

本文引用: 董国华, 杜银苹, 耿猛, 等. antagomiR-21 上调 SIRT1 激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路改善 T2DM 大鼠冠状动脉内皮依赖性舒张[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(9): 771-778. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.09.005.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-09-0771-08

• 实验研究 •

antagomiR-21 上调 SIRT1 激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路改善 T2DM 大鼠冠状动脉内皮依赖性舒张

董国华, 杜银苹, 耿猛, 李菲, 董国梁

(徐州市第一人民医院全科医学科, 江苏省徐州市 221000)

[摘要] **[目的]** 探讨 miR-21 抑制剂 antagomiR-21 调控沉默信息调节因子 1(SIRT1)对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠冠状动脉内皮依赖性舒张的影响及其机制。**[方法]** 以腹腔注射链脲佐菌素加高脂饲料喂养的方法建立 T2DM 大鼠模型,将 28 只成模大鼠随机分为模型组、antagomiR-NC 组、antagomiR-21 组、antagomiR-21+SIRT1 抑制剂 EX527 组,每组 7 只;另将 7 只普通饲料喂养的正常大鼠作为对照组。观察大鼠冠状动脉血流变化,采用离体血管环灌注技术观察大鼠冠状动脉的舒张功能。将体外培养的人冠状动脉内皮细胞(HCAEC)分为甘露醇组、高糖组、高糖+antagomiR-NC 组、高糖+antagomiR-21 组、高糖+antagomiR-21+EX527 组,采用 qRT-PCR 检测 miR-21、SIRT1 的 mRNA 表达,Western blot 检测 SIRT1、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)及其磷酸化蛋白的表达。**[结果]** 与对照组相比,T2DM 模型大鼠冠状动脉中 miR-21 水平升高 96.88%,而 SIRT1 蛋白和 mRNA 水平、冠状动脉流量分别降低 40.85%、64.29%、22.15% ($P<0.05$);与甘露醇组比较,体外高糖处理的 HCAEC 中 miR-21 表达升高 285.71%,SIRT1 蛋白和 mRNA 表达水平分别降低 44.78%、74.51% ($P<0.05$);antagomiR-21 干预后体内 miR-21 水平分别降低 77.42%、58.66%,SIRT1 蛋白水平分别升高 55.56%、91.43%,SIRT1 mRNA 水平分别升高 88.57%、97.30% ($P<0.05$);与模型组相比,antagomiR-21 干预后大鼠冠状动脉流量升高 19.23%, 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 及 10^{-5} mol/L 乙酰胆碱(Ach)诱导的大鼠冠状动脉舒张率分别升高 111.89%、41.88%、41.98%、30.01% ($P<0.05$), 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 及 10^{-5} mol/L 去氧肾上腺素(Phe)诱导的大鼠冠状动脉收缩率分别降低 36.71%、47.90%、49.19%、45.27% ($P<0.05$);antagomiR-21 干预后 HCAEC 中 PI3K、Akt、eNOS 的磷酸化水平较高糖组分别升高 48.48%、81.40%、134.29% ($P<0.05$);EX527 处理可明显逆转体内 antagomiR-21 引起的上述变化 ($P<0.05$)。**[结论]** antagomiR-21 可通过上调 SIRT1 表达激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路,从而改善 T2DM 大鼠冠状动脉内皮依赖性舒张。

[关键词] 2 型糖尿病; antagomiR-21; 沉默信息调节因子 1; 冠状动脉内皮依赖性舒张

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

AntagomiR-21 upregulates SIRT1 to activate PI3K/Akt/eNOS signal pathway and improves endothelium-dependent relaxation of coronary arteries in T2DM rats

DONG Guohua, DU Yinping, GENG Meng, LI Fei, DONG Guoliang

(Department of General Practice, Xuzhou First People's Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of antagomiR-21 on endothelium-dependent relaxation of coronary artery in type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats by regulating silent information regulator 1 (SIRT1) and its mechanism.

Methods T2DM rat model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin and fed with high-fat diet. 28 adult rats were randomly divided into model group, antagomiR-NC group, antagomiR-21 group, and antagomiR-21+SIRT1 inhibitor EX527 group, with 7 rats in each group; in addition, 7 normal rats fed with common diet were used as control group. The changes of coronary artery flow in rats were observed, and the diastolic effect of coronary artery in rats was observed by isolated vascular ring perfusion technique. Human coronary artery endothelial cells (HCAEC) were divided

[收稿日期] 2023-02-07

[修回日期] 2023-05-05

[基金项目] 徐州市重点研发计划项目(KC20151)

[作者简介] 董国华,硕士,医师,研究方向为 2 型糖尿病合并冠心病的影响因素分析,E-mail:ghxz0381@163.com。通信作者杜银苹,硕士,主治医师,研究方向为心血管疾病的诊疗,E-mail:yinpingzp@163.com。

