

本文引用: 林俊敏, 梁风金, 吴莹, 等. CDR132L 改善高血压合并高脂血症小鼠血管重构和功能[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(4): 303-309. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.04.004.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-04-0303-07

· 实验研究 ·

## CDR132L 改善高血压合并高脂血症小鼠血管重构和功能

林俊敏, 梁风金, 吴莹, 许开祖, 吴梅芳, 林丽明

莆田学院附属医院心血管内科 福建医科大学临床医学院, 福建省莆田市 351100

**[摘要]** **[目的]** 观察 CDR132L(miR-132 反义核苷酸)对高血压合并高脂血症小鼠血管重构和功能的影响,并探究其可能的作用机制。**[方法]** 随机选择 30 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,分为三组:对照组、模型组和 CDR132L 组,每组 10 只。对照组接受标准饲料喂养,模型组和 CDR132L 组给予 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)和高脂食物联合喂养来诱导高血压和高脂血症。CDR132L 组给予 20 mg/kg CDR132L 腹腔注射,1 次/周,连续 6 周,对照组和模型组腹腔注射相同剂量的生理盐水溶液。尾套法测量小鼠尾动脉收缩压和舒张压,血脂、血糖检测由全自动生化分析仪完成,HE 染色观察胸主动脉结构,血管环试验观察小鼠胸主动脉内皮依赖性舒张反应,定量基因扩增检测胸主动脉 miR-132 表达水平,Western blot 检测胸主动脉 Gab1 和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)蛋白表达水平。**[结果]** 与对照组相比,模型组小鼠收缩压、舒张压、血清甘油三酯、血清总胆固醇和体质量均明显升高( $P<0.05$ ),胸主动脉内膜凹凸不平,血管壁厚度不均,中膜平滑肌细胞的排列呈现不规则状态,血管壁上存在大量脂肪积聚,胸主动脉内皮依赖性舒张反应减低( $P<0.05$ ),胸主动脉 miR-132 表达水平明显增加( $P<0.05$ ),Gab1 和 eNOS 蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ )。与模型组相比,CDR132L 组小鼠收缩压、舒张压、血清甘油三酯、血清总胆固醇和体质量均无统计学差异( $P>0.05$ ),胸主动脉管腔内膜较完整光滑,血管壁厚度较均一,中膜平滑肌细胞的排列较为有序,血管壁仅存在少量脂肪积聚,胸主动脉内皮依赖性舒张反应增强( $P<0.05$ ),胸主动脉 miR-132 表达水平明显降低( $P<0.05$ ),Gab1 和 eNOS 蛋白表达水平明显增加( $P<0.05$ )。**[结论]** CDR132L 能改善高血压合并高脂血症小鼠血管重构及内皮依赖性舒张功能,这一作用可能与其降低胸主动脉 miR-132 表达水平,进而上调胸主动脉 Gab1 和 eNOS 蛋白表达水平有关。

**[关键词]** CDR132L; miR-132; 高血压; 高脂血症; 血管重构; 内皮舒张功能

**[中图分类号]** R363;R5

**[文献标识码]** A

## CDR132L improves vascular remodeling and function in hypertensive combined with hyperlipidemia mice

LIN Junmin, LIANG Fengjin, WU Ying, XU Kaizu, WU Meifang, LIN Liming

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Putian University & Clinical Medicine School of Fujian Medical University, Putian, Zhejiang 351100, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effect of CDR132L (miR-132 antisense oligonucleotide) on vascular remodeling and function in mice with hypertension and hyperlipidemia, and explore its possible mechanism. **Methods** A total of 30 8-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: control group, model group and CDR132L group, with 10 mice in each group. The control group received with a standard diet while the model group and CDR132L group received N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and high-fat diet to induce hypertension and hyperlipidemia. The CDR132L group was administered with intraperitoneal injection of CDR132L at a dose of 20 mg/kg once weekly for six consecutive weeks, whereas the control group and the model group were given intraperitoneal injection of an equivalent volume of normal saline. The tail-cuff method was utilized for blood pressure measurement, blood lipid and glucose levels were assayed by an automatic biochemical analyzer, the thoracic aorta structure was observed by HE staining, endothelium-dependent relaxation of the thoracic aorta was evaluated by the vascular ring test, the expression level

[收稿日期] 2023-09-21

[修回日期] 2024-02-21

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2022J011433、2022J011431);国家自然科学基金青年项目(81800278)

