

茶多酚治疗对糖尿病大鼠血浆中 microRNA 表达谱的影响

张丽媛¹, 刘钰瑜², 杨亚军², 纳青青¹ (广东医科大学 1. 解剖学教研室; 2. 药理学教研室, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 了解茶多酚治疗后糖尿病大鼠血浆中微小 RNA (microRNA) 表达谱的变化, 并分析其与糖尿病性骨质疏松的潜在关系。**方法** Sprague-Dawley 大鼠随机分为: 对照组 (Con 组)、糖尿病模型组 (DOP 组) 以及治疗组 [糖尿病模型+低剂量 (4.8 g/kg) 茶多酚组 (DOP+L 组)、糖尿病模型+中剂量 (9.6 g/kg) 茶多酚组 (DOP+M 组)、糖尿病模型+高剂量 (14.4 g/kg) 茶多酚组 (DOP+H 组)]。大鼠灌胃用药持续 12 周后, 骨密度仪检测各组大鼠第 5 腰椎骨密度, Micro-CT 扫描胫骨观察骨微结构。通过高通量测序方法获得各组大鼠血浆中 microRNA 的表达谱, 并进行生物信息学分析。**结果** 与 DOP 组比较, 治疗组大鼠胫骨上段骨小梁数目有所增加, 骨微结构明显改善, DOP+L、DOP+H 组大鼠骨密度显著增高 ($P<0.05$)。DOP 与 Con 组差异表达显著的 microRNA 共 252 个 (上调 113 个, 下调 139 个), DOP 与 DOP+L 组 344 个 (上调 213 个, 下调 131 个), DOP 与 DOP+M 组 350 个 (上调 219 个, 下调 131 个), DOP 与 DOP+H 组 323 个 (上调 209 个, 下调 114 个)。与 Con 组比较, DOP 组的 miR-382-3p 表达显著降低, miR-96-5p 和 miR-21 则明显升高; 与 DOP 组比较, 各治疗组的 miR-382-3p 表达明显升高, miR-96-5p 和 miR-21 则明显降低 ($P<0.01$ 或 0.05)。**结论** 茶多酚能有效改善糖尿病大鼠骨代谢异常; 潜在的分子机制可能与改善 microRNA 的表达序列有关。

关键词: 茶多酚; 糖尿病性骨质疏松; microRNA; 大鼠

中图分类号: R 285

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 04-0368-08

Effect of tea polyphenols treatment on microRNA expression profile in plasma of diabetes rats

ZHANG Li-yuan¹, LIU Yu-yu², YANG Ya-jun², NA Qing-qing¹ (1. Department of Anatomy; 2. Pharmacology Teaching and Research Office of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** To determine the changes of microRNA (miRNA) expression profile in plasma of diabetes rats after tea polyphenols treatment, and the potential relationship between microRNA (miRNA) expression profile and osteoporosis induced by diabetes. **Method** Sprague Dawley rats were randomly divided into: control group (Con), diabetes (DOP) model group, diabetes model low-dose (4.8 g/kg) tea polyphenols (DOP+L), middle dose (9.6 g/kg) of tea polyphenols (DOP+M) in diabetes model, high dose (14.4 g/kg) tea polyphenols (DOP+H) in diabetes model. After 12 weeks of oral administration, the bone density of the 5th lumbar vertebrae in each group of rats was measured by a bone density meter, and the microstructure of the tibia was observed by Micro CT scanning. the expression profile of microRNA in the plasma of rats in each group through high-throughput sequencing method and conduct bioinformatics analysis. **Results** Compared with the DOP group, the number of bone trabeculae in the upper tibial segment of rats in the treatment group was increased, the bone microstructure was significantly improved, and the bone mineral density of rats in the DOP+L and DOP+H groups was significantly increased ($P<0.05$). There were 252 differentially expressed microRNA in DOP and Con group (113 up-regulated and 139 down-regulated), 344 microRNAs in DOP and DOP+L group (213 up-regulated and 131 down-regulated), 350 microRNAs in DOP and DOP+M group (219 up-regulated and 131 down-regulated), 323 microRNAs in DOP and DOP+H groups (209 up-regulated and 114 down-regulated). Compared with the Con group, the expression of miR-382-3p was significantly decreased in the DOP group, while the expression of miR-96-5p and miR-21 was significantly increased. Compared with the DOP group, the expression of miR-382-3p was significantly increased in all treatment groups, while miR-96-5p and miR-21 were significantly decreased ($P<0.01$ or 0.05). **Conclusion** Tea polyphenols can effectively improve the abnormal bone metabolism in diabetic rats. The underlying molecular mechanism may be related to improving the expression sequence of microRNA.

