

血管内皮细胞来源外泌体 miR-214 对 H_2O_2 诱导血管内皮细胞损伤的影响*

史斌浩 王建飞 汪贵忠 李陈璇 曹洁 高林 欧阳星文

(安徽省第二人民医院心内科, 安徽 合肥 230041)

【摘要】目的 探讨血管内皮细胞来源外泌体 miR-214 对过氧化氢(H_2O_2)诱导的血管内皮细胞损伤的影响。**方法** 体外培养人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC), 并转染 miR-214 抑制物(in-miR-214)及其阴性对照(in-miR-NC), 分离并鉴定外泌体, 同时检测 miR-214 表达。再次培养 HUVEC, 分为正常对照组(Control 组)、氧化损伤组(H_2O_2 组)、空白外泌体+氧化损伤组(exo NC+ H_2O_2 组)、in-miR-NC 外泌体+氧化损伤组(exo in-miR-NC+ H_2O_2 组)和 in-miR-214 外泌体+氧化损伤组(exo in-miR-214+ H_2O_2 组)。qRT-PCR 检测细胞中 miR-214 表达水平; MTT 和流式细胞术检测细胞增殖、凋亡; 划痕愈合实验检测细胞迁移; Western blot 检测细胞增殖、凋亡、迁移相关蛋白水平。**结果** 成功从 HUVEC 细胞中分离出外泌体, 且转染 in-miR-214 可抑制外泌体中 miR-214 表达($P<0.05$)。 H_2O_2 诱导后, HUVEC 细胞增殖活力和划痕愈合率降低, 凋亡率增高; 同时, 细胞中 miR-214 表达水平增高, Cyclin D1、PCNA、Bcl2、MMP2 和 MMP9 蛋白水平降低, Bax 蛋白水平增高($P<0.05$)。添加 HUVEC 外泌体和外泌体来源的 in-miR-214 可部分削弱 H_2O_2 对 HUVEC 细胞的损伤, 且后者的效果要明显优于前者($P<0.05$)。**结论** HUVEC 来源外泌体通过低表达 miR-214 保护 HUVEC 免受 H_2O_2 诱导的细胞损伤。

【关键词】 外泌体; miR-214; 过氧化氢; 血管内皮细胞损伤; 高血压

【中图分类号】 R544.1 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 03. 003

Influence of vascular endothelial cell-derived exosomal miR-214 on H_2O_2 -induced vascular endothelial cell injury

SHI Binhao, WANG Jianfei, WANG Guizhong, LI Chenxuan, CAO Jie, GAO Lin, OUYANG Xingwen

(Department of Cardiology, Anhui No. 2 Provincial People's Hospital, Hefei 230041, China)

【Abstract】Objective To investigate the influence of vascular endothelial cell-derived exosomal miR-214 on H_2O_2 -induced vascular endothelial cell injury. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured in vitro, and transfected with miR-214 inhibitor (in-miR-214) and its negative control (in-miR-NC), and exosomes were isolated and identified, and miR-214 expression was detected. HUVECs were cultured again and separated into normal control (Control) group, oxidative damage (H_2O_2) group, blank exosome + oxidative damage (exo NC+ H_2O_2) group, in-miR-NC exosome + oxidative damage (exo in-miR-NC+ H_2O_2) group and in-miR-214 exosome+oxidative damage (exo in-miR-214+ H_2O_2) group. QRT-PCR was performed to detect the expression level of miR-214 in cells. MTT and flow cytometry were performed to detect cell proliferation and apoptosis. The scratch healing assay was performed to detect cell migration. The Western blot was performed to detect cell proliferation, apoptosis, migration-related protein levels. **Results** Exosomes were successfully isolated from HUVEC cells, and transfection of in-miR-214 could inhibit the expression of miR-214 in exosomes ($P<0.05$). After H_2O_2 induction, the proliferation activity and scratch healing rate of HUVEC cells decreased, and the apoptosis rate increased. The expression level of miR-214 in the cells increased, the protein levels of Cyclin D1, PCNA, Bcl2, MMP2 and MMP9 decreased, and the protein level of Bax increased ($P<$

基金项目:2021 年度安徽省高校自然科学研究一般项目(ZR2021B003)

通讯作者:王建飞, 博士, 主任医师, E-mail: wangjianfei78@163.com

引用本文:史斌浩, 王建飞, 汪贵忠, 等. 血管内皮细胞来源外泌体 miR-214 对 H_2O_2 诱导血管内皮细胞损伤的影响[J]. 西部医学, 2023, 35(3):

323-330. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 03. 003

0.05). Adding HUVEC exosomes and exosome-derived in-miR-214 could partially attenuate H_2O_2 damage to HUVEC cells, and the effect of the latter was significantly better than that of the former ($P < 0.05$). **Conclusion** HUVEC-derived exosomes protect HUVEC from H_2O_2 -induced cell damage through low expression of miR-214.

【Key words】 Exosomes; miR-214; H_2O_2 ; Vascular endothelial cell injury; Hypertension

