3949(2022)30-12-1025-08

· 实验研究 ·

沉默 CDKN2B-AS1 调控 miR-98-5p、STAT3 对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的影响

张松闯, 杨光辉, 张增辉, 王传花

(河南医学高等专科学校附属医院 河南省第二人民医院心血管内科, 河南省新乡市 451191)

[摘要] **[目的]** 探讨细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2B 反义 RNA 1 (CDKN2B-AS1) 是否通过靶向 miR-98-5p 影响高糖诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 损伤。**[方法]** 将 HUVEC 分为对照组 (含 5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养)、模型组 (含 33.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养)、模型+si-NC 组、模型+si-CDKN2B-AS1 组、模型+miR-NC 组、模型+miR-98-5p 模拟物组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC 组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-98-5p 组。运用实时定量聚合酶链反应检测 HUVEC 的 CDKN2B-AS1、miR-98-5p 表达; Western blot 检测信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 蛋白表达; 流式细胞术检测细胞凋亡; 超氧化物歧化酶 (SOD)、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA) 试剂盒检测 SOD、LDH、MDA 水平。双荧光素酶报告实验分析 miR-98-5p 与 CDKN2B-AS1、STAT3 的靶向结合。**[结果]** 高糖使 HUVEC 中 CDKN2B-AS1、STAT3 表达、凋亡率、LDH、MDA 水平升高, miR-98-5p 表达、SOD 水平降低 ($P < 0.05$)。沉默 CDKN2B-AS1 或过表达 miR-98-5p 后, 高糖诱导的 HUVEC 中 CDKN2B-AS1、STAT3 表达、凋亡率、LDH、MDA 水平降低, miR-98-5p 表达、SOD 水平升高 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验显示, CDKN2B-AS1 靶向 miR-98-5p, miR-98-5p 靶向 STAT3。抑制 miR-98-5p 逆转了沉默 CDKN2B-AS1 对高糖诱导的 HUVEC 凋亡、氧化应激、STAT3 蛋白表达的抑制作用。**[结论]** 沉默 CDKN2B-AS1 通过调节 miR-98-5p/STAT3 轴抑制高糖诱导的 HUVEC 氧化应激和凋亡, CDKN2B-AS1 可作为糖尿病相关血管并发症的候选治疗靶标。

[关键词] 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2B 反义 RNA 1; miR-98-5p; 信号转导及转录激活因子 3; 高糖; 人脐静脉内皮细胞; 氧化应激; 细胞凋亡

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of silencing CDKN2B-AS1 to regulate miR-98-5p and STAT3 on high glucose-induced injury of human umbilical vein endothelial cell

ZHANG Songchuang, YANG Guanghui, ZHANG Zenghui, WANG Chuanhua

(Internal Medicine-Cardiovascular Department, Affiliated Hospital of Henan Medical College & Second People's Hospital of Henan Province, Xinzheng, Henan 451191, China)

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether cyclin-dependent kinase inhibitor 2B antisense RNA 1 (CDKN2B-AS1) affects high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) injury by targeting miR-98-5p. **Methods** HUVECs were divided into control group (cultured in DMEM containing 5 mmol/L glucose), model group (cultured in DMEM containing 33.5 mmol/L glucose), model+si-NC group, model+si-CDKN2B-AS1 group, model+miR-NC group, model+miR-98-5p mimic group, model+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC group, model+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-98-5p group. The expressions of CDKN2B-AS1 and miR-98-5p in HUVEC were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction; Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein expression was detected by Western blot; Apoptosis was detected by flow cytometry; Superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) kits were used to detect SOD, LDH, MDA levels. Targeted binding of miR-98-5p to CDKN2B-AS1 and STAT3 was analyzed by dual-luciferase reporter experiment. **Results** High glucose increased CDKN2B-AS1 and STAT3 expressions, cell apoptosis rate, LDH and MDA levels, and decreased miR-98-5p expression and SOD level in

[收稿日期] 2021-03-11

[修回日期] 2021-06-05

[作者简介] 张松闯, 主治医师, 研究方向为冠心病、心肌梗死、心力衰竭、心律失常和高血压等, E-mail: zwclbi@163.com。通信作者王传花, 主任医师, 研究方向为冠心病、心力衰竭、心律失常、高血压和心肌病, E-mail: zseys153@163.com。

HUVEC ($P < 0.05$). After silencing CDKN2B-AS1 or overexpressing miR-98-5p, high glucose-induced CDKN2B-AS1 and STAT3 expressions, cell apoptosis rate, LDH and MDA levels decreased, while miR-98-5p expression and SOD level increased in HUVEC ($P < 0.05$). Dual-luciferase reporter experiment results showed that CDKN2B-AS1 targeted miR-98-5p and miR-98-5p targeted STAT3. Inhibition of miR-98-5p reversed the inhibitory effects of CDKN2B-AS1 silencing on high glucose-induced HUVEC apoptosis, oxidative stress, and STAT3 protein expression. **Conclusion** Silencing CDKN2B-AS1 suppresses high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in HUVEC by regulating the miR-98-5p/STAT3 axis, and CDKN2B-AS1 may serve as a candidate therapeutic target for diabetes-related vascular complications.