Key words: tea polyphenols; diabetes osteoporosis; microRNA; rat

收稿日期: 2024-05-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82274614), 广东省医学科学技术研究基金项目 (A08442)

作者简介: 张丽媛, 女, 硕士, 讲师, E-mail: zmdjzly@126.com

流行病学研究证实糖尿病患者骨质疏松和骨折的发生率均显著高于非糖尿病患者^[1-3]。目前学术界认为糖尿病性骨质疏松症是糖尿病的严重并发症之一,其能导致与骨质疏松性骨折的风险增加。

microRNA是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA,通过与靶基因mRNA碱基配对引导沉默复合体(RISC)降解信使RNA或阻碍其翻译,在细胞生长和发育的过程中起着多种作用^[4]。最近研究表明,microRNA在糖尿病病理生理过程和多种并发症的发生、发展过程中都起着至关重要的作用^[5]。血清中microRNA失调也与包括骨质疏松症在内的骨骼疾病密切相关^[6]。

流行病学研究表明:茶的饮用量的增加有助于降低老年人患骨质疏松性骨折的风险^[7]。茶多酚是茶叶主要的功能性成分,研究发现它可以通过调控胰岛素信号的传导途径及AMPK途径中多个分子靶点的磷酸化水平,影响包括 α -糖苷酶、 α -淀粉酶等双糖酶活性,减弱胰岛素抵抗及糖易生作用,促进胰岛素的合成和分泌。同时,茶多酚能够促进脂质的氧化代谢,减轻脂代谢紊乱^[8-9]。然而,到目前为止,关于茶多酚在糖尿病骨质疏松症的作用研究非常少。本研究旨在利用高通量测序技术探索microRNA表达水平的变化是否参与糖尿病性骨质疏松的病理生理过程,以及了解microRNA参与茶多酚治疗糖尿病骨质疏松的可能作用途径靶点,以期对糖尿病性骨质疏松症的预防和治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

15只Sprague-Dawley大鼠,体质量约180~230g,购自广东省实验动物中心,饲养条件为:22~26℃、湿度为60%~80%、定期12h明暗循环(光照时间07:00~19:00)。实验获广东医科大学动物实验伦理委员会批准(批准号:20180412)。

在1周的适应性喂养后,15只大鼠随机分为2组:12只大鼠(糖尿病模型组)按照60mg/kg腹腔注射链脲佐菌素(STZ, Sigma, USA);3只大鼠注射柠檬酸缓冲液[对照组(Con组)]。注射STZ或柠檬酸缓冲液72h后,大鼠禁食8h,但允许喝水。采集尾静脉血用以测量空腹血糖(FBG, >16.7mmol/L)。糖尿病大鼠随机分为4组,每组3只。其中1组为模型组(DOP组);3组为治疗组,通过灌胃服用不同剂量的茶多酚(Solarbio):低剂量(4.8g/kg)茶多酚(DOP+L组)、

中剂量(9.6g/kg)茶多酚(DOP+M组)、高剂量(14.4g/kg)茶多酚(DOP+H组)。Con组和DOP组大鼠均给予生理盐水灌胃。所有大鼠自由进食和饮水,持续12周。

1.2 样品采集和骨密度检测

实验期结束,禁食8h后,用戊巴比妥钠溶液(60mg/kg)麻醉大鼠。麻醉后,处死前通过骨密度测试仪(LUNAR-Prodigy, USA, 双能X射线法)测量骨密度(BMD)。处死后,迅速从腹主动脉收集血液,离心分离血清(4000r/min, 10min, 4℃), -80℃保存。采用预冷磷酸盐缓冲液洗涤后,快速分离胫骨。

1.3 Micro-CT骨微结构测量

取左侧胫骨近端使用Scanco Micro-CT VIVA40进行扫描,标本三维重建采用Reconstruction Utility软件。

1.4 高通量RNA测序

使用TRIzol(Invitrogen, CA, USA)从每组的血浆样本中提取总RNA。在平台上对样本进行测序以获得图像文件,通过测序平台的软件进行转换,并生成原始数据。使用Cutadapt(v1.15)软件对测序数据进行过滤,以获得高质量的序列供进一步分析。