[作者简介] 林俊敏,副主任医师,主要从事心力衰竭的基础和临床研究 E-mail:13860998033@139.com。通信作者林丽明,医学博士,副主任医师,主要从事动脉粥样硬化和心力衰竭的基础和临床研究,E-mail:2533358160@qq.com。

of miR-132 in the thoracic aorta was measured by qPCR, the protein expression levels of Gab1 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the thoracic aorta were determined by Western blot. **Results** Compared with the control group, the model group demonstrated notable rises in systolic and diastolic blood pressure, serum triglyceride, total cholesterol levels, and body weight. Moreover, the intima of thoracic aorta and the thickness of vascular wall was uneven, the smooth muscle cells of the tunica media were arranged irregularly, with a large amount of fat deposition in the vascular wall, and the endothelium-dependent relaxation response of thoracic aorta was decreased ( $P < 0.05$ ). The expression level of miR-132 in the thoracic aorta was significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the expression level of Gab1 and eNOS protein was markedly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the CDR132L group showed no significant differences in systolic and diastolic blood pressure, serum triglyceride and total cholesterol levels, as well as body weight ( $P > 0.05$ ). However, the CDR132L group exhibited a complete and smooth intima of the thoracic aorta with minimal intravascular lipid deposition, the thickness of the vascular wall was uniform, the smooth muscle cells of the tunica media were arranged orderly, accompanied by enhanced endothelium-dependent relaxation response of the thoracic aorta ( $P < 0.05$ ). The expression level of miR-132 in the thoracic aorta was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while the expression levels of Gab1 and eNOS protein were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CDR132L can improve vascular remodeling and endothelium-dependent relaxation in hypertensive and hyperlipidemia mice, which may be related to the decrease of miR-132 expression level and the up-regulation of Gab1 and eNOS protein expression levels in the thoracic aorta.

[**KEY WORDS**] CDR132L; miR-132; hypertension; hyperlipidemia; vascular remodeling; endothelial diastolic function

动脉粥样硬化性心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 是人类健康威胁最大的慢性疾病, 大约占有疾病谱死亡原因的 40%<sup>[1]</sup>。随着人口老龄化和高血压、糖脂代谢紊乱等危险因素的流行, ASCVD 患病人群仍在不断增加<sup>[2]</sup>。根据 2015 年的疾病负担研究结果, 我国缺血性心脏病最主要的两个危险因素是高血压和高胆固醇血症<sup>[3]</sup>。然而, 临床上很多高血压和高胆固醇血症患者没有症状, 等到发现时常已合并血管重构、内皮舒张功能障碍和亚临床动脉粥样硬化, 甚至出现 ASCVD 事件。因此, 如何在管理好血压、血脂的同时, 针对早期出现的血管病理重构和内皮舒张功能障碍进行干预, 对减少后期 ASCVD 事件、改善心血管病患者总体预后和减轻社会疾病负担意义重大。

miRNA 是一种非编码小分子 RNA, 通过与 mRNA 的碱基配对, 负调控蛋白编码基因的表达<sup>[4]</sup>。miR-132 位于人染色体 17p13.3, 在脊椎动物中和 miR-212 有着相似并且高度保守的序列, 在基因组中呈现串联排列, 统称为 miR-132/212 基因簇<sup>[5]</sup>。近年来研究发现, miR-132 参与一系列心血管生理和病理功能调节, 可能成为新型的心血管疾病治疗靶点<sup>[6]</sup>。Kumarswamy 等<sup>[7]</sup> 研究发现, miR-132/212 基因缺失能够增强血管内皮舒张功能, 促进出生后和成年小鼠的血管生成反应。Hinkel 等<sup>[8]</sup> 研究发现, 靶向 miR-132 的反义寡核苷酸 anti-miR-132 增加主动脉缩窄诱导的压力超负荷猪心肌毛细血管密度, 减轻心室重构, 改善心脏收缩功能。然而, 至今

尚无研究探讨 miR-132 反义寡核苷酸对高血压合并高脂血症小鼠血管重构和血管内皮功能的影响。

因此, 本研究拟参照 Schiattarella 等<sup>[9]</sup> 实验方法, 通过给予 C57BL/6 小鼠 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 和高脂联合喂养诱导高血压和高脂血症, 模拟临床中常见的高血压合并高胆固醇血症患者。在此基础上, 进一步观察经化学修饰的 miR-132 反义寡核苷酸 CDR132L 对高血压合并高脂血症小鼠血管重塑和内皮舒张功能的影响及其潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和试剂盒

苏木精、0.1% 伊红 (硕博生物公司); 兔抗小鼠  $\beta$ -actin、Gab1、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 单克隆抗体 (TCS 公司); PCR 引物 (上海博尚公司)。