[KEY WORDS] cyclin-dependent kinase inhibitor 2B antisense RNA 1; miR-98-5p; signal transducer and activator of transcription 3; high glucose; human umbilical vein endothelial cell; oxidative stress; apoptosis

糖尿病是一种常见的慢性代谢性疾病,严重危害人类健康。作为糖尿病病理改变的最初致病因素,高血糖导致的血管内皮损伤被认为是糖尿病血管并发症的早期事件之一^[1]。高血糖诱导的氧化应激诱发细胞死亡,损害血管生成,导致血管疾病^[2]。因此,探索新的调节因子以减轻高血糖对内皮细胞的损伤具有重要意义。长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是包含200多个核苷酸的非编码RNA分子,在患病的细胞和组织中均参与许多调节机制^[3-4]。lncRNA通过与微小RNA(microRNA, miRNA, miR)特异性结合参与表观遗传过程,并与糖尿病及其并发症有关^[5]。lncRNA细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2B反义RNA 1(cyclin-dependent kinase inhibitor 2B antisense RNA 1, CDKN2B-AS1)涉及多种病理过程,包括糖尿病及其并发症^[6]。CDKN2B-AS1的作用机制之一是与miRNA结合,miRNA是一种长度约22个核苷酸的非编码RNA,能参与基因表达的翻译后修饰^[7]。miRNA家族成员之一miR-98-5p参与糖尿病及其并发症的病理学过程^[8]。尽管关于CDKN2B-AS1和miR-98-5p在糖尿病及其并发症中作用的知识越来越丰富,但二者在糖尿病血管内皮细胞功能中的作用以及CDKN2B-AS1和miR-98-5p的靶向关系却知之甚少。信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)与糖尿病心血管并发症之一糖尿病性心肌病的细胞凋亡和氧化应激有关^[9];STAT3通路的抑制能保护人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)免受高糖诱导的细胞凋亡、氧化应激和炎症^[10]。本研究应用高葡萄糖模拟糖尿病环境,探讨CDKN2B-AS1和miR-98-5p对高糖诱导的HUVEC损伤的影响及潜在机制,并探索CDKN2B-AS1、miR-98-5p和STAT3之间的调节关系,为理解糖尿病血管并发症的发展提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

HUVEC购自武汉益普生物科技有限公司,Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司,蛋白酶抑制剂混合物购自美国Sigma-Aldrich公司,放射免疫沉淀法(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)裂解缓冲液、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白质检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自上海Beyotime公司,二抗购自Jackson ImmunoResearch公司,si-NC、si-CDKN2B-AS1、miR-NC、miR-98-5p模拟物、anti-miR-NC、miR-98-5p抑制剂(anti-miR-98-5p)购自上海吉玛公司,Dual-Glo荧光素酶检测系统试剂盒、SYBR Green购自美国Promega公司,M-MLV First Strand Kit购自美国Life Technologies公司,miScript反转录试剂盒购自德国Qiagen公司。

1.2 细胞培养

HUVEC于37℃、5%CO₂、95%空气环境中,在含10%(体积比)热灭活胎牛血清、0.1 U/L青霉素和0.1 μg/L链霉素的DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)培养基中培养。

1.3 细胞分组与转染

将对数生长期的HUVEC接种在带有6孔板的细胞培养皿中。12 h后细胞融合至60%~80%时弃去完全培养基,用无血清培养基洗涤细胞2~3次,然后在培养箱中用无血清培养基饥饿处理使细胞周期同步化。将HUVEC分为对照组、模型组、模型+si-NC组、模型+si-CDKN2B-AS1组、模型+miR-NC组、模型+miR-98-5p模拟物组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-98-5p组。对照组:HUVEC与含正常葡萄糖(5 mmol/L)的培养基孵育24 h;模型组:

HUVEC 与含高浓度葡萄糖(33.5 mmol/L)的培养基孵育 24 h^[11]。其余组依次将 si-NC、si-CDKN2B-AS1、miR-NC、miR-98-5p 模拟物、anti-miR-NC、anti-miR-98-5p 转染物加入孔中,再用含 33.5 mmol/L 葡萄糖的培养基孵育 24 h。

转染:将 1×10^6 个 HUVEC 接种到 6 孔板中后,将所有转染物与 Lipofectamine 2000 在无血清的 Opti-MEN 培养基中混合,然后将转染混合物添加到细胞中充分混合 6 h,再用含 33.5 mmol/L 葡萄糖的完全培养基替换转染溶液,并通过实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)验证转染 24 h 的效率。

1.4 qRT-PCR 检测 CDKN2B-AS1、miR-98-5p 表达

用 TRIzol 试剂提取 HUVEC 的总 RNA。为了制备 cDNA,用 M-MLV First Strand Kit 或 miScript 反转录试剂盒逆转录总 RNA。合成的 cDNA 与 SYBR Green 在 Bio-Rad CFX96 实时 PCR 系统上进行 qRT-PCR。分别以甘油醛 3 磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)或 U6 用作 CDKN2B-AS1、miR-98-5p 的内参,CDKN2B-AS1、miR-98-5p 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。引物序列如下:GAPDH, F: 5'-GACTCCACTCACGGCAAAT-TCA-3', R: 5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'; U6, F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3', R: 5'-AACGCTTCACGA ATTTGCGT-3'; CDKN2B-AS1, F: 5'-ACA-GAAGCCT ACGAAGAAGCTC-3', R: 5'-TGCATGGTG-GTGCATCTGTA-3'; miR-98-5p, F: 5'-ATCCAGTCCGT-GTCGTG-3', R: 5'-TGCTTGAGGTAGTAAGTTG-3'。

