

本文引用: 韩洋, 秦建宁, 谭瑶, 等. piRNA-823 通过 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞内皮-间充质转化和血管生成[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(9): 762-772. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.09.004.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2025)33-09-0762-10

piRNA-823 通过 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞内皮-间充质转化和血管生成

韩洋, 秦建宁, 谭瑶, 虞乐天, 屈顺林

南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病
国际科技创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] [目的] 探讨 piRNA-823 在高糖处理的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)表型转化中的生物学功能及其分子机制。[方法] 将 HUVEC 置于 33.3 mmol/L 高糖培养基中孵育 72 h。采用 RT-qPCR 检测 piRNA-823 的相对表达水平,采用 Western blot 检测内皮细胞标志物、间充质细胞标志物和转化生长因子 β 1(TGF- β 1) 信号通路相关蛋白的表达变化,利用划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移能力的变化,通过血管生成实验评估新生血管形成情况。将 piRNA-823 mimic (piRNA-823 过表达) 转染至 HUVEC 中,分析其对高糖诱导的内皮-间充质转化(EndMT)及血管生成的影响。进一步采用 TGF- β 1 激活剂(SRI011381)和抑制剂(SB525334)干预,以验证 piRNA-823 是否通过调控 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路发挥作用。[结果] piRNA-823 mimic 显著抑制高糖诱导的 HUVEC 活力、增殖和迁移能力以及血管生成。piRNA-823 mimic 能够抑制高糖诱导的 HUVEC EndMT,具体表现为上调内皮细胞相关标志物的表达,同时下调间充质细胞标志物的表达。划痕实验、Transwell 实验和血管生成实验进一步证实 piRNA-823 mimic 可有效逆转高糖诱导的 HUVEC 增殖、迁移能力的增强以及新生血管数量的增加。机制研究发现,TGF- β 1 激活剂可部分逆转 piRNA-823 mimic 的保护效应,TGF- β 1 抑制剂则能增强其作用,表明 piRNA-823 通过抑制 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路的激活发挥调控作用。[结论] piRNA-823 通过抑制 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路的激活,显著抑制高糖诱导的 HUVEC EndMT、细胞增殖和迁移能力以及血管生成。[关键词] piRNA-823; 内皮-间充质转化; 血管生成; TGF- β 1/Smad2/3 信号通路 [中图分类号] R363;R5 [文献标识码] A

piRNA-823 inhibits high glucose induced endothelial-mesenchymal transition and angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells through TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway

HAN Yang, QIN Jianning, TAN Yao, YU Letian, QU Shunlin

Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory of Arterial Hard Chemistry of Hunan Province & Hunan Province Arteriosclerotic Disease International Scientific and Technological Innovation Cooperation Base, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the biological function and molecular mechanisms of piRNA-823 in the phenotypic transformation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by high glucose. **Methods** HUVEC were incubated in high glucose (33.3 mmol/L) culture medium for 72 h. The relative expression levels of piRNA-823 were detected by RT-qPCR, the expression changes of endothelial cell markers, mesenchymal cell markers and proteins related to transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling pathway were detected by Western blot, the changes of cell migration ability were evaluated by scratch and Transwell assays, the formation of new angiogenesis were assessed through angiogenesis experiments. piRNA-823 mimic (overexpression of piRNA-823) were transfected into HUVEC to analyze their effects on high glucose induced endothelial-mesenchymal transition (EndMT) and angiogenesis. Further in-

[收稿日期] 2025-03-21

[修回日期] 2025-04-05

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2023JJ30526);湖南省卫健委重点项目(202102063633)

[作者简介] 韩洋,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化及发病机制,E-mail:hanyang421mt@163.com。通信作者屈顺林,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化及发病机制,E-mail:qushunlin78@126.com。

tervention was performed using TGF- β 1 activator (SRI011381) and inhibitor (SB525334) to verify whether piRNA-823 exerts its effect by regulating the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway. **Results** piRNA-823 mimic significantly inhibited the viability, proliferation, migration and angiogenesis of HUVEC induced by high glucose. The piRNA-823 mimic inhibited high glucose induced EndMT in HUVEC, characterized by upregulation of endothelial cell markers and downregulation of mesenchymal cell markers. Scratch experiments, Transwell experiments and angiogenesis experiments further confirmed that piRNA-823 mimic could effectively reverse high glucose induced HUVEC proliferation, migration ability enhancement, and increase in the number of new angiogenesis. Mechanistic studies revealed that the TGF- β 1 activator partially reversed the protective effect of piRNA-823 mimic, whereas the TGF- β 1 inhibitor enhanced its effect, suggesting that piRNA-823 exerts its regulatory role by suppressing the activation of the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway. **Conclusion** piRNA-823 significantly inhibits high glucose induced EndMT, proliferation, migration and angiogenesis in HUVEC by suppressing the activation of TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway.

[KEY WORDS] piRNA-823; endothelial-mesenchymal transition; angiogenesis; TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway

糖尿病已经成为一种全球普遍存在的内分泌代谢紊乱疾病。国际糖尿病联盟预测,到 2030 年,全球受糖尿病影响的人数将达到 5.78 亿,到 2045 年,这一数字将攀升至 7 亿^[1]。长期的慢性高血糖会引发一系列微血管并发症,包括糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病和糖尿病伤口愈合慢。内皮细胞损伤在组织重塑、纤维化和血管生成中起着关键作用,是糖尿病微血管病变发病机制的核心环节。

内皮-间充质转化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)最早于 1975 年被发现于胚胎发育过程中,这是一种由外源性刺激因素引起的生物学现象,导致内皮细胞失去紧密连接、运动能力增强、细胞外基质蛋白的分泌增加以及获得间充质细胞表型^[2-3]。EndMT 是血管内皮功能障碍的关键指标之一,内皮细胞在 EndMT 过程中会丧失内皮标志物(如 CD31 和 CD144),同时获得间充质干细胞的特性,如表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、成纤维细胞特异性蛋白 1(fibroblast-specific protein 1, FSP-1)、波形蛋白和 I 型胶原 α 1(collagen type I alpha 1, COL1A1),并展现出迁移、侵袭和增殖的细胞表型^[4]。转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)信号通路、Wnt/ β -联蛋白信号通路和骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)信号通路等关键信号通路是 EndMT 调控的核心组成部分。近年来的研究表明,EndMT 和血管生成与糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、肺动脉高压、动脉粥样硬化和心肌纤维化的进展紧密相关^[5-6]。