into mannitol group, high glucose group, high glucose+antagomiR-NC group, high glucose+antagomiR-21 group, high glucose+antagomiR-21+EX527 group. The expression of miR-21 and SIRT1 mRNA was detected by qRT-PCR, and the expression of SIRT1, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its phosphorylated protein was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the levels of miR-21 in the coronary arteries of T2DM model rats increased by 96.88%, while the expression levels of SIRT1 protein and mRNA, and coronary artery flow decreased by 40.85%, 64.29% and 22.15%, respectively ($P<0.05$); compared with the mannitol group, *in vitro* high glucose treatment caused an increase of 285.71% in miR-21 expression in HCAEC, while the expression levels of SIRT1 protein and mRNA decreased by 44.78% and 74.51%, respectively ($P<0.05$). The intervention of antagomiR-21 resulted in a decrease of 77.42% and 58.66% in both *in vivo* and *in vitro* miR-21 levels, an increase of 55.56% and 91.43% in SIRT1 protein levels, and an increase of 88.57% and 97.30% in SIRT1 mRNA levels, respectively ($P<0.05$). Compared with the model group, the intervention of antagomiR-21 resulted in a 19.23% increase in coronary artery flow in rats, and a 111.89%, 41.88%, 41.98%, and 30.01% increase in coronary artery relaxation rate induced by 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L acetylcholine (Ach), respectively ($P<0.05$), and the coronary artery contraction rate in rats decreased by 36.71%, 47.90%, 49.19% and 45.27% induced by 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L phenylephrine (Phe) ($P<0.05$). After the intervention of antagomiR-21, the phosphorylation levels of PI3K, Akt and eNOS in HCAEC increased by 48.48%, 81.40% and 134.29%, respectively, compared to the high glucose group ($P<0.05$). EX527 treatment can significantly reverse the above changes caused by antagomiR-21 *in vitro* and *in vivo* ($P<0.05$). **Conclusion** AntagomiR-21 can activate the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway by upregulating SIRT1 expression, thereby improving endothelium-dependent relaxation of coronary artery in T2DM rats.

[**KEY WORDS**] type 2 diabetes mellitus; antagomiR-21; silent information regulator 1; endothelium-dependent relaxation of coronary artery

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种致残率和死亡率很高的慢性代谢疾病,常伴随包括冠状动脉粥样硬化性心脏病(即冠心病)在内的多种血管并发症,以高血糖为主要特征,我国患病人数高达1.298亿且呈逐年增加的趋势,严重影响着人们的身体健康^[1]。动脉粥样硬化是糖尿病血管并发症形成的基础,而血管内皮功能障碍被认为是动脉粥样硬化的必要初始阶段^[2],其发生与包括微小RNA(microRNA, miRNA)在内的多种基因的异常表达密切相关^[3-4]。miR-21是一种研究较为广泛的miRNA,在T2DM小鼠冠状动脉中表达上调,抑制其表达可改善小鼠冠状动脉内皮依赖性舒张^[5],但其改善血管内皮功能障碍的具体机制并不完全清楚。沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, SIRT1)是Sirtuin家族成员之一,在抵抗应激、介导凋亡、调控炎症反应和抗衰老等过程中发挥着重要作用,与包括血管内皮功能障碍在内的多种病理过程的发生密切相关^[6-7]。有研究指出,在肌痛性脑脊髓炎/慢性疲劳综合征中miR-21是内皮功能相关的miRNA,可通过转化生长因子 β (transformation growth factor- β , TGF- β)下调SIRT1表达影响内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)产生^[8]。然而,miR-21能否通过调控SIRT1介导冠状动脉内皮依赖性舒张未见报

道。miR-21抑制剂antagomiR-21已被广泛应用于包括T2DM在内的动物模型中,且可成功敲低体内miR-21水平^[9]。本研究旨在观察antagomiR-21改善冠状动脉内皮依赖性舒张是否与其调控SIRT1表达有关,并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

35只8周龄清洁级雄性SD大鼠,体质量180~220 g,购于江苏南京医科大学卫生检测中心,许可证号为SYXK(苏)2020-0006,并获得徐州医科大学动物实验伦理委员会批准(批准号为XYMU201-KL043-02)。人冠状动脉内皮细胞(human coronary artery endothelial cells, HCAEC)购于宁波明舟生物科技有限公司,antagomiR-21及对照寡核苷酸antagomiR-NC购于广州锐博生物科技有限公司,反转录试剂盒、SYBR Green PCR试剂盒购于德国Qiagen公司,引物购于上海生工生物工程有限公司,SIRT1抑制剂EX527购于美国Sigma-Aldrich公司,硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)购于美国Sigma公司,去氧肾上腺素(phenylephrine, Phe)购于美国Aladdin公司,高脂高糖饲料购于上海懋康生物科技有限公司,所有抗体购于美

国 CST 公司。解剖显微镜(型号:SZX10,日本 Olympus 公司),CO₂ 细胞培养箱(型号:C170,德国 Binder 公司),肌张力转换器(型号:JZ-100,北京新航兴业科贸有限公司),生物信号采集处理系统(型号:Medlab-U/4C501H,南京美易科技有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(型号:Light Cycler960,美国 Roche 公司),凝胶成像分析系统(型号:Gel Doc XR,美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 大鼠模型的构建及分组处理

所有大鼠在温度为 20~25℃、相对湿度为 40%~70%和 12 h 昼夜交替环境下适应性饲养 1 周后,随机取 7 只以普通饲料喂养,作为对照组;其余大鼠构建 T2DM 大鼠模型^[10]:以高脂高糖饲料(在普通饲料中添加 20%蔗糖、10%猪油、2.5%胆固醇和 1%胆酸钠)喂养 4 周后,禁食 12 h,腹腔注射 45 mg/kg 链脲佐菌素(streptozotocin,STZ);对照组注射等体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲剂(浓度为 0.1 mol/L)。注射 STZ 72 h 后,取尾静脉血测定空腹血糖,空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 时表示模型构建成功。将 28 只成模大鼠随机分为模型组、antagomiR-NC 组、antagomiR-21 组、antagomiR-21 + EX527 组,每组 7 只。其中,antagomiR-NC 组、antagomiR-21 组大鼠在造模成功后第 2 周分别经尾静脉注射 25 mg/kg antagomiR-NC、antagomiR-21, antagomiR-21 + EX527 组经尾静脉注射 25 mg/kg antagomiR-21 和 2 mg/kg EX527,而模型组和对照组则注射等量生理盐水,每周 2 次,持续 8 周。