高血压是一种以动脉血压持续上升为特征的“心血管综合征”,具有高致残率和高致死率^[1]。据报道,内皮细胞损伤和功能障碍与高血压的发生发展密切相关,过度的氧化应激是血管内皮损伤的常见原因^[2]。因此,要想防治高血压,有必要对血管内皮氧化损伤的机制进行探究。研究显示,miRNA 被认为是包括高血压在内的多种疾病的潜在诊断、治疗和预后因素^[3]。随着 miRNA 的治疗学和 miRNA 的递送系统的研究进展,使人们对基于 miRNA 的临床应用产生了希望^[4]。然而,miRNA 的人类治疗最大的障碍是确保 miRNA 在给药后到达靶器官和/或部位。外泌体是一种可以携带 miRNA 进入体内的一种囊泡,可由多种细胞分泌获取^[5]。内皮细胞外泌体来源的 miRNA 可介导内皮细胞与平滑肌细胞间的相关机制来保护内皮细胞受损^[6]。此外,miR-214 被证实可作为心血管疾病的潜在治疗剂和靶标,如在心脏或血液中下调 miR-214 可减轻患者的心脏损伤或肺动脉高血压^[7-8]。然而,关于外泌体 miR-214 对高血压是保护还是损伤作用尚未可知。据报道,过氧化氢(H_2O_2)可通过增加 MDA 的积累,降低抗氧化酶 SOD 水平,诱导血管内皮细胞氧化损伤^[9]。因此,评估和探讨血管内皮细胞来源外泌体 miR-214 对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞损伤影响及作用机制,对研究高血压血管内皮损伤机制及探究高血压治疗的新靶点具有重大的意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)由中科院上海细胞中心提供;DEME 培养基(12491023)、青霉素和链霉素(15070063)均由美国 Gibco 提供;外泌体总 RNA& 总蛋白提取试剂盒(4478545)由美国 Invitrogen 提供;miR-214 抑制物(in-miR-214)及其阴性对照(in-miR-NC)均由上海 Y-J Biological 设计合成; H_2O_2 (88597)由美国 Sigma 提供;SYBR Green qRT-PCR 试剂盒(FP303-01)由北京 TIANGEN 提供;一抗 CD63(ab134045)、肿瘤易感基因 101 (TSG101, ab109201)、钙联蛋白(calnexin, ab133615)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1, ab16663)、增殖细胞核抗原(PCNA, ab92552)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl2, ab32124)、Bcl2 相关 X 蛋白(Bax, ab32503)、基质金属蛋白酶 2(MMP2, ab92536)、基质金属蛋白酶 9

(MMP9, ab76003)和 β -肌动蛋白(β -actin, ab8226)由英国 Abcam 提供;MTT 细胞增殖检测试剂盒(M1020)由北京 Solarbio 提供;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(P-CA-201)由武汉 Procell 提供。FEI Tecnai G2 Spirit 透射电子显微镜(美国 Thermo Fisher);ZetaView PMX110 颗粒跟踪分析仪(德国 PMX);GelDocXR+凝胶成像系统(美国 BIO-RAD);BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD);ABI7300 实时 PCR 系统(美国 Applied Biosystems);SynergyMx 多功能酶标仪(美国 Bio Tek)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HUVEC 细胞在 DEME 培养基(含有 10% FBS 和 1% 青-链霉素)中常规培养。后续研究均选用对数期增殖的 HUVEC 细胞。

1.2.2 细胞转染 HUVEC 细胞汇合到 60%~80%,转染 in-miR-214 或 in-miR-NC, 24 h 后再次转染备用。

1.2.3 外泌体的提取、鉴定 提取外泌体前,将上述转染和未转染的 HUVEC 细胞使用无血清培养基过夜饥饿处理,离心后去除细胞沉淀和碎片,收集细胞培养液,经 0.22 μ m 滤膜过滤后超速离心纯化。随后,将收获的外泌体重新悬浮在 PBS 中以用于进一步的实验。对应依次为:exo in-miR-214、exo in-miR-NC 和 exo NC。提取的外泌体在 80 kV 透射电子显微镜下进行表征观察,NTA 用于分析外泌体浓度及粒径分布,Western blot 用于检测外泌体标志蛋白 CD63 和 TSG101 水平。

1.2.4 Western blot 检测外泌体标志蛋白 CD63 和 TSG101 水平 从外泌体样品中提取总蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭后,加入 CD63、TSG101 和 calnexin 4 $^{\circ}$ C 过夜培养,加入二抗室温孵育 1 h,采用化学发光液显色,拍照。

1.2.5 外泌体进入细胞观察 外泌体样品中添加适量的 Dil 染料,避光孵育 20 min 后,使用外泌体染色滤柱除去多余染料,并加入正常 HUVEC 细胞共培养 24 h,用甲醛固定后在荧光显微镜下观察外泌体进入细胞的情况。

1.2.6 qRT-PCR 检测外泌体中 miR-214 表达 从外泌体中提取总 RNA,然后将 RNA 逆转录为 cDNA,接着使用 SYBR Green qRT-PCR 试剂盒进行检测。

引物序列如下: miR-214: 正向 5'-ACAGCAGCA-CAGACAGGCAGT-3', 反向 5'-GTCTACGGCCAT-ACCACCCTGA-3'; U6: 正向 5'-GCTTCGGCAGCA-CATATACTAAAAT-3', 反向 5'-CGCTTCACGAA-TTTGCGTGTTCAT-3'。miR-214 的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算, 标准化为 U6 的表达。

1.2.7 外泌体干预细胞实验 将 HUVEC 细胞分为 5 组: 正常对照组 (Control 组, 未处理细胞)、氧化损伤组 (H_2O_2 组, $500\ \mu M\ H_2O_2$ 处理 12 h)^[10]、空白外泌体+氧化损伤组 (exo NC+ H_2O_2 组, 添加 $50\ \mu L$ exo NC 和 $500\ \mu M\ H_2O_2$ 处理 12 h)^[11]、in-miR-NC 外泌体+氧化损伤组 (exo in-miR-NC+ H_2O_2 组, 添加 $50\ \mu L$ exo in-miR-NC 和 $500\ \mu M\ H_2O_2$ 处理 12 h) 和 in-miR-214 外泌体+氧化损伤组 (exo in-miR-214+ H_2O_2 组, 添加 $50\ \mu L$ exo in-miR-214 和 $500\ \mu M\ H_2O_2$ 处理 12 h)。qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-214 表达情况。

