

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2025. 08. 012

miR-29 对糖尿病中内皮细胞线粒体自噬的影响及其机制研究^{*}

申永慧¹, 刘俊红¹, 刘翠霞², 曹淑丽¹, 王群超¹, 连 娜¹

1. 邯郸市眼科医院内科, 河北邯郸 056000; 2. 邯郸市医疗保障局, 河北邯郸 056000

摘 要: **目的** 探讨 miR-29 对糖尿病小鼠内皮细胞线粒体自噬及胰岛素抵抗的影响及其作用机制。**方法** 选取 16 只雄性非糖尿病小鼠作为对照组, 另选取 32 只鼠龄匹配的雄性糖尿病小鼠构建糖尿病模型, 将造模成功的小鼠随机分为模型组和 miR-29 agomir 组, 检测小鼠血清空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白(HDL-C)、空腹胰岛素(FINS)水平及稳态模型评估胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、定量胰岛素敏感性检查指数(QUICKI)。在高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(HU-VECs)中建立糖尿病模型, 将增长率为 80% 的细胞分为 NC 组、HG 组、二甲基亚砜(DMSO)组、HG+miR-29 agomir 组、羧基氯化物间氯苯胺(CCCP)组、CCCp+miR-29 agomir 组, 分别采取不同的方式培养。通过苏木精-伊红(HE)、阿尔辛蓝(AB)、弹性纤维以及 Masson 和网状纤维染色研究 db/db 小鼠胸主动脉的病理变化。蛋白质印迹法检测 db/db 小鼠胸主动脉, 以及高糖和 CCCP 诱导的 HUVECs 中 BCL2 相关的 X(BAX)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Beclin1、Parkin 和 PTEN 诱导的激酶 1(Pink1)蛋白的表达水平。细胞划痕试验和 Mito-Tracker Red CMXRos 染色分别检测 HUVECs 的迁移情况和线粒体活性。**结果** 模型组和 miR-29 agomir 组血清 TC、TG、LDL-C、FBG、FINS 水平及 HOMA-IR、QUICKI 高于对照组, 且模型组高于 miR-29 agomir 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。模型组和 miR-29 agomir 组血清 HDL-C 水平低于对照组, 且模型组低于 miR-29 agomir 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。HE 染色结果显示, 与对照组相比, 模型组动脉壁明显增厚, 动脉中膜和外膜间隙加宽, 浸润细胞显著增加。AB 染色结果显示, 与对照组相比, 模型组和 miR-29 agomir 组小鼠的动脉中膜和外膜间隙中可见蓝色酸性黏液。Masson 染色结果显示, 与对照组相比, 模型组的胶原纤维明显较厚, 细胞排列混乱且分布不均。弹性纤维染色结果显示, 与对照组相比, 模型组的动脉中膜和外膜间隙变宽, 并失去了原来的不均匀形状。网状纤维染色结果显示, 与对照组相比, 模型组和 miR-29 agomir 组小鼠的网状纤维色增强并紊乱。模型组和 miR-29 agomir 组小鼠的胸主动脉 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平高于对照组, 且模型组高于 miR-29 agomir 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。模型组和 miR-29 agomir 组小鼠的胸主动脉 Bcl-2 蛋白表达水平低于对照组, 且模型组低于 miR-29 agomir 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。HG 组 HUVECs 的伤口距离长于 NC 组, HG+miR-29 agomir 组伤口距离短于 NC 组和 HG 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。HG 组 HUVECs 的线粒体活性弱于 NC 组, HG+miR-29 agomir 组 HUVECs 的线粒体活性强于 HG 组, 弱于 NC 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。HG 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 表达水平高于 NC 组, HUVECs 中 Bcl-2 表达水平低于 NC 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。HG+miR-29 agomir 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 表达水平低于 HG 组和 NC 组, HUVECs 中 Bcl-2 表达水平高于 HG 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。CCCp 组 HUVECs 的伤口距离长于 NC 组, 线粒体活性弱于 NC 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。CCCp+miR-29 agomir 组 HUVECs 的伤口距离短于 NC 组和 CCCP 组, 线粒体活性强于 CCCP 组, 弱于 NC 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。CCCp 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平高于 NC 组, Bcl-2 蛋白表达水平低于 NC 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。CCCp+miR-29 agomir 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平低于 CCCP 组, Bcl-2 表达水平高于 CCCP 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。CCCp+miR-29 agomir 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平低于 NC 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** miR-29 agomir 显著改善 db/db 小鼠的高脂血症、高血糖、高胰岛素血症和胰岛素抵抗。此外, 根据组织病理学分析, 它显著减轻了糖尿病诱导的血管内皮功能障碍。在 db/db 小鼠胸主动脉中, 高糖和 CCCP 诱导的 HUVECs 中, miR-29 agomir 显著增加 Bcl-2 的表达, 减少 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 的表达, 从而保护内皮细胞免受凋亡和线粒体自噬。此外, miR-29 agomir 具有显著增强高糖和 CCCP 诱导的 HUVECs 的迁移、线粒体活性的作用。miR-29 通过下调内皮细胞的凋亡和抑制线粒体自噬来改善糖尿病诱导的内皮和线粒体功能障碍, 提示 miR-29 可能是糖尿病胰岛素抵抗中的潜在治疗靶点。

关键词: 微小 RNA-29; 内皮细胞; 线粒体自噬; 胰岛素抵抗

^{*} 基金项目: 2022 年度河北省医学科学研究课题计划(20220479)。

作者简介: 申永慧, 女, 主治医师, 主要从事内科方向的研究。

中图法分类号:R587.1;R781.6+4

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)08-1067-10

Effect of miR-29 on mitochondrial autophagy in endothelial cells in diabetes mellitus and its mechanisms*

