

本文引用: 赵雪艳, 黄海珍, 陈宁园, 等. miR-29c-5p 在冠心病患者外周血白细胞中的表达及其对内皮细胞损伤的调控机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(5): 403-411. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.05.003.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-05-0403-09

· 实验研究 ·

## miR-29c-5p 在冠心病患者外周血白细胞中的表达及其对内皮细胞损伤的调控机制

赵雪艳, 黄海珍, 陈宁园, 黄玲, 宋重阳, 杨晴, 许婧, 彭均华, 潘尚领

广西医科大学病理生理学教研室, 广西南宁市 530021

[摘要] [目的] 分析微小 RNA-29c-5p(miR-29c-5p)在冠心病外周血白细胞中的表达,并探索其在高脂条件下调控内皮细胞氧化损伤和凋亡的机制。[方法] 在冠心病患者外周血白细胞中检测 miR-29c-5p 的表达水平;利用高脂诱导建立 EA.hy926 内皮细胞损伤模型,在高脂损伤模型中分别过表达和沉默 miR-29c-5p 并检测凋亡相关蛋白的表达和活性氧簇(ROS)水平及脂质过氧化程度。利用生物信息学方法预测 miR-29c-5p 的潜在靶基因,通过双荧光素酶报告基因实验验证其与靶基因的调控关系。[结果] 与健康对照组人群相比,miR-29c-5p 在冠心病组的表达水平降低,并对冠心病有诊断意义( $AUC:0.712,95\%CI:0.632\sim0.792,P<0.01$ )。在高脂损伤模型中,细胞活力下降,细胞凋亡增加( $P<0.01$ ),同时 miR-29c-5p 的表达水平升高( $P<0.01$ )。沉默 miR-29c-5p 表达细胞损伤被逆转,细胞活力增加( $P<0.01$ ),高脂诱导的细胞凋亡减少,ROS 及脂质过氧化水平降低(均  $P<0.05$ );而过表达 miR-29c-5p,细胞活力降低( $P<0.01$ ),高脂诱导的细胞凋亡增加,ROS 及脂质过氧化水平升高(均  $P<0.05$ )。生物信息学分析预测和双荧光素酶报告基因实验证实 miR-29c-5p 与组蛋白去乙酰化酶 2(HDAC2)基因的 3'UTR 区相结合,下调 HDAC2 的 mRNA 和蛋白表达水平(均  $P<0.05$ )。[结论] miR-29c-5p 在冠心病外周血白细胞中表达下调,对冠心病有诊断意义;抑制 miR-29c-5p 的表达可通过上调 HDAC2 减轻高脂诱导的内皮细胞氧化损伤及凋亡。

[关键词] 冠心病; 内皮细胞; 微小 RNA-29c-5p; 细胞凋亡

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

### Expression of miR-29c-5p in the peripheral leukocytes of patients with coronary heart disease and its mechanism underlying the regulation of endothelial injury

ZHAO Xueyan, HUANG Haizhen, CHEN Ningyuan, HUANG Ling, SONG Chongyang, YANG Qing, XUN Jing, PENG Junhua, PAN Shangling

Department of Pathophysiology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the expression of miR-29c-5p in peripheral blood leukocytes of patients with coronary heart disease (CHD), and to explore its mechanism in regulating oxidative damage and apoptosis of endothelial cells induced by high-lipid conditions. **Methods** The expression levels of miR-29c-5p were detected in peripheral blood leukocytes of patients with CHD. Endothelial cell injury in EA.hy926 cells was induced by exposure to high concentrations of the lipid. miR-29c-5p was overexpressed and silenced respectively in the high-fat-induced model, and the expression of apoptosis-related proteins, the level of reactive oxygen species (ROS), and the degree of lipid peroxidation were detected. Bioinformatics methods were used to predict the potential target genes of miR-29c-5p, and the dual luciferase reporter assay was performed to verify its regulatory relationship with the target genes. **Results** Compared with the control group, the expression level of miR-29c-5p was decreased in the CHD group and had diagnostic significance for CHD with an  $AUC$  value of 0.712 (95%  $CI: 0.632\sim0.792, P<0.01$ ). In the high-fat-induced model, cell viability was

[收稿日期] 2026-01-20

[修回日期] 2026-04-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82360286)

[作者简介] 赵雪艳, 硕士研究生, 主要从事冠心病的分子遗传学研究, E-mail: zxy20260118@163.com. 通信作者潘尚领, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的分子遗传学研究及人类长寿的遗传学研究, E-mail: slpan@gxmu.edu.cn.

decreased and cell apoptosis was increased ( $P < 0.01$ ), together with an elevated miR-29c-5p expression level ( $P < 0.01$ ). Silencing miR-29c-5p expression alleviated cell damage, increased cell viability ( $P < 0.01$ ), reduced high-fat-induced apoptosis, lowered ROS and lipid peroxidation levels (all  $P < 0.05$ ); while overexpressing miR-29c-5p decreased cell viability ( $P < 0.01$ ), increased high-fat-induced cell apoptosis and raised ROS and lipid peroxidation levels (all  $P < 0.05$ ). Moreover, bioinformatics analysis prediction and dual luciferase reporter assay confirmed that miR-29c-5p bound to the 3' UTR region of the histone deacetylase 2 (HDAC2) gene, thereby downregulating the mRNA and protein expression levels of HDAC2 (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** The expression of miR-29c-5p is decreased in peripheral blood leukocytes of patients with CHD, which may serve as a diagnostic biomarker for this disease. Inhibition of miR-29c-5p expression in endothelial cells may alleviate oxidative injury and apoptosis induced by high-fat exposure via upregulating HDAC2.