1.2.8 流式细胞术检测 HUVEC 凋亡 收集 HUVEC 细胞, PBS 重悬后添加 $100\ \mu L$ 结合缓冲液, 再分别添加 $5\ \mu L$ Annexin V-FITC 和 PI, 避光孵育 15 min, 上机 (流式细胞仪) 检测细胞凋亡情况。

1.2.9 MTT 检测 HUVEC 增殖 HUVEC 细胞接

种至 96 孔板, 培养 48 h 后添加 $100\ \mu L$ MTT 工作液孵育 60 min, 检测 490 nm 处吸光度 (OD) 值。

1.2.10 划痕愈合实验检测 HUVEC 迁移 将 HUVEC 细胞置于 6 孔板中, 使用无菌移液器 ($200\ \mu L$) 对 6 孔板底部的细胞进行划痕, 然后用 PBS 去除划下的细胞, 48 h 后观察划痕愈合情况, 并拍照记录。划痕愈合率 = $(1 - \text{实测划痕宽度} / \text{初始划痕宽度}) \times 100\%$ 。

1.2.11 Western blot 检测细胞中增殖、凋亡和迁移相关蛋白水平 从 HUVEC 细胞中提取总蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上, 参照 1.2.4 方法检测细胞中 Cyclin D1、PCNA、Bax、Bcl2、MMP2 和 MMP9 蛋白水平, β -actin 为内参蛋白。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理。计量数据结果以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 通过 t 检验和单因素方差分析进行组间差异比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVEC 衍生外泌体的分离及鉴定 HUVEC 衍生的外泌体呈大小不一的圆形囊泡状, 直径为 $40 \sim 120\ nm$, 且可检测到 CD63 和 TSG101 表达, 但不表达 calnexin。以上结果表明成功从 HUVEC 中分离出外泌体。见图 1。

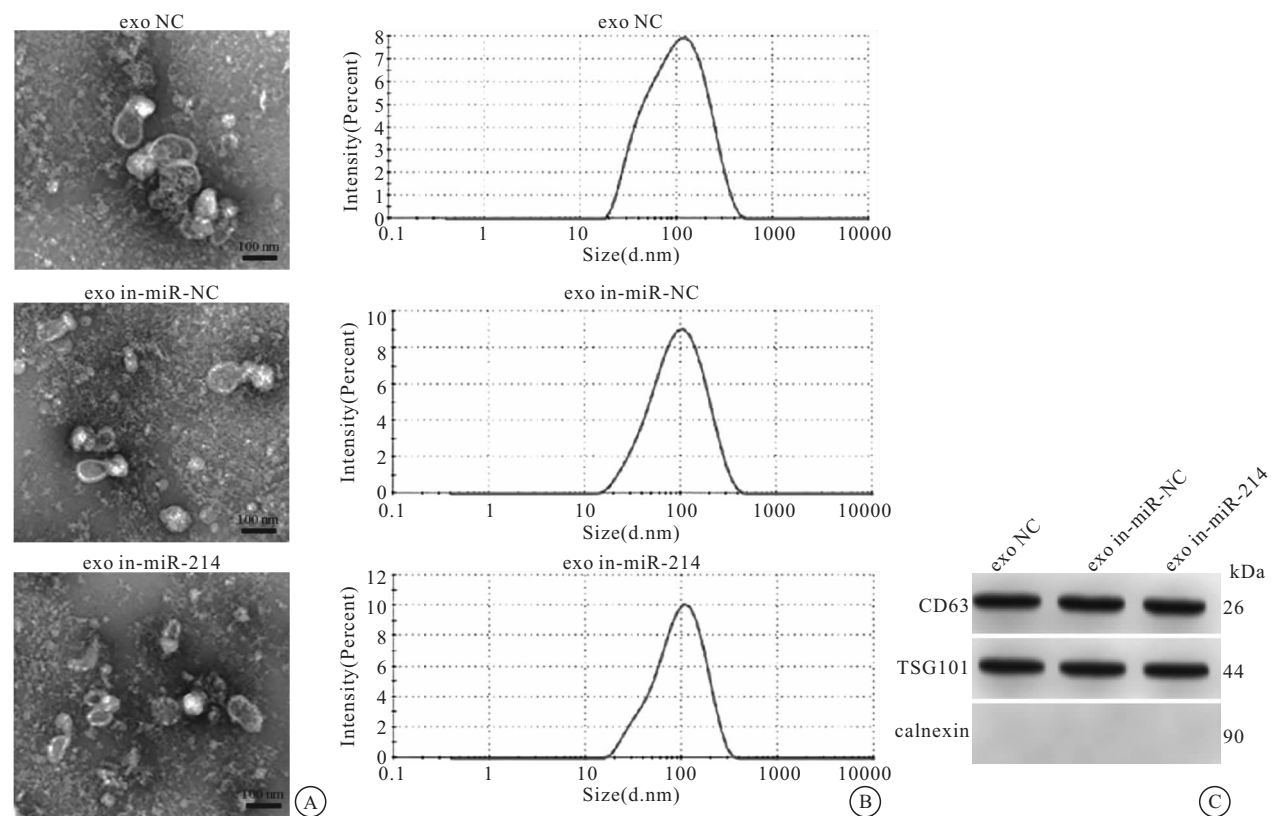


图 1 HUVEC 衍生外泌体鉴定
Figure 1 Identification of HUVEC-derived exosomes

注: A. 透射电子显微镜下观察外泌体超微结构 (标尺: 100 nm); B. NTA 检测外泌体尺寸分布; C. Western blot 评估外泌体标记物 CD63、TSG101 和 calnexin 蛋白水平。

2.2 HUVEC 衍生外泌体中 miR-214 的表达 Dil 标记的外泌体存在于 HUVEC 细胞系的细胞核和细胞质周围,表明 HUVEC 细胞能够有效吸收外泌体

(图 2)。同时对外泌体中 miR-214 水平进行检测,结果显示,转染 in-miR-214 的 HUVEC 衍生的外泌体中 miR-214 表达显著降低($P<0.05$),见表 1。