SHEN Yonghui¹, LIU Junhong¹, LIU Cuixia², CAO Shuli¹, WANG Qunchao¹, LIAN Na¹

1. Department of Internal Medicine, Handan Eye Hospital, Handan, Hebei 056000, China;

2. Handan Medical Security Bureau, Handan, Hebei 056000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of miR-29 on mitochondrial autophagy and insulin resistance of endothelial cells and its mechanism. **Methods** Sixteen male non-diabetic mice were selected as the control group, and 32 male diabetic mice with matched mouse ages were selected to construct a diabetes model. The mice successfully constructed were randomly divided into model group and miR-29 agomir group. The serum levels of fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein (HDL-C), fasting insulin (FINS), homeostasis model assessment of insulin resistance index (HOMA-IR) and quantitative insulin sensitivity index (QUICKI) were detected. A diabetes model was established in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by high glucose. The cells with 80% rate growth were divided into NC group, HG group, dimethyl sulfoxide (DMSO), HG+miR-29 agomir group, carbonyl cyanide m-chlorophenzone (cCCCP) group and CCCP+miR-29 agomir group which were cultured in different ways. The pathological changes of thoracic aorta in db/db mice were studied by hematoxylin and eosin, Alcian blue (AB), elastic fiber, Masson and reticular fiber staining. The protein expression levels of BCL2-associated X (BAX), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Beclin1, Parkin, and PTEN-induced kinase 1 (Pink1) in the thoracic aorta, hyperglycemic and CCCP-induced HUVECs of db/db mice was detected by protein immunoblotting. Cell scratch assay and MitoTracker Red CMXRos staining were used to detect HUVECs migration and mitochondrial activity respectively. **Results** The serum levels of TC, TG, LDL-C, FBG, FINS, HOMA-IR and QUICKI in model group and miR-29 agomir group were higher than those in control group, and the model group were higher than those in miR-29 agomir group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The serum HDL-C level of model group and miR-29 agomir group was lower than that of control group, and the serum HDL-C level of model group was lower than that of miR-29 agomir group, with statistical significance ($P<0.05$). HE staining results showed that compared with the control group, the artery wall of the model group was significantly thickened, the space between the medial and outer membranes was widened, and the infiltrating cells were significantly increased. AB staining showed that compared with the control group, blue acidic mucus was visible in the interstitial space between the middle and outer membranes of the mice in the model group and miR-29 agomir group. Masson staining showed that compared with the control group, the collagen fibers in the model group were significantly thicker and the cells were disordered and unevenly distributed. The results of elastic fiber staining showed that compared with the control group, the gap between the media and the outer membrane of the artery in the model group became wider and lost the original uneven shape. The results of reticular fiber staining showed that compared with the control group, the reticular fiber color of mice in the model group and miR-29 agomir group was enhanced and disorganized. The protein expression levels of BAX, Beclin1, Parkin and Pink1 in thoracic aorta of mice in model group and miR-29 agomir group were higher than those in control group, and those in model group were higher than those in miR-29 agomir group, with statistical significance ($P<0.05$). The protein expression level of Bcl-2 protein in thoracic aorta of mice in model group and miR-29 agomir group was lower than that in control group, and the model group was lower than that in miR-29 agomir group, with statistical significance ($P<0.05$). The wound distance of HUVECs in HG group was longer than that in NC group, and the wound distance of HG+miR-29 agomir group was shorter than that in NC group and HG group, with statistical significance ($P<0.05$). The mitochondrial activity of HUVECs in HG group was weaker than that in NC group, and the mitochondrial activity of HUVECs in HG+miR-29 agomir group was stronger than that in HG group but weaker than that in NC group, with statistical significance ($P<0.05$). The protein expression levels of BAX, Beclin1, Parkin and Pink1 in HUVECs in HG group were higher than those in NC group, while the protein expression level of Bcl-2 in HUVECs was lower than that in NC group, with statistical significance ($P<0.05$). The protein expression levels of BAX, Beclin1, Parkin and Pink1 in HUVECs of HG+miR-29 agomir group were lower than those of HG and NC groups, and the protein expression level of Bcl-2 in HUVECs was

higher than that of HG group, with statistical significance ($P < 0.05$). The wound distance of HUVECs in CCCP group was longer than that in NC group, and the mitochondrial activity was weaker than that in NC group, with statistical significance ($P < 0.05$). The wound distance of HUVECs in CCCP + miR-29 agomir group was shorter than that in NC and CCCP groups, and the mitochondrial activity was stronger than that in CCCP group but weaker than that in NC group, with statistical significance ($P < 0.05$). The protein expression levels of BAX, Beclin1, Parkin and Pink1 in HUVECs in CCCP group were higher than those in NC group, while the protein expression level of Bcl-2 was lower than that in NC group, with statistical significance ($P < 0.05$). The protein expression levels of BAX, Beclin1, Parkin and Pink1 in HUVECs of CCCP + miR-29 agomir group were lower than those of CCCP group, and the protein expression level of Bcl-2 was higher than that of CCCP group, with statistical significance ($P < 0.05$). The protein expression levels of BAX, Beclin1, Parkin and Pink1 in HUVECs in CCCP + miR-29 agomir group were lower than those in NC group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-29 agomir significantly improves hyperlipidemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance in db / db mice. In addition, according to histopathological analysis, it significantly reduces diabetes-induced vascular endothelial dysfunction. In diabetic thoracic aorta, high glucose and CCCP-induced HUVECs, miR-29 agomir significantly increase the protein expression of Bcl-2 and decrease the protein expression of BAX, Beclin1, Parkin and Pink1, thereby protecting endothelial cells from apoptosis and mitophagy. In addition, miR-29 agomir significantly enhance high glucose and CCCP-induced HUVECs migration, mitochondrial activity. miR-29 ameliorates diabetic induced endothelial and mitochondrial dysfunction by down-regulating endothelial cell apoptosis and mitochondrial autophagy, suggesting that miR-29 may be a potential therapeutic target in diabetic insulin resistance.

Key words: microRNA-29; endothelial cell; mitophagy; insulin resistance

2 型糖尿病(T2DM)是最常见的糖尿病类型^[1],其特征是进行性胰岛素缺乏、 β 细胞功能障碍和胰岛素抵抗^[2]。内皮功能障碍是 T2DM 引发大血管和微血管并发症的核心机制,在血管病变的发生、发展中起关键作用^[3]。因此,阐明糖尿病诱导内皮功能障碍的分子机制并据此开发更有效的治疗药物具有重要意义。

在糖尿病患者中,内皮细胞表现出线粒体损伤、线粒体功能障碍和抗氧化功能降低^[4]。线粒体是双膜结合的细胞器,在能量产生和细胞稳态中发挥着关键作用^[5]。线粒体功能障碍与线粒体钙超载有关,线粒体钙超载会导致线粒体膜电位降低、线粒体呼吸受损,以及过度产生活性氧,从而导致糖尿病诱发的内皮损伤^[6]。因此,靶向线粒体功能障碍可能是缓解糖尿病发生血管并发症的有效治疗策略。