1.3 HCAEC 培养及分组处理

以含 10%胎牛血清的 1640 培养基于 37℃、5%CO₂ 培养箱内常规培养 HCAEC,取长势良好的第 3 代对数生长期细胞进行实验。实验分为甘露醇组、高糖组、高糖+antagomiR-NC 组、高糖+antagomiR-21 组和高糖+antagomiR-21+EX527 组,每组设 6 个重复。其中,甘露醇组细胞以含 5 mmol/L 葡萄糖和 25 mmol/L 甘露醇的培养基培养,高糖组细胞以含 30 mmol/L 葡萄糖的培养基培养,高糖+antagomiR-NC 组、高糖+antagomiR-21 组细胞分别转染 antagomiR-NC、antagomiR-21 后以含 30 mmol/L 葡萄糖的培养基培养,高糖+antagomiR-21+EX527 组细胞转染 antagomiR-21 后以含 30 mmol/L 葡萄糖和 EX527 的培养基培养。

1.4 细胞转染

将 HCAEC 以每孔 500 个接种至 6 孔细胞板上,常规培养至 70%左右融合时,根据脂质体 2000 转染试剂说明书将 antagomiR-NC、antagomiR-21 转染

至 HCAEC 中,转染 6 h 后更换新鲜培养基,继续培养 48 h 后收集细胞,采用 qRT-PCR 检测 HCAEC 中 miR-21 的表达水平以评价 antagomiR-21 的转染效果。

1.5 离体心脏灌流检测冠状动脉流量

将大鼠以颈椎脱臼的方式处死后,开胸并将大鼠心脏及连通的主动脉根部快速剪下,将大鼠心脏(利用主动脉根部)固定在灌流装置上,观察记录大鼠冠状动脉每分钟的流量。

1.6 制备大鼠冠状动脉血管环

将大鼠以颈椎脱臼的方式处死后,分离大鼠冠状动脉并将其放入预冷的 Krebs 液中;将冠状动脉置于显微镜下继续分离,去除周围黏附组织后,把动脉剪成 1.5 mm 冠状动脉环,于-4℃保存备用。

1.7 qRT-PCR 检测大鼠冠状动脉 miR-21 表达

液氮研磨冠状动脉组织后,加入 Trizol 试剂(参照说明书)提取组织总 RNA;根据反转录试剂盒说明书将 RNA 合成双链 cDNA 后,按照 SYBR Green PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增实验,反应条件为:95℃预变性 40 s,95℃变性 40 s,60℃退火 40 s,72℃延伸 50 s,循环 45 次。引物序列:miR-21 上游序列为 5'-AGCTTATCAGACTGATGTTG-3',下游序列为 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3';U6 上游序列为 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3',下游序列为 5'-AAATATGGAACGCTTCACGA-3'。U6 为内参,2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-21 的相对表达水平。

1.8 离体大鼠冠状动脉血管舒缩功能测定

将冠状动脉环穿于 2 根钨丝(25 μm)上,并把钨丝固定在肌动扫描仪的器官浴槽(盛有 K-H 液)内,持续通入含 95%O₂、5%CO₂ 的混合气体;连接张力转换器后,调节基础张力为 1.5 mN,K-H 液平衡 1.5 h。Ach 诱导的舒张反应:向浴槽内加入 10⁻⁶ mol/L Phe 让动脉环收缩至基线后,加入 10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L Ach,记录每一浓度下的血管舒张幅度。SNP 诱导的舒张反应:向浴槽内加入 10⁻⁶ mol/L Phe 让动脉环收缩至基线后,加入 10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L SNP,记录每一浓度下的血管舒张幅度。Phe 诱导的收缩反应:加入 10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L Phe,记录每一浓度下的血管收缩幅度。

1.9 Western blot 检测相关蛋白表达

取待测冠状动脉组织或 HCAEC 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,测定浓度后,将蛋白样品与 1×上样缓冲液等体积混合后,置于沸水浴中变性 5 min;将蛋白样品行电泳分离后,行转膜、封闭处理;加入 SIRT1(1:2 000)、磷脂酰肌醇 3-激酶[(phosphati-

dylinositol 3-kinase, PI3K), 1 : 1 000], p-PI3K (1 : 1 000)、蛋白激酶 B [(protein kinase B, PKB/Akt), 1 : 1 000]、p-Akt (1 : 1 000)、p-eNOS (1 : 2 000)、eNOS (1 : 2 000) 和 GAPDH (1 : 1 000) 抗体, 4 ℃ 下孵育过夜, 在室温下以辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 10 000) 孵育 2 h。化学发光剂显影曝光后, 以 GAPDH 作为内参, 使用凝胶成像分析系统分析。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学分析软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间进一步两两比较则采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠冠状动脉和高糖处理的 HCAEC 中 miR-21、SIRT1 的表达

与对照组比较, 模型组大鼠冠状动脉中 miR-21 的表达水平升高 96.88%, 而 SIRT1 蛋白和 mRNA 的表达水平分别降低 40.85%、64.29% ($P < 0.05$); 与甘露醇组比较, 高糖处理可引起 HCAEC 中 miR-21 的表达水平升高 285.71%, SIRT1 蛋白和 mRNA 的表达水平分别降低 44.78%、74.51% ($P < 0.05$; 图 1)。