PIWI 相互作用 RNA (PIWI-interacting RNA, piRNA) 是一类长度大约在 24 ~ 31 个核苷酸的短链非编码 RNA,最初在生殖系统中被鉴定^[7]。在糖尿病视网膜病变的研究中,已证实 PIWI 相关蛋白 HIWI2 水平的升高会通过蛋白激酶 B/糖原合成酶激

酶 3 α / β (protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 α / β , Akt/GSK3 α / β) 途径影响上皮-间充质转化和细胞迁移^[8]。此外,小 RNA 测序已确定 piRNA-019825 与糖尿病肾病相关^[9]。近年来,piRNA 家族中的成员 piR-hsa-823(亦称作 DQ570543 或 piRNA-823)已被证实参与了多种疾病的进程,涉及多发性骨髓瘤、结肠直肠癌、肝纤维化、食道癌、乳腺癌以及主动脉夹层等。然而,piRNA-823 是否在高糖(high glucose, HG)诱导的内皮细胞表型转化中发挥作用,以及如何影响糖尿病微血管并发症的发生,目前尚不明确。本研究旨在利用高糖处理的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)构建 EndMT 和血管生成的体外模型,以探讨 piRNA-823 在高糖诱导的 HUVEC EndMT 和血管生成中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料

HUVEC 株购自中国科学院上海细胞生物所。DMEM 低糖培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;CD31 抗体、CD144 抗体和 TGF- β 1 抗体购自中国 Abiowell 公司;COL1A1 抗体、FSP-1 抗体、GAPDH 抗体和 HRP 结合的山羊抗兔 IgG 购自美国 Proteintech 公司; α -SMA 抗体购自中国 Huabio 公司;Smad2/3 抗体、PCNA 抗体和 Snail 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;Pierce ECL Western 印迹底物和 DAB 购自美国 Thermo Fisher 公司;TGF- β 1 激活剂 SRI011381 购自美国 MCE 生物公司;TGF- β 1 抑制剂 SB525334 购自美国 APEX BIO 公司;T25 细胞培养瓶购自美国 NEST 公司;piR-hsa-823 mimic 和 mimic-NC 购自 HonorGene 生物公司;Lip6000TM 转染试剂购自上海碧云天生物技术股份

有限公司。RT-qPCR 所用的引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 细胞培养和处理

将 HUVEC 置于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中进行培养,并在含有 5% CO₂ 的培养箱中维持在 37 °C 的环境下。正常培养基的葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L,高糖培养基的葡萄糖浓度为 33.3 mmol/L,在同一培养箱中培养 72 h。第一步,将细胞分为正常对照组(NC 组)、高糖组(HG 组),检测 piRNA-823 的表达;将细胞分为 HG + piRNA-823 mimic 组、HG + piRNA-823 mimic-NC 组,检测 piRNA-823 mimic 的转染效率。第二步,将细胞分为正常对照组、高糖组、HG + piRNA-823 mimic 组和 HG + piRNA-823 mimic-NC 组,探讨 piRNA-823 mimic 是否有助于改善高糖诱导的 EndMT 和血管生成。第三步,将细胞分为 HG + piRNA-823 mimic 组、HG + piRNA-823 mimic + SRI011381 和 HG + piRNA-823 mimic + SB525334 组,探究 piRNA-823 mimic 是否通过 TGF- β 1/smad2/3 通路抑制 EndMT 和血管生成,SRI011381 的终浓度为 10 μ mol/L,SB525334 的终浓度为 6 μ mol/L。

1.3 Western blot 检测

利用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液对细胞进行裂解,以提取总蛋白。随后,通过 SDS-PAGE 电泳技术对提取的蛋白样品进行分离,依据分子量的不同将蛋白分开。接着,将分离的蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 2 h。之后,将一抗在 4 °C 摇床上孵育过夜。第二天,加入二抗继续孵育 2 h,用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。最后,利用全自动化学发光成像分析系统进行显影,并使用 Image J 软件分析目标蛋白质的条带强度。

1.4 RT-qPCR 检测

利用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA,随后采用 NovoScript Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 将 RNA 反转录成 cDNA。在进行 RT-qPCR 时,使用 NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus。实验分析通过 ABI Step One Plus real-time PCR 扩增系统完成。以 U6 基因为内参,对 CD31、CD144、 α -SMA、FSP-1、COL1A1 和 piRNA-823 水平进行标准化,实验重复 3 次。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计算目标基因的相对表达量。各基因的引物序列见表 1。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer Sequences

引物名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')
CD31	GTAGGTGTGAGTCTAGAGAG	TGGGTGGCATTGAGGTCATTTG
CD144	GTACCACCTCACTGCTGTCATTG	CAGGCACGGACGCATTGAAC
α -SMA	AGGAAGGACCTCTATGCTAACAAT	AACACATAGGTAACGAGTCAGAGC
FSP-1	CCACAAGTACTCGGGCAAAG	TGGGCTGCTTATCTGGGAAG
COL1A1	TGGCAAAGAAGCGGCAAAGG	AGGAGCACCAGCAGGACCATC
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCCT
piRNA-823	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC	ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG

1.5 免疫荧光

将内皮细胞接种到 6 孔板中,置于培养箱中培养。次日,瞬时转染 piRNA-823 mimic,并在无血清培养基中培养 24 h。室温下用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min。用免疫荧光封闭液室温封闭 1 h,再用抗 CD31(1 : 100)和抗 α -SMA(1 : 2 000)于 4 °C 孵育过夜。然后用 Cy3 结合的山羊抗兔 IgG 抗体(1 : 400)于室温避光孵育 1 h。最后,在室温下用 DAPI 避光标记细胞核 5 min。使用荧光显微镜进行拍照记录。

1.6 细胞划痕实验

将转染后的细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长至 90% 汇合时,使用 100 μ L 枪头在孔底划一条垂直于孔边缘的直线,形成划痕。随后,以 PBS 缓冲液轻柔冲洗 3 次。接着,向孔中加入含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基,将 6 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中继续培养。分别在划痕后 0 h、24 h 和 48 h,使用显微镜在相同位置采集图像,并对各时间点的图像进行对比分析,以评估细胞的迁移能力。