[**KEY WORDS**] coronary heart disease; endothelial cells; microRNA-29c-5p; apoptosis

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是一种常见且危害严重的心血管疾病, 其基本病理特征为动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As), 这是一个复杂的慢性炎症性病理过程<sup>[1]</sup>。血管内皮细胞功能障碍是 As 的关键始动环节。正常的血管内皮不仅是一道物理屏障, 更是一个具备多种内分泌与旁分泌功能的活跃器官, 发挥调节血管张力、抑制炎症反应、抗凝及维持血管壁稳态的重要作用<sup>[2]</sup>。高脂血症是公认的冠心病发生的主要危险因素<sup>[3-4]</sup>。

miRNA 是一类单链非编码 RNA, 长度较短, 约为 19 ~ 25 nt, 其稳定性不受内源性 RNA 酶影响, 广泛参与细胞增殖、分化、凋亡和应激反应等生命活动<sup>[5-6]</sup>。miR-29c-5p 在多种疾病过程中发挥重要调控作用。在缺血性脑卒中患者中, miR-29c-5p 呈高表达, 可通过靶向脂蛋白受体相关蛋白 6 (lipoprotein receptor-related protein 6, LRP6) 对其表达进行负向调控, 进而增加脑微血管内皮细胞的通透性, 破坏细胞间紧密连接并促进炎症反应的发生<sup>[7]</sup>。在牛卵泡颗粒细胞中, miR-29c-5p 可促进细胞凋亡并抑制增殖及类固醇生成<sup>[8]</sup>。在恶性肿瘤 (如胆囊癌) 中, miR-29c-5p 表达下调, 可通过负向调控细胞质多聚腺苷酸化元件结合蛋白 4 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4, CPEB4) 抑制肿瘤细胞的增殖与迁移<sup>[9]</sup>。此外, 研究显示 miR-29c-5p 与乳腺癌风险相关<sup>[10]</sup>。综上所述, miR-29c-5p 在不同组织和病理状态下功能多样, 尤其可能与血管内皮损伤、炎症反应以及细胞增殖和迁移等密切相关, 提示其在冠心病的发生发展中可能具有重要调控作用。

本研究通过检测冠心病患者外周血白细胞中 miR-29c-5p 的表达水平, 并在高脂诱导的内皮细胞损伤模型基础上探讨其生物学功能及作用机制, 旨在阐明 miR-29c-5p 参与内皮细胞损伤及冠心病发生发展的潜在分子机制, 为冠心病的防治提供新的

理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞来源及主要试剂

EA.hy926 细胞购自中国科学院上海细胞库。棕榈酸钠 (sodium palmitate, SP) 粉末 (北京普西唐生物科技有限公司); 胎牛血清 (长沙赛尔博克斯生物科技有限公司); 胰蛋白酶细胞消化液、microRNA 抽提试剂盒、microRNA 反转录试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司); AxyPrep™ Multisource Total RNA Miniprep Kit (杭州爱思进生物技术有限公司); HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 脂质体转染试剂 LipoFiter™ 3.0 (上海汉恒生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、活性氧检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司)。miR-29c-5p 抑制物 (miR-29c-5p inhibitor) (序列为 5'-GAACACACCAGGAGAAAUCGGUCA-3')、抑制物对照 (inhibitor NC) (序列为 5'-UCUACUCU-UUCUAGGAGGUUGUGA-3')、miR-29c-5p 模拟物 (miR-29c-5p mimics) (序列为 5'-UGACCGAUUU-CUCCUGGUGUUC-3') 和模拟物对照 (mimics NC) (序列为 5'-UCACAACCUCUAGAAAGAGUAGA-3') (通用生物安徽股份有限公司); eBioscience™ Annexin V 凋亡检测试剂盒 (FITC 标记) (赛默飞世尔科技有限公司), Bax 和 Caspase-3 兔单克隆抗体 (成都正能生物技术有限公司); Be1-2、组蛋白去乙酰化酶 2 (histone deacetylase 2, HDAC2)、兔单克隆抗体 (上海阿贝斯生物科技有限公司); GAPDH 兔单克隆抗体和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (武汉赛维尔生物科技有限公司); 脱脂奶粉、电泳液、转膜液 (上

海雅酶生物科技有限公司);超敏 ECL 发光底物检测试剂盒(湖北普美生物科技有限公司)。

## 1.2 细胞培养

配制完全培养基,500 mL 的 DMEM 中加入 55 mL 胎牛血清使血清含量为 10%,并加入  $1 \times 10^5$  U/L 青霉素和 100 g/L 链霉素,将复苏的 EA.hy926 细胞置于 10 cm 培养皿中并加入 9 mL 左右完全培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。当细胞汇合达 80% ~ 90% 时进行细胞传代。

## 1.3 内皮细胞高脂损伤模型的构建

取对数生长期的 EA.hy926 细胞,用磷酸盐(phosphate,PBS)清洗 1 次后,更换为无血清基础培养基,对照组用基础培养基常规培养,模型组加入棕榈酸钠处理以模拟高脂损伤环境。随后将细胞置于 37 °C 的 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中继续培养 24 h。

## 1.4 细胞转染及分组

将 EA.hy926 细胞以每孔约  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合达 60% ~ 80% 时进行转染。使用 LipoFiter™ 3.0 脂质体转染试剂分别将 miR-29c-5p mimics、mimics NC、miR-29c-5p inhibitor 和 inhibitor NC 转染至 EA.hy926 细胞。转染 48 h 后,对细胞进行高脂处理,随后收集细胞用于后续实验。

## 1.5 CCK-8 法检测细胞活力

细胞长至相应密度经胰酶消化后进行细胞计数,按每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中培养 24 h,每组设 4 个复孔。对照组细胞正常培养,其余各组分别转染 miR-29c-5p mimics、mimics NC、miR-29c-5p inhibitor 及 inhibitor NC,转染后予以高脂处理 24 h。随后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h。最后使用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔吸光度值。

## 1.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集细胞培养上清,消化细胞,结束后使用完全培养基重悬细胞并同收集的上清一起离心,再用 PBS 重悬细胞,1 000 r/min 离心 3 min,重复 2 次,弃掉 PBS,每管加入稀释好的 100 μL 1 × Binding Buffer,5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染料,轻轻吹打混匀,室温避光孵育 15 ~ 20 min。上机前每管补加 400 μL 1 × Binding Buffer,混匀后进行流式上机检测。

## 1.7 MDA 试剂盒检测脂质过氧化程度

MDA 含量的测定按试剂盒说明书进行,大致方法如下:取 4 个 10 cm 细胞培养皿种入适量数量一致的 EA.hy926,待细胞生长至 60% ~ 80% 后,分别

转染 miR-29c-5p mimics、mimics NC、miR-29c-5p inhibitor 及 inhibitor NC。转染后使用高脂处理 24 h,收集细胞,按要求制备样本,取上清液于离心管中。按说明书比例加入试剂一(TBA 工作液)与试剂二(酸试剂),混匀。100 °C 水浴 60 min,冷却至室温后,1 000 g 离心 10 min。测定各样本在 532 nm 和 600 nm 处的吸光度值,随后计算 MDA 含量。