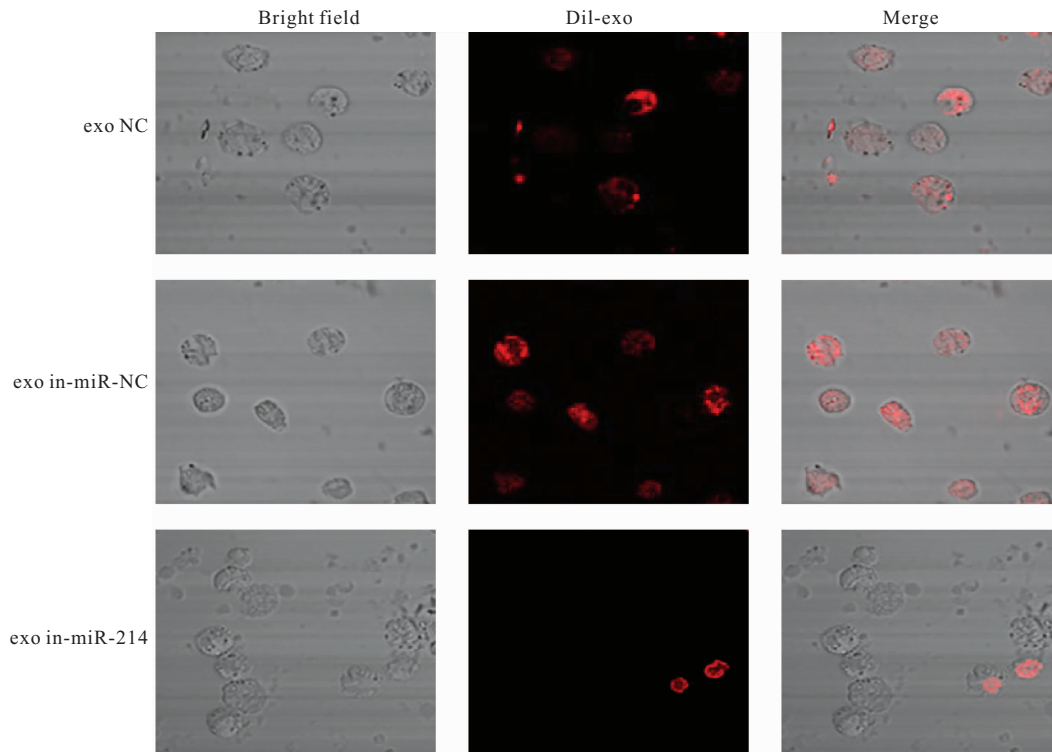


图 2 激光共聚焦显微镜观察由 HUVECs 分泌的 Dil 标记的外泌体(400×)
Figure 2 Laser confocal microscopy observation of Dil-labeled exosomes secreted by HUVECs (400×)

表 1 miR-214 在 HUVEC 衍生的外泌体中表达($\bar{x}\pm s$)
Table 1 miR-214 expression in HUVEC-derived exosomes

外泌体	miR-214 相对表达水平
exo NC 组	1.02±0.04
exo in-miR-NC 组	1.05±0.03
exo in-miR-214 组	0.24±0.02 ^{①②}

注:与 exo NC 组相比,① $P<0.05$;与 exo in-miR-NC 组相比,② $P<0.05$ 。

2.3 HUVEC 外泌体来源的 miR-214 对 H_2O_2 诱导的 HUVEC 细胞中 miR-214 表达及细胞增殖的影响

与 Control 组相比, H_2O_2 组 HUVEC 细胞中 miR-214 表达上调,细胞增殖活力下调,Cyclin D1 和 PCNA 蛋白水平降低($P<0.05$);与 H_2O_2 组相比,exo NC+ H_2O_2 组 HUVEC 细胞中 miR-214 表达差异无统计学意义($P>0.05$),细胞增殖活力升高,Cyclin D1 和 PCNA 蛋白水平升高($P<0.05$);与 exo in-miR-NC + H_2O_2 组相比,exo in-miR-214 + H_2O_2 组 HUVEC 细胞中 miR-214 表达下调,细胞增殖活力升高,Cyclin D1 和 PCNA 蛋白水平升高($P<0.05$);而 exo in-miR-NC+ H_2O_2 组与 exo NC+ H_2O_2 组细胞中 miR-214 表达和细胞增殖活力以及 Cyclin D1 和 PCNA 蛋白水平变化均无显著差异($P>0.05$)。见图 3、表 2。

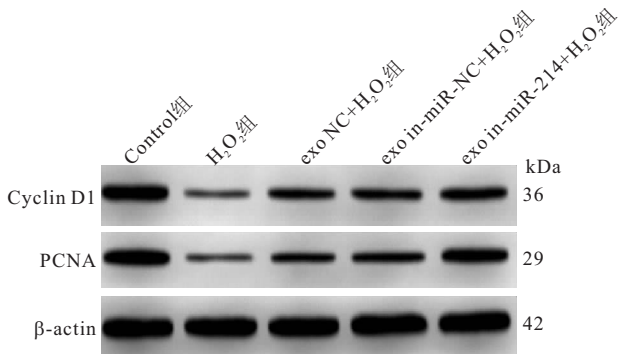


图 3 Western blot 评估 HUVEC 细胞中增殖相关蛋白 CyclinD1 和 PCNA 水平
Figure 3 Western blot assessment of proliferation-related proteins CyclinD1 and PCNA levels in HUVEC cells