1.7 Transwell 实验

首先,用胰蛋白酶对转染后的细胞进行消化处

理,随后加入无血清培养基对细胞进行重悬,并使用细胞计数板对细胞进行精确计数。将 Transwell 小室置于 24 孔培养板中,向小室的上层培养皿中加入 300 μL 含有 2×10^4 个细胞的无血清培养基,同时在下层培养皿中加入 700 μL 含有 20% 胎牛血清的培养基,以构建细胞迁移的梯度环境。将培养板置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 ~ 48 h。培养结束后,细心地取出培养板并丢弃旧的培养基。接着,在室温下用 4% 多聚甲醛对细胞进行固定,固定 40 min。之后,在室温下用 0.1% 结晶紫溶液对细胞进行避光染色,染色 20 min。使用棉签轻轻擦拭小室内侧的细胞,以去除未迁移的细胞,然后用去离子水缓慢冲洗细胞室,最后将细胞室倒置晾干。将处理好的细胞室置于载玻片上,使用显微镜拍照,并对迁移至下层培养皿的细胞进行计数,以评估细胞的迁移能力。

1.8 血管生成实验

将 Matrix-Gel 基质凝胶置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中充分溶解,以确保其均匀性和稳定性。次日,从冰箱中取出预冷的 24 孔培养板,向每个孔中加入 25 μL 已溶解的 Matrix-Gel 基质凝胶。接着,将培养板置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 1 h,使基质凝胶完全凝固,形成适合细胞黏附和血管生成的三维基质环境。之后,对转染后的细胞进行胰蛋白酶消化处理,再用无血清培养基重悬细胞,并使用细胞计数仪或血细胞计数板对细胞进行精确计数。根据计数结果,将细胞悬液调整至合适浓度,确保每孔加入 2×10^4 个细胞。将细胞悬液均匀铺于已凝固的 Matrix-Gel 基质凝胶表面,然后将培养板放回 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 4 ~ 6 h,使细胞有足够时间在基质凝胶上黏附并开始形成管状结构。培养结束后,使用倒置光学显微镜观察细胞的血管生成情况。随机选取每个孔的 5 个不同视野进行拍照,确保视野分布均匀且具有代表性。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件对数据进行处理和分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 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。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖对内皮细胞中 piRNA-823 表达的抑制作用及转染效率验证

与正常对照组相比,高糖组内皮细胞中 piRNA-

823 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$),表明高糖环境能够抑制 piRNA-823 的表达。在转染 piRNA-823 mimic 的内皮细胞中,piRNA-823 mRNA 水平显著增加,与 HG+mimic-NC 组相比差异显著 ($P < 0.05$)。以上结果表明,piRNA-823 mimic 的转染取得了成功,且在高糖培养的内皮细胞中,piRNA-823 的表达上调(图 1)。

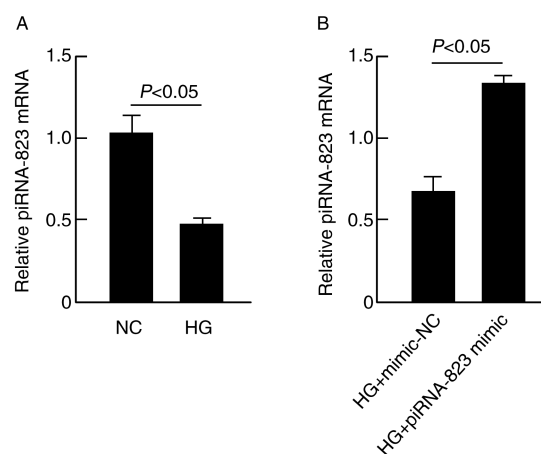


图 1. 高糖对内皮细胞中 piRNA-823 表达的抑制作用及转染效率验证

A 为 RT-qPCR 检测 piRNA-823 mRNA 水平,

B 为 RT-qPCR 检测转染后 piRNA-823 mRNA 水平。 $n=3$ 。

Figure 1. The inhibitory effect of high glucose on the expression of piRNA-823 in endothelial cells and the validation of transfection efficiency

2.2 piRNA-823 抑制高糖诱导的 HUVEC EndMT

与正常对照组相比,高糖处理显著促进 EndMT 的发生,具体表现为内皮细胞标志物 CD31 和 CD144 的表达显著降低,而间充质细胞标志物 α -SMA、FSP-1 和 COL1A1 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。此外,高糖处理显著上调 EndMT 标志物 Snail 和增殖标志物增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达 ($P < 0.05$),进一步证实高糖对 EndMT 的促进作用。

在高糖处理的细胞中,piRNA-823 mimic 能够升高 CD31 和 CD144 的表达,降低 α -SMA、FSP-1 和 COL1A1 的表达 ($P < 0.05$)。此外,piRNA-823 mimic 还显著抑制 Snail 和 PCNA 的表达 ($P < 0.05$)。这表明 piRNA-823 在高糖条件下对 HUVEC EndMT 具有显著的抑制作用。在 mRNA 水平上,高糖处理显示出与蛋白表达一致的变化,CD31 和 CD144 的 mRNA 水平降低, α -SMA、FSP-1 和 COL1A1 的 mRNA 水平升高 ($P < 0.05$),piRNA-823 mimic 能够

显著逆转这些变化($P < 0.05$)。免疫荧光实验进一步验证了这些结果:与正常对照组相比,高糖处理的细胞中 CD31 的表达显著减少,而 α -SMA 的表达