1.5 Western blot 检测 STAT3 蛋白表达

使用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解缓冲液从 HUVEC 中提取总蛋白,并使用 BCA 蛋白质检测试剂盒进行定量。蛋白质提取物经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移到聚偏氟乙烯膜上。之后,用 4% 脱脂牛奶将膜封闭 1 h,然后用 1:1 000 稀释的 STAT3 和 GAPDH 一抗在 4 °C 过夜。随后用辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下和膜孵育 1 h。冲洗后,将膜转移到 Bio-Rad ChemiDoc™ XRS 系统中,并用化学发光底物显影。蛋白条带强度通过 Image Lab™ 软件进行分析。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

收集 5×10^4 个 HUVEC,使用美国 BD Biosciences Pharmingen 公司的异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)膜联蛋白 V(Annexin V)/碘化丙锭(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂

盒测定 HUVEC 的凋亡,使用 BD FACS 流式细胞仪检测凋亡率。

1.7 SOD、LDH、MDA 水平检测

收集培养的 HUVEC 上清液,根据 SOD、LDH、MDA 试剂盒的操作说明书步骤检测 SOD、LDH、MDA 水平。

1.8 双荧光素酶报告实验

miR-98-5p 与 CDKN2B-AS1 或 STAT3 的互补序列分别在 Starbase 或 Targetscan 软件中预测。通过将靶标片段插入 PmirGLO 双荧光素酶载体来重建荧光素酶报告质粒。实验中使用野生型(wild type, WT)-CDKN2B-AS1、突变型(mutant type, MT)-CDKN2B-AS1、WT-STAT3 和 MT-STAT3 双荧光素酶报告质粒,上述质粒均包含 miR-98-5p 预测位点。将 1×10^5 个 HUVEC 接种在 24 孔板中过夜,用双荧光素酶报告质粒和 miR-NC 或 miR-98-5p 共转染,48 h 后使用 Dual-Glo 荧光素酶检测系统试剂盒进行双荧光素酶活性测定,以萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的荧光强度比值表示活性。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计与分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CDKN2B-AS1、miR-98-5p、STAT3 在 HUVEC 中的表达

与对照组相比,模型组 HUVEC 中 CDKN2B-AS1 和 STAT3 蛋白表达水平升高,miR-98-5p 表达水平降低($P < 0.05$);与模型组、模型+si-NC 组相比,模型+si-CDKN2B-AS1 组 HUVEC 中 CDKN2B-AS1 和 STAT3 蛋白表达水平降低,miR-98-5p 表达水平升高($P < 0.05$;图 1)。

2.2 沉默 CDKN2B-AS1 对高糖诱导的 HUVEC 凋亡率的影响

与对照组相比,模型组 HUVEC 凋亡率显著增加($P < 0.05$);与模型组、模型+si-NC 组相比,模型+si-CDKN2B-AS1 组 HUVEC 凋亡率显著减低($P < 0.05$;图 2)。

2.3 沉默 CDKN2B-AS1 对高糖诱导的 HUVEC 氧化应激的影响

与对照组相比,模型组 HUVEC 中 SOD 水平降低,LDH、MDA 水平升高($P < 0.05$);与模型组、模型+

si-NC 组相比, 模型 + si-CDKN2B-AS1 组 HUVEC 中 SOD 水平升高, LDH、MDA 水平降低 ($P < 0.05$; 图 3)。

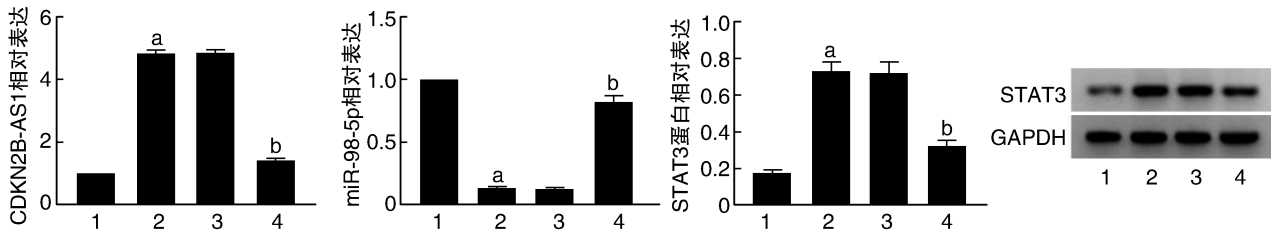


图 1. 各组 CDKN2B-AS1、miR-98-5p、STAT3 表达比较

1 为对照组; 2 为模型组; 3 为模型 + si-NC 组; 4 为模型 + si-CDKN2B-AS1 组。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与模型组、模型 + si-NC 组相比。

Figure 1. Comparison of the expressions of CDKN2B-AS1, miR-98-5p and STAT3 in each group