2.4 HUVEC 外泌体来源的 miR-214 对 H_2O_2 诱导的 HUVEC 细胞凋亡的影响 与 Control 组相比, H_2O_2 组 HUVEC 细胞凋亡率升高,同时细胞中 Bcl2 蛋白水平降低,Bax 蛋白水平增高($P<0.05$);与 H_2O_2 组相比,exo NC+ H_2O_2 组 HUVEC 细胞凋亡率降低,同时细胞中 Bcl2 蛋白水平升高,Bax 蛋白水平降低($P<0.05$);与 exo in-miR-NC+ H_2O_2 组相比,

表 2 各组 HUVEC 细胞中 miR-214 表达及细胞增殖能力($\bar{x} \pm s$)

Table 2 miR-214 expression and cell proliferation ability in HUVEC cells in each group

组别	miR-214	增殖活力(OD 值)	Cyclin D1	PCNA
Control 组	1.02±0.06 ^①	0.76±0.05 ^①	0.84±0.06 ^①	0.95±0.07 ^①
H ₂ O ₂ 组	2.95±0.16	0.38±0.03	0.33±0.04	0.29±0.03
exo NC+H ₂ O ₂ 组	2.89±0.30	0.45±0.04 ^①	0.48±0.05 ^①	0.46±0.04 ^①
exo in-miR-NC+H ₂ O ₂ 组	2.78±0.25	0.47±0.03	0.51±0.06	0.49±0.03
exo in-miR-214+H ₂ O ₂ 组	1.67±0.10 ^②	0.62±0.05 ^②	0.67±0.04 ^②	0.78±0.06 ^②

注:与 H₂O₂ 组相比,① $P<0.05$;与 exo in-miR-NC+H₂O₂ 组相比,② $P<0.05$ 。

exo in-miR-214+H₂O₂ 组 HUVEC 细胞凋亡率降低,同时细胞中 Bcl2 蛋白水平升高,Bax 蛋白水平降低($P<0.05$);而 exo in-miR-NC+H₂O₂ 组与 exo NC+

H₂O₂ 组凋亡率以及 Bax 和 Bcl2 蛋白水平变化无显著差异($P>0.05$)。见图 4、表 3。

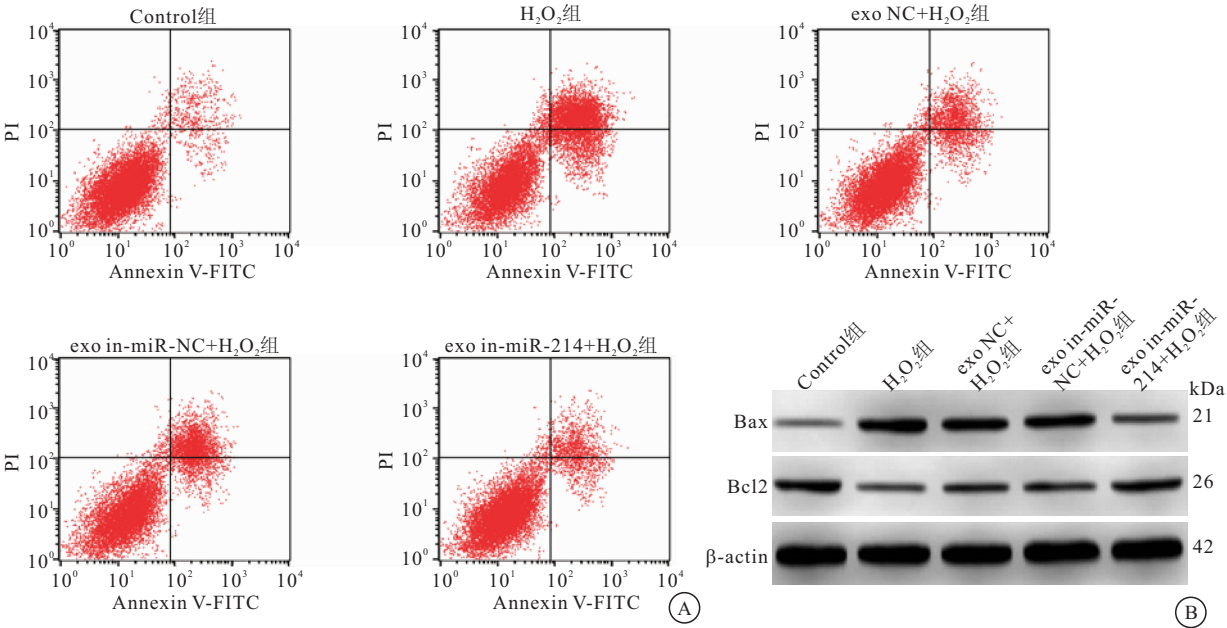


图 4 HUVEC 外泌体来源的 miR-214 对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞凋亡的影响

Figure 4 The effect of HUVEC exosome-derived miR-214 on H₂O₂-induced apoptosis of HUVEC cells

注:A. 流式细胞术检测细胞凋亡;B. Western blot 评估细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl2 蛋白水平。

表 3 各组 HUVEC 细胞凋亡能力($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率(%)	Bax	Bcl2
Control 组	8.35±0.29 ^①	0.16±0.02 ^①	0.65±0.05 ^①
H ₂ O ₂ 组	60.54±6.29	0.79±0.05	0.18±0.03
exo NC+H ₂ O ₂ 组	39.25±3.95 ^①	0.66±0.04 ^①	0.36±0.05 ^①
exo in-miR-NC+H ₂ O ₂ 组	43.61±4.78	0.60±0.05	0.39±0.04
exo in-miR-214+H ₂ O ₂ 组	25.61±1.64 ^②	0.36±0.04 ^②	0.50±0.06 ^②