有研究报道,miR-29 已被证明是许多生物学过程的重要调节因子,包括神经元成熟^[7]、纤维化^[8]、造血^[9]、复制衰老^[9]和免疫反应^[10]。最近有研究报道,miR-29 是 T2DM 基因网络中最强的候选微小 RNA(miRNA)之一^[11]。其他研究已表明,miR-29 对葡萄糖具有高度反应性,并可能调节 β 细胞增殖和胰岛素分泌^[12]。因此,本研探讨了 miR-29 对糖尿病诱导的内皮功能障碍的治疗作用及其潜在机制。本研究为后续研究提供了理论依据,有助于未来探讨将 miR-29 作为评估 T2DM 药物疗效的生物标志物,以及作为代谢综合征潜在治疗靶点的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性糖尿病小鼠(32 只,C57BL/KsJ db/

db,35~40 g)和与鼠龄匹配的雄性非糖尿病小鼠(16 只,C57BL/KsJ db/m,7 周龄,16~18 g)均购自常州卡文斯实验动物有限公司[许可证号:SCXK(苏)2021-0013]。所有动物饲养在邯郸康业制药有限公司[动物使用许可证号:SYXK(冀)2024-004],饲养环境的温度为(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为(60.0 ± 5.0)%,每 12 h 进行光、暗循环,所有小鼠均可获得饮用水和食物。miR-29 agomir 购自广州锐博生物技术有限公司。本研究经邯郸市眼科医院动物护理与使用委员会审核批准(院科伦审 AEWC-200718)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及干预 选择糖尿病小鼠,测定空腹血糖(FBG) >16.7 mmol/L,则可确认为糖尿病模型构建成功。将非糖尿病小鼠作为对照组,糖尿病小鼠随机分为模型组和 miR-29 agomir 组。miR-29 agomir 组小鼠每天腹腔注射 5 nmol/kg miR-29 agomir,对照组和模型组小鼠腹腔注射等量的生理盐水,持续 6 周。所有小鼠均用 5.0%异氟烷实施安乐死。从每只小鼠身上解剖胸主动脉,立即在液氮中冷冻,并置于 -80°C 环境中储存。

1.2.2 血清生物化学指标检测 实施干预措施 6 周后,测定小鼠血清生物化学指标。禁食 24 h,通过拆除小鼠眼球,从每只小鼠的眼眶中采集 1 mL 血液。采用 F006-1-1 血糖测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)检测 FBG 水平。采集全血并分离血清进行生物化学检测。采用全自动生物化学分析仪检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇

(LDL-C) 和高密度脂蛋白 (HDL-C) 水平。采用 H203-1-1 胰岛素测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)检测空腹胰岛素(FINS)水平。稳态模型评估胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的计算公式如下: $HOMA-IR = FBG (mmol/L) \times FINS (mIU/L) / 22.5^{[13]}$ 。此外,还使用定量胰岛素敏感性检查指数(QUICKI)评估胰岛素抵抗: $QUICKI = 1 / [\log(FINS) + \log(FBG)]^{[14]}$ 。

1.2.3 组织病理学检测 将胸主动脉组织固定在 4.0%多聚甲醛中,在石蜡中包埋,并切片 5 μm 。将切片脱蜡至水中,分别采用苏木精-伊红(HE,G1120,Solarbio)、阿尔新蓝(AB,BA4121,BASO)、弹性纤维(BA4083A,BASO)、Masson(BA4079A,BASO)及网状纤维(BA4165,BASO)染色。HE 染色:切片用 AB 染色 5 min,并在室温下用盐酸乙醇分化 3 s,用自来水冲洗 30 min 后变蓝,切片用伊红染色溶液染色 2 min。AB 染色:切片用 AB 染色,持续 20 min,再用 0.5%的碘酸水溶液氧化 10 min 切片,并用 Schiff 试剂染色 15 min。弹性纤维染色:切片用 Lugol 碘溶液孵育 5 min,并用硫代硫酸钠处理 5 min,随后用醛-品红染色溶液染色 10 min。Masson 染色:切片用 Weigert 氏铁苏木精染色 5 min,用 1.0%盐酸乙醇分化几秒钟后,用自来水洗涤切片 30 min 并变蓝,用胭脂红酸性品红溶液染色 10 min,再用磷钼酸水溶液处理 5 min 后,采用苯胺蓝溶液复染 5 min,用 1.0%冰醋酸处理 1 min。网状纤维染色:切片用 1.0%高锰酸钾氧化 5 min,2.0%草酸处理 2 min 和 1.0%硝酸铈处理 10 s,然后浸入氨水-银溶液中 1 min,用 95.0%乙醇洗涤后,切片在显影剂中显影 1 min。随后用 0.2%氯化金着色 1 min,并用 5.0%亚硫酸钠处理 1 min,用梯度乙醇脱水后,使用透明二甲苯固定,然后用中性树胶固定。最后,在光学显微镜(日本 Nikon 公司)下对切片进行研究。

1.2.4 HUVEC 培养和干预处理 人脐静脉内皮细胞(HUVECs,美国模式培养物集存库)放入加了 10.0%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 Gibco 培养基中培养,置于 37 $^{\circ}C$ 、5.0%CO₂ 的环境中进行培养。将增长率为 80.0%的细胞分为 NC 组、HG 组、二甲基亚砜(DMSO)组、HG+miR-29 agomir 组、CCCP 组、CCCP+miR-29 agomir 组。NC 组细胞正常培养;HG 组采用 30 mmol/L 高糖诱导的 HUVECs 构建糖尿病细胞模型;DMSO 组采用溶解于 0.1%DMSO 的 50 nmol/L 氧化磷酸化解偶联剂羰基氰化物间氯苯基脒(CCCP, HY-100941,美国 Med Chem Express)处理;HG+miR-29 agomir 组采用 30 mmol/L 高糖诱导的 HUVECs 构建糖尿病细胞模型联合 miR-29 抑制表达载体转染后进行培养;CCCP 组采用 30 mmol/L 高糖诱导的 HUVECs 构建糖尿病细胞模型,再添加 10

mmol/L CCCP 进行培养;CCCP+miR-29 agomir 组采用 30 mmol/L 高糖诱导的 HUVECs 构建糖尿病细胞模型联合 miR-29 过表达载体转染后再添加 10 mmol/L CCCP 进行培养。

1.2.5 蛋白质印迹法 通过裂解缓冲液裂解胸主动脉组织或 HUVECs。Bradford 蛋白质浓度测定试剂盒(P0006,上海碧云天生物技术有限公司)用于测定总蛋白质的浓度。通过 10.0%SDS-PAGE 分离蛋白质,并将其转移到 PVDF 膜(美国 Bio-Rad 公司)上。将膜与一抗[抗 BCL2 相关的 X(BAX, 1/1 000, ab53154,美国 Abcam 公司)、抗 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2, 1/1 000, ab194583,美国 Abcam 公司)、抗 Beclin1 (1/1 000, 11306-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司)、抗 Parkin(1/1 000, 14060-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司)、抗 PTEN 诱导的激酶 1(Pink1, 1/1 000; 23274-1-AP;武汉三鹰生物技术有限公司)和抗 β -肌动蛋白(β -actin, 1/1 000, 66009-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司)]在 4 $^{\circ}C$ 下孵育过夜。然后,用辣根过氧化物酶缀合的二抗(1/2 000, ab7090,美国 Abcam 公司)在室温下孵育 1 h。蛋白质条带用增强化学发光试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)进行可视化,然后通过 Image Pro Plus 6.0 软件进行定量。