### 1.2 动物分组

30 只 SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 随机分为对照组、模型组和 CDR132L 组, 每组 10 只。对照组标准饲料喂养, 模型组和 CDR132L 组小鼠给予高脂饲料 (60% 的热量来自猪油) 和 L-NAME 0.5 g/L 饮用水联合喂养建立高血压合并高脂血症动物模型<sup>[9]</sup>。CDR132L 组给予 CDR132L 20 mg/kg 腹腔注射, 每周 1 次, 持续 6 周, 对照组和模型组给予等量生理盐水腹腔注射。上述所有动物实验均在获得莆田学院附属医院伦理委员会许可后实施。

### 1.3 经尾动脉测量收缩压和舒张压

干预结束后,用 BP-6 动物无创血压测定仪测量小鼠血压。小鼠鼠尾经加压尾套连接 BP-6 系统的脉搏传感器,平衡 20 min 后,在小鼠安静状态下观察到脉搏波之后,开始充气加压直至脉搏波消失。随后逐渐放气,再次出现脉搏波时读数作为收缩压,继续放气,脉搏波幅度达到最大值时读数为舒张压。取 3 次数值的平均值为最终血压。

### 1.4 血清样本制备

摘眼球法取小鼠全血约 0.5 mL,室温下 1 000 g 离心 10 min,吸取上层血清,-80 °C 冰箱保存备用。

### 1.5 胸主动脉 HE 染色

动脉标本固定在 4% 多聚甲醛溶液中。固定 24 h 后,组织脱水,石蜡包埋,5  $\mu$ m 切片,HE 染色。观察主动脉内膜形态学改变,并计算血管壁/管腔面积比值。

### 1.6 胸主动脉血管环试验

参照王贤方等<sup>[10]</sup>的实验方法,将小鼠脱臼处死后迅速用眼科剪剪开小鼠胸腔,取出胸主动脉立即放入盛有 4 °C Krebs 液培养皿中,同时通 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气体,在解剖显微镜下用无齿镊分离血管周围组织,剪取 3 mm 长胸主动脉血管环,以 0.75 g 的静息张力平衡 60 min。随后,所有血管环首先用 KCl(60 mmol/L)收缩,并在 Krebs 液中冲洗数次。然后加入 10<sup>-5</sup> mol/L 去甲肾上腺素(norepinephrine,NE),使其稳定收缩。在水浴槽中加入 10<sup>-9</sup> ~ 10<sup>-5</sup> mol/L 的乙酰胆碱(acetylcholine,Ach)或硝普钠(sodium nitroprusside,SNP),分别测量内皮依赖性或非依赖性的血管扩张反应。使用数据采集系统(PowerLab,澳大利亚)计算 EC50(即产生 50% 最大舒张百分比的摩尔浓度)以及 pD2 值,pD2 为 EC50 以 10 为底数的负对数值,用以表示血管舒张敏感性。

### 1.7 qPCR 检测胸主动脉组织 miR-132 表达水平

参照 Trizol 说明书提取胸主动脉组织总 RNA,按照 TaqMan Kit 说明书反转录合成 cDNA。miR-132 上游引物为 5'-AGCAGCATATATGGCACTC-3',下游引物为 5'-CAGCTGAGTCTGACGA-3';内参  $\beta$ -actin 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下

游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。采用 Bio-Rad Chromo4<sup>TM</sup> 检测器进行 qPCR 检测,扩增条件:95 °C 5 min;95 °C 15 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,循环 40 次。结果以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 值表示 miR-132 的相对表达水平。

### 1.8 Western blot 检测

使用裂解液从胸主动脉组织中提取总蛋白质,二喹啉甲酸法进行蛋白定量,经 SDA-PAGE 电泳分离、转膜,并进行丽春红染色以验证转移成功。随后,在室温下使用 5% 去脂乳摇床震荡封闭 1 h,并在 TBST 缓冲液中洗涤 3 次。接着,在 4 °C 下与以下抗体( $\beta$ -actin 抗体、Gab1 抗体和 eNOS 抗体)共孵育过夜。再次用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后,将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育 2 h,最后用 ECL 显色方法检测和 NIH Image J 软件分析,以  $\beta$ -actin 为内参蛋白,计算相对蛋白表达量。

### 1.9 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-132 与 Gab1 的调控关系

TargetScan 数据库预测 miR-132 的靶向结合位点。利用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂将野生型 Gab1(Gab1-WT)、突变型 Gab1(Gab1-MUT)分别与 miR-132 模拟物(miR-132 mimic)、miR-132 阴性对照(miR-NC)共转染至 HEK-293T 细胞,48 h 后检测各组细胞双荧光素酶相对活性。