## 1.8 ROS 试剂盒检测细胞活性氧水平

ROS 含量的测定按试剂盒说明书进行,大致方法如下:将 EA.hy926 以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 6 孔板中,每孔加入 2 mL 完全培养基,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,使细胞充分贴壁。吸弃旧培养基,进行如下分组处理:正常培养的细胞组更换为新鲜培养基。转染细胞组更换为含特定浓度高脂刺激物的新鲜培养基继续培养 24 h。后弃去原培养液,使用无血清基础培养基将 DCFH-DA 储存液稀释至 5 μmol/L 的工作浓度,将稀释好的探针工作液加入各孔,确保完全覆盖细胞。随后,将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中避光孵育 30 min,孵育结束后,弃去探针加载液,使用 PBS 缓冲液轻柔洗涤细胞 3 次,以彻底去除胞外残留探针。后每管加入 300 μL PBS,立即进行流式细胞术检测。

## 1.9 细胞中 miRNA 及 mRNA 的表达水平检测

采用 SanPrep 柱式 microRNA 抽提试剂盒提取高脂处理的 EA.hy926 细胞中 miRNA,并对提取的 miRNA 使用微量紫外分光光度计进行检测,以 miRNA 的 RNA > 30 μg/L, mRNA 的 RNA 大于 100 μg/L, RNA 总量 > 2 μg, OD<sub>260/230</sub> 值在 2.0 ~ 2.2 之间, OD<sub>260/280</sub> 值在 1.8 ~ 2.2 之间作为质量控制条件,使用 miRNA 反转录试剂盒(末端加尾法)将 miRNA 反转录为 cDNA。用 AxyPrep™ Multisource Total RNA Miniprep Kit 试剂盒提取高脂处理的 EA.hy926 细胞的 mRNA。采用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA。RT-qPCR 检测 miR-29c-5p 在冠心病组及造模组的表达情况。扩增程序如下:95 °C 预变性 30 s;95 °C 5 s,60 °C 34 s,共 40 个循环;熔解曲线阶段设置为 95 °C 15 s;60 °C 60 s;95 °C 15 s。为验证棕榈酸钠造模是否成功、是否存在炎症及炎症严重程度,以及 miR-29c-5p 是否与靶基因 HDAC2 存在互作,采用 RT-qPCR 检测炎症因子白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) 以及靶基因 HDAC2 的 mRNA 表达水平。RT-qPCR 扩增程序如下:95 °C 预变性 30 s;95 °C

10 s; 60 °C 30 s, 共 40 个循环; 溶解曲线阶段设置为 95 °C 15 s; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s。miRNA 内参为 U6, mRNA 内参为 GAPDH 以校正加样差异, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1. RT-qPCR 引物序列  
Table 1. Primer sequences for RT-qPCR

基因	序列(5'→3')
miR-29c-5p	GGCCCGATTCTCCTGGTGTTCAAAA
U6 上游	CAGCACATATACTAAAATTGGAACG
U6 下游	ACGAATTTGCGTGTTCATCC
TNF- $\alpha$ 上游	GCCCATGTTGTAGCAAACCCT
TNF- $\alpha$ 下游	GTTATCTCTCAGCTCCACGC
IL-6 上游	CAATGAGGAGACTTGCCTGCTG
IL-6 下游	GGTCAGGGGTGTTATTGCAT
HDAC2 上游	CCGCATGACCCATAACTTGCT
HDAC2 下游	TCATTCTTCGGCAGTGGCTT
GAPDH 上游	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH 下游	TTCCCGTTCAGCTCAGGGAT

### 1.10 Western blot 检测蛋白表达

取 4 个培养皿, 接种相同浓度的 EA. hy926 细胞, 采用完全培养基进行培养, 待细胞汇合到 60% ~ 80% 时, 在 EA. hy926 中沉默或过表达 miR-29c-5p 后进行高脂处理, 具体培养方法同上。处理结束后, 用 PBS 洗涤细胞 1 次; 向培养皿中加入细胞裂解液与蛋白磷酸酶抑制剂混合物, 同时使用细胞刮刀收集细胞, 置于冰上裂解约 15 min 以提取总蛋白; 随后以 12 000 r/min 的转速离心 15 min, 取上清液; 采用 BCA 法测定蛋白浓度。按比例加入 Loading Buffer, 煮沸 5 ~ 7 min 使蛋白变性。根据目标蛋白的分子量大小选择适配的分离胶, 先以 80 V 低电压驱动样品进入分离胶, 再将电压调高至 120 V 进行蛋白分离。用甲醇活化 PVDF 膜后, 在冰浴条件下将分离后的蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜上, 随后使用脱脂奶粉封闭膜上的非特异性结合位点。按照试剂说明书稀释抗体, 加入一抗, 于 4 °C 条件下孵育过夜; 随后用 TBST 洗涤膜 3 次, 每次 5 min。加入稀释好的二抗, 室温避光孵育 1 ~ 1.5 h, 再用 TBST 洗涤膜 3 次, 每次 5 min。将显影液 A 液与 B 液按 1 : 1 比例混合配制, 使用凝胶成像仪进行显影。采用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析。

### 1.11 预测目标靶基因

通过 miRNA 靶基因预测工具 miRWalk 与 TargetScan 对 miR-29c-5p 的潜在靶基因进行筛选, 结合文献调研确定关键靶基因 HDAC2。为验证调控关系, 分别通过 Western blot、RT-qPCR 及双荧光素酶报告基因实验进行功能验证, 双荧光素酶报告基因实验由武汉金开瑞生物有限公司提供技术服务。

### 1.12 统计学分析

采用 SPSS 27.0 和 GraphPad 8.0 软件进行统计学处理, 每组包含至少 3 个独立生物学重复。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间参数比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-29c-5p 与冠心病相关

本研究纳入 79 例冠心病标本, 81 例健康对照组标本。冠心病组来自广西壮族自治区人民医院心血管内科, 健康对照组来源于广西壮族自治区人民医院健康体检中心。所有研究对象的外周血样本均于清晨空腹状态下采集, 并在受试者入院后、未接受任何药物或介入治疗前完成采样, 外周血采集后于规定时间内进行离心分离白细胞, 随后立即置于 -80 °C 冰箱中保存, 以便后续提取 miRNA。冠心病入选标准为冠状动脉造影检查至少一支主要冠状动脉(左主干、前降支、回旋支、右冠状动脉)管腔直径狭窄  $\geq 50\%$ 。排除标准包括: 肥厚型梗阻性心肌病、急性心肌炎、心包炎、重度心力衰竭、严重肝肾功能不全、恶性肿瘤、自身免疫性疾病、严重感染、未控制的严重高血压、内分泌疾病。受试者均无精神疾病知情且同意, 该研究由广西医科大学伦理委员会批准(批准号: 20160304-25)。患者的人口学和临床特征见表 2, 其中空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)由广西壮族自治区人民医院检验科生物化学分析仪检测。冠心病组与健康对照组的年龄、体重指数(body mass index, BMI)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、FBG、LDLC 水平在两组间差异无显著性; 与健康对照组比较, 冠心病组 TC 升高 5.6%, TG 升高 12.6% (均  $P < 0.01$ ), HDLC 降低 8.73% ( $P < 0.01$ )。