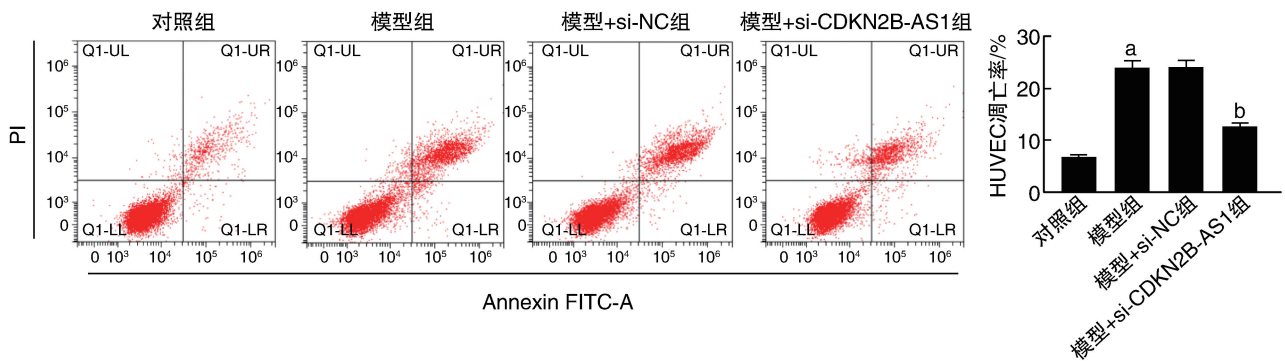


图 2. 沉默 CDKN2B-AS1 对高糖诱导的 HUVEC 凋亡率的影响

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与模型组、模型 + si-NC 组相比。

Figure 2. Effect of silencing CDKN2B-AS1 on high glucose-induced apoptosis rate in HUVEC

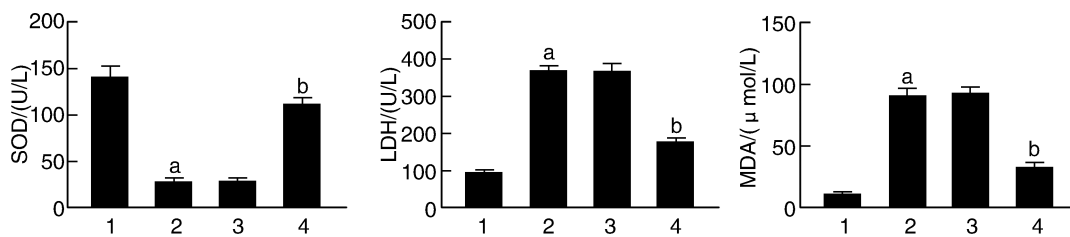


图 3. 沉默 CDKN2B-AS1 对高糖诱导的 HUVEC 氧化应激的影响

1 为对照组; 2 为模型组; 3 为模型 + si-NC 组; 4 为模型 + si-CDKN2B-AS1 组。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与模型组、模型 + si-NC 组相比。

Figure 3. Effect of silencing CDKN2B-AS1 on high glucose-induced oxidative stress in HUVEC

2.4 miR-98-5p 对高糖诱导的 HUVEC 凋亡及氧化应激的影响

模型 + miR-98-5p 模拟物组 HUVEC 中 miR-98-5p 表达水平高于模型组、模型 + miR-NC 组, STAT3 表达水平、凋亡率低于模型组、模型 + miR-NC 组, SOD 水平高于模型组、模型 + miR-NC 组, 而 LDH、MDA 水平低于模型组、模型 + miR-NC 组 ($P < 0.05$; 图 4)。

2.5 miR-98-5p 与 CDKN2B-AS1、STAT3 的靶向关系

miR-98-5p 与 CDKN2B-AS1 互补序列通过 Starbase 软件预测, miR-98-5p 与 STAT3 互补序列通过 Targetscan 软件预测。miR-98-5p 组 WT-CDKN2B-AS1、WT-STAT3 荧光素酶活性均比 miR-NC 组降低 ($P < 0.05$)。而 miR-98-5p 组与 miR-NC 组之间的 MT-CDKN2B-AS1、MT-STAT3 荧光素酶活性差异均无统计学意义 ($P = 0.829, P = 0.511$)。见图 5。