### 1.10 统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,Ach 和 SNP 的摩尔浓度经对数转换后符合正态分布。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CDR132L 对高血压合并高脂血症小鼠血压和代谢参数的影响

模型组小鼠的血压、血脂及体质量与对照组相比均显著增加( $P < 0.05$ ),而 CDR132L 组小鼠的血压、血脂及体质量与模型组之间没有统计学上的差异,血糖在三组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ;表 1)。

表 1. CDR132L 对高血压合并高脂血症小鼠血压和代谢参数的影响( $n = 10$ )

分组	体质量/g	收缩压/mmHg	舒张压/mmHg	甘油三酯/(mmol/L)	总胆固醇/(mmol/L)	血糖/(mmol/L)
对照组	26.93 $\pm$ 3.44	100.89 $\pm$ 5.49	67.00 $\pm$ 5.55	1.26 $\pm$ 0.24	1.56 $\pm$ 0.27	6.70 $\pm$ 1.18
模型组	33.40 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>	113.57 $\pm$ 6.75 <sup>a</sup>	78.86 $\pm$ 6.01 <sup>a</sup>	2.41 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	2.75 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	6.99 $\pm$ 1.27
CDR132L 组	35.10 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	113.00 $\pm$ 7.21 <sup>a</sup>	77.50 $\pm$ 6.09 <sup>a</sup>	2.48 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	2.79 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	6.78 $\pm$ 0.69

注:a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较。

## 2.2 CDR132L对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉结构的影响

HE染色显示,对照组小鼠胸主动脉内膜光滑,血管壁厚度均一,中膜平滑肌细胞排列紧密且规则,血管壁无空泡现象(无脂肪沉积);模型组小鼠胸主动脉内膜凹凸不平,血管壁厚度不均一,中膜平滑肌细胞排列呈不规则状态,血管壁出现较多空

泡(脂肪沉积);CDR132L组小鼠胸主动脉内膜较完整光滑,血管壁厚度相对均匀,中膜平滑肌细胞排列较为有序,仅出现少量空泡现象(轻微的脂肪沉积;图1A)。模型组小鼠胸主动脉血管壁/管腔面积比值较对照组增加52% ( $P<0.05$ ),CDR132L组小鼠胸主动脉血管壁/管腔面积比值较模型组降低16% ( $P<0.05$ ;图1B)。

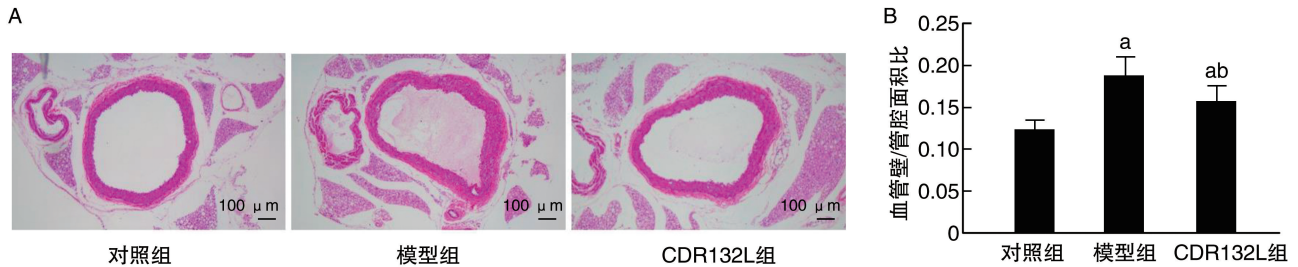


图1. CDR132L对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉结构的影响( $n=10$ )

A为胸主动脉HE染色,B为胸主动脉血管壁/管腔面积比值比较。a为 $P<0.05$ ,与对照组比较;b为 $P<0.05$ ,与模型组比较。

Figure 1. Effect of CDR132L on the structure of thoracic aorta in mice with hypertension and hyperlipidemia ( $n=10$ )

## 2.3 CDR132L对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉内皮依赖性舒张功能的影响

与对照组相比,模型组小鼠胸主动脉内皮对ACh介导的舒张反应降低,当ACh浓度 $\geq 10^{-8}$  mol/L时,模型组小鼠胸主动脉内皮依赖性舒张功能较对照组降低53% ( $P<0.05$ );CDR132L显著改善高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉对ACh介导的内皮依赖性舒张功能,且CDR132L组胸主动脉内皮pD2值与模型组相比显著增加( $7.01 \pm 0.16$ 比 $6.8 \pm 0.13$ ,  $P<0.05$ ;图2)。