显著增加,piRNA-823 mimic 能够显著逆转这些变化($P < 0.05$;图 2)。

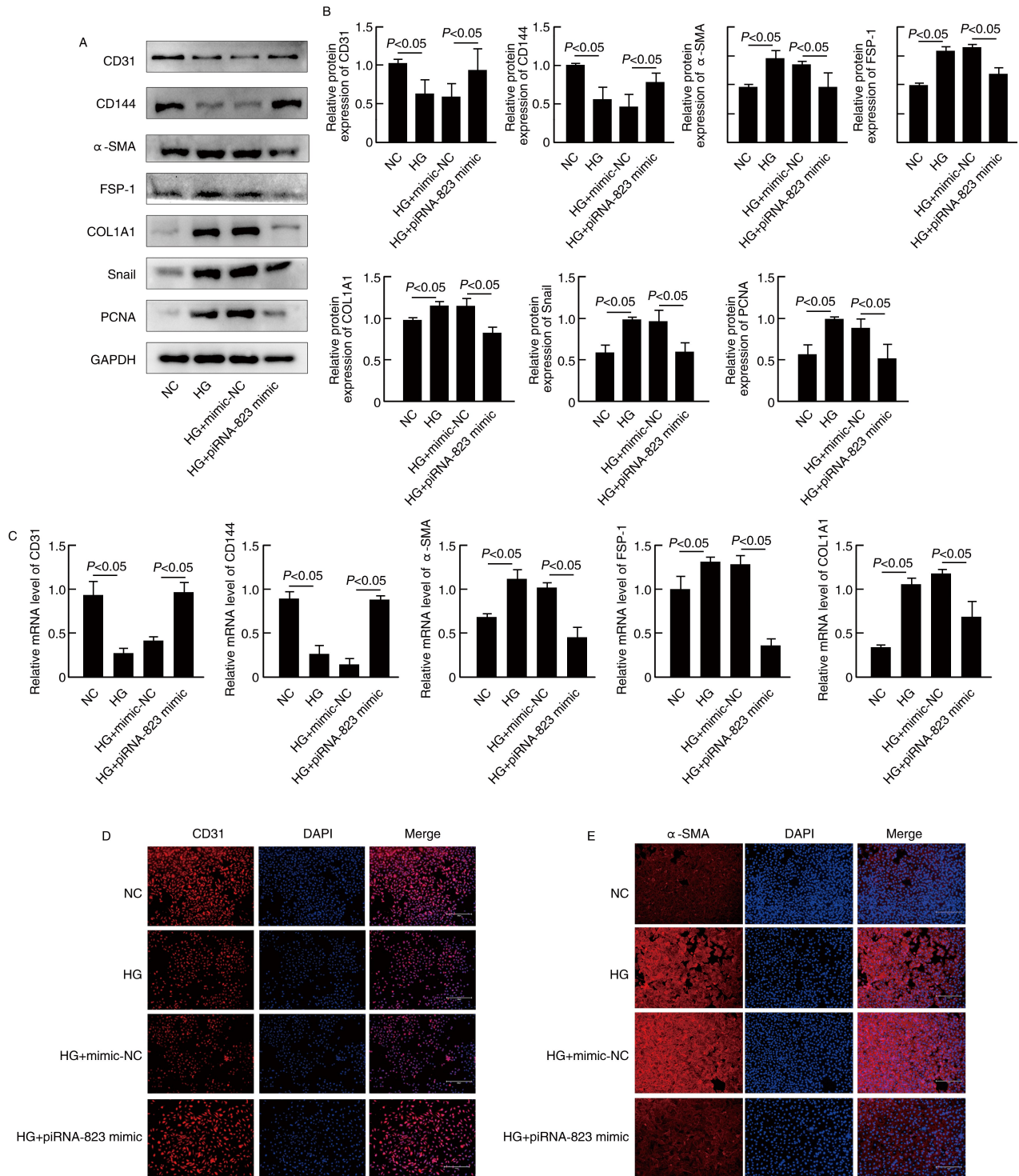


图 2. piRNA-823 抑制高糖诱导的 HUVEC EndMT

A 和 B 为 Western blot 检测 CD31、CD144、 α -SMA、FSP-1、COL1A1、Snail 和 PCNA 的蛋白表达及其统计分析图, C 为 RT-qPCR 检测 CD31、CD144、 α -SMA、FSP-1 和 COL1A1 的 mRNA 水平, D 和 E 为免疫荧光染色。n=5, Bar=300 μ m。

Figure 2. piRNA-823 inhibited high glucose induced HUVEC EndMT

2.3 piRNA-823 抑制高糖诱导的 HUVEC 增殖、迁移和血管生成

细胞划痕实验结果显示,与正常对照组相比,高糖处理显著增强 HUVEC 的增殖能力,piRNA-823 mimic 显著抑制高糖诱导的增殖能力($P<0.05$)。Transwell 实验结果显示,与正常对照组相比,高糖处理显著增强 HUVEC 的迁移能力,穿过 Transwell 小室的细胞数量明显增加,而 piRNA-823 mimic 显

著降低高糖诱导的迁移能力,穿过小室的细胞数量显著减少($P<0.05$)。血管生成实验结果显示,与正常对照组相比,高糖处理显著增加 HUVEC 在 Matrix-Gel 基质凝胶上形成的管状结构数量,而 piRNA-823 mimic 显著减弱高糖诱导的血管生成能力,形成的管状结构数量明显减少($P<0.05$;图 3)。以上结果表明,piRNA-823 对高糖诱导的 HUVEC 的增殖、迁移和血管生成具有显著的抑制作用。