1.5 生物信息学分析

1.5.1 差异表达分析和microRNAs的靶基因预测

使用DESeq(R包)分析差异microRNAs。以 $|\log_2$ 倍变化 >1 , $P<0.05$ 作为差异有统计学意义。使用ggplot2(R包)获得显示差异microRNA分布的火山图。运用多种预测数据库预测差异microRNA的靶基因,将交集作为最终microRNAs的靶基因结果。

1.5.2 功能和途径富集分析 将1.5.1预测得到的靶基因结果进行GO功能富集分析和KEGG功能富集分析,并通过R语言可视化GO和KEGG功能富集分析结果。

1.5.3 蛋白质-蛋白质相互作用分析 使用STRING数据库进行蛋白质相互作用分析(<https://string-db.org/>),用以挖掘核心的调控基因。

1.5.4 RT-PCR验证测序结果 根据转录组测序和生物信息分析结果,选择miR-382-3p、miR-96-5p和miR-21作为qRT-PCR的验证目标。实验所用引物采用Primer 3.0软件设计。3个microRNA都进行RT-PCR测量以获得每个样品的平均CT值,其中目标量标准化为内参的量,通过Quantity One软件进行图像分析。

1.6 统计学处理

采用SPSS 19.0进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$

表示,两组间比较采用 Bonferroni 方法,3 组及以上的组间比较采用单因素方差分析及 q 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 茶多酚对大鼠胫骨上段松质骨骨微结构的影响

如图 1 所示,Con 组大鼠胫骨上段骨小梁形状规则,数量较多;DOP 组大鼠胫骨上段骨小梁数目变少,排列稀疏且不均匀,不少地方可见部分空洞形成(见

红色箭头所指区域),推测骨微结构已经受到明显的破坏;DOP+L 组大鼠胫骨上段骨小梁数目相对于 DOP 组有所增加,形状较规则,但仍可见有部分空洞形成,骨微结构改善不太明显;DOP+M 组大鼠胫骨上段骨小梁相对于 DOP 组数目增加明显,排列相对紧密,推测骨微结构已有明显改善;DOP+H 组大鼠胫骨上段与 Con 组相似,虽然骨小梁数目和排列紧密度仍有一定差距,且还能看见小部分空洞,但骨小梁数目优于 DOP+M 组。

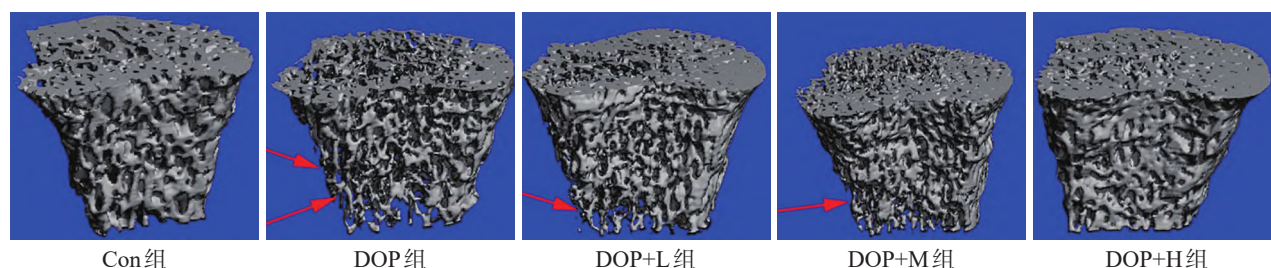


图 1 茶多酚对大鼠胫骨上段松质骨骨微结构的影响(红色箭头:骨小梁空洞)

2.2 茶多酚对大鼠骨密度的影响

DOP 组大鼠的骨密度显著低于 Con 组 ($P<0.01$)。使用了不同剂量茶多酚的 3 组大鼠的骨密度相对于 Con 组大鼠虽有下降,但差异无统计学意义 ($P>0.05$);与 DOP 组比较, DOP+L、DOP+H 组大鼠骨密度明显增高 ($P<0.05$),而 DOP+M 组骨密度虽有升高但差异无统计学意义 ($P>0.05$),结合 2.1 结果,考虑可能与样本量少导致个体差异有关。见图 2。