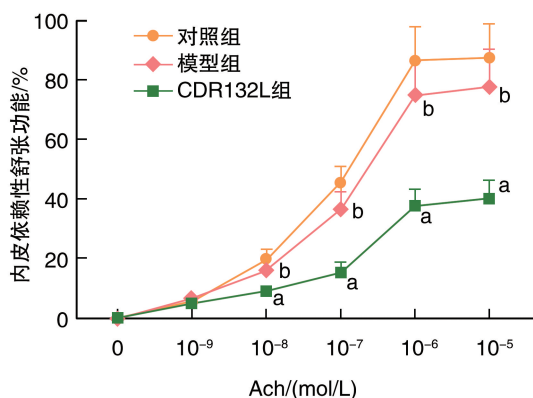


图2. CDR132L对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉内皮依赖性舒张功能的影响( $n=10$ )

a为 $P<0.05$ ,与对照组比较;b为 $P<0.05$ ,与模型组比较。

Figure 2. Effect of CDR132L on endothelium-dependent diastolic function of thoracic aorta in mice with hypertension and hyperlipidemia ( $n=10$ )

## 2.4 CDR132L对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉非内皮依赖性舒张功能的影响

CDR132L组小鼠胸主动脉内皮对ACh介导的血管舒张反应增强可能与血管平滑肌细胞对一氧化氮(nitric oxide, NO)的敏感性增加和/或内皮来源的NO生物利用度增加有关。为了区分具体机制,进一步评估胸主动脉对NO直接供体SNP的非内皮依赖性舒张反应。结果显示,对照组、模型组和CDR132L组小鼠胸主动脉内皮对SNP介导的非内皮依赖性舒张功能无显著性差异( $P>0.05$ ;图3)。

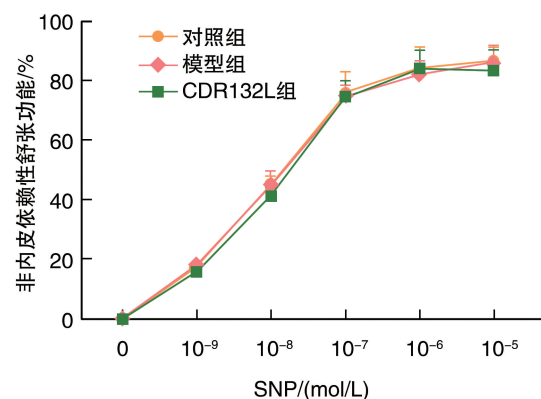


图3. CDR132L对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉非内皮依赖性舒张功能的影响( $n=10$ )

Figure 3. Effect of CDR132L on endothelium-independent diastolic function of thoracic aorta in mice with hypertension and hyperlipidemia ( $n=10$ )

## 2.5 CDR132L 对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉 miR-132 表达水平的影响

与对照组相比,模型组小鼠胸主动脉 miR-132 表达水平增加 54 倍 ( $P < 0.05$ );CDR132L 显著降低高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉 miR-132 表达,与模型组相比,CDR132L 组小鼠胸主动脉 miR-132 表达水平降低 71% ( $P < 0.05$ ;图 4)。

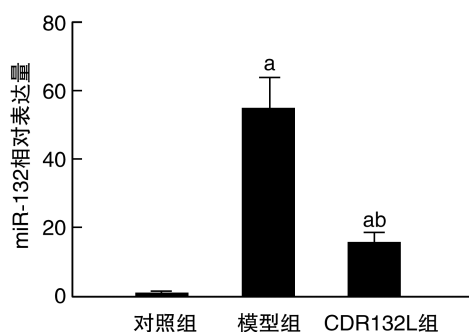


图 4. CDR132L 对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉 miR-132 表达水平的影响 ( $n = 10$ )

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较。

Figure 4. Effect of CDR132L on the expression level of miR-132 in thoracic aorta in mice with hypertension and hyperlipidemia ( $n = 10$ )

## 2.6 CDR132L 对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉 Gab1 和 eNOS 蛋白水平的影响

Western blot 检测结果显示,与对照组相比,模型组小鼠胸主动脉 Gab1 和 eNOS 蛋白表达水平分别降低 42% 和 45% ( $P < 0.05$ );CDR132L 显著增加高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉 Gab1 和 eNOS 蛋白表达水平,与模型组相比,CDR132L 组小鼠胸主动脉 Gab1 和 eNOS 蛋白表达水平分别增加 67% 和 71% ( $P < 0.05$ ;图 5)。