表 2. 受试者主要临床参数资料

**Table 2. Clinical parameters of the CHD patients and controls**

临床指标	健康对照组 (n=81)	冠心病组 (n=79)	t	P
年龄/岁	63.12±5.83	64.82±5.56	-1.885	0.061
BMI/(kg/m <sup>2</sup> )	23.78±1.95	23.99±2.24	-0.644	0.521
SBP/(mmHg)	136.21±19.26	134.03±20.82	0.689	0.492
DBP/(mmHg)	79.96±11.98	79.49±12.34	0.247	0.805
FBG/(mmol/L)	4.94±0.41	4.69±0.65	0.112	0.911
TC/(mmol/L)	4.62±0.57	4.88±0.51	-3.091	0.002
TG/(mmol/L)	1.11±0.36	1.25±0.31	-2.661	0.009
HDLc/(mmol/L)	1.26±0.26	1.15±0.15	3.277	0.001
LDLc/(mmol/L)	2.89±0.63	2.85±0.51	-0.616	0.539

RT-qPCR 检测健康对照组和冠心病组外周血白细胞 miR-29c-5p 的表达水平。结果显示,与健康对照组相比,冠心病患者 miR-29c-5p 的相对表达水平在外周血白细胞中下调 38.11% ( $P<0.01$ ;图 1A)。使用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析外周血白细胞 miR-29c-5p 对冠心病的诊断价值,ROC 曲线分析提示,miR-29c-5p 的曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.712(95% CI: 0.632~0.792,  $P<0.01$ ),说明 miR-29c-5p 对于冠心病具有一定的诊断意义(图 1B)。

2.2 内皮细胞高脂损伤模型的构建

CCK-8 法评估不同浓度棕榈酸钠(0~500  $\mu\text{mol/L}$ )处理的 EA.hy926 细胞的活力,发现其半抑制浓度

(IC<sub>50</sub>)约为 300  $\mu\text{mol/L}$ (图 2A)。与对照组细胞相比,经此浓度处理的高脂损伤模型组细胞,其炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 相对表达水平分别升高 135 倍和 3.26 倍(均  $P<0.01$ ,图 2B 和 2C),凋亡检测进一步表明模型组细胞凋亡率为 55.3%(图 2D)。以上结果共同提示,脂质棕榈酸钠在 300  $\mu\text{mol/L}$  时,能有效诱导 EA.hy926 细胞发生炎症损伤和细胞凋亡,表明高脂损伤细胞模型构建成功。进一步检测 miR-29c-5p 在高脂损伤模型组和对照组细胞的相对表达水平,发现高脂损伤模型组的表达水平为对照组的 2.12 倍( $P<0.01$ ,图 2E)。

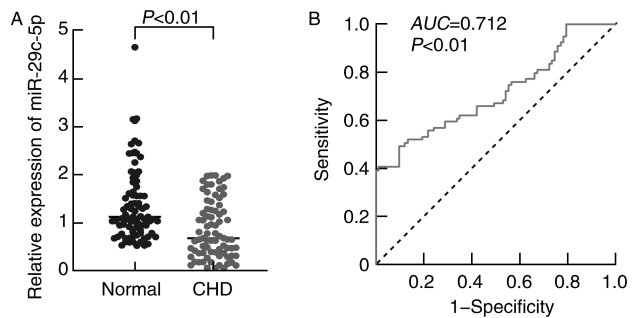


图 1. miR-29c-5p 在冠心病患者外周血白细胞中的表达情况及其受试者工作特征曲线

A 为冠心病组与健康对照组外周血白细胞 miR-29c-5p 的表达水平; B 为 miR-29c-5p 诊断冠心病的受试者工作特征曲线。

Figure 1. Expression of miR-29c-5p in the peripheral blood leukocytes of CHD patients and its receiver operating characteristic curve

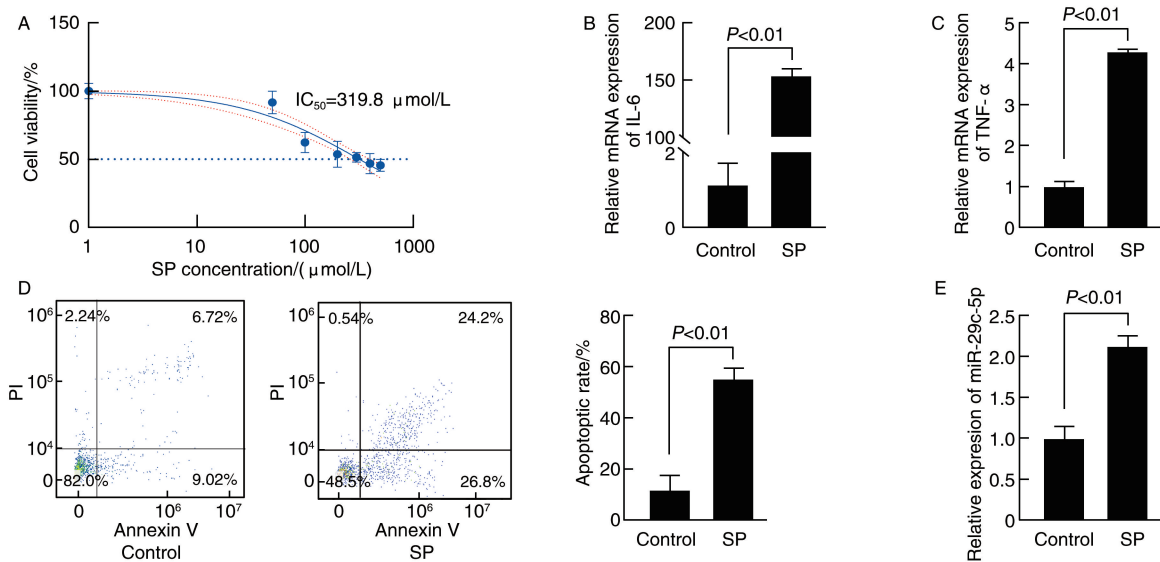


图 2. 内皮细胞高脂损伤模型的构建

A 为 CCK-8 检测不同浓度棕榈酸钠处理 EA.hy926 细胞 24 h 后细胞活力变化;B 和 C 分别为 RT-qPCR 检测 EA.hy926 细胞经 300  $\mu\text{mol/L}$  棕榈酸钠处理 24 h 后,IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 相对表达量( $n=3$ );D 为流式细胞仪检测 EA.hy926 细胞经 300  $\mu\text{mol/L}$  棕榈酸钠处理 24 h 后的凋亡情况及细胞凋亡统计( $n=3$ );E 为 RT-qPCR 检测 EA.hy926 细胞经 300  $\mu\text{mol/L}$  棕榈酸钠处理 24 h 后 miR-29c-5p 的相对表达量( $n=3$ )。