注:与 H₂O₂ 组相比,① $P<0.05$;与 exo in-miR-NC+H₂O₂ 组相比,② $P<0.05$ 。

2.5 HUVEC 外泌体来源的 miR-214 对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞迁移的影响 与 Control 组相比,H₂O₂ 组 HUVEC 细胞划痕愈合率下降,同时细胞中 MMP2 和 MMP9 蛋白水平降低($P<0.05$);与 H₂O₂ 组相比,exo NC+H₂O₂ 组 HUVEC 细胞划痕愈合率升高,同时细胞中 MMP2 和 MMP9 蛋白水平升高

($P<0.05$);与 exo in-miR-NC+H₂O₂ 组相比,exo in-miR-214+H₂O₂ 组 HUVEC 细胞划痕愈合率升高,同时细胞中 MMP2 和 MMP9 蛋白水平升高($P<0.05$);而 exo in-miR-NC+H₂O₂ 组与 exo NC+H₂O₂ 组 HUVEC 细胞划痕愈合率与细胞中 MMP2 和 MMP9 蛋白水平变化无显著差异($P>0.05$)。见表 4、图 5。

表 4 各组 HUVEC 细胞迁移能力($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Migration ability of HUVEC cells in each group

组别	划痕愈合率(%)	MMP2	MMP9
Control 组	64.25±5.16 ^①	0.88±0.07 ^①	0.79±0.06 ^①
H ₂ O ₂ 组	22.32±2.15	0.33±0.04	0.30±0.02
exo NC+H ₂ O ₂ 组	34.79±1.95 ^①	0.42±0.04 ^①	0.44±0.05 ^①
exo in-miR-NC+H ₂ O ₂ 组	37.45±2.24	0.46±0.05	0.48±0.06
exo in-miR-214+H ₂ O ₂ 组	46.19±3.26 ^②	0.64±0.05 ^②	0.62±0.05 ^②

注:与 H₂O₂ 组相比,① $P<0.05$;与 exo in-miR-NC+H₂O₂ 组相比,② $P<0.05$ 。

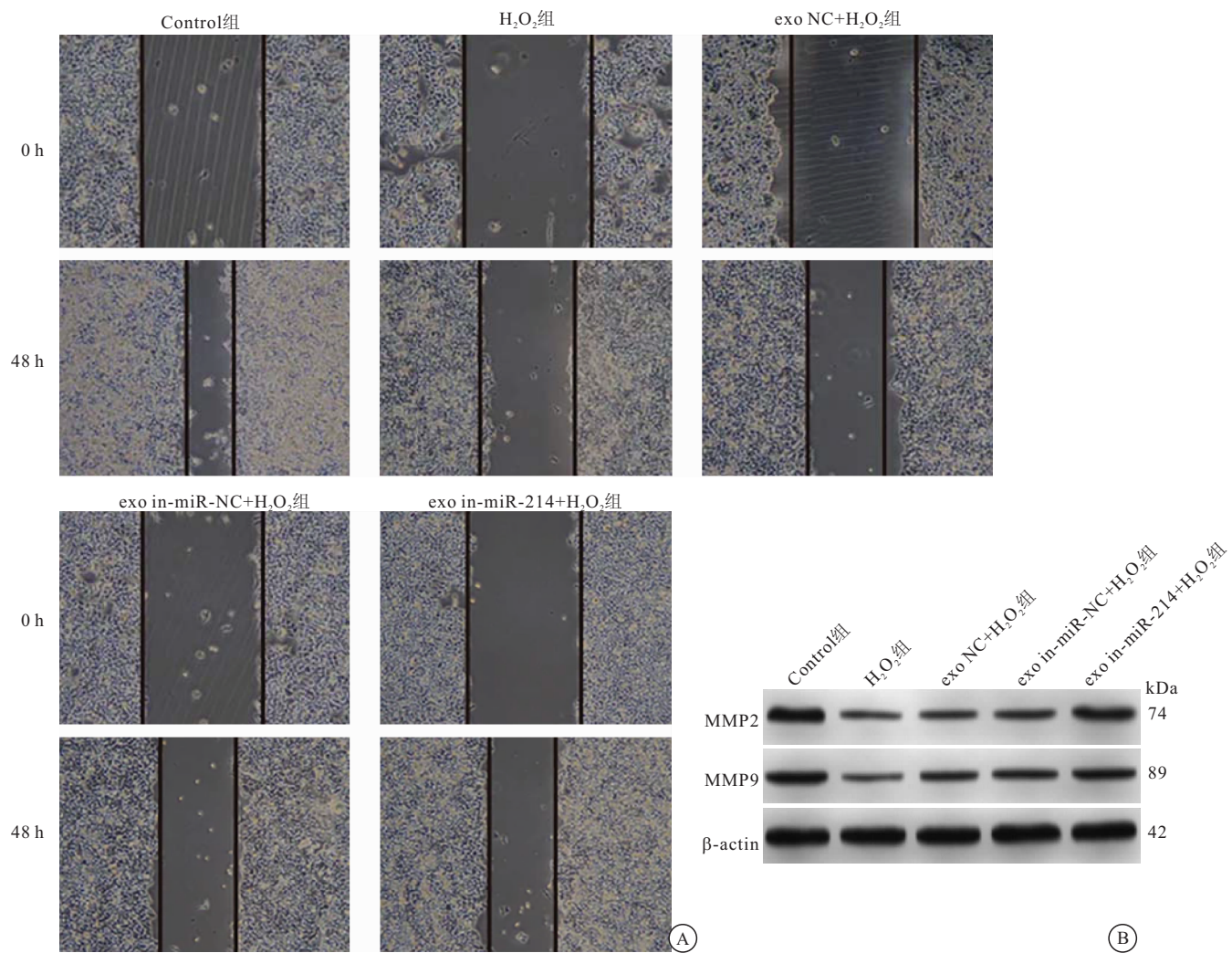


图 5 HUVEC 外泌体来源的 miR-214 对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞迁移的影响

Figure 5 The effect of HUVEC exosome-derived miR-214 on H₂O₂-induced HUVEC cell migration