1.2.6 细胞划痕试验 将 HUVEC 接种到 6 孔板(1×10^6 个细胞/孔)上。24 h 后,将 HUVECs 生长至完全融合,并用 10 μL 移液管尖端刮伤。然后,用无血清培养基培养 HUVECs 24 h。在光显微镜下在 0 h 和 24 h 获得图像。通过使用 Image Pro Plus 6.0 软件测量伤口距离来评估细胞划痕。

1.2.7 线粒体活性的测量 HUVECs 的线粒体在黑暗中用 100 nmol/L MitoTracker Red CMXRos 染色溶液染色 15 min。通过荧光显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)捕获图像。利用 Image Pro Plus 6.0 软件对线粒体荧光强度进行定量^[15]。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平比较 32 只糖尿病小鼠均造模成功,并被分为模型组和 miR-29 agomir 组,每组 16 只。模型组和 miR-29 agomir 组血清 TC、TG 和 LDL-C 水平高于对照组,且模型组高于 miR-29 agomir 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。模型组和 miR-29 agomir 组血清 HDL-C 水平低于对照组,且模型组低于 miR-29 agomir 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组小鼠血清 FBG、FINS 水平比较 模型组和 miR-29 agomir 组血清 FBG、FINS 水平高于对照组,且模型组高于 miR-29 agomir 组,差异均有统计学意

义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 各组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平比较($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	<i>n</i>	TC	TG	LDL-C	HDL-C
对照组	16	13.07±1.08	1.51±0.11	1.24±0.39	2.99±0.36
模型组	16	18.03±1.47 [*]	2.57±0.48 [*]	2.22±0.27 [*]	1.38±0.25 [*]
miR-29 agomir 组	16	15.29±1.07 ^{*#}	1.81±0.23 ^{*#}	1.41±0.38 ^{*#}	2.21±0.24 ^{*#}
<i>F</i>		62.113	45.477	33.407	116.822
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 2 各组小鼠血清 FBG、FINS 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FBG(mmol/L)	FINS(mIU/L)
对照组	16	5.34±0.61	5.29±0.63
模型组	16	31.01±2.24 [*]	15.36±1.72 [*]
miR-29 agomir 组	16	17.44±2.67 ^{*#}	10.52±1.62 ^{*#}
<i>F</i>		592.820	190.875
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠 HOMA-IR、QUICKI 比较 模型组和 miR-29 agomir 组 HOMA-IR、QUICKI 高于对照组,且模型组高于 miR-29 agomir 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

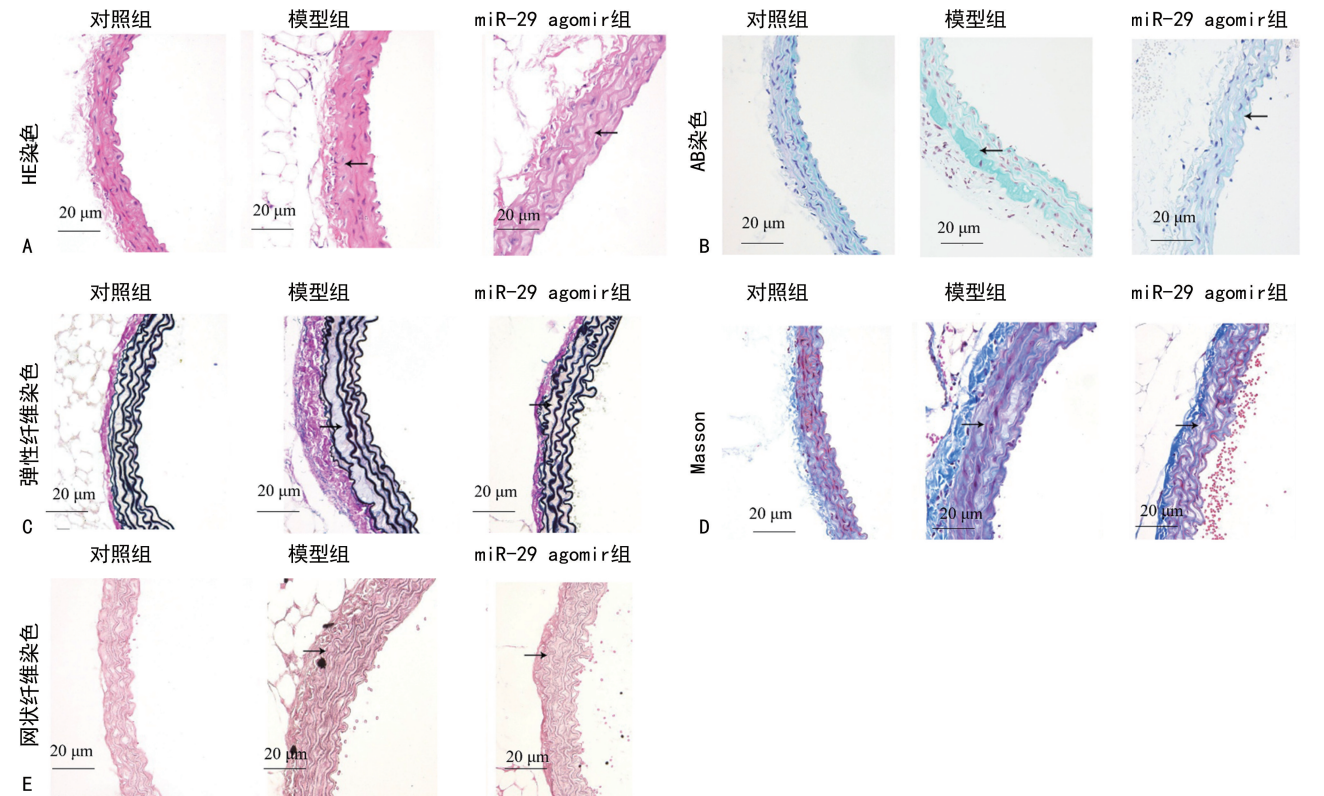
2.4 染色结果 HE 染色结果显示,与对照组相比,模型组动脉壁明显增厚,动脉中膜和外膜间隙加宽,浸润细胞显著增加,见图 1A。AB 染色结果显示,与对照组相比,模型组和 miR-29 agomir 组小鼠的动脉

中膜和外膜间隙中可见蓝色酸性黏液,见图 1B。弹性纤维染色结果显示,与对照组相比,模型组的胶原纤维明显较厚,细胞排列混乱且分布不均,见图 1C。Masson 染色结果显示,与对照组相比,模型组的动脉中膜和外膜间隙变宽,并失去了原来的不均匀形状,见图 1D。网状纤维染色结果显示,与对照组相比,模型组和 miR-29 agomir 组小鼠的网状纤维色增强并紊乱,见图 1E。