Figure 2. Establishment of a high lipid-induced injury model in endothelial cells

### 2.3 沉默 miR-29c-5p 表达通过调控凋亡相关蛋白的表达减轻高脂诱导的内皮细胞损伤

在 EA. hy926 细胞中过表达 miR-29c-5p 其细胞活力下降约 28.38% ;沉默 miR-29c-5p 的表达其细胞活力升高约 19.44% (均  $P < 0.01$  ;图 3A)。在棕榈酸钠诱导 EA. hy926 细胞损伤模型中分别过表达 miR-29c-5p (SP + miR-29c-5p mimics) 和沉默 miR-29c-5p (SP + miR-29c-5p inhibitor), 发现过表达组中 Bcl-2 蛋白水平下降 10.06% ( $P < 0.01$ ), Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达水平分别上升 16.64% 和 5.89% ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );相反,在沉默组中 Bcl-2 蛋白水平升高 14.24% ( $P < 0.01$ ), Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达水平分别下降 34.75% 和 23.42% (均

$P < 0.01$ ) (图 3B-E)。这些结果共同提示沉默 miR-29c-5p 表达在高脂诱导的内皮细胞中能显著延缓细胞的损伤,抑制 miR-29c-5p 表达对高脂损伤的内皮细胞发挥着一定的保护作用。

### 2.4 沉默 miR-29c-5p 表达缓解高脂诱导的内皮细胞氧化应激

MDA 和 ROS 检测结果显示,与 SP+mimics NC 组相比,过表达组 (SP + miR-29c-5p mimics) 细胞内脂质过氧化水平 (MDA) 升高 1.3 倍 ( $P < 0.05$ ),氧化应激水平 (ROS) 升高 68.1% ( $P < 0.05$ );相反,沉默组 (SP + miR-29c-5p inhibitor) 细胞内脂质过氧化水平降低 24.7% ( $P < 0.05$ ),氧化应激水平降低 23.75% ( $P < 0.01$ ;图 4A 和 4B)。

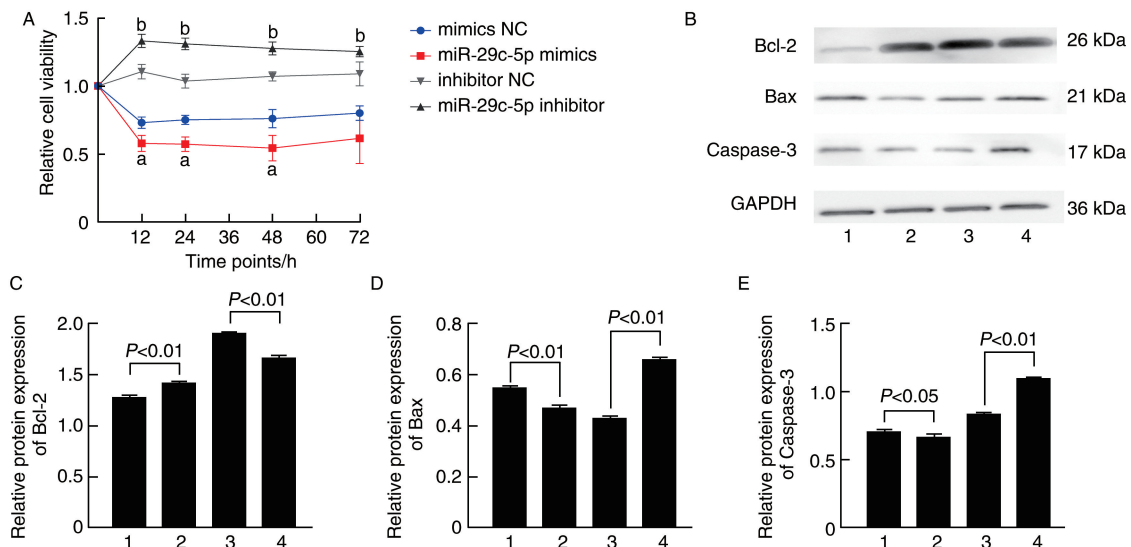


图 3. miR-29c-5p 对高脂诱导的内皮细胞凋亡的影响

A 为过表达和沉默 miR-29c-5p 组及相应阴性对照组细胞存活率随时间(0 ~ 72 h)的变化 ( $n = 3$ );B 为 Western blot 测定高脂模型下过表达和沉默 miR-29c-5p 对 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响;C ~ E 为 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达统计分析 ( $n = 3$ )。

1 为 SP+miR-29c-5p mimics 组,2 为 SP+mimics NC 组,3 为 SP+miR-29c-5p inhibitor 组,4 为 SP+inhibitor NC 组。  
a 为  $P < 0.01$ ,与 mimics NC 组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 inhibitor NC 组比较。

Figure 3. Effect of miR-29c-5p on high-fat-induced endothelial cell apoptosis

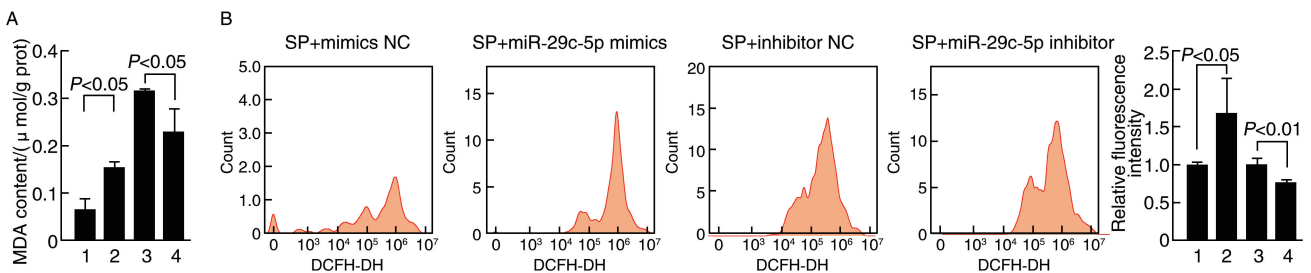


图 4. miR-29c-5p 对高脂诱导的内皮细胞氧化应激的影响

A 为高脂条件下 miR-29c-5p 对细胞内 MDA 含量的影响 ( $n = 3$ );B 为流式细胞仪检测 DCFH-DA 染色后 miR-29c-5p 对高脂条件下 ROS 荧光信号强度的影响及统计结果 ( $n = 3$ )。