## 2.7 miR-132 与 Gab1 的调控关系验证

经靶基因预测数据库 TargetScan 生物信息学分析发现,miR-132 与 Gab1 存在结合位点。在转染 Gab1-WT 细胞中,miR-132 mimic 组细胞荧光素酶活性较 miR-NC 组降低 59% ( $P < 0.05$ );在转染 Gab1-MUT 细胞中,miR-132 mimic 组与 miR-NC 组的细胞荧光素酶活性没有显著差异 ( $P > 0.05$ ;图 6)。

## 3 讨论

高血压和高脂血症是 ASCVD 最重要的两个危险因素,且两者在血管损伤方面有协同作用<sup>[11]</sup>。如

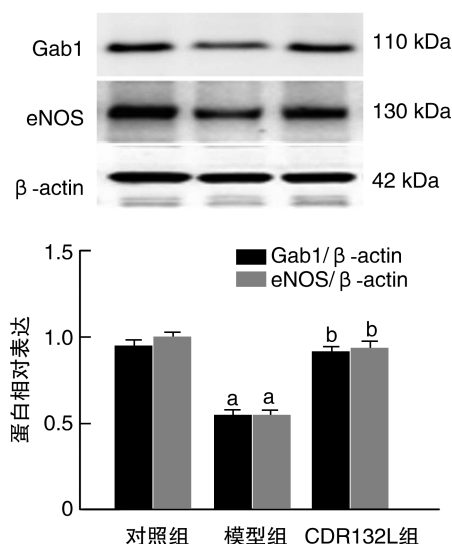


图 5. CDR132L 对高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉 Gab1 和 eNOS 蛋白水平的影响 ( $n = 10$ )

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较。

Figure 5. Effects of CDR132L on Gab1 and eNOS protein levels in thoracic aorta in mice with hypertension and hyperlipidemia ( $n = 10$ )

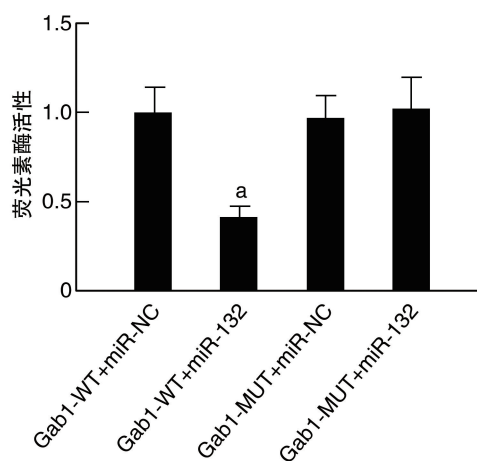
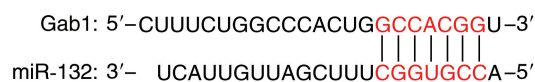


图 6. miR-132 与 Gab1 可能的结合位点及双荧光素酶报告基因检测 ( $n = 3$ )

a 为  $P < 0.05$ ,与 Gab1-WT+miR-NC 组比较。

Figure 6. Possible binding sites of miR-132 and Gab1 and dual-luciferase reporter gene assay ( $n = 3$ )

何在管理好血压和血脂的同时,尽早拮抗或逆转高血压合并高脂血症相关的血管重构和舒张功能障碍,对减少后期 ASCVD 风险意义重大。本研究在动物水平证实了高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉组织 miR-132 表达水平明显增加,CDR132L 尽管

不能降低小鼠的血压、血脂和体质量,但能够抑制 miR-132 表达,上调 Gab1 和 eNOS 表达,进而改善高血压合并高脂血症小鼠血管内皮舒张功能。

本研究的特点是采用 L-NAME 和高脂饮食喂养小鼠,诱导压力(高血压)和代谢(高脂血症、肥胖、糖尿病)“双重打击”,构建高血压合并高脂血症小鼠模型。本研究中,相对对照组,模型组小鼠血压、体质量、血脂明显升高,与 Schiattarella 等<sup>[9]</sup>研究结果一致,提示高血压合并高脂血症小鼠造模成功。CDR132L 治疗对高血压合并高脂血症小鼠血压、体质量及血脂水平无明显作用,三组之间血糖水平亦无显著性差异。这些结果与之前一些研究发现沉默 miR-132 能够改善血脂、血糖和胰岛素敏感性不一致。如 Bijkerk 等<sup>[12]</sup>研究发现,2 型糖尿病小鼠注射 antimiR-132 能降低胰岛中 miR-132 表达,从而促进胰岛素分泌,降低血糖。Hanin 等<sup>[13]</sup>研究发现,antimiR-132 通过多靶点和累积协同效应,逆转饮食诱导的肥胖小鼠肝脏 miR-132 过量表达和高脂血症表型。研究结果不一致可能与实验动物模型以及 miR-132 抑制水平不同有关,未来有必要进一步探讨 antimiR-132 在不同动物模型中对血压及糖脂代谢紊乱的量效关系。