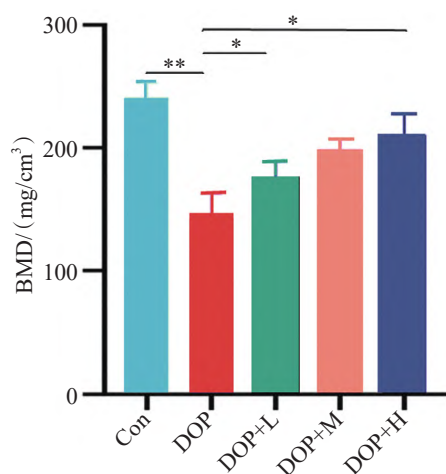


图 2 茶多酚对大鼠骨密度的影响 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

2.3 高通量 RNA 测序

所有样品均通过了 Phred 质量分数 30 分界线,约 10% 的读数 (<18 nts 和 >25 nts) 被丢弃,处理后的数据对比 miRBase 的大鼠基因组映射率在 60%~80%。

2.4 各组间表达差异显著的 microRNA 分析

各组间表达差异显著的 microRNA 满足以下条件: $|\log FC|>1$, $P<0.05$,见图 3。DOP 与 Con 组表达差异显著的 microRNA 共 252 个(上调 113 个,下调 139 个),DOP 与 DOP+L 组 344 个(上调 213 个,下调 131 个),DOP 与 DOP+M 组 350 个(上调 219 个,下调 131 个),DOP 与 DOP+H 组 323 个(上调 209 个,下调 114 个)。根据上述结果绘制的火山图见图 4。

2.5 各组间表达差异显著的 microRNA 交集分析

选取 Con 和 DOP 组前 10 位表达差异显著下调的 microRNA, DOP 和 DOP+L 组、DOP 和 DOP+M 组、DOP 和 DOP+H 组前 10 位表达差异显著上调的 microRNA,取交集,得到 6 个 microRNA (miR-382-3p、miR-122-5p、miR-335、miR-203a-3p、miR-200b-3p 和 miR-199a-5p),见图 5A。选取 Con 和 DOP 组前 10 位表达差异显著上调的 microRNA, DOP 和 DOP+L 组、DOP 和 DOP+M 组、DOP 和 DOP+H 组前 10 位表达差异显著下调的 microRNA,取交集,得到 2 个 microRNA (miR-21 和 miR-96-5p),见图 5B。

2.6 各组间表达差异显著的 microRNA 靶基因预测和功能聚类分析

从测序分析结果中选出在 DOP 组表达显著下调并在 Con 组和 3 个治疗组中表达显著上调的 miR-382-3p,以及在 DOP 组表达显著上调并在 Con 组和 3 个治疗组中表达显著下调的 miR-21、miR-96-5p,通过预