1 为 SP+mimics NC 组,2 为 SP+miR-29c-5p mimics 组,3 为 SP+inhibitor NC 组,4 为 SP+miR-29c-5p inhibitor 组。

Figure 4. Effect of miR-29c-5p on high-fat-induced oxidative stress in endothelial cells

### 2.5 miR-29c-5p 调节 HDAC2 表达水平

利用 miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) 和 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 在线工具对 miR-29c-5p 的靶基因进行了预测, miR-Walk 预测靶基因后剔除重复基因以 bindingp = 1、accessibility < 0.05、au > 0.5 作为筛选条件, 共获得 1 602 个靶基因, TargetScan 预测到 410 个靶基因, 二者取交集后得到 43 个共同靶基因(图 5A)。结合既往文献研究结果, 将 HDAC2 作为重点关注对象。在高脂损伤的细胞模型中, Western blot 检测结果显示, 过表达 miR-29c-5p 使 HDAC2 的蛋白表达水平降低 13.79% ( $P < 0.05$ ), 而沉默 miR-29c-5p 的表达则使 HDAC2 的蛋白表达水平上升 39.58% ( $P <$

0.01; 图 5B)。RT-qPCR 检测结果显示, 过表达 miR-29c-5p 后 HDAC2 的 mRNA 表达水平下降 95.28% ( $P < 0.01$ ), 沉默 miR-29c-5p 则使 HDAC2 的 mRNA 表达水平升高 5.35 倍 ( $P < 0.01$ ; 图 5D)。最后使用双荧光素酶报告基因实验验证两者的直接作用。结果显示, 与 NC-mimics+HDAC2-WT 组相比, 在 miR-29c-5p-mimics + HDAC2-WT 组转染 293T 细胞的荧光比值降低 18.56% ( $P < 0.01$ ); 而与 NC-mimics + HDAC2-MUT 组相比, miR-29c-5p-mimics + HDAC2-MUT 组转染 293T 细胞的荧光比值无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 提示 miR-29c-5p 与 HDAC2 的 3'UTR 区有直接结合的作用(图 5E)。综上, miR-29c-5p 靶向 HDAC2 3'UTR 区抑制 mRNA 和蛋白的表达。

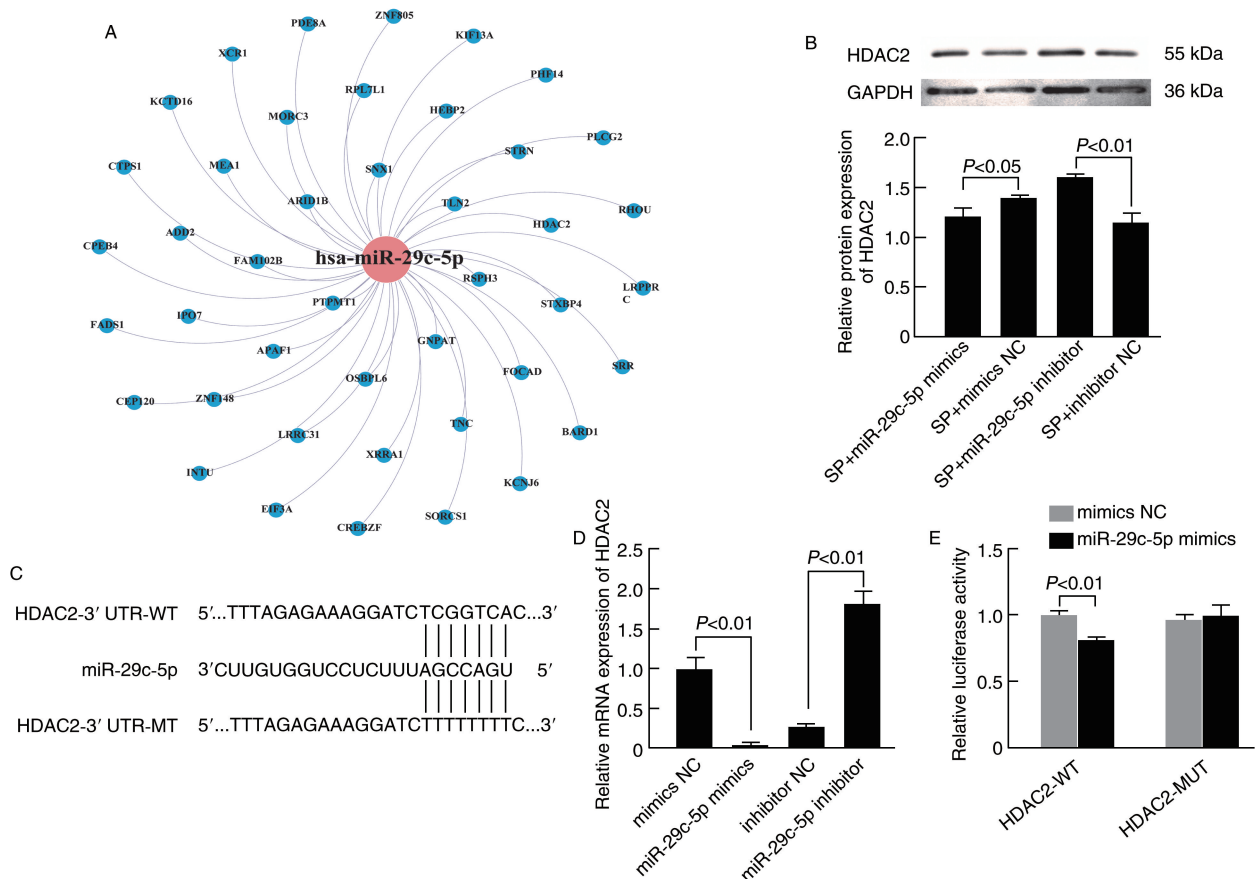


图 5. miR-29c-5p 作用靶点

A 为 miRWalk 与 TargetScan 数据库预测靶基因的交集基因; B 为 Western blot 测定高脂损伤模型下过表达和沉默 miR-29c-5p 对 HDAC2 蛋白表达的影响及统计结果 ( $n=3$ ); C 为 HDAC2 与 miR-29c-5p 之间预测的结合位点示意图; D 为过表达和沉默 miR-29c-5p 对 HDAC2 mRNA 表达的影响 ( $n=3$ ); E 为双荧光素酶报告基因实验检测共转染 miR-29c-5p mimics 与 HDAC2-WT(野生型)或 HDAC2-MUT(突变型)载体的荧光素酶活性变化 ( $n=5$ )。