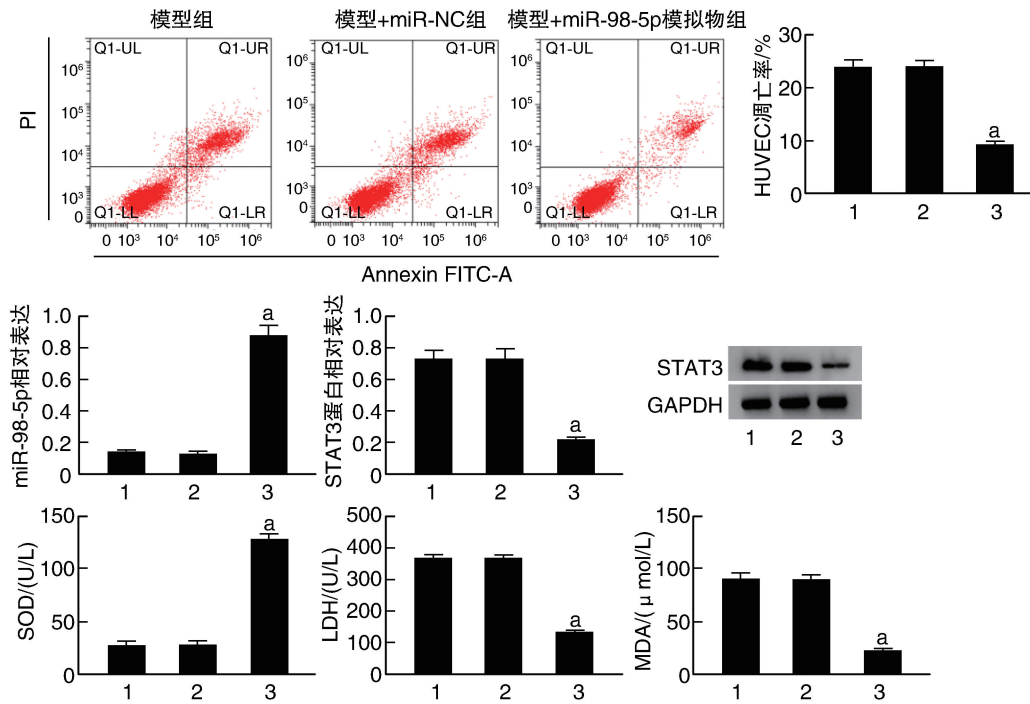


图 4. miR-98-5p 对高糖诱导的 HUVEC 凋亡及氧化应激的影响

1 为模型组;2 为模型+miR-NC 组;3 为模型+miR-98-5p 模拟物组。

a 为 $P < 0.05$, 与模型组、模型+miR-NC 组相比。

Figure 4. Effect of miR-98-5p on high glucose-induced HUVEC apoptosis and oxidative stress

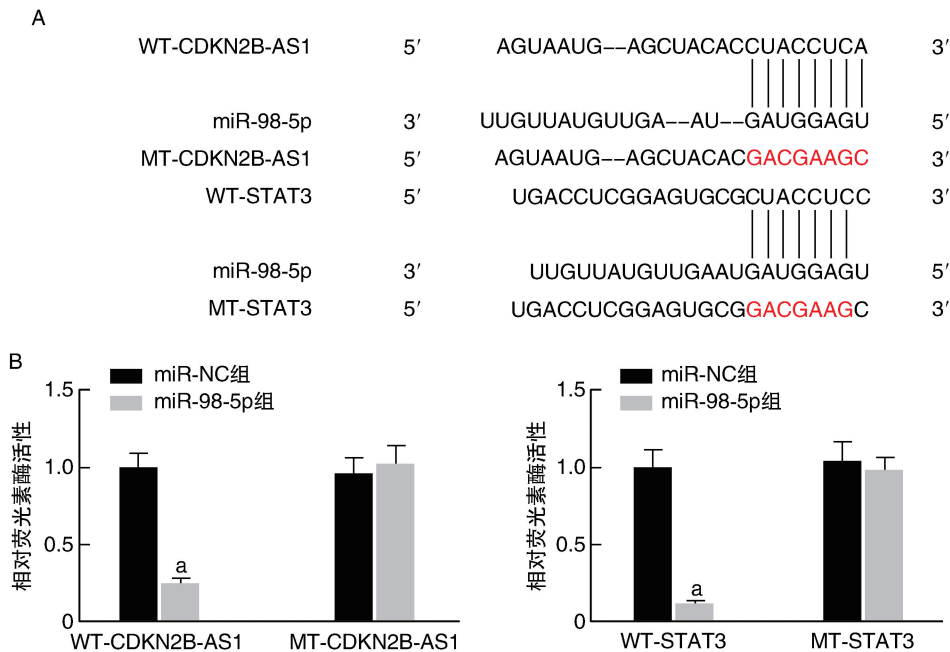


图 5. miR-98-5p 与 CDKN2B-AS1、STAT3 的互补序列及双荧光素酶报告实验

A 为 miR-98-5p 与 CDKN2B-AS1、STAT3 的互补序列;B 为双荧光素酶报告实验。a 为 $P < 0.05$, 与 miR-NC 组相比。

Figure 5. Complementary sequence of miR-98-5p with CDKN2B-AS1, STAT3 and dual-luciferase reporter experiment

2.6 抑制 miR-98-5p 对沉默 CDKN2B-AS1 的高糖诱导的 HUVEC 凋亡及 STAT3 蛋白表达的影响

模型+si-CDKN2B-AS1 组 HUVEC 的 miR-98-5p 表

达水平高于模型组,STAT3 表达水平、凋亡率低于模型组 ($P < 0.05$);模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-98-5p 组 HUVEC 的 miR-98-5p 表达水平低于模型+

si-CDKN2B-AS1 组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC 组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-98-5p 组, STAT3 表达水平、凋亡率高于模型+si-CDKN2B-AS1 组(图 6)。