表 3 各组小鼠血清 HOMA-IR、QUICKI 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	HOMA-IR	QUICKI
对照组	16	1.25±0.18	10.63±0.77
模型组	16	21.12±2.33 [*]	46.37±2.37 [*]
miR-29 agomir 组	16	8.18±1.94 ^{*#}	27.96±3.39 ^{*#}
<i>F</i>		496.172	812.033
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。



注:A 为 HE 染色的代表性图像;B 为 AB 染色的代表性图像;C 为弹性纤维染色的代表性图像;D 为 Masson 染色的代表性图像;E 为胸主动脉的网状纤维染色的代表性图像;比例尺为 20 μm 。

图 1 各种方法的染色结果($\times 200$)

2.5 各组小鼠的胸主动脉 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平比较 模型组和 miR-29 agomir 组小鼠的胸主动脉 Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平高于对照组,且模型组高于 miR-29 agomir 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。模型组和 miR-29 agomir 组小鼠的胸主动脉 Bcl-2 蛋白表达水平低于对照组,且模型组低于 miR-29 agomir 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 4、图 2。

2.6 各组 HUVECs 伤口距离及线粒体活性比较 HG 组 HUVECs 的伤口距离长于 NC 组, HG+miR-29 agomir 组伤口距离短于 NC 组和 HG 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。HG 组 HUVECs 的线粒体活性弱于 NC 组, HG+miR-29 agomir 组 HUVECs 的线粒体活性强于 HG 组,弱于 NC 组,差

异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 3、4 和表 5。

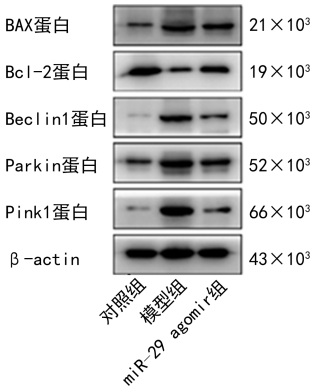


图 2 各组小鼠的胸主动脉 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达 (蛋白质印迹法结果)

表 4 各组小鼠的胸主动脉 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	BAX 蛋白	Bcl-2 蛋白	Beclin1 蛋白	Parkin 蛋白	Pink1 蛋白
对照组	16	0.21±0.03	0.71±0.02	0.12±0.02	0.23±0.03	0.11±0.01
模型组	16	0.43±0.03 [*]	0.33±0.02 [*]	0.52±0.02 [*]	0.78±0.02 [*]	0.63±0.02 [*]
miR-29 agomir 组	16	0.36±0.01 ^{*#}	0.53±0.03 ^{*#}	0.28±0.02 ^{*#}	0.35±0.04 ^{*#}	0.26±0.01 ^{*#}
<i>F</i>		299.211	956.471	1 520.003	1 297.759	5 372.502
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

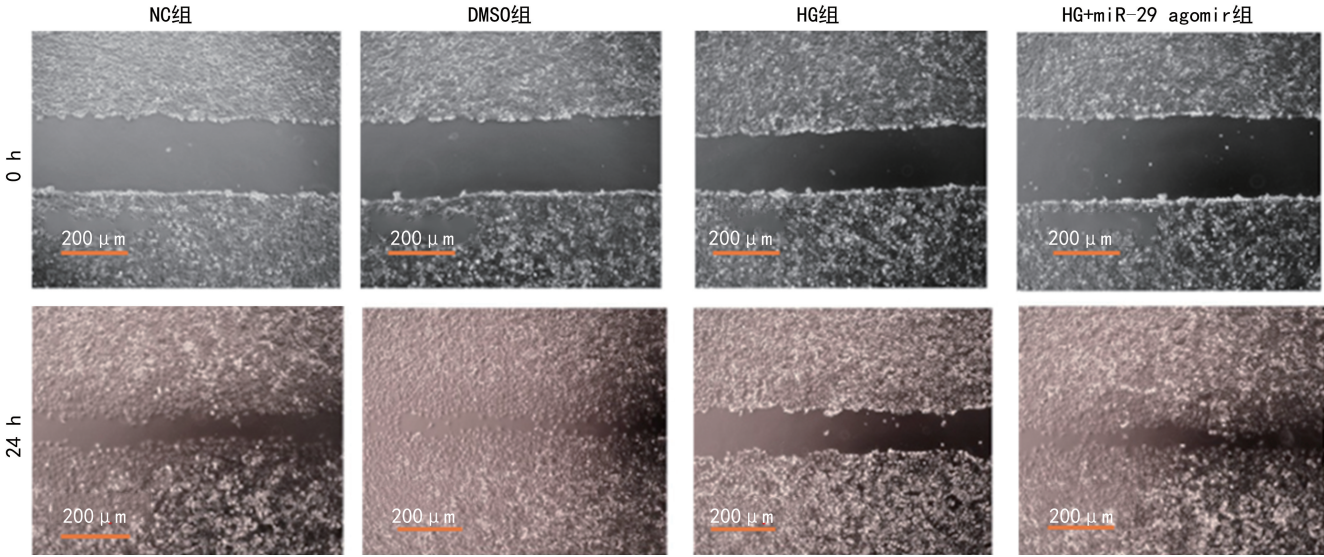


图 3 miR-29 增强 HG 诱导的 HUVECs 的迁移

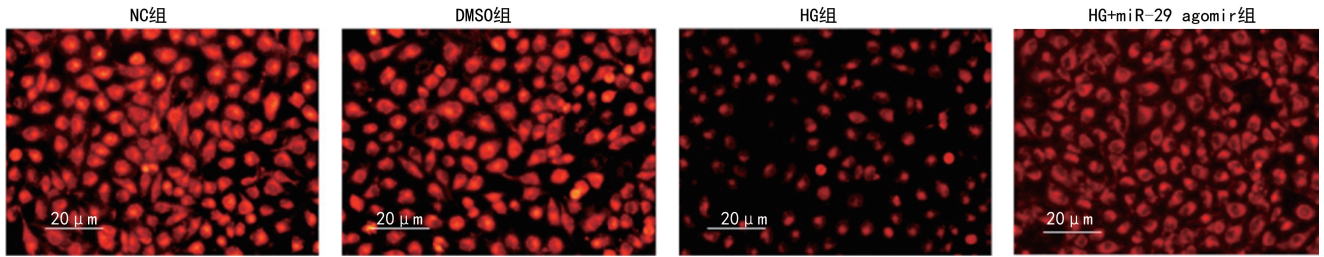


图 4 miR-29 增强 HG 诱导的 HUVECs 的线粒体活性

表 5 各组 HUVECs 伤口距离及线粒体活性比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	伤口距离(mm)	线粒体活性
NC 组	3	0.27±0.02	0.33±0.02
DMSO 组	3	0.25±0.03	0.32±0.03
HG 组	3	0.42±0.02*	0.13±0.02*
HG+miR-29 agomir 组	3	0.22±0.03*#	0.28±0.03*#
<i>F</i>		36.621	39.540
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 NC 组比较,**P*<0.05;与 HG 组比较,#*P*<0.05。