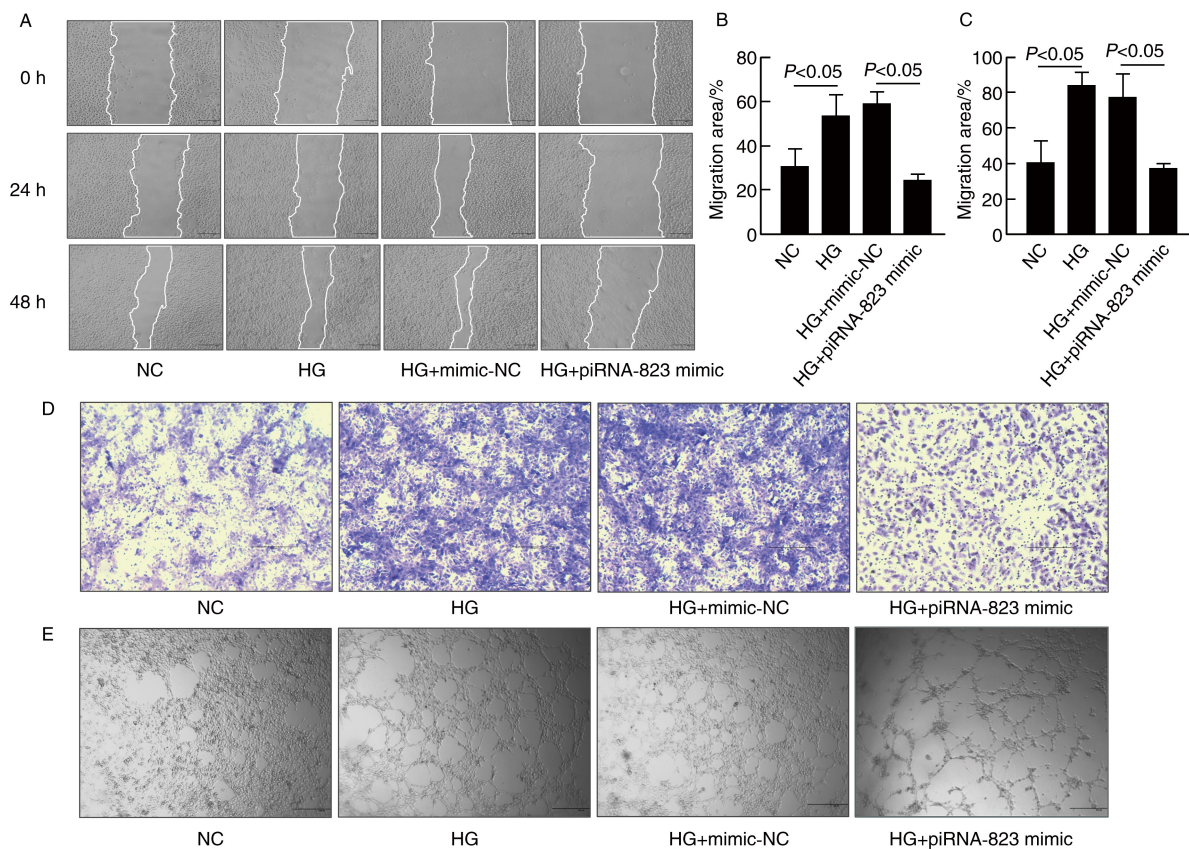


图 3. piRNA-823 抑制高糖诱导的 HUVEC 增殖、迁移和血管生成

A 为细胞划痕实验,B 为细胞划痕实验 24 h 细胞迁移面积统计分析图,C 为细胞划痕实验 48 h 细胞迁移面积统计分析图,D 为 Transwell 实验测定细胞迁移数量,E 为血管生成实验确定管形成和分支点。 $n=5$,Bar=300 μm 。

Figure 3. piRNA-823 inhibited high glucose induced HUVEC proliferation, migration and angiogenesis

2.4 piRNA-823 抑制 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路的活性

与正常对照组相比,高糖处理的细胞中 TGF- β 1 和 Smad2/3 的表达显著上调($P<0.05$)。这表明高糖环境可能通过激活 TGF- β 1/Smad 信号通路促进 EndMT 的发生。在高糖处理的细胞中,piRNA-823 mimic 显著降低 TGF- β 1 和 Smad2/3 的表达($P<0.05$;图 4)。

2.5 piRNA-823 通过 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路抑制高糖诱导的 HUVEC EndMT

Western blot 结果显示, SRI011381 干预后,

TGF- β 1 和 Smad2/3 的表达显著升高, CD31 和 CD144 的表达显著降低, α -SMA、FSP-1 和 COL1A1 的表达显著升高($P<0.05$)。此外, Snail 和 PCNA 的表达也显著上调($P<0.05$)。在 mRNA 水平上,激活剂干预后显示出与蛋白表达一致的变化($P<0.05$),进一步证实 TGF- β 1/Smad 信号通路在调控 EndMT 中的关键作用。免疫荧光染色结果显示, SRI011381 干预后, CD31 的表达显著减少,而 α -SMA 的表达显著增加($P<0.05$)。与激活剂的作用相反,使用抑制剂 SB525334 干预后,上述由激活剂

引起的 EndMT 相关变化均被显著逆转 ($P < 0.05$; 图 5)。

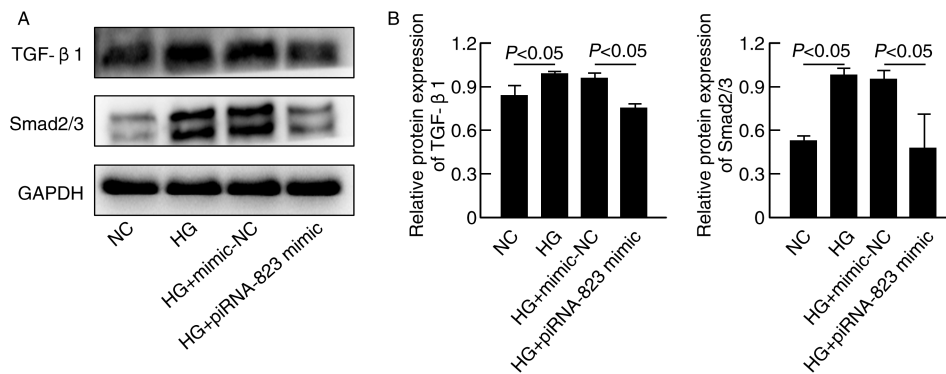


图 4. piRNA-823 抑制 TGF-β1/Smad2/3 信号通路的活性

A 和 B 为 Western blot 检测 TGF-β1 和 Smad2/3 的蛋白表达及其统计分析图。n=5。

Figure 4. piRNA-823 inhibited the activity of TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway

2.6 piRNA-823 通过 TGF-β1/Smad2/3 信号通路抑制高糖诱导的 HUVEC 增殖、迁移和血管生成

细胞划痕实验和 Transwell 实验结果显示, piRNA-823 mimic 显著抑制高糖诱导的 HUVEC 的增殖和迁移能力 ($P < 0.05$)。细胞划痕实验结果显示, SRI011381 干预后, 划痕 24 h 和 48 h 细胞的迁移能力显著增强; 相反, SB525334 干预后, 细胞的迁移能力显著受到抑制 ($P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示, SRI011381 干预后, 细胞的迁移能力显著增强; 相反, SB525334 干预后, 细胞的迁移能力显著受到抑制 ($P < 0.05$)。血管生成实验结果显示, piRNA-823 mimic 能够显著减少高糖诱导的细胞形成的管状结构数量; SRI011381 干预后, 细胞形成的管状结构数量显著增加; 相反, SB525334 干预后, 细胞形成的管状结构数量显著减少 ($P < 0.05$; 图 6)。以上结果表明, TGF-β1/Smad2/3 信号通路的激活或抑制能够显著影响内皮细胞的血管生成能力。