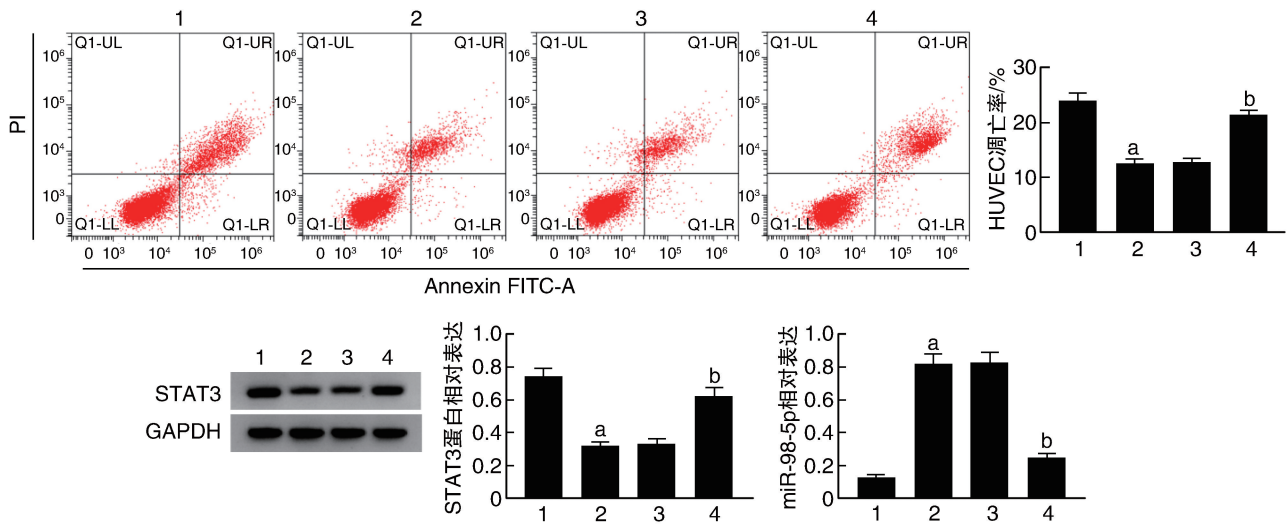


图 6. 抑制 miR-98-5p 对沉默 CDKN2B-AS1 的高糖诱导的 HUVEC 凋亡及 STAT3 蛋白表达的影响

1 为模型组;2 为模型+si-CDKN2B-AS1 组;3 为模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC 组;4 为模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-98-5p 组。
a 为 $P < 0.05$, 与模型组相比; b 为 $P < 0.05$, 与模型+si-CDKN2B-AS1 组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC 组相比。

Figure 6. Effect of inhibition of miR-98-5p on high glucose-induced apoptosis and STAT3 protein expression in HUVEC silenced by CDKN2B-AS1

2.7 抑制 miR-98-5p 对沉默 CDKN2B-AS1 的高糖诱导的 HUVEC 氧化应激的影响

模型+si-CDKN2B-AS1 组 HUVEC 的 SOD 水平高于模型组, LDH 和 MDA 水平低于模型组 ($P < 0.05$); 模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-98-5p 组

HUVEC 的 SOD 水平低于模型+si-CDKN2B-AS1 组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC 组, LDH 和 MDA 水平高于模型+si-CDKN2B-AS1 组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC 组 ($P < 0.05$; 图 7)。

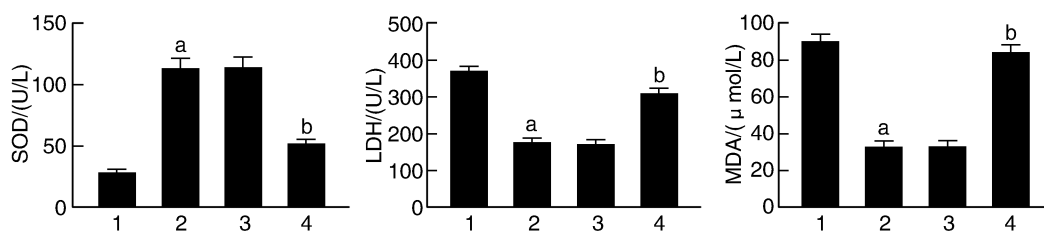


图 7. 抑制 miR-98-5p 对沉默 CDKN2B-AS1 的高糖诱导的 HUVEC 氧化应激的影响

1 为模型组;2 为模型+si-CDKN2B-AS1 组;3 为模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC 组;4 为模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-98-5p 组。
a 为 $P < 0.05$, 与模型组相比; b 为 $P < 0.05$, 与模型+si-CDKN2B-AS1 组、模型+si-CDKN2B-AS1+anti-miR-NC 组相比。

Figure 7. Effect of inhibition of miR-98-5p on high glucose-induced oxidative stress in HUVEC silenced by CDKN2B-AS1

3 讨论

报道指出,糖尿病引起的高血糖症破坏了内皮细胞的功能并导致血管并发症^[12]。因此,避免内皮细胞损伤是糖尿病血管并发症的治疗目的。了解高糖损伤血管内皮细胞的潜在机制将为糖尿病血管并发症的临床治疗提供重要参考。已知高葡萄

糖刺激血管内皮细胞损伤,导致细胞凋亡增加和氧化应激,伴随着 LDH、MDA 水平增加, SOD 活性降低^[13-14]。本研究首先确定了高糖对 HUVEC 的损伤,即高糖使细胞凋亡率、LDH、MDA 水平增加,而抗氧化酶 SOD 水平减少,与前人研究结果^[13-14]一致。