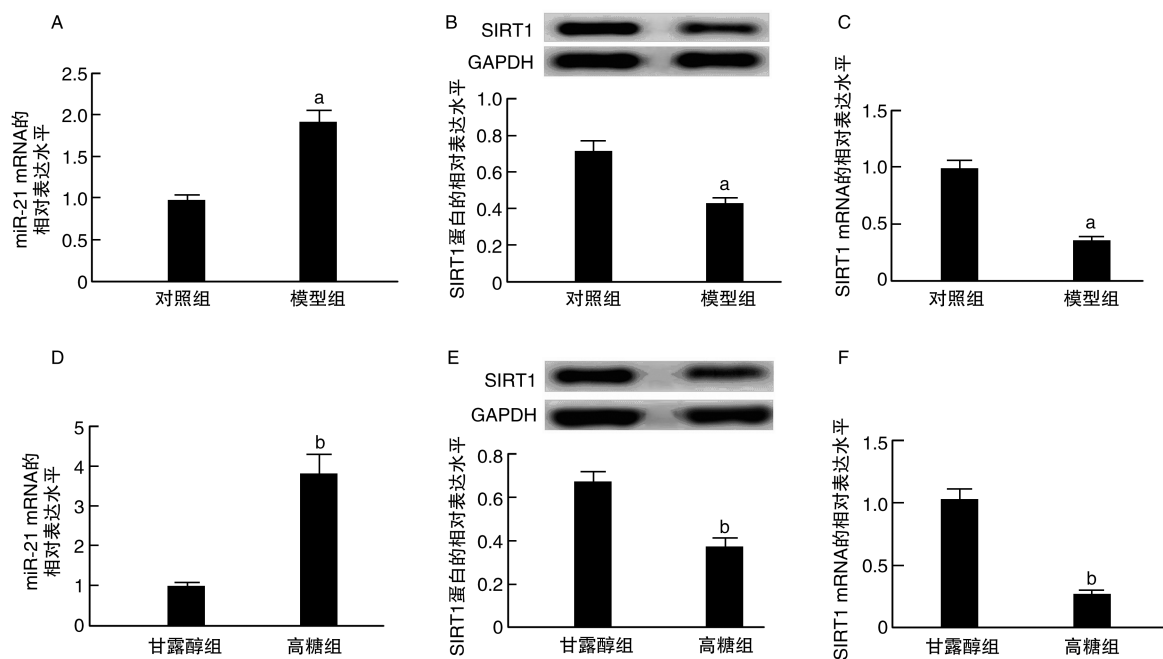


图 1. miR-21、SIRT1 在糖尿病大鼠冠状动脉和高糖处理的 HCAEC 中的表达

A、D 为 qRT-PCR 检测 miR-21 mRNA 表达, B、E 为 Western blot 检测 SIRT1 蛋白表达, C、F 为 qRT-PCR 检测 SIRT1 mRNA 表达。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与甘露醇组比较。

Figure 1. Expression of miR-21 and SIRT1 in coronary arteries and HCAEC treated with high glucose in diabetic rats

2.2 antagomiR-21 对糖尿病大鼠冠状动脉和高糖处理的 HCAEC 中 SIRT1 表达的影响

与模型组比较, antagomiR-NC 组大鼠冠状动脉中 miR-21 和 SIRT1 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与高糖组比较, 高糖+antagomiR-NC 组中 miR-21 和 SIRT1 的蛋白、mRNA 表达水平差异也无统计学意义 ($P > 0.05$); antagomiR-21 干预后体内 miR-21 的表达水平分别降低 77.42%、58.66%, SIRT1 蛋白表达水平分别升高 55.56%、91.43%, SIRT1 mRNA 表达水平分别升高 88.57%、97.30%

($P < 0.05$); EX527 干预后体内 SIRT1 蛋白表达水平分别降低 42.86%、43.28%, SIRT1 mRNA 表达水平分别降低 27.27%、23.29% ($P < 0.05$; 图 2)。

2.3 antagomiR-21 调控 SIRT1 表达对糖尿病大鼠冠状动脉流量的影响

模型组大鼠冠状动脉流量较对照组降低 22.15% ($P < 0.05$), 而 antagomiR-21 干预后大鼠冠状动脉流量较模型组升高 19.23% ($P < 0.05$), 但 EX527 干预后大鼠冠状动脉流量较 antagomiR-21 组降低 12.46% ($P < 0.05$; 图 3)。