3 讨论

糖尿病作为一种慢性疾病, 可引发以大中型动脉粥样硬化为特征的大血管病变, 以及涉及视网膜病变、肾病和神经系统损害的微血管病变^[10]。这些并发症的发生与血管内皮功能障碍密切相关。内皮功能障碍会导致内皮细胞增殖、迁移和凋亡失衡, 影响血管的正常修复和再生^[11]。EndMT 在糖尿病微血管并发症的发生和发展中起着关键作用, 其诱导的细胞形态变化和功能改变可进一步促进血管生成, 加剧糖尿病视网膜病变和肾病等并发症。

miRNA 是一类内源性、单链、非编码的小分子 RNA, 可参与到 EndMT 的发展。研究发现, miR-320 通过下调 SRY 相关高迁移率蛋白 4 的表达, 抑制 HUVEC EndMT^[12]。piRNA 通过与 PIWI 蛋白相互作用形成 piRNA 沉默复合物 (piRNA-induced silencing complex, piRISC), 在基因沉默和转录调控中发挥重要作用。一项关于 piRNA-823 的荟萃分析显示, piRNA-823 的异常表达与多种癌症相关^[13-14]。piRNA-823 在多发性骨髓瘤和肝细胞癌中促进肿瘤细胞增殖^[15], 在食管癌中通过 DNA 甲基转移酶 3B 诱导的 DNA 甲基化和血管生成促进肿瘤发生^[16]。此外, piRNA-823 还可以促进肝星状细胞活化和纤维化^[17]。本研究探讨了 piRNA-823 在高糖诱导的内皮细胞中的作用, 结果发现, piRNA-823 在高糖培养的 HUVEC 中表达下调, 并参与促进 EndMT、增殖、迁移和血管生成, piRNA-823 mimic 能显著抑制高糖诱导的 EndMT、增殖、迁移和血管生成。

TGF-β1/Smad2/3 信号通路在 EndMT 和血管生成中起着关键调控作用。TGF-β1 与其受体结合后, 激活 Smad2/3, 使其从细胞质转移到细胞核, 调控多种基因的转录^[18]。TGF-β1/Smad2/3 信号通路通过调控细胞骨架的重组和细胞间的连接, 促进细胞的迁移和侵袭能力。外源性 TGF-β1 可作为诱导 EndMT 发生的关键因素。高糖显著上调 TGF-β1 和 Smad2/3 的蛋白表达, 而 piRNA-823 mimic 能够显著抑制这些变化。采用 TGF-β1 激活剂 SRI011381 和抑制剂 SB525334 干预后, 细胞迁移和血管生成能力呈现相应的增强或减弱。piRNA-823 可能通过抑制 TGF-β1/Smad2/3 信号通路的活性, 显著抑制