有学者研究表明,与多种人类疾病的发病机制

相关的 lncRNA 可以作为诱饵、信号或支架来结合 DNA、RNA 或蛋白质,从而发挥多种生物学功能^[15],并参与糖尿病血管并发症相关的细胞生物学过程^[16]。CDKN2B-AS1 已被证明在胃癌、结肠腺癌、宫颈癌、卵巢癌等各种恶性肿瘤中异常表达,也是糖尿病及其并发症中的重要调节剂^[17]。已经发现 CDKN2B-AS1 有助于糖尿病肾病的进展^[18]。在糖尿病患者和高糖刺激的人系膜细胞中,CDKN2B-AS1 上调。上调的 CDKN2B-AS1 与 miR-15b-5p 竞争性结合,通过诱导 WNT2B 的表达促进高糖诱导的人系膜细胞的细胞外基质积累和炎症反应^[19]。这些研究表明 CDKN2B-AS1 是高糖诱导的细胞损伤的不利因素,但 CDKN2B-AS1 在糖尿病血管内皮细胞损伤中的作用尚不清楚。本研究中,高糖使 HUVEC 的 CDKN2B-AS1 上调,沉默 CDKN2B-AS1 降低了高糖诱导的 HUVEC 凋亡、LDH、MDA 水平,升高了 SOD 水平,证实沉默 CDKN2B-AS1 可减轻细胞凋亡和氧化应激,具有保护高糖诱导的 HUVEC 损伤的作用。

已有研究证明 CDKN2B-AS1 作为竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)参与基因表达的调控^[20]。miR-98-5p 是一种调节氧化应激和细胞凋亡的应激相关 miRNA,并负调控下游相关蛋白的表达^[21-22]。Khan 等^[8]在 2 型糖尿病人血液样本检测到 miR-98-5p 的下调,miR-98-5p 的存在伴随着糖尿病角质形成细胞增殖的减少和凋亡的增加。有报道指出,高浓度葡萄糖降低了大鼠主动脉内皮细胞中 miR-98 的水平^[23]。另有报道发现,miR-98-5p 在急性心肌梗死细胞模型^[24]和脑缺血再灌注模型^[25]中表达下调;miR-98-5p 的上调降低了脑缺血再灌注小鼠脑组织中活性氧的产生并增强 SOD 活性,通过抗凋亡和抗氧化应激保护小鼠脑缺血再灌注损伤^[25]。本研究结果发现,miR-98-5p 在高糖诱导的 HUVEC 中下调,而在沉默 CDKN2B-AS1 后上调。使用 miR-98-5p 模拟物后, HUVEC 中 SOD 水平增强,细胞凋亡、LDH、MDA 水平减低,表明 miR-98-5p 在高糖诱导的 HUVEC 损伤中发挥保护作用。本研究还显示,CDKN2B-AS1 是 HUVEC 中 miR-98-5p 的 ceRNA,miR-98-5p 抑制剂逆转了沉默 CDKN2B-AS1 对高糖所致的 HUVEC 凋亡、氧化应激的抑制作用。表明 CDKN2B-AS1 通过靶向 miR-98-5p 调节高糖诱导的血管内皮细胞损伤。

此外,本研究发现 STAT3 可作为血管内皮细胞中 miR-98-5p 下游靶点。先前的研究显示,STAT3

信号通路的抑制有助于改善高糖诱导的细胞损伤^[26]。STAT3 被发现在高糖刺激的心肌细胞中高表达,STAT3 的抑制可阻断高糖引起的心肌细胞凋亡、氧化应激损伤^[27]。表明 STAT3 是糖尿病相关并发症的一个有利因子。在本研究中, HUVEC 中 STAT3 蛋白表达在高糖损伤后上调,但在沉默 CDKN2B-AS1 后或加入 miR-98-5p 模拟物时下调;通过双荧光素酶报告实验发现,miR-98-5p 与 STAT3 的部分核苷酸序列特异性结合;沉默 CDKN2B-AS1 后抑制 STAT3 蛋白表达的作用被 miR-98-5p 抑制剂所逆转。提示 CDKN2B-AS1 通过在 HUVEC 中靶向结合 miR-98-5p 来调节 STAT3 的表达。因此得出结论:CDKN2B-AS1 通过 miR-98-5p/STAT3 轴调节高糖诱导的血管内皮细胞损伤。

总之,本研究探索了高糖刺激的 HUVEC 中 CDKN2B-AS1、miR-98-5p 和 STAT3 的关系,发现沉默 CDKN2B-AS1 通过调节 miR-98-5p/STAT3 轴抑制高糖诱导的 HUVEC 氧化应激和凋亡,表明 CDKN2B-AS1 可作为糖尿病相关血管并发症的候选治疗靶标。

[参考文献]

- [1] HUANG K, YU X X, YU Y S, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes high glucose-induced inflammation and apoptosis of vascular endothelial cells by regulating miR-361-3p/SOCS3 axis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(5): 1243-1252.
- [2] ZHAO X, SU L, HE X Y, et al. Long noncoding RNA CA7-4 promotes autophagy and apoptosis via sponging miR-877-3P and miR-5680 in high glucose-induced vascular endothelial cells[J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 70-85.
- [3] ZHANG W Y, ZHENG J, HU X, et al. Dysregulated expression of long noncoding RNAs serves as diagnostic biomarkers of type 2 diabetes mellitus[J]. *Endocrine*, 2019, 65(3): 494-503.
- [4] HAN N, TIAN W, YU N, et al. YAP1 is required for the angiogenesis in retinal microvascular endothelial cells via the inhibition of MALAT1-mediated miR-200b-3p in high glucose-induced diabetic retinopathy[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 1309-1320.
- [5] LEUNG A, NATARAJAN R. Long noncoding RNAs in diabetes and diabetic complications[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(11): 1064-1073.
- [6] TORAIH E A, ABDELGHANY A A, ABD EL FADEAL N M, et al. Deciphering the role of circulating lncRNAs: RNCR2, NEAT2, CDKN2B-AS1, and PVT1 and the possible prediction of anti-VEGF treatment outcomes in diabetic reti-