注：A. 划痕愈合实验检测细胞迁移；B. Western blot 评估细胞迁移相关蛋白 MMP2 和 MMP9 蛋白水平。

3 讨论

外周血的阻力增加是高血压的典型特征之一，而血管内皮细胞不仅可以调节外周血管阻力，同时又可作为高血压损伤的靶细胞^[12]。血管内皮细胞的完整性对于维持血管功能具有重要作用，氧化应激下的内皮细胞损伤是高血压发展的关键调节因子，故维护血管内皮细胞免受损伤对于预防心血管类疾病事件发生具有重要意义^[13-14]。因此，根据以往文献报道^[15-16]，本研究选用 500 μM H₂O₂ 诱导 HUVEC 构建内皮细胞损伤模型，以探究保护高血压疾病中血管内皮损伤的有效方法。

miRNA 在高血压类疾病中具有重要作用，如：miR-483 可通过抑制炎症反应和纤维化反应来降低实验性肺动脉高血压^[17]。但由于 miRNA 极不稳定且易降解的特性，因此，临床中该药物的应用远达不到预期。据报道，外泌体天然来源于细胞，故其可快速

拥有靶向能力，且它们可以通过穿过生物屏障将小分子药物或功能性 RNA 传递到细胞中，进而有效递送生物药物^[18]。因此，越来越多的研究通过利用这些特征来设计天然外泌体，以期能够将药物或功能性核酸递送至特定器官或组织^[19]。本研究通过分离转染 in-miR-214 的 HUVEC 中的外泌体，进而探究血管内皮细胞来源外泌体 miR-214 对 H₂O₂ 诱导 HUVEC 损伤的影响。据报道，跨膜蛋白 CD63 和 TSG101 是外泌体等细胞外囊泡的常见外泌体特异性标志物，国际细胞外囊泡协会建议用于外泌体的鉴定^[20]。而内质网特异性蛋白分子 calnexin 则在外泌体样本中不表达^[21]。经分析和证实本研究已成功从 HUVEC 中分离出外泌体。同时通过 Dil 标记外泌体实验证实 HUVEC 细胞能够有效吸收外泌体，且转染 in-miR-214 可明显降低 HUVEC 细胞衍生的外泌体中 miR-214 的表达。为深入探讨外泌体来源的 miR-214 对

H₂O₂ 诱导 HUVEC 损伤的影响,本研究通过 H₂O₂ 构建 HUVEC 损伤模型,结果显示,H₂O₂ 诱导后,HUVEC 细胞活力和迁移能力明显降低,且凋亡率升高,同时细胞中 Cyclin D1、PCNA、Bcl2、MMP2 和 MMP9 水平下调,Bax 水平上调。Cyclin D1 和 PCNA 是细胞增殖的关键分子蛋白,与细胞增殖密切相关^[22];Bcl2 和 Bax 是一对细胞凋亡主要的调控因子,Bcl2 的升高和 Bax 的降低表明细胞具有抗凋亡作用;而 MMP2 和 MMP9 则属于基质金属蛋白酶家族,是引起癌细胞转移和新生血管生成的两种重要酶^[23-24]。以上结果说明,成功构建 H₂O₂ 诱导的内皮细胞损伤模型。同时,在 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 中检测到高水平的 miR-214 表达,提示 miR-214 可能参与内皮细胞损伤。进一步研究显示,转染外泌体可通过调控 Cyclin D1、PCNA、Bcl2、Bax 和 MMP2 和 MMP9 表达情况进而明显改善 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞增殖、迁移和凋亡,进而有效减弱 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 损伤。此外,转染 in-miR-214 的 HUVEC 来源的外泌体对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 损伤的保护作用要明显优于未转染 in-miR-214 的外泌体。表明外泌体携带疾病标志物 miRNA 的效用比单独的外泌体作用效果更好。另外,H₂O₂ 组与 exo NC+H₂O₂ 组 HUVEC 细胞中 miR-214 表达情况无差异,推测其原因,其一单独外泌体中可能不存在 miR-214,其二也可能是有其他因子参与调控并干预了外泌体中 miR-214 表达,然而具体是哪种情况对 miR-214 表达造成了影响,仍需更深入的研究证明。

本研究证实了血管内皮细胞来源外泌体 miR-214 对 H₂O₂ 诱导血管内皮细胞损伤的影响,为治疗高血压提供帮助,同时为外泌体的临床应用提供参考。然而,本研究还存在一定的不足,未设计不同浓度梯度的 H₂O₂ 诱导血管内皮细胞损伤,其次并未在动物模型中对结论进行验证;此外,由于 miRNA 的不稳定性,即使在同一组织部位中,也可能因研究对象的不同而具有差异表达,因此后续将扩大研究对象,以完善外泌体 miR-214 对 H₂O₂ 诱导血管内皮细胞损伤的作用。

4 结论

外泌体及外泌体来源的 miR-214 可保护血管内皮细胞免受 H₂O₂ 诱导损伤;且外泌体携带疾病标志物 miRNA 对 H₂O₂ 诱导血管内皮细胞损伤的保护作用要明显优于单独使用外泌体的作用效果。

【参考文献】

[1] LAMIRAULT G, ARTIFONI M, DANIEL M, *et al.* Resist-

ant Hypertension: Novel Insights[J]. *Curr Hypertens Rev*, 2020, 16(1): 61-72.