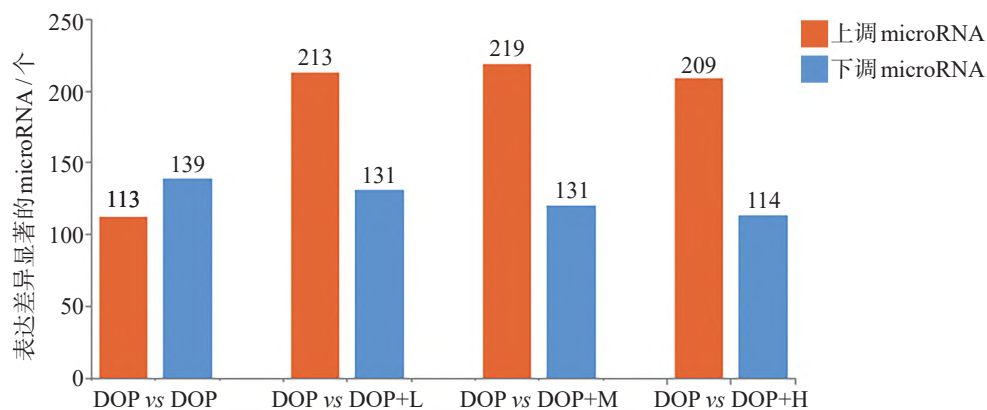


图3 各组间表达差异显著的microRNA柱状图分析

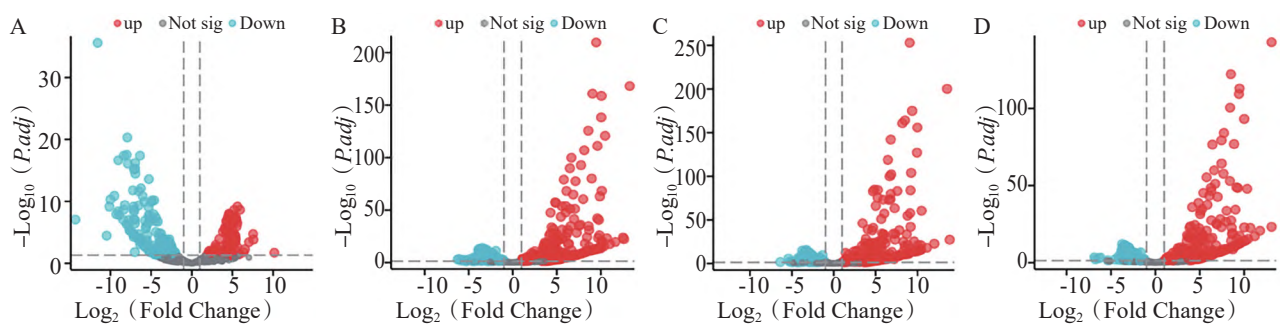
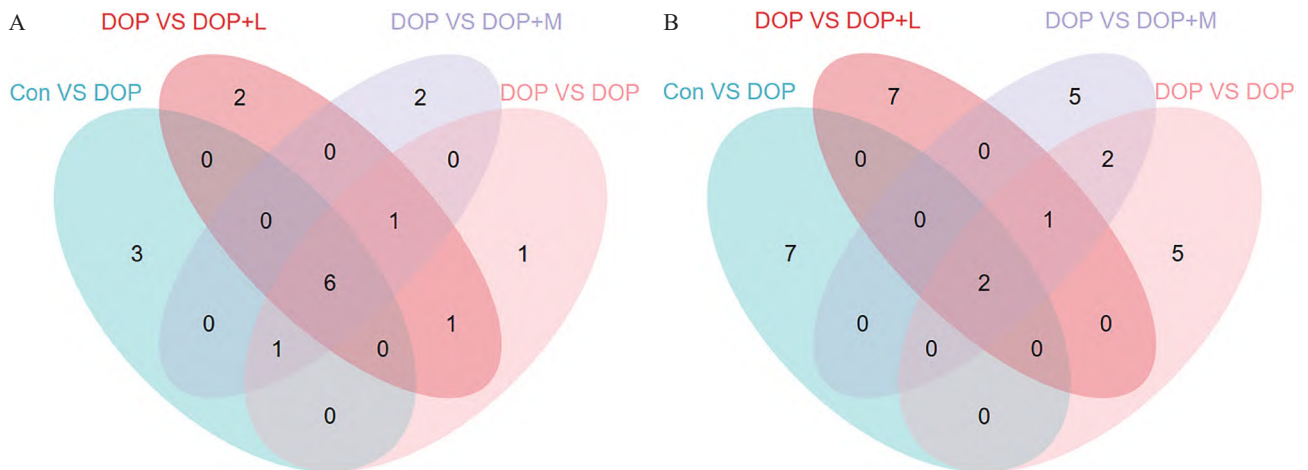


图4 各组间表达差异显著的microRNA火山图分析



A. Con 和 DOP 组表达差异显著下调的 microRNA 与 DOP 和各治疗组表达差异显著上调的 microRNA 的交集; B. Con 和 DOP 组表达差异显著上调的 microRNA 与 DOP 和各治疗组表达差异显著下调的 microRNA 的交集

图5 各组间表达差异显著的 microRNA 交集(韦恩图)分析

测网站 Targetscan、miRDB 预测上述 3 种 microRNA 的靶基因,各网站综合预测得分>85,得到 163 种不同的靶基因,其中排列前 10 的靶基因见表 1。GO 和 KEGG 分析结果显示,这些靶基因在骨质疏松症中主要富集在 regulation of protein catabolic process (蛋白质分解代谢过程的调控)、stress-activated MAPK cascade (应力激活的 MAPK 级联)、positive regulation of protein catabolic process (蛋白质分解代谢过程的正

调控)等生物学过程(biological process, BP), adherens junction (粘附体接合)、apical plasma membrane (顶端质膜)、focal adhesion (粘着斑)等细胞组分(cellular component, CC),及 beta-catein binding (beta 绑定)、guanyl-nucleotide exchange factor activity (鸟苷核苷酸交换因子活性)、Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity (Ras-鸟苷核苷酸交换因子活性)等分子功能(molecular function, MF)中。同时,还富集在 PD-