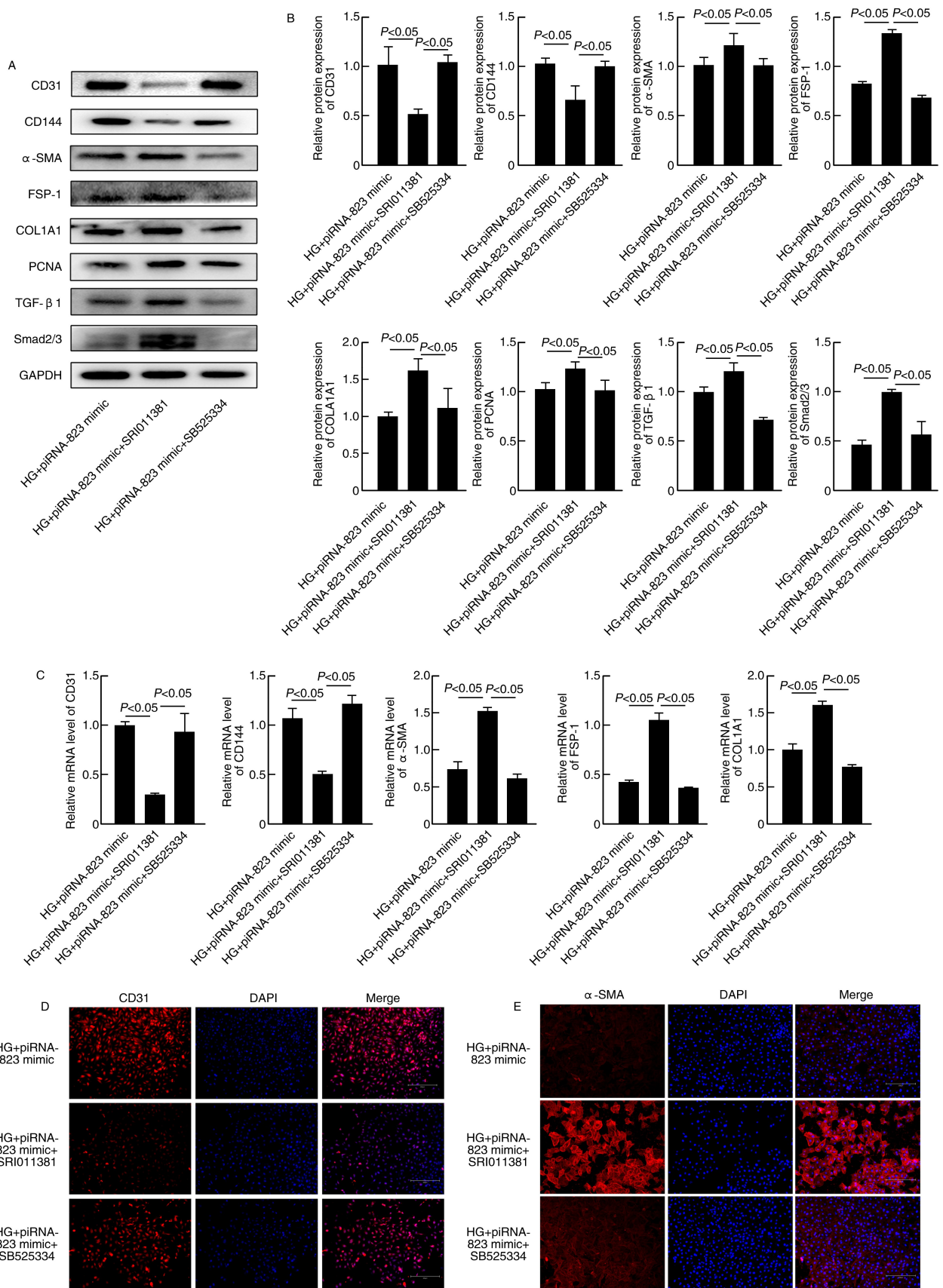


图 5. piRNA-823 通过 TGF-β1/Smad2/3 信号通路抑制高糖诱导的 HUVEC EndMT

A 和 B 为 Western blot 检测 CD31、CD144、α-SMA、FSP-1、COL1A1、PCNA、TGF-β1 和 Smad2/3 的蛋白表达及其统计分析图，

C 为 RT-qPCR 检测 CD31、CD144、α-SMA、FSP-1 和 COL1A1 的 mRNA 水平，D 和 E 为免疫荧光染色。n=5, Bar=300 μm。

Figure 5. piRNA-823 inhibited high glucose induced HUVEC EndMT through TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway

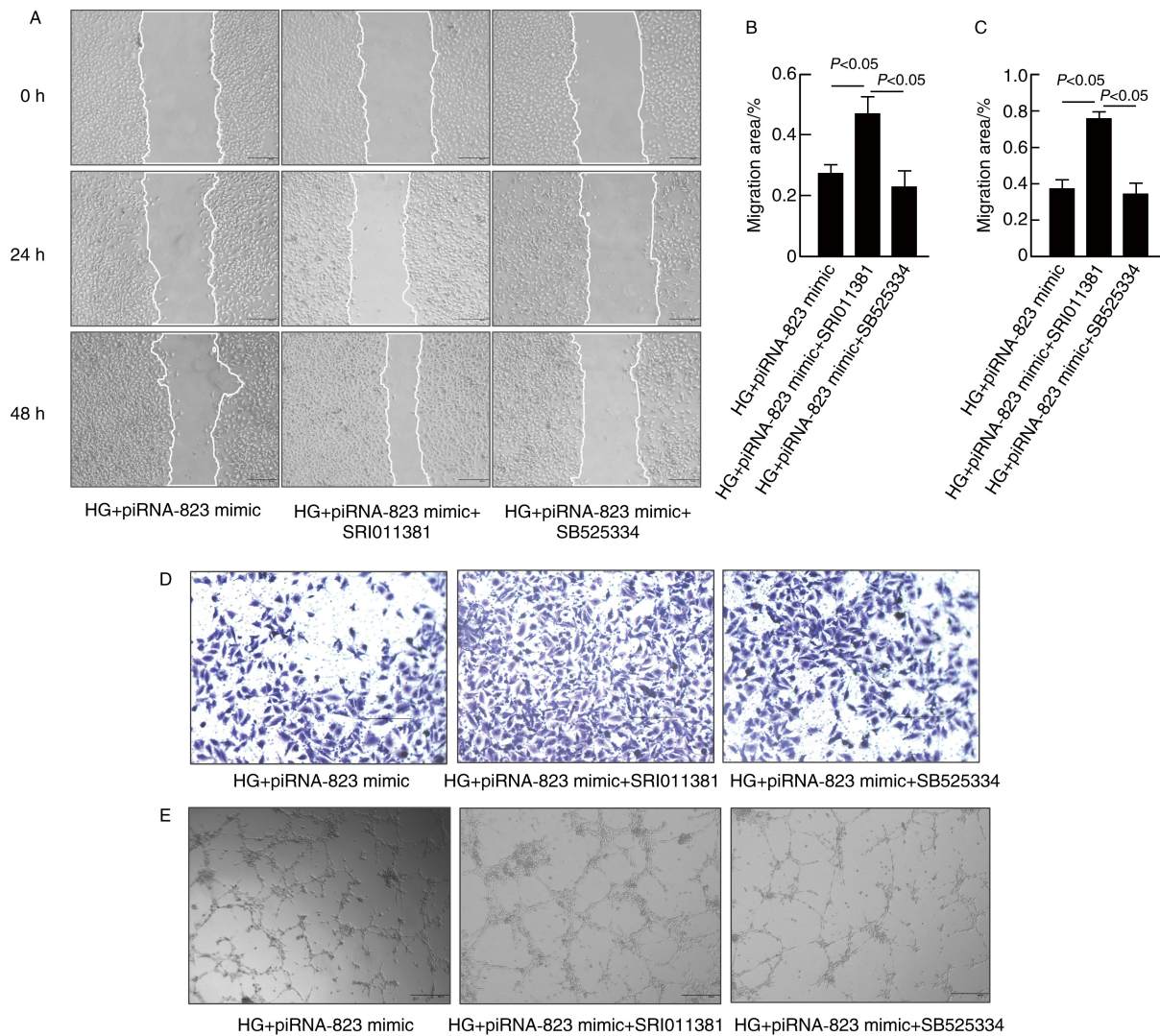


图 6. piRNA-823 通过 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路抑制高糖诱导的 HUVEC 增殖、迁移和血管生成
A 为细胞划痕实验, B 为细胞划痕实验 24 h 细胞迁移面积统计分析图, C 为细胞划痕实验 48 h 细胞迁移面积统计分析图,
D 为 Transwell 实验, E 为血管生成实验确定管形成和分支点。n=5, Bar=300 μ m。

Figure 6. piRNA-823 inhibited high glucose induced HUVEC proliferation, migration and angiogenesis through TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway