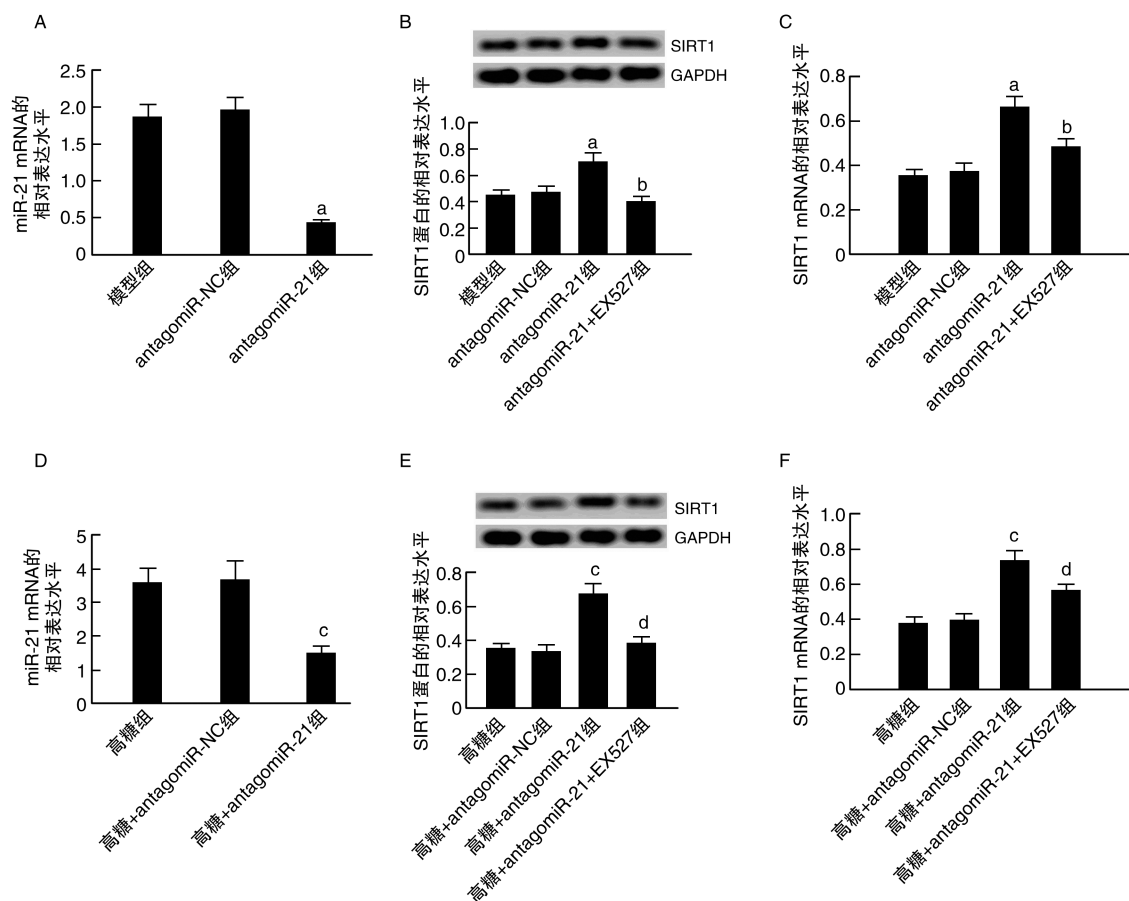


图 2. antagomiR-21 对冠状动脉和内皮细胞中 SIRT1 表达的影响

A, D 为 qRT-PCR 检测 miR-21 mRNA 表达, B, E 为 Western blot 检测 SIRT1 蛋白表达, C, F 为 qRT-PCR 检测 SIRT1 mRNA 表达。
a 为 $P < 0.05$, 与模型组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 antagomiR-21 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与高糖组比较; d 为 $P < 0.05$, 与高糖+antagomiR-21 组比较。

Figure 2. Effect of antagomiR-21 on SIRT1 expression in coronary arteries and endothelial cells

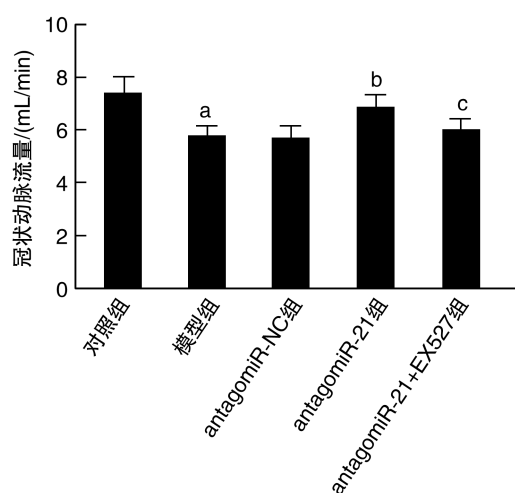


图 3. antagomiR-21 调控 SIRT1 表达对糖尿病大鼠冠状动脉流量的影响

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较;
c 为 $P < 0.05$, 与 antagomiR-21 组比较。

Figure 3. Effect of antagomiR-21 regulation of SIRT1 expression on coronary artery flow in diabetic rats

2.4 antagomiR-21 调控 SIRT1 对糖尿病大鼠冠状动脉舒缩功能的影响

与对照组比较, 模型组 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 及 10^{-5} mol/L Ach 诱导的大鼠冠状动脉舒张率分别降低 59.43%、38.19%、37.79%、31.93% ($P < 0.05$); 与模型组比较, antagomiR-21 干预后 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 及 10^{-5} mol/L Ach 诱导的大鼠冠状动脉舒张率分别升高 111.89%、41.88%、41.98%、30.01% ($P < 0.05$); 与 antagomiR-21 组比较, EX527 干预后 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 及 10^{-5} mol/L Ach 诱导的大鼠冠状动脉舒张率分别降低 38.52%、17.98%、16.74%、15.95% ($P < 0.05$; 图 4A); 各组大鼠冠状动脉对 SNP 诱导的非内皮依赖性舒张反应无明显差异 ($P > 0.05$; 图 4B)。模型组 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 及 10^{-5} mol/L Phe 诱导的大鼠冠状动脉收缩率较对照组分别升高 146.56%、259.49%、

309.21%、197.78% ($P < 0.05$), antagomiR-21 干预后 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 及 10^{-5} mol/L Phe 诱导的大鼠冠状动脉收缩率较模型组分别降低 36.71%、47.90%、49.19%、45.27% ($P < 0.05$),

EX527 干预后 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 及 10^{-5} mol/L Phe 诱导的大鼠冠状动脉收缩率较 antagomiR-21 组分别升高 34.70%、63.52%、46.36%、51.17% ($P < 0.05$; 图 4C)。