Figure 5. Target genes of miR-29c-5p

## 3 讨论

冠心病是全球主要的死亡原因之一, 血管内皮

细胞损伤是其核心病理环节。高脂血症常通过诱发氧化应激和炎症反应破坏内皮屏障功能, 进而促进动脉粥样硬化的发生发展<sup>[11]</sup>。miRNA 作为关键

的转录后调控因子,广泛参与脂质代谢、炎症反应及内皮功能等生命活动的精细调控<sup>[12]</sup>。研究表明,多种 miRNA 在高脂条件下表达异常,进而加剧内皮细胞凋亡及动脉粥样硬化进程。例如,有研究发现血脂异常可上调内皮细胞中的 miR-652-3p,导致胰岛素基因增强子结合蛋白 1 (insulin gene enhancer binding protein 1, ISL1) 蛋白水平降低、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 激活受抑及一氧化氮 (nitric oxide, NO) 生成减少,从而加重内皮损伤<sup>[13]</sup>。miR-29b 通过靶向褪黑素膜受体 1A 型 (melatonin receptor 1A, MT1), 参与高脂饮食诱导的内皮通透性增加和细胞凋亡<sup>[14]</sup>。本研究聚焦于 miR-29c-5p, 旨在探讨其在冠心病外周血白细胞中的表达情况及其对高脂诱导的内皮细胞损伤的影响。

本研究发现, miR-29c-5p 在冠心病患者外周血白细胞中的表达水平显著下调,而在棕榈酸钠诱导的内皮细胞损伤模型中表达上调,并通过实验证实其具有促进内皮细胞凋亡和氧化应激的作用。这种在不同场景下的表达差异,可能与研究对象、细胞类型、病理背景及疾病阶段的不同密切相关。如 Patil 等<sup>[15]</sup> 研究表明,不同细胞类型的 miRNA 表达谱在部分 miRNA 中存在差异。此外,已有研究表明,同一 miRNA (如 miR-1、miR-21 等) 在不同疾病状态或不同研究中常表现出不同的表达水平,甚至呈现完全相反的功能。例如, miR-1 在心肌肥厚中表达下调,而在缺血状态下表达上调。这提示 miRNA 的表达并非静态,而是随疾病进展呈动态变化;同时,其表达在不同细胞类型间存在显著差异,即便在同一器官内也可能截然不同<sup>[16]</sup>。由于机体稳态的维持依赖复杂的分子调控网络。本研究发现,冠心病患者外周血白细胞中 miR-29c-5p 表达水平显著下调,这可能是机体为拮抗炎症反应、维持血管内环境稳态而产生的代偿性适应机制。miR-29 家族已被证实是心血管疾病的潜在治疗靶点,其可靶向胶原蛋白、层粘连蛋白等细胞外基质相关基因调节纤维化进程<sup>[17-18]</sup>。

棕榈酸钠与棕榈酸在生物学作用上具有高度一致性。研究表明,血清棕榈酸水平升高与心血管疾病的发生发展有关,且棕榈酸能直接诱导内皮细胞内质网应激和凋亡<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,冠心病组 TC、TG 及 HDLC 水平与健康对照组存在显著差异,可为本研究提供临床背景支持。尽管本研究未直接检测患者血清棕榈酸浓度,但 Lopez-Alvarenga 等<sup>[20]</sup> 在以阿拉斯加原住民为研究对象的多元回归分析中观察到,血清棕榈酸水平与 TG 水平呈正相

关。此外有研究表明,合并腹部肥胖与高甘油三酯血症的患者,其血清游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 水平显著高于无此并发症的患者<sup>[21]</sup>。因此,本研究选用棕榈酸钠构建内皮细胞损伤模型模拟冠心病的核心病理特征。在内皮细胞抑制 miR-29c-5p 的表达水平可显著缓解棕榈酸钠诱导的氧化损伤和细胞凋亡。这一发现揭示了 miR-29c-5p 在内皮细胞脂毒性损伤中的关键作用,为其成为冠心病防治的新靶标奠定了理论基础。

为进一步探讨 miR-29c-5p 调控内皮细胞损伤的分子机制,我们通过生物信息学方法预测并验证了其下游靶基因。并通过双荧光素酶报告基因实验、RT-qPCR 及 Western blot 相互验证了 miR-29c-5p 与 HDAC2 基因存在靶向关系。HDAC2 是重要的表观遗传调控因子,其通过去除组蛋白乙酰基促使染色质浓缩,进而抑制基因转录,广泛参与细胞周期、凋亡等生物学过程<sup>[22-23]</sup>。现有研究表明,HDAC2 在调控细胞凋亡中发挥着关键作用。例如,在肿瘤研究中,HDAC2 可通过激活 Janus 激酶-信号转导及转录激活因子 1 (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 1, JAK-STAT1) 通路促进干扰素  $\gamma$  诱导的程序性死亡配体 1 表达,抑制肿瘤细胞凋亡;而敲除 HDAC2 则促进凋亡<sup>[24]</sup>。另有研究揭示,HDAC2 具有去乳酸化酶活性,能降低组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸乳酸化 (histone H3 lysine 9 lactylation, H3K9la) 水平,维持血管内皮细胞稳态并抑制凋亡;而 H3K9la 过度修饰则可反馈抑制 HDAC2 表达,促进血管生成与细胞凋亡<sup>[25]</sup>。此外有研究指出,HDAC2 在内皮细胞中过表达可以抑制内皮功能障碍和促进内皮稳态<sup>[26]</sup>。既往研究与本研究结论一致,证实 miR-29c-5p 可通过靶向抑制 HDAC2 表达,调控内皮细胞的氧化损伤与凋亡。

本研究通过临床样本检测发现, miR-29c-5p 在冠心病患者中呈低表达;进一步通过内皮细胞高脂损伤模型验证了该分子的差异表达与内皮细胞凋亡及氧化应激存在关联。尽管临床样本与体外模型中 miR-29c-5p 的表达趋势存在差异,但这一现象反映了生物体在生理与病理状态下、整体与局部水平调控的复杂性。后续研究方向包括:(1) 在更大规模的临床队列中验证 miR-29c-5p 的诊断价值;(2) 深入探讨 HDAC2 下游的具体分子机制,利用染色质免疫沉淀测序或乙酰化蛋白质组学技术筛选 HDAC2 在内皮细胞中的关键下游靶基因,并通过回复实验,在过表达 HDAC2 的基础上,观察是否能拮抗 miR-29c-5p 所导致的内皮细胞凋亡和氧化应激损伤,以明确 HDAC2 是否通过特定信号轴介导其