高糖诱导的 HUVEC EndMT、增殖、迁移和血管生成。

目前的研究表明, piRNA-823 mimic 可抑制高糖诱导的 HUVEC 增殖和迁移能力。此外, piRNA-823 mimic 还可对 EndMT 和血管生成相关过程起到保护作用, 从而抑制糖尿病微血管并发症的发生。因此, 通过技术干预 piRNA-823 的表达有望成为治疗糖尿病微血管并发症的新思路。然而, piRNA-823 在不同细胞类型和组织中的表达水平存在显著差异, 如何实现其在特定细胞或组织中的精准调控是一个亟待解决的关键问题。例如, 在主动脉夹层的研究中, piRNA-823 抑制剂可能会影响血管平滑肌细胞的正常生理功能。此外, piRNA-823 的调控机

制较为复杂, 难以通过单一靶点来实现精准调控。目前, 尽管核酸递送系统(如脂质纳米颗粒)在实验室研究中取得了一定的进展, 但在临床应用中仍面临效率和安全性双重挑战。因此, 开发新型递送系统, 尤其是利用纳米技术开发更高效的靶向递送系统, 以提高 piRNA-823 抑制剂或激活剂的靶向性和生物利用度, 是未来研究的重要方向。

尽管本研究揭示了 piRNA-823 在高糖诱导的内皮细胞中的重要作用, 但仍存在一些局限性。例如, 还不清楚 piRNA-823 是否直接与 TGF- β 1、TGF- β 受体(如 TGFBR I 和 TGFBR II)或 Smad2/3 蛋白相互作用。研究主要集中在细胞水平, 缺乏动物实验和临床研究的支持。这限制了对 piRNA-823 在糖尿

病及其并发症中作用机制的全面理解。未来的研究需要通过动物实验和临床研究进一步验证 piRNA-823 的作用机制和潜在应用价值。

综上所述,piRNA-823 在高糖培养的 HUVEC 中低表达,piRNA-823 mimic 能够显著抑制高糖诱导的 HUVEC EndMT、增殖、迁移和血管生成。piRNA-823 可能有潜力作为诊断和治疗糖尿病微血管并发症的新的生物标志物。

[参考文献]

- [1] SINCLAIR A, SAEEDI P, KAUNDAL A, et al. Diabetes and global ageing among 65-99-year-old adults: findings from the international diabetes federation diabetes atlas, 9th edition[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2020, 162: 108078.
- [2] YU W, LIU Z, AN S, et al. The endothelial-mesenchymal transition (EndMT) and tissue regeneration[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2014, 9(3): 196-204.
- [3] CRUZ-SOLBES A S, YOUKER K. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and endothelial to mesenchymal transition (EndMT): role and implications in kidney fibrosis [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2017, 60: 345-372.
- [4] HONG L, DU X, LI W, et al. EndMT: a promising and controversial field[J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(7): 493-500.
- [5] GIORDO R, AHMED Y M A, ALLAM H, et al. EndMT regulation by small RNAs in diabetes-associated fibrotic conditions; potential link with oxidative stress[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 683594.
- [6] JIMENEZ S A, PIERA-VELAZQUEZ S. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of systemic sclerosis-associated pulmonary fibrosis and pulmonary arterial hypertension. Myth or reality? [J]. *Matrix Biol*, 2016, 51: 26-36.
- [7] HAASE A D. An introduction to PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in the context of metazoan small RNA silencing pathways[J]. *RNA Biol*, 2022, 19(1): 1094-1102.
- [8] SIVAGURUNATHAN S, RAMAN R, CHIDAMBARAM S. PIWI-like protein, HIWI2; a novel player in proliferative diabetic retinopathy[J]. *Exp Eye Res*, 2018, 177: 191-196.
- [9] THART L M, DE KLERK J A, BOULAND G A, et al. Small RNA sequencing reveals snoRNAs and piRNA-019825 as novel players in diabetic kidney disease[J]. *Endocrine*, 2024, 86(1): 194-203.
- [10] JIA G, BAI H, MATHER B, et al. Diabetic vasculopathy: molecular mechanisms and clinical insights[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 804.
- [11] 张馨予, 谢子月, 王梓安, 等. 动脉粥样硬化中抗内皮

细胞功能障碍的治疗进展[J/OL]. *中国动脉硬化杂志*, 1-11 [2025-05-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1262.R.20241205.1414.006.html>.

ZHANG X Y, XIE Z Y, WANG Z A, et al. Progress in the treatment of endothelial dysfunction in atherosclerosis [J/OL]. *Chin J Arterioscler*, 1-11 [2025-05-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1262.R.20241205.1414.006.html>.

- [12] 肖晨, 陈金娜, 章舒蕾, 等. miR-320 通过下调 SRY 相关高迁移率族蛋白 4 的表达抑制人脐静脉内皮细胞内皮间质转化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(1): 17-23.
- XIAO C, CHEN J N, ZHANG S L, et al. miR-320 inhibits endothelial-mesenchymal transition of human umbilical vein endothelial cells by down-regulating the expression of SRY-related high mobility group protein 4[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(1): 17-23.
- [13] TAGHIZADEH M, JAFARI-KOSHKI T, JAFARLOU V, et al. The role of piRNAs in predicting and prognosing in cancer: a focus on piRNA-823 (a systematic review and meta-analysis) [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 484.
- [14] SHAKER F H, SANAD E F, ELGHAZALY H, et al. piR-823 tale as emerging cancer-hallmark molecular marker in different cancer types: a step-toward ncRNA-precision [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2025, 398(1): 47-68.
- [15] LI B, HONG J, HONG M, et al. piRNA-823 delivered by multiple myeloma-derived extracellular vesicles promoted tumorigenesis through re-educating endothelial cells in the tumor environment [J]. *Oncogene*, 2019, 38(26): 5227-5238.
- [16] SU J F, ZHAO F, GAO Z W, et al. piR-823 demonstrates tumor oncogenic activity in esophageal squamous cell carcinoma through DNA methylation induction via DNA methyltransferase 3B[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(4): 152848.
- [17] TANG X, XIE X, WANG X, et al. The combination of piR-823 and eukaryotic initiation factor 3 B (EIF3B) activates hepatic stellate cells via upregulating TGF- β 1 in liver fibrogenesis [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 9151-9165.
- [18] JIANG Y, ZHOU X, HU R, et al. TGF- β 1-induced SMAD2/3/4 activation promotes RELM- β transcription to modulate the endothelium-mesenchymal transition in human endothelial cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 105: 52-60.

(此文编辑 文玉珊)