表1 前10名预测靶基因

排名	目标分数	基因ID	基因符号	转录本
1	100	302396	Nexmif	NM_001313815
2	100	295401	Plppr4	NM_001001508
3	99	314964	Phf2011	NM_001271439
4	99	314850	Frs2	NM_001108097
5	99	361986	Slc39a1	NM_001134577
6	99	295356	Slc16a4	NM_001013913
7	98	679869	Tcf7l2	NM_001191052
8	98	171120	Jmjd1c	NM_001191719
9	98	306548	Hook3	NM_001136098
10	98	302396	Nexmif	NM_053802

L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer (癌症中PD-L1的表达和PD-1检查点通路)、GnRH signaling pathway (GnRH信号通路)、Hippo signaling pathway (Hippo信号通路)等通路中。GO基因功能富

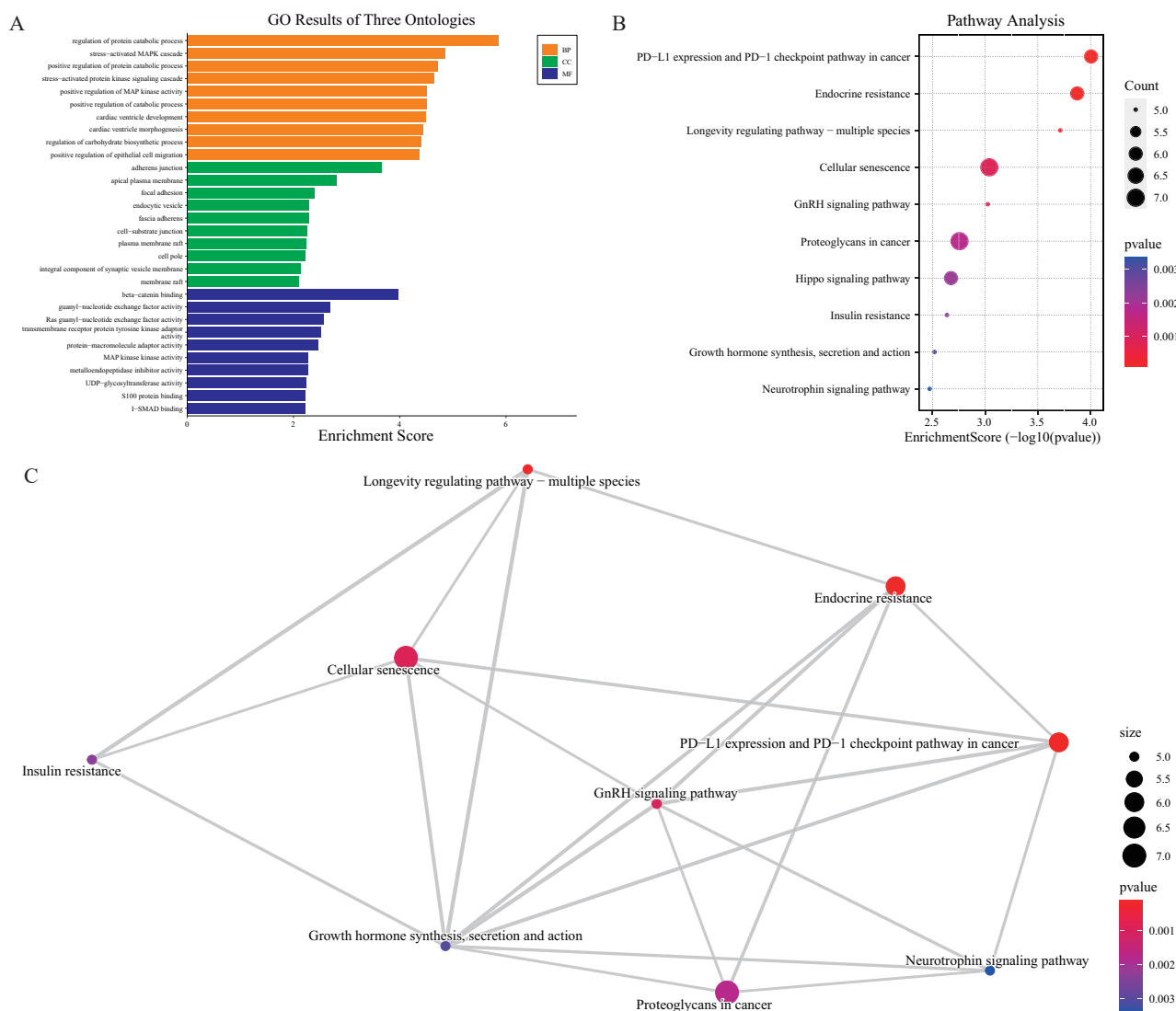
集分析和KEGG基因功能富集分析的可视化结果见图6。

2.7 各组间表达差异显著的microRNA预测靶基因相关的蛋白互作网络分析

利用STRING数据库构建分析所得的表达差异显著的microRNA预测的靶基因的蛋白相互作用网络,见图7。结果显示它们之间具有较大相关性的有FoxO1、Map3k3、Smad7、Alk等,主要与氧化应激增加、葡萄糖和脂质代谢失调等通路有关。

2.8 各组间miR-382-3p、miR-96-5p和miR-21表达水平的比较

选择各组间表达差异显著的miR-382-3p、miR-96-5p和miR-21,通过RT-PCR验证其表达水平与高通量测序结果一致。与Con组比较,DOP组的miR-382-3p表达显著降低,miR-96-5p和miR-21则明显升高;



A. GO富集分析结果; B. KEGG富集分析结果; C. KEGG富集分析Hippo信号通路

图6 各组间表达差异显著的microRNA靶基因功能聚类分析