生物学功能;(3)在动物模型中验证其体内功能,进一步明确其具体作用机制。

综上所述,miR-29c-5p 在冠心病患者外周血白细胞中表达下调,有助于冠心病的诊断。在内皮细胞中抑制 miR-29c-5p 表达可减缓高脂诱导的氧化损伤与凋亡,其保护效应的分子机制可能通过调控 HDAC2 的表达来实现。

#### [参考文献]

- [1] HENEIN M Y, VANCHERI S, LONGO G, et al. The role of inflammation in cardiovascular disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12906.
- [2] 苏美名, 赵致淇, 赵亚萍, 等. 转录因子 KLF2 和 KLF4 调控人血管内皮细胞血管稳态相关基因表达的特征[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(5): 375-385.
- SU M M, ZHAO M Q, ZHAO Y P, et al. Characteristics of transcription factors KLF2 and KLF4 regulating gene expression related to vascular homeostasis in human endothelial cells[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(5): 375-385.
- [3] NAVAR-BOGGAN A M, PETERSON E D, D'AGOSTINO R B Sr, et al. Hyperlipidemia in early adulthood increases long-term risk of coronary heart disease[J]. *Circulation*, 2015, 131(5): 451-458.
- [4] NIŦU E T, JIANU N, MERLAN C, et al. A comprehensive review of the latest approaches to managing hypercholesterolemia: a comparative analysis of conventional and novel treatments: part I[J]. *Life (Basel)*, 2025, 15(8): 1185.
- [5] CARTA G, MURRU E, BANNI S, et al. Palmitic acid: physiological role, metabolism and nutritional implications[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 902.
- [6] YANG Y, YU Q, LI B, et al. Palmitate lipotoxicity is closely associated with the fatty acid-albumin complexes in BV-2 microglia[J]. *PLoS One*, 2023, 18(4): e0281189.
- [7] KAPPLINGATTU S V, BHATTACHARYA S, ADLAKHA Y K. MiRNAs as major players in brain health and disease: current knowledge and future perspectives[J]. *Cell Death Discovery*, 2025, 11(1): 7.
- [8] MORENO-MOYA J M, VILELLA F, SIMÓN C. MicroRNA: key gene expression regulators[J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(6): 1516-1523.
- [9] DAI Q, SUN J, DAI T, et al. miR-29c-5p knockdown reduces inflammation and blood-brain barrier disruption by upregulating LRP6[J]. *Open Med*, 2022, 17(1): 353-364.
- [10] CHENG J, WEI Y, ZHAO Z, et al. MiR-29c-5p regulates the function of Buffalo granulosa cells to induce follicular atresia by targeting INHBA[J]. *Theriogenology*, 2023, 205: 50-62.
- [11] SHU Y J, BAO R F, JIANG L, et al. MicroRNA-29c-5p suppresses gallbladder carcinoma progression by directly targeting CPEB4 and inhibiting the MAPK pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(3): 445-457.
- [12] VISSERS T A C M, PIEK L, PATULEIA S I S, et al. Elevated miR-29c-5p expression in nipple aspirate fluid is associated with extremely high mammographic breast density[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(15): 3805.
- [13] HIGASHI Y. Endothelial function in dyslipidemia: roles of LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides[J]. *Cells*, 2023, 12(9): 1293.
- [14] 罗宇霖, 袁渊, 罗茂. 细胞外囊泡微小 RNA 在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(2): 157-164, 170.
- LUO Y L, YUAN Y, LUO M. Research progress on the role of extracellular vesicle microRNA in atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(2): 157-164, 170.
- [15] PATIL A H, BARAN A, BREHM Z P, et al. A curated human cellular microRNAome based on 196 primary cell types[J]. *Giga-science*, 2022, 11: giac083.
- [16] ZHU H Q, LI Q, DONG L Y, et al. MicroRNA-29b promotes high-fat diet-stimulated endothelial permeability and apoptosis in apoE knock-out mice by down-regulating MT1 expression[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176(3): 764-770.
- [17] PATIL A H, BARAN A, BREHM Z P, et al. A curated human cellular microRNAome based on 196 primary cell types[J]. *Giga-science*, 2022, 11: giac083.
- [18] ABDELLATIF M. Differential expression of microRNAs in different disease states[J]. *Circ Res*, 2012, 110(4): 638-650.
- [19] LIU M N, LUO G, GAO W J, et al. miR-29 family: a potential therapeutic target for cardiovascular disease[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166: 105510.
- [20] LOPEZ-ALVARENGA J C, EBBESSON S O, EBBESSON L O, et al. Polyunsaturated fatty acids effect on serum triglycerides concentration in the presence of metabolic syndrome components. The Alaska-Siberia Project[J]. *Metabolism*, 2010, 59(1): 86-92.
- [21] HE Y, LI S, JIANG L, et al. Palmitic acid accelerates endothelial cell injury and cardiovascular dysfunction via palmitoylation of PKM2[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(5): e2412895.
- [22] LOPEZ-ALVARENGA J C, EBBESSON S O, EBBESSON L O, et al. Polyunsaturated fatty acids effect on serum triglycerides concentration in the presence of metabolic syndrome components. The Alaska-Siberia project[J]. *Metabolism*, 2010, 59(1): 86-92.
- [23] YANG R F, ZHANG H, WANG Z, et al. A study on the relationship between waist phenotype, hypertriglyceridemia, coronary artery lesions and serum free fatty acids in adult and elderly patients with coronary diseases[J]. *Immun Ageing*, 2018, 15(1): 14.
- [24] LI Y, SETO E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(10): a026831.
- [25] WANG M, LIAO J, WANG J, et al. HDAC2 promotes autophagy-associated HCC malignant progression by transcriptionally activating LAPTM4B[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(8): 593.
- [26] XU P, XIONG W, LIN Y, et al. Histone deacetylase 2 knockout suppresses immune escape of triple-negative breast cancer cells via downregulating PD-L1 expression[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(8): 779.
- [27] FAN W, ZENG S, WANG X, et al. A feedback loop driven by H3K9 lactylation and HDAC2 in endothelial cells regulates VEGF-induced angiogenesis[J]. *Genome Biol*, 2024, 25(1): 165.
- [28] HORI D, NOMURA Y, NAKANO M, et al. Endothelial-specific overexpression of histone deacetylase 2 protects mice against endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2020, 54(5): 947-958.