表 6 各组 HUVECs 中 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)						
组别	<i>n</i>	BAX 蛋白	Bcl-2 蛋白	Beclin1 蛋白	Parkin 蛋白	Pink1 蛋白
NC 组	3	0.24±0.03	0.13±0.02	0.17±0.01	0.18±0.03	0.23±0.02
DMSO 组	3	0.24±0.03	0.12±0.02	0.16±0.01	0.17±0.02	0.22±0.02
HG 组	3	0.78±0.04*	0.05±0.01*	0.24±0.02*	0.52±0.03*	0.48±0.04*
HG+miR-29 agomir 组	3	0.12±0.01*#	0.13±0.03#	0.08±0.01*#	0.11±0.01*#	0.10±0.01*#
<i>F</i>		299.315	9.944	73.572	180.311	122.424
<i>P</i>		<0.001	0.005	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 NC 组比较,**P*<0.05;与 HG 组比较,#*P*<0.05。

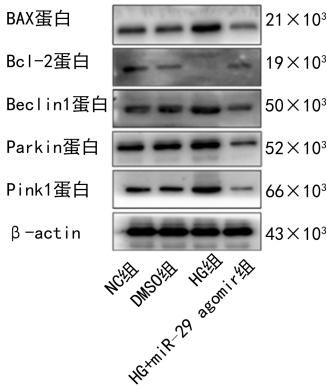


图 5 各组 HUVECs 中 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达蛋白质印迹法结果

2.8 各组 HUVECs 的伤口距离及线粒体活性比较 CCCP 组 HUVECs 的伤口距离长于 NC 组,线粒体活性弱于 NC 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

2.7 各组 HUVECs 中 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平比较 HG 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 表达水平高于 NC 组, HUVECs 中 Bcl-2 表达水平低于 NC 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。HG+miR-29 agomir 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 表达水平低于 HG 组和 NC 组, HUVECs 中 Bcl-2 表达水平高于 HG 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 6、图 5。

CCCP+miR-29 agomir 组 HUVECs 的伤口距离短于 NC 组和 CCCP 组,线粒体活性强于 CCCP 组,弱于 NC 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见图 6、7 和表 7。

2.9 各组 HUVECs 中 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平比较 CCCP 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平高于 NC 组, Bcl-2 蛋白表达水平低于 NC 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。CCCP+miR-29 agomir 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平低于 CCCP 组, Bcl-2 表达水平高于 CCCP 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。CCCP+miR-29 agomir 组 HUVECs 中 BAX、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平低于 NC 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见图 8、表 8。

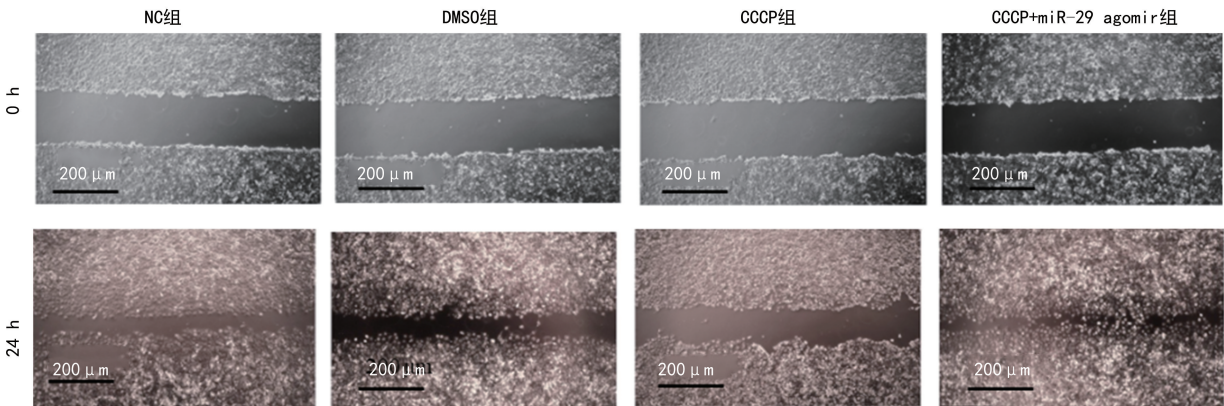


图 6 miR-29 增强 CCCP 诱导的 HUVECs 的迁移(比例尺=200 μm)

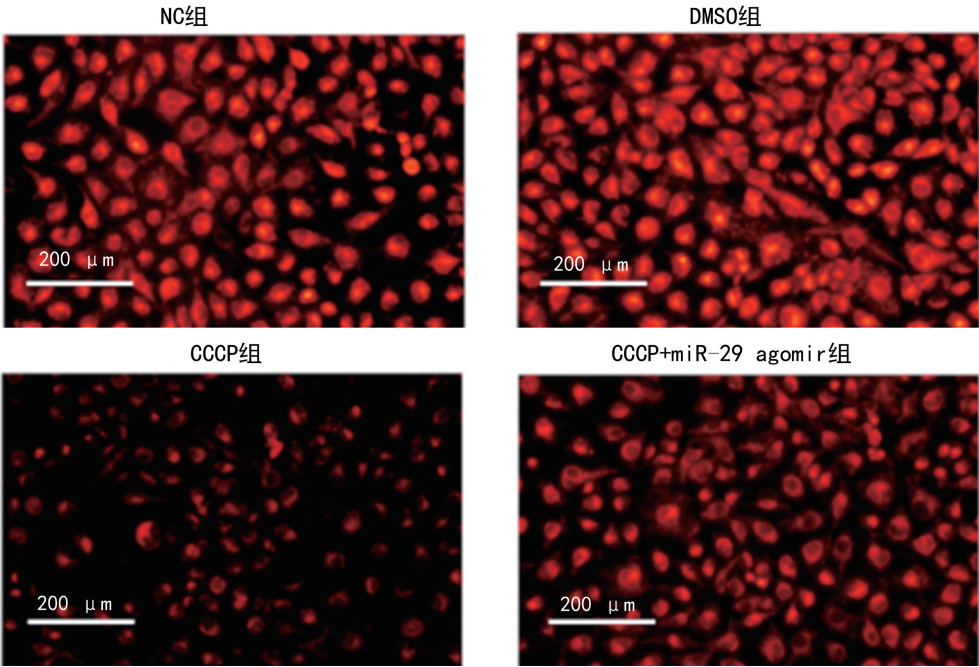


图 7 miR-29 增强 CCCP 诱导的 HUVECs 的线粒体活性(比例尺=200 μm)