- nopathy patients [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2019, 257(9): 1897-1913.
- [7] LI Y, ZHI K, HAN S, et al. TUG1 enhances high glucose-impaired endothelial progenitor cell function via miR-29c-3p/PDGF-BB/Wnt signaling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 441-453.
- [8] KHAN R, KADAMKODE V, KESHARWANI D, et al. Circulatory miR-98-5p levels are deregulated during diabetes and it inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting PPP1R15B in keratinocytes [J]. *RNA Biol*, 2020, 17(2): 188-201.
- [9] LIU C Y, HAN Y H, GU X M, et al. Paeonol promotes Opa1-mediated mitochondrial fusion via activating the CK2 α -Stat3 pathway in diabetic cardiomyopathy [J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102098.
- [10] CHEN J, ZHANG W, XU Q, et al. Ang-(1-7) protects HUVECs from high glucose-induced injury and inflammation via inhibition of the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2865-2878.
- [11] ZHANG S H, ZHANG S G, ZHOU P, et al. LncRNA MALAT1 affects high glucose-induced endothelial cell proliferation, apoptosis, migration and angiogenesis by regulating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8551-8559.
- [12] CHEN X, DUONG M N, PSALTIS P J, et al. High-density lipoproteins attenuate high glucose-impaired endothelial cell signaling and functions; potential implications for improved vascular repair in diabetes [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2017, 16(1): 121-129.
- [13] TIAN H, LI S, YU K. DJ-1 alleviates high glucose induced endothelial cells injury via PI3K/Akt-eNOS signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1205-1211.
- [14] 王锐凡, 雷欣安, 成高丽, 等. 鳄嘴花总黄酮对高糖诱导血管内皮细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2019, 11(9): 1077-1080.
WANG R F, LEI X A, CHENG G L, et al. Protective effect and mechanism of total flavonoids of *Clinacanthus nutans* for vascular endothelial injury induced by high glucose [J]. *Chin J Evid Based Cardiovasc Med*, 2019, 11(9): 1077-1080.
- [15] LETI F, DISTEFANO J K. Long noncoding RNAs as diagnostic and therapeutic targets in type 2 diabetes and related complications [J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8(8): 207-225.
- [16] CHEN Y, HE Y, ZHOU H. The potential role of lncRNAs in diabetes and diabetic microvascular complications [J]. *Endocr J*, 2020, 67(7): 659-668.
- [17] SONG C, QI Y, ZHANG J, et al. CDKN2B-AS1: an indispensable long non-coding RNA in multiple diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(41): 5335-5346.
- [18] THOMAS A A, FENG B, CHAKRABARTI S. ANRIL regulates production of extracellular matrix proteins and vasoactive factors in diabetic complications [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 314(3): E191-E200.
- [19] CHANG J, YU Y, FANG Z, et al. Long non-coding RNA CDKN2B-AS1 regulates high glucose-induced human mesangial cell injury via regulating the miR-15b-5p/WNT2B axis [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2020, 12(1): 109-119.
- [20] LIU F, XIAO Y, MA L, et al. Regulating of cell cycle progression by the lncRNA CDKN2B-AS1/miR-324-5p/ROCK1 axis in laryngeal squamous cell cancer [J]. *Int J Biol Markers*, 2020, 35(1): 47-56.
- [21] CHAN H W, YANG B, WONG W, et al. A pilot study on microRNA profile in tear fluid to predict response to anti-VEGF treatments for diabetic macular edema [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(9): 2920-2937.
- [22] SUN X, LI X, MA S, et al. MicroRNA-98-5p ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced neuronal injury by inhibiting Bach1 and promoting Nrf2/ARE signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1-4): 114-121.
- [23] LI X X, LIU Y M, LI Y J, et al. High glucose concentration induces endothelial cell proliferation by regulating cyclin-D2-related miR-98 [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(6): 1159-1169.
- [24] MA R, GAO L, LIU Y, et al. LncRNA TTTY15 knock-down alleviates H₂O₂-stimulated myocardial cell injury by regulating the miR-98-5p/CRP pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(1): 81-92.
- [25] YU S, ZHAI J, YU J, et al. miR-98-5p protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through anti-apoptosis and anti-oxidative stress in mice [J]. *J Biochem*, 2021, 169(2): 195-206.
- [26] SUN M, BU W, LI Y, et al. Danzhi Jiangtang Capsule ameliorates kidney injury via inhibition of the JAK-STAT signaling pathway and increased antioxidant capacity in STZ-induced diabetic nephropathy rats [J]. *Biosci Trends*, 2019, 12(6): 595-604.
- [27] 刘付贞, 潘德茂, 陈景福, 等. 柚皮苷抗高糖诱导的心肌细胞损伤作用与抑制 STAT3 通路有关 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(4): 345-350.
LIU F Z, PAN D M, CHEN J F, et al. Naringin protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting STAT3 pathway [J]. *Chin J Arterioscler*, 2014, 22(4): 345-350.

(此文编辑 曾学清)