本研究中,胸主动脉 HE 染色发现,CDR132L 组胸主动脉内膜较完整光滑,血管壁厚度较为均一,中膜平滑肌细胞排列较为规则,血管壁出现少量脂肪沉积现象。表明 CDR132L 治疗能改善 L-NAME 联合高脂饮食诱导高血压合并高脂血症小鼠的血管结构。近期 Taubel 等<sup>[14]</sup>研究发现,CDR132L 能够改善射血分数减低心力衰竭患者的心脏功能和心室重构,推测 CDR132L 可能通过作用于心脏和血管共同的重构促进因子发挥作用。ACh 作用于内皮细胞可释放 NO 等众多血管活性物质使得血管舒张,因其为内皮依赖性血管扩张剂,可用来评价内皮细胞功能。SNP 作为 NO 直接供体,具有直接作用于血管平滑肌的能力,通过非依赖于血管内皮的机制来扩张血管。CDR132L 治疗能减轻 L-NAME 联合高脂饮食诱导的高血压合并高脂血症小鼠的血管内皮功能障碍,表现在胸主动脉对 ACh 介导的内皮依赖性舒张功能增强,但对 SNP 介导的非内皮依赖性舒张功能无显著影响。该研究结果与 Kumarswamy 等<sup>[7]</sup>基本一致,后者研究发现,miR-212/132 基因敲除小鼠内皮依赖性血管舒张显著增强,但非内皮依赖性血管舒张和野生型小鼠相当。考虑到 miR-212 和 miR-132 有着相似并且高度保守的序列,本研究尚不能排除 CDR132L 可能作用于 miR-212 发挥改

善血管内皮功能的作用。此外,本研究中并未观察到 CDR132L 能够显著改善小鼠的血压和代谢参数,提示 CDR132L 可能通过其他机制改善血管重构和内皮舒张功能。

Gab1 作为一种接头蛋白,通常认为其通过放大细胞存活和有丝分裂信号通路,在细胞增殖和肿瘤发生中起着关键作用<sup>[15]</sup>。近年来研究发现,Gab1 也参与调节血管生成、血管炎症和动脉粥样硬化。Zhao 等<sup>[16]</sup>研究发现,内皮细胞特异性 Gab1 敲除小鼠缺血诱导的血流恢复受损,血管生成减少,并伴有明显的肢体坏死。Lu 等<sup>[17]</sup>研究发现,Gab1 在肢体缺血和血管内皮生长因子诱导的出生后血管生成反应中至关重要,是介导 eNOS 激活和小管形成的重要上游信号调节剂,且这一作用依赖于蛋白激酶 A。Dixit 等<sup>[18]</sup>研究发现,Gab1 和蛋白激酶 A 对于流体剪切力诱导的 eNOS 激活至关重要。本研究发现,CDR132L 显著增加高血压合并高脂血症小鼠胸主动脉 Gab1 和 eNOS 蛋白表达,提示其可能通过调控血管内皮细胞 Gab1/eNOS 信号转导通路来改善血管舒张功能。此外,Higuchi 等<sup>[19]</sup>研究发现,内皮 Gab1 缺失可能通过下调内皮稳态关键转录因子 KLF2 和 KLF4 表达,加重血管紧张素 II 诱导的 ApoE 敲除小鼠血管炎症和动脉粥样硬化。Qian 等<sup>[20]</sup>研究发现,Gab1 缺失可能通过增强自噬抑制人脐静脉内皮细胞增殖、迁移和小管形成。这些研究提示 CDR132L 还可能通过增加 Gab1 表达影响其他下游信号途径来改善血管结构和功能。

本研究还存在着不足之处:首先,CDR132 干预剂量单一,未能明确 CDR132 改善血管重构和功能存在剂量浓度效应或毒性效应;其次,双荧光素酶报告基因实验验证 miR-132 与其下游靶基因 Gab1 存在直接相互作用,但仍缺少在细胞水平进一步验证 CDR132L 改善高血压合并高脂血症小鼠血管重构和功能的分子机制。

总之,本研究发现,miR-132 在 L-NAME 和高脂饮食联合喂养诱导的高血压合并高脂血症小鼠血管中高表达,CDR132L 能有效逆转高血压合并高脂血症小鼠血管重构和内皮依赖性舒张功能障碍,这一作用可能与其抑制血管 miR-132 表达,弱化 miR-132 对 Gab1 和 eNOS 蛋白的负调控有关。通过本研究进一步拓宽 miR-132 参与调节高血压合并高脂血症小鼠动物模型血管重构的证据,为将来 CDR132L 可能用于防治高血压合并高脂血症相关的血管损伤提供理论依据。