表 7 各组 HUVECs 的伤口距离及线粒体活性比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	伤口距离(mm)	线粒体活性
NC 组	3	0.28±0.02	0.33±0.02
DMSO 组	3	0.27±0.03	0.34±0.03
CCCP 组	3	0.56±0.02 *	0.14±0.02 *
CCCP+miR-29 agomir 组	3	0.21±0.03 * #	0.28±0.03 * #
<i>F</i>		112.933	39.192
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 CCCP 组比较, # $P<0.05$ 。

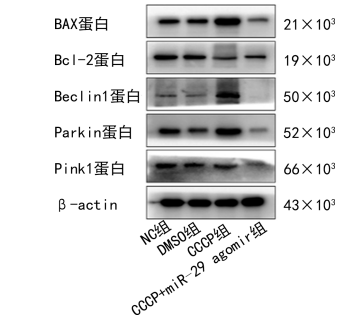


图 8 各组 HUVECs 中 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达(蛋白质印迹法结果)

表 8 各组 HUVECs 中 BAX、Bcl-2、Beclin1、Parkin 和 Pink1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)						
组别	<i>n</i>	BAX 蛋白	Bcl-2 蛋白	Beclin1 蛋白	Parkin 蛋白	Pink1 蛋白
NC 组	3	0.31±0.03	0.32±0.02	0.18±0.01	0.22±0.03	0.18±0.02
DMSO 组	3	0.29±0.03	0.31±0.02	0.18±0.01	0.21±0.02	0.18±0.02
CCCP 组	3	0.70±0.04 *	0.10±0.01 *	0.49±0.02 *	0.63±0.02 *	0.25±0.03 *
CCCP+miR-29 agomir 组	3	0.12±0.01 * #	0.17±0.03 * #	0.08±0.02 * #	0.10±0.02 * #	0.08±0.01 * #
<i>F</i>		206.306	77.562	380.314	310.521	32.612
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 CCCP 组比较, # $P<0.05$ 。

3 讨 论

糖尿病会增加心血管疾病的发生风险^[5]。慢性高血糖可直接导致内皮细胞损伤,内皮功能障碍是诱发糖尿病心血管事件的关键诱因^[16]。因此,开发有效的药物可能是改善糖尿病内皮功能的重要策略。本研究发现,miR-29 可以通过下调 db/db 小鼠内皮细胞,以及高糖和 CCCP 诱导的 HUVECs 的凋亡和线粒体自噬来减轻糖尿病内皮和线粒体功能障碍。

本研究建立了以高脂血症、高血糖、高胰岛素血症和胰岛素抵抗为特征的糖尿病 db/db 小鼠模型。研究结果显示,miR-29 agomir 治疗 6 周,显著降低了血清 TC、TG、LDL-C、FINS、FBG 水平及 HOMA-IR、QUICKI,提高血清 HDL-C 水平。先前研究表明,miR-29 是胰岛素刺激的葡萄糖代谢和脂质氧化的重要调节因子^[17]。异常的血糖波动可能与糖尿病慢性并发症有关^[3]。此外,患有高 TG 血症和胰岛素

抵抗的糖尿病患者患心血管疾病的风险更高^[18]。内皮功能障碍是心血管疾病的独立预测因子^[19]。根据组织病理学观察结果显示,db/db 小鼠胸主动脉出现血管内皮功能障碍的现象。miR-29 agomir 显著改善糖尿病引起的 db/db 小鼠血管内皮功能障碍。如上所述,miR-29 可以保护 oxLDL^[20]、血管紧张素 II^[21]和高糖^[22]诱导的内皮功能障碍。因此,针对 miR-29 的药物开发对糖尿病内皮功能障碍可能具有良好的治疗作用。

高糖诱导的内皮功能障碍是糖尿病相关血管并发症发生的关键起始因素^[3]。因此,本研究构建了高糖诱导的 HUVECs。糖尿病胸主动脉和高糖诱导的 HUVECs 均表现为内皮和线粒体功能障碍。线粒体动力学和线粒体自噬是调节线粒体稳态的关键过程^[23]。线粒体的形态和功能改变在糖尿病诱导的内皮功能障碍中发挥着至关重要的作用^[24]。线粒体自噬是维持线粒体质量的重要机制。这是 1 个复杂的过程,涉及线粒体和自噬机制之间的相互作用,受损或不需要的线粒体可以被选择性去除。越来越多的证据表明,减轻内皮细胞线粒体自噬可以保护内皮细胞免受高血糖的影响。例如,间充质干细胞通过 Pink1/Parkin 信号通路非依赖性线粒体自噬减轻高血糖介导的内皮损伤^[25]。通过检测细胞凋亡标记物(BAX 和 Bcl-2)和线粒体自噬标记物(Beclin1、Parkin 和 Pink1),本研究观察到 miR-29 agomir 显著改善了糖尿病胸主动脉和高糖诱导的 HUVECs 的细胞凋亡和线粒体自噬。线粒体钙缺陷与一氧化氮的内皮生物利用率降低有关,导致内皮依赖性血管舒张缺陷,这是糖尿病内皮功能障碍的 1 个关键特征^[26]。内皮细胞结构和功能的变化是许多心血管疾病的病理基础,尤其是糖尿病^[26]。高糖是内皮功能障碍的常见原因。在本研究中,miR-29 agomir 可以减轻高糖诱导的内皮细胞凋亡和线粒体功能障碍,从而改善血管内皮功能障碍。因此,miR-29 可能延缓心血管疾病的进展,降低其病死率,提高患者的生活质量。

通过用解偶联剂 CCCP 处理细胞,可以在实验条件下使线粒体去极化以模拟线粒体损伤状态^[27]。CCCP 导致线粒体内膜的膜电位急剧下降,这是通过线粒体内膜中的转运蛋白复合体导入蛋白质所必需的^[27]。Pink1 可以选择性地将 Parkin 募集到受损细胞的线粒体中,从而导致解偶联。即使没有线粒体膜去极化,Pink1 也会避免降解途径,并将 Parkin 募集到线粒体中,在其他健康的线粒体中引起线粒体自噬^[27]。因此,CCCP 通过激活 Pink1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬和降低线粒体膜电位来诱导线粒体损伤^[27]。miR-29 通过下调 Pink1、Parkin 和 Bec-

lin1 的表达,显著改善 CCCP 诱导的 HUVECs 线粒体自噬。总之,本研究结果表明,miR-29 agomir 治疗可以预防糖尿病诱导的内皮和线粒体功能障碍。

综上所述,本研究表明在 db/db 小鼠的胸主动脉,以及高糖和 CCCP 诱导的 HUVECs 中,miR-29 减轻了内皮细胞的凋亡和线粒体自噬。此外,miR-29 显著改善高糖和 CCCP 诱导的 HUVECs 的迁移、线粒体活性。因此,miR-29 具有潜在的治疗糖尿病内皮和线粒体功能障碍的潜力,其参与内皮细胞的凋亡和线粒体自噬的过程。