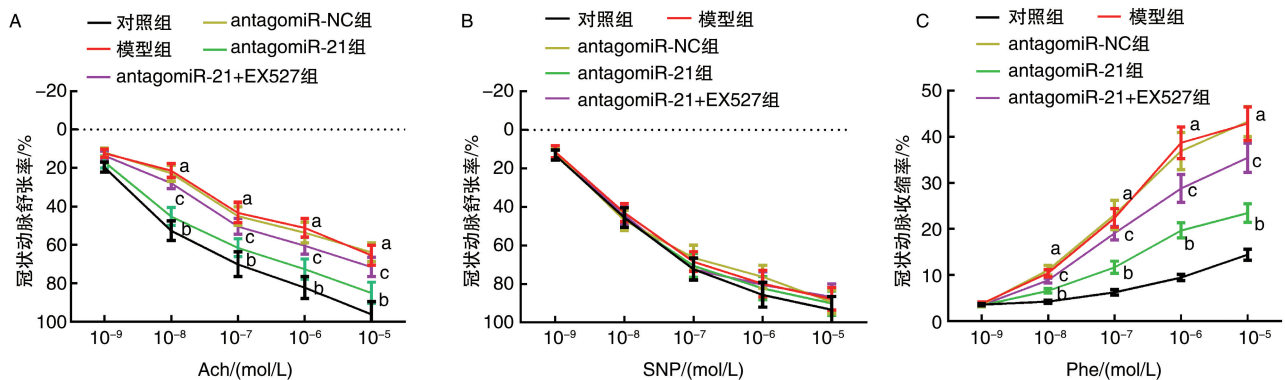


图 4. antagomiR-21 调控 SIRT1 对糖尿病大鼠冠状动脉舒缩功能的影响

A 为 ACh 诱导的大鼠冠状动脉舒张率, B 为 SNP 诱导的大鼠冠状动脉舒张率, C 为 Phe 诱导的大鼠冠状动脉收缩率。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 antagomiR-21 组比较。

Figure 4. Effect of antagomiR-21 regulation of SIRT1 on coronary artery systolic function in diabetic rats

2.5 antagomiR-21 调控 SIRT1 对高糖诱导的 HCAEC 中 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的影响

与甘露醇组比较, 高糖组细胞内 PI3K、Akt、eNOS 磷酸化水平分别降低 45.00%、54.74%、60.67% ($P < 0.05$); 与高糖组比较, antagomiR-21

干预后 PI3K、Akt、eNOS 磷酸化水平分别升高 48.48%、81.40%、134.29% ($P < 0.05$); EX527 干预后细胞内 PI3K、Akt、eNOS 磷酸化水平较高糖+antagomiR-21 组分别降低 28.57%、51.28%、45.12% ($P < 0.05$; 图 5)。

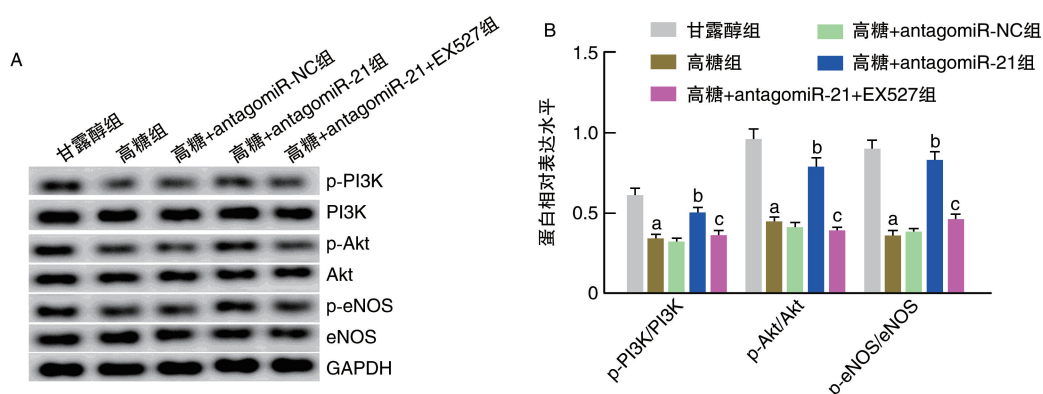


图 5. antagomiR-21 调控 SIRT1 对高糖诱导 HCAEC 中 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的影响

A 为 Western blot 检测 PI3K/Akt/eNOS 信号通路相关蛋白表达, B 为 PI3K、Akt、eNOS 磷酸化水平。

a 为 $P < 0.05$, 与甘露醇组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高糖组比较; c 为 $P < 0.05$, 与高糖+antagomiR-21 组比较。

Figure 5. Effect of antagomiR-21 regulation of SIRT1 on PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in HCAEC induced by high glucose

3 讨论

T2DM 是威胁人类身体健康的重要因素之一, 持续的高血糖可导致患者一氧化氮、eNOS 的生物

活性下调, 引起血管内皮功能障碍, 导致各种血管并发症的发生, 严重影响着患者的生命安全^[11-12]。血管内皮是血管稳态的关键调节剂, 维持血管舒张和血管收缩之间的平衡, 抑制和刺激平滑肌细胞的

迁移和增殖,纤维蛋白溶解和血栓形成,并参与调节血小板黏附和聚集;内皮功能障碍是糖尿病血管并发症发病的关键因素^[13],其发生与多种 miRNA 的调控密切相关。例如:miR-30 是糖尿病临床前模型中冠状动脉微血管功能障碍的循环生物标志物,具有促进脂肪酸 β 氧化和内皮细胞功能障碍的作用^[14];miR-181b 在糖尿病患者的肾动脉中水平降低,而转染 miR-181b 模拟物上调 miR-181b 表达可改善糖尿病小鼠主动脉中的内皮依赖性血管舒张^[15];高血糖显著改变了内皮/主动脉中 miR-34a 的表达,而抑制 miR-34a 表达可通过激活 SIRT1 挽救高血糖引起的炎症、氧化应激和内皮功能障碍^[16]。

miR-21 是一种与心血管疾病发生密切相关的 miRNA,被证实抑制其表达可改善 T2DM 冠状动脉内皮依赖性舒张,保护血管内皮功能^[5]。SIRT1 是一种营养感应脱乙酰酶,在糖尿病中下调,激活其表达在缓解糖尿病引起的全身和微血管功能障碍中发挥着重要作用^[17]。有研究指出,四氯化碳诱导的急性肝损伤和轻度烧伤引起的肺损伤的改善均与 miR-21 下调激活 SIRT1 表达有关^[18-19];miR-21 可通过调控 TGF- β 和 TNF- α 通路下调内皮细胞中 SIRT1 的表达^[8]。本研究中,miR-21 在 T2DM 大鼠冠状动脉中表达上调,而 SIRT1 表达下调;同时,体外高糖处理下的 HCAEC 中也观察到了同样的结果;antagomiR-21 干预可引起体内外 SIRT1 表达升高,大鼠冠状动脉流量回升,并改善大鼠冠状动脉环对 Ach 诱导的内皮依赖性血管舒张和对 Phe 诱导的内皮依赖性血管收缩,而 EX527 干预可逆转 antagomiR-21 的上述作用。这表明,antagomiR-21 可通过激活 SIRT1 表达改善大鼠冠状动脉舒缩功能。