## [参考文献]

- [1] LI J J, ZHAO S P, ZHAO D, et al. 2023 Chinese guideline for lipid management[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1190934.
- [2] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要[J]. *中国循环杂志*, 2022, 37(6): 553-578.  
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2021: an updated summary[J]. *Chin Circ J*, 2022, 37(6): 553-578.
- [3] ZHANG G S, YU C H, ZHOU M G, et al. Burden of ischaemic heart disease and attributable risk factors in China from 1990 to 2015: findings from the global burden of disease 2015 study[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 18.
- [4] HO P T B, CLARK I M, LE L T T. MicroRNA-based diagnosis and therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7167.
- [5] WANET A, TACHENY A, ARNOULD T, et al. miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(11): 4742-4753.
- [6] XU K Z, CHEN C G, WU Y, et al. Advances in miR-132-based biomarker and therapeutic potential in the cardiovascular system[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 751487.
- [7] KUMARSWAMY R, VOLKMANN I, BEERMANN J, et al. Vascular importance of the miR-212/132 cluster[J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(45): 3224-3231.
- [8] HINKEL R, BATKAI S, BÄHR A, et al. AntimiR-132 attenuates myocardial hypertrophy in an animal model of percutaneous aortic constriction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77(23): 2923-2935.
- [9] SCHIATTARELLA G G, ALTAMIRANO F, TONG D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Nature*, 2019, 568(7752): 351-356.
- [10] 王贤方, 张园, 李锐, 等. 重组人肿瘤坏死因子相关弱凋亡诱导因子对小鼠主动脉内皮舒张功能及凝血相关因子的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(1): 22-26.  
WANG X F, ZHANG Y, LI R, et al. Impact of recombinant human tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis on the aorta endothelial function and blood coagulation[J]. *Chin J Arterioscler*, 2014, 22(1): 22-26.
- [11] 左惠娟, 邓利群, 王锦纹, 等. 高血压患者部分血脂指标与颈动脉斑块的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(6): 507-512.
- ZUO H J, DENG L Q, WANG J W, et al. Correlation between lipid parameters and carotid plaque among patients with hypertension[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(6): 507-512.
- [12] BIJKERK R, ESGUERRA J L S, ELLENBROEK J H, et al. *In vivo* silencing of microRNA-132 reduces blood glucose and improves insulin secretion[J]. *Nucleic Acid Ther*, 2019, 29(2): 67-72.
- [13] HANIN G, YAYON N, TZUR Y, et al. miRNA-132 induces hepatic steatosis and hyperlipidaemia by synergistic multitarget suppression[J]. *Gut*, 2018, 67(6): 1124-1134.
- [14] TAUBEL J, HAUKE W, RUMP S. microRNA-132 inhibition improves cardiac function and reduces remodeling in patients with heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF): an exploratory subgroup analysis of the CDR132L first-in-human study[J]. *Circulation*, 2023, 148(Suppl\_1): A15137.
- [15] PÉREZ-BAENA M J, CORDERO-PÉREZ F J, PÉREZ-LOSADA J. The role of GAB1 in cancer[J]. *Cancers*, 2023, 15(16): 4179.
- [16] ZHAO J J, WANG W Y, HA C H, et al. Endothelial Grb2-associated binder 1 is crucial for postnatal angiogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(5): 1016-1023.
- [17] LU Y, XIONG Y, HUO Y Q, et al. Grb-2-associated binder 1 (Gab1) regulates postnatal ischemic and VEGF-induced angiogenesis through the protein kinase A-endothelial NOS pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(7): 2957-2962.
- [18] DIXIT M, LOOT A E, MOHAMED A, et al. Gab1, SHP2, and protein kinase A are crucial for the activation of the endothelial NO synthase by fluid shear stress[J]. *Circ Res*, 2005, 97(12): 1236-1244.
- [19] HIGUCHI K, NAKAOKA Y, SHIOYAMA W, et al. Endothelial Gab1 deletion accelerates angiotensin II-dependent vascular inflammation and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice[J]. *Circ J*, 2012, 76(8): 2031-2040.
- [20] QIAN X, WANG H, WANG Y L, et al. Enhanced autophagy in GAB1-deficient vascular endothelial cells is responsible for atherosclerosis progression[J]. *Front Physiol*, 2021, 11: 559396.

(此文编辑 文玉珊)