- [2] DIKALOVA A E, PANDEY A, XIAO L, *et al.* Mitochondrial Deacetylase Sirt3 Reduces Vascular Dysfunction and Hypertension While Sirt3 Depletion in Essential Hypertension Is Linked to Vascular Inflammation and Oxidative Stress[J]. *Circ Res*, 2020, 126(4): 439-452.
- [3] CHENG Y, WANG D, WANG F, *et al.* Endogenous miR-204 Protects the Kidney against Chronic Injury in Hypertension and Diabetes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(7):1539-1554.
- [4] YANG G, QIN H, LIU B, *et al.* Mesenchymal stem cells-derived exosomes modulate vascular endothelial injury via miR-144-5p/PTEN in intracranial aneurysm[J]. *Hum Cell*, 2021, 34(5): 1346-1359.
- [5] SONG Y, WANG B, ZHU X, *et al.* Human umbilical cord blood-derived MSCs exosome attenuate myocardial injury by inhibiting ferroptosis in acute myocardial infarction mice[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2021, 37(1): 51-64.
- [6] ZHENG B, YIN W N, SUZUKI T, *et al.* Exosome-Mediated miR-155 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells Induces Endothelial Injury and Promotes Atherosclerosis[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(6): 1279-1294.
- [7] AMIN M M J, TREVELYAN C J, TURNER N A. MicroRNA-214 in Health and Disease[J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3274-3278.
- [8] NOSALSKI R, SIEDLINSKI M, DENBY L, *et al.* T-Cell-Derived miRNA-214 Mediates Perivascular Fibrosis in Hypertension[J]. *Circ Res*, 2020, 126(8): 988-1003.
- [9] 吴文明,赵汝岗,张强. Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化及氧化应激损伤的影响[J]. *西部医学*, 2022, 34(1): 57-62.
- [10] ZHAO J, HAN Y, WANG Z, *et al.* Alginate oligosaccharide protects endothelial cells against oxidative stress injury via integrin- α /FAK/PI3K signaling [J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(12): 2749-2758.
- [11] GAO M, YU T, LIU D, *et al.* Sepsis plasma-derived exosomal miR-1-3p induces endothelial cell dysfunction by targeting SERP1[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135(2): 347-365.
- [12] QIAN W, ZHENG Z Q, NIE J G, *et al.* LncRNA SNHG12 alleviates hypertensive vascular endothelial injury through miR-25-3p/SIRT6 pathway[J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 110(4): 651-661.
- [13] ALEXANDER Y, OSTO E, SCHMIDT-TRUCKSÄSS A, *et al.* Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(1): 29-42.
- [14] GIUSTINO G, PINNEY S P, LALA A, *et al.* Coronavirus and Cardiovascular Disease, Myocardial Injury, and Arrhythmia: JACC Focus Seminar[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76(17): 2011-2023.
- [15] LIU L T, LIANG L, WANG W, *et al.* Isolariciresinol-9'-O- α -

- L-arabinofuranoside protects against hydrogen peroxide? induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells via a PI3K/Akt/Bad-dependent pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 488-494.
- [16] SAFAEIAN L, SAJJADI S E, JAVANMARD S H, *et al*. Protective effect of Melissa officinalis extract against H₂O₂-induced oxidative stress in human vascular endothelial cells[J]. *Res Pharm Sci*, 2016, 11(5): 383-389.
- [17] ZHANG J, HE Y, YAN X, *et al*. MicroRNA-483 amelioration of experimental pulmonary hypertension[J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(5): e11303-e11308.
- [18] ZHANG Y, BI J, HUANG J, *et al*. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917-6934.
- [19] YING W, GAO H, DOS REIS F C G, *et al*. MiR-690, an exosomal-derived miRNA from M2-polarized macrophages, improves insulin sensitivity in obese mice[J]. *Cell Metab*, 2021, 33(4): 781-790.
- [20] THÉRY C, WITWER K W, AIKAWA E, *et al*. Minimal in-formation for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750-1535784.
- [21] FU Y, GAO X, HE G H, *et al*. Protective effects of umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes in a diabetic rat model through live retinal imaging[J]. *Int J Ophthalmol*, 2021, 14(12): 1828-1833.
- [22] 杨莉, 黄娇, 彭媛, 等. 奈达铂对乳腺癌细胞增殖、侵袭转移、凋亡及 TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. *西部医学*, 2022, 34(1): 140-145, 150.
- [23] LIU H, HU X, JIANG R, *et al*. CQMUH-011 Inhibits LPS-Induced Microglia Activation and Ameliorates Brain Ischemic Injury in Mice[J]. *Inflammation*, 2021, 44(4): 1345-1358.
- [24] SHI J, LV H, TANG C, *et al*. Mangiferin inhibits cell migration and angiogenesis via PI3K/AKT/mTOR signaling in high glucose? and hypoxia? induced RRCECs[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 473-478.

(收稿日期:2022-04-01;修回日期:2022-11-29;编辑:刘灵敏)

(上接第 322 页)

- [17] EGNATCHIK R A, LEAMY A K, JACOBSON D A, *et al*. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload[J]. *Mol Metab*, 2014, 3(5): 544-553.
- [18] RICE M B, CAVALLARI J, FANG S, *et al*. Acute decrease in HDL cholesterol associated with exposure to welding fumes[J]. *J Occup Environ Med*, 2011, 53(1): 17-21.
- [19] YAN B, LI J, GUO J, *et al*. The toxic effects of indoor atmospheric fine particulate matter collected from allergic and non-allergic families in Wuhan on mouse peritoneal macrophages[J]. *Appl Toxicol*, 2016, 36(4): 596-608.
- [20] 赵培, 刘晶, 于芳, 等. PM_{2.5} 对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的影响及机制[J]. *西部医学*, 2021, 33(3): 326-329, 335.
- [21] LENNA S, HAN R, TROJANOWSKA M. Endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction[J]. *IUBMB life*, 2014, 66(8): 530-537.
- [22] LUO B, LEE A S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies[J]. *Oncogene*, 2013, 32(7): 805-818.
- [23] ZHU G, LEE A S. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(7): 1413-1420.

(收稿日期:2022-04-28;修回日期:2022-12-19;编辑:刘灵敏)