NO 是人体内重要的血管舒张因子,其生物利用度降低是导致内皮依赖性血管舒张功能障碍的主要特征^[20];eNOS 是一种合成 NO 的限速酶,在内皮细胞上广泛表达,负责产生 NO,其活化可促进 NO 生成与释放,发挥血管保护作用^[21]。PI3K/Akt/eNOS 信号通路是一条与内皮细胞功能关系密切的通路,PI3K 是细胞内重要的信号蛋白酶,可因二聚体构象的改变而被激活,进而引起下游 Akt 磷酸化,从而促进 Akt 信号通路的活化;而活化的 Akt 通路可进一步磷酸化 eNOS 而调节 eNOS 活性^[22],激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路可改善内皮依赖性血管舒张损伤^[23-24]。有研究指出,在高糖诱导的人脐静脉内皮细胞中,增加 SIRT1 表达可促进 PI3K/Akt/eNOS 信号激活^[25];在神经胶质瘤中,SIRT1 沉默可

通过调控 PTEN 诱导 PI3K/Akt 通路失活^[26]。本研究发现,antagomiR-21 干预可上调高糖作用下 HCAEC 中 PI3K、Akt、eNOS 磷酸化水平,而 EX527 可明显逆转 antagomiR-21 对 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的影响。提示 antagomiR-21 通过上调 SIRT1 表达引起 PI3K/Akt/eNOS 信号通路活化,进而改善 T2DM 冠状动脉舒缩功能。

总之,antagomiR-21 可通过上调 SIRT1 表达激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路改善 T2DM 冠状动脉舒缩功能,antagomiR-21 有望成为防治糖尿病血管病变的潜在药物。

[参考文献]

- [1] 王喜鸟,姚文慧,潘珍珍,等.淫羊藿苷改善糖尿病小鼠血管功能的作用及其机制[J].中国药科大学学报,2022,53(2):215-221.
WANG X N, YAO W H, PAN Z Z, et al. Protective effects and mechanism of icariin against vascular function in diabetic mice[J]. J Chin Pharm Univ, 2022, 53 (2): 215-221.
- [2] GAO J R, QIN X J, FANG Z H, et al. To explore the pathogenesis of vascular lesion of type 2 diabetes mellitus based on the PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Diabetes Res, 2019, 2019: 4650906.
- [3] RUI X, WU X, RONG Z, et al. Upregulation of lncRNA GASL1 inhibits atherosclerosis by regulating miR-106a/LKB1 axis[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2023, 23(1): 11.
- [4] TANASHYAN M M, SHABALINA A A, KUZNETSOVA P I, et al. miR-33a and its association with lipid profile in patients with carotid atherosclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6376.
- [5] JUGUILON C, WANG Z, WANG Y, et al. Mechanism of the switch from NO to H₂O₂ in endothelium-dependent vasodilation in diabetes[J]. Basic Res Cardiol, 2022, 117(1): 1-25.
- [6] 周丰,陈野,陈晨,等.沉默信息调节因子1调控牙周炎发生发展的机制[J].国际口腔医学杂志,2021,48(3):341-346.
ZHOU F, CHEN Y, CHEN C, et al. Mechanism of sirtuin 1 in regulating periodontitis[J]. Int J Stomatol, 2021, 48(3): 341-346.
- [7] HU B X, GONG Z S, BI Z H. Inhibition of miR-383 suppresses oxidative stress and improves endothelial function by increasing sirtuin 1[J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(2): e8616.
- [8] BLAUENSTEINER J, BERTINAT R, LEÓN L E, et al. Altered endothelial dysfunction-related miRs in plasma from ME/CFS patients[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 10604.
- [9] WANG Y, YANG L Z, YANG D G, et al. MiR-21 antagomir improves insulin resistance and lipid metabolism disorder in streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus rats[J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(2): 394-404.
- [10] 陈文文,白春英,谢小超,等. miR-141 与 2 型糖尿病大鼠血糖水平的关系及其作用机制研究[J].中国糖尿病杂志,2020,28(2):133-139.
CHEN W W, BAI C Y, XIE X C, et al. Relationship between miR-141 and blood glucose levels in rats with type 2 diabetes and its mechanism[J]. Chin J Diabetes, 2020, 28(2): 133-139.
- [11] ZHANG L, JIANG F, XIE Y, et al. Diabetic endothelial microangiopathy and pulmonary dysfunction[J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1073878.