参考文献

- [1] KAUR R, KAUR M, SINGH J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies[J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1): 121.
- [2] WANG C H, WEI Y H. Roles of mitochondrial sirtuins in mitochondrial function, redox homeostasis, insulin resistance and type 2 diabetes[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5266.
- [3] KARAN A, BHAKKIYALAKSHMI E, JAYASURIYA R, et al. The pivotal role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetes-induced endothelial dysfunction [J]. Pharmacol Res, 2020, 153: 104601.
- [4] OTTO M, BUCHER C, LIU W T, et al. 12(S)-HETE mediates diabetes-induced endothelial dysfunction by activating intracellular endothelial cell TRPV1[J]. J Clin Invest, 2020, 130(9): 4999-5010.
- [5] JIN H, ZHU Y, LI Y P, et al. BDNF-mediated mitophagy alleviates high-glucose-induced brain microvascular endothelial cell injury[J]. Apoptosis, 2019, 24(5/6): 511-528.
- [6] PRASUN P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(10): 165838.
- [7] KOLE A J, SWAHARI V, HAMMOND S M, et al. miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis [J]. Genes Dev, 2011, 25(2): 125-130.
- [8] VAN ROOIJ E, SUTHERLAND L B, THATCHER J E, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(35): 13027-13032.
- [9] HAN Y C, PARK C Y, BHAGAT G, et al. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia[J]. J Exp Med, 2010, 207(3): 475-489.
- [10] MA F, XU S, LIU X G, et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ [J].

Nat Immunol, 2011, 12(9): 861-869.

[11] BARAN-GALE J, FANNIN E E, KURTZ C L, et al. Beta cell 5'-shifted isomiRs are candidate regulatory hubs in type 2 diabetes[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73240.

[12] BAGGE A, CLAUSEN T R, LARSEN S, et al. MicroRNA-29a is up-regulated in beta-cells by glucose and decreases glucose-stimulated insulin secretion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 426(2): 266-272.

[13] BIAGETTI B, AULINAS A, CASTERAS A, et al. HOMA-IR in acromegaly: a systematic review and Meta-analysis[J]. Pituitary, 2021, 24(2): 146-158.

[14] KATSUKI A, SUMIDA Y, GABAZZA E C, et al. QUICKI is useful for following improvements in insulin sensitivity after therapy in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(6): 2906-2908.

[15] SOUTAR M P M, KEMP THORNE L, ANNUARIO E, et al. FBS/BSA media concentration determines CCCP's ability to depolarize mitochondria and activate PINK1-PRKN mitophagy[J]. Autophagy, 2019, 15(11): 2002-2011.

[16] LESPAGNOL E, DAUCHET L, PAWLAK-CHAOUCH M, et al. Early endothelial dysfunction in type 1 diabetes is accompanied by an impairment of vascular smooth muscle function: a Meta-analysis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 203.

[17] MASSART J, SJÖGREN R J O, LUNDELL L S, et al. Altered miR-29 expression in type 2 diabetes influences glucose and lipid metabolism in skeletal muscle[J]. Diabetes, 2017, 66(7): 1807-1818.

[18] GLOVACI D, FAN W J, WONG N D. Epidemiology of diabetes mellitus and cardiovascular disease[J]. Curr Cardiol Rep, 2019, 21(4): 21.

[19] COCO C, SGARRA L, POTENZA M A, et al. Can epigenetics of endothelial dysfunction represent the key to precision medicine in type 2 diabetes mellitus[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): 2949.

[20] NOURMOHAMMADI K, BAYRAMI A, NADERI R, et al. Cyclosporine a induces cardiac remodeling through TGF-β/Smad3/miR-29 signaling pathway and alters gene expression of miR-30b-5p/CaMKIIδ isoforms pathways: alleviating effects of moderate exercise[J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(7): 5859-5870.

[21] SUN L L, ZHANG J J, LI Y W. Chronic central miR-29b antagonism alleviates angiotensin II-induced hypertension and vascular endothelial dysfunction[J]. Life Sci, 2019, 23: 116862.

[22] LI J, ZHANG Y J, YE Y Y, et al. Pancreatic β cells control glucose homeostasis via the secretion of exosomal miR-29 family[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(3): e12055.

[23] PARK Y S, CHOI S E, KOH H C. PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction[J]. Toxicol Lett, 2018, 284: 120-128.

[24] XIANG H, SONG R P, OUYANG J, et al. Organelle dynamics of endothelial mitochondria in diabetic angiopathy[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 895: 173865.

[25] ZHU W Z, YUAN Y J, LIAO G N, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate hyperglycemia-induced endothelial injury through modulation of mitophagy[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(8): 837.

[26] KUSMINSKI C M, GHABEN A L, MORLEY T S, et al. A novel model of diabetic complications: adipocyte mitochondrial dysfunction triggers massive β-Cell hyperplasia[J]. Diabetes, 2020, 69(3): 313-330.

[27] LIVINGSTON M J, WANG J H, ZHOU J L, et al. Clearance of damaged mitochondria via mitophagy is important to the protective effect of ischemic preconditioning in kidneys[J]. Autophagy, 2019, 15(12): 2142-2162.

(收稿日期: 2024-10-06 修回日期: 2025-01-11)

(上接第 1066 页)

[16] 李美霞. 宫颈高危型人乳头瘤病毒感染患者的阴道微生物生态分析[J]. 中国药物与临床, 2021, 21(16): 2842-2844.

[17] SINGH P, ARIF Y, BAJGUZ A, et al. The role of quercetin in plants[J]. Plant Physiol Biochem, 2021, 166: 10-19.

[18] 朱慧敏. 槲皮素对大鼠宫颈炎的治疗作用[J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(5): 417-420.

[19] RICHE K, LENARD N R. Quercetin's effects on glutamate cytotoxicity[J]. Molecules, 2022, 27(21): 7620.

[20] 刘兰宁, 唐焕珍, 李晓媛. 基于 ROS/TXNIP/NLRP3 通路探讨槲皮素对 Pg-LPS 诱导 RAW264. 7 细胞炎症因子表达的影响[J]. 中成药, 2022, 44(12): 4049-4052.

[21] 刘桂霞, 邓科兰, 厉银平. lncRNA MNX1-AS1 在非小细胞肺癌中的表达及调控 PI3K/Akt 通路对癌细胞生物学行为的影响[J]. 河北医学, 2023, 29(1): 13-18.

[22] DHANYA R. Quercetin for managing type 2 diabetes and its complications, an insight into multitarget therapy[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146: 112560.

[23] 刘利, 蔡大军. 子宫颈病变组织中 HPV 16 感染与 TLR4 介导的 PI3K 信号通路相关蛋白表达的关系[J]. 慢性病学杂志, 2019(7): 1070-1072.

(收稿日期: 2024-09-10 修回日期: 2024-10-28)