- [12] 刘莉芳, 赵 桁, 张云良, 等. 2 型糖尿病患者血清 Nesfatin-1、HSP60 与下肢血管病变的相关性研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(11): 965-970.
- LIU L F, ZHAO H, ZHANG Y L, et al. Study on the correlation between serum Nesfatin-1, HSP60 and lower extremity vascular disease in patients with type 2 diabetes[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(11): 965-970.
- [13] POPYHOVA E B, STEPANOVA T V, LAGUTINA D D, et al. The role of diabetes in the onset and development of endothelial dysfunction[J]. Probl Endokrinol, 2020, 66(1): 47-55.
- [14] VEITCH S, NJOCK M S, CHANDY M, et al. MiR-30 promotes fatty acid beta-oxidation and endothelial cell dysfunction and is a circulating biomarker of coronary microvascular dysfunction in pre-clinical models of diabetes[J]. Cardiovasc Diabetol, 2022, 21(1): 31.
- [15] CHENG C K, SHANG W B, LIU J, et al. Activation of AMPK/miR-181b axis alleviates endothelial dysfunction and vascular inflammation in diabetic mice[J]. Antioxidants, 2022, 11(6): 1137.
- [16] WU J, LIANG W, TIAN Y, et al. Inhibition of P53/miR-34a improves diabetic endothelial dysfunction via activation of SIRT1[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3538-3548.
- [17] VIEIRA C P, HAMMER S S, MCFARLAND D, et al. Fasting and fasting-mimicking treatment activate SIRT1/LXR α and alleviate diabetes-induced systemic and microvascular dysfunction[J]. Diabetologia, 2021, 64(7): 1674-1689.
- [18] 侯延丽, 王 鹏, 王娅宁. 芍药色素下调 miR-21 并激活 SIRT1/FOXO1 通路进而保护 CCl₄ 诱导的大鼠急性肝损伤[J]. 毒理学杂志, 2021, 35(5): 405-411.
- HOU Y L, WANG P, WANG Y N. The protective effect of peonidin through SIRT1/FOXO1 pathway via miR-21 on CCl₄-induced acute liver injury in rats[J]. J Toxicol, 2021, 35(5): 405-411.
- [19] XU Z Y, XIE X H, TIAN J, et al. Down-regulation of miR-21 alleviates lung injury induced by burns through activating silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1)-protein kinase B (Akt)-nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway[J]. J Biomater Tissue Eng, 2020, 10(4): 576-581.
- [20] LEE Y N, IM E. Regulation of miRNAs by natural antioxidants in cardiovascular diseases: focus on SIRT1 and eNOS[J]. Antioxidants, 2021, 10(3): 377.
- [21] SIRAGUSA M, OLIVEIRA JUSTO A F, MALACARNE P F, et al. VE-PTP inhibition elicits eNOS phosphorylation to blunt endothelial dysfunction and hypertension in diabetes[J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(6): 1546-1556.
- [22] 郭 芬. 柚皮苷调控 PI3K/Akt/eNOS 通路控制 2 型糖尿病大鼠脑血管内皮氧化损伤的作用探讨[J]. 安徽医药, 2021, 25(4): 645-648.
- GUO F. Naringin regulates PI3K/Akt/eNOS pathway to control cerebral vascular endothelial oxidative damage in type 2 diabetic rats[J]. Anhui Med Pharm J, 2021, 25(4): 645-648.
- [23] WANG P, TIAN X, TANG J, et al. Artemisinin protects endothelial function and vasodilation from oxidative damage via activation of PI3K/AKT/eNOS pathway[J]. Exp Gerontol, 2021, 147: 111270.
- [24] CARRIZZO A, CONTE G M, SOMMELLA E, et al. Novel potent decameric peptide of spirulina platensis reduces blood pressure levels through a PI3K/AKT/eNOS-dependent mechanism[J]. Hypertension, 2019, 73(2): 449-457.
- [25] HUANG L, CAI H A, ZHANG M S, et al. Ginsenoside Rg1 promoted the wound healing in diabetic foot ulcers via miR-489-3p/Sirt1 axis[J]. J Pharmacol Sci, 2021, 147(3): 271-283.
- [26] DING Y, WANG J, ZHANG H, et al. Long noncoding RNA-GASS attenuates progression of glioma by eliminating microRNA-10b and Sirtuin 1 in U251 and A172 cells[J]. Biofactors, 2020, 46(3): 487-496.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 761 页)

- [24] KAUR T, MADGULKAR A, BHALEKAR M, et al. Molecular docking in formulation and development[J]. Curr Drug Discov Technol, 2019, 16(1): 30-39.
- [25] WANG J, WANG W N, XU S B, et al. MicroRNA-214-3p: a link between autophagy and endothelial cell dysfunction in atherosclerosis[J]. Acta Physiol (Oxf), 2018, 222(3): 10.1111/apha.12973.
- [26] QIN X, GUO J. MicroRNA-328-3p protects vascular endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein induced injury via targeting forkhead box protein O4 (FOXO4) in atherosclerosis[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e921877.
- [27] 张 风, 郑 刚, 齐 婧, 等. 动脉粥样硬化相关的炎症信号通路的研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26(10): 144-148.
- ZHANG F, ZHENG G, QI J. Research progress of inflammatory signaling pathway associated with atherosclerosis[J]. J Clin Med Pract, 2022, 26(10): 144-148.
- [28] WANG B, HOU X T, SUN Y N, et al. Interleukin-17a influences the vulnerability rather than the size of established atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Open Life Sci, 2022, 17(1): 1104-1115.
- [29] ERBEL C, DENGLER T J, WANGLER S, et al. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(1): 125-134.
- [30] LIU Z D, LU F H, PAN H, et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(1): 232-241.
- [31] 董国华, 杜银苹, 耿 猛, 等. antagomiR-21 上调 SIRT1 激活 PI3K/AKT/eNOS 信号通路改善 T2DM 大鼠冠状动脉内皮依赖性舒张[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(9): 763-770.
- DONG G H, DU Y P, GENG M, et al. AntagomiR-21 upregulates SIRT1 to activate PI3K/AKT/eNOS signal pathway and improves endothelium-dependent relaxation of coronary arteries in T2DM rats[J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(9): 763-770.
- [32] 伏江龙, 杨 雪, 万宛若, 等. 中药单体通过 NF- κ B 信号通路防治动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(17): 195-208.
- FU J L, YANG X, WAN W R. Chinese medicine monomers regulate atherosclerosis through NF- κ B pathway: a review[J]. Chin J Exp Trad Med Form, 2022, 28(17): 195-208.
- (此文编辑 许雪梅)