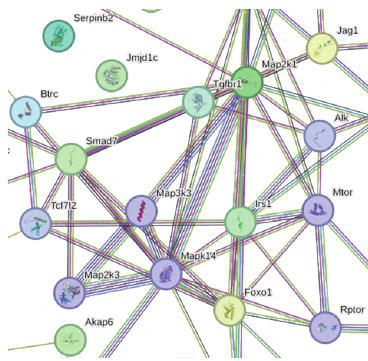


图7 各组间表达差异显著的microRNA预测靶基因相关的蛋白互作网络图

与DOP组比较,各治疗组的miR-382-3p表达明显升高,miR-96-5p和miR-21则明显降低($P<0.01$ 或 0.05)。见图8。

3 讨论

多项研究表明茶多酚通过抗炎、抗氧化和模拟雌激素作用,在预防和治疗肥胖、癌症、骨质疏松症、糖尿病和其他代谢综合征方面发挥着重要的作用^[10-11]。本研究发现,4.8、9.6和14.4 g/kg茶多酚都可以改善STZ诱导的糖尿病大鼠的骨丢失。DOP组大鼠在注射STZ后血糖升高达17.0 mmol/L及以上,并逐渐表现出多食、多尿和身体质量减轻的症状,表明课题组成功诱导了糖尿病大鼠模型。通过对糖尿病模型大鼠进行为期12周的茶多酚治疗后,发现治疗组的糖尿病大鼠对比DOP组除了骨密度增加外,Micro-CT发现其骨微结构也得到明显改善,表明茶多酚在改善糖尿病大鼠骨质疏松方面有着积极的作用。接着课题组通过对糖尿病性骨质疏松大鼠以及经茶多酚治疗后的糖尿病性骨质疏松大鼠的转录组学进行分析,探讨microRNA是否参与糖尿病性骨质疏松的病理生理变化,希望进

一步揭示microRNA在茶多酚治疗糖尿病性骨质疏松中发病机制中的可能靶点。

通过高通量测序法检测Con、DOP和治疗组大鼠血中microRNA表达差异,生物信息学分析发现茶多酚治疗骨质疏松可能是通过多种途径发挥作用,包括改善脂质代谢,减少炎症等。与Con组大鼠相比,DOP组大鼠血清中miR-96-5p和miR-21水平显著升高,提示糖尿病大鼠的氧化应激水平可能高于正常大鼠。Sies^[12]研究发现,miR-96-5p能间接调节谷胱甘肽水平。而谷胱甘肽是一种关键的抗氧化剂,负责消除损伤性氧化应激相关的活性氧。体内低水平的miR-96-5p可以减轻机体的氧化应激反应,然而糖尿病大鼠体内高浓度的miR-96-5p提示糖尿病诱发的氧化应激可能是糖尿病性骨质疏松的潜在病理机制。本研究中发现,相对于正常大鼠,DOP组的miR-181-5p、miR-486-5p、miR-378-5p水平都升高,这些microRNA被认为会加速细胞的衰老进程^[13-15]。其中,miR-181-5p还能够导致线粒体功能障碍及活性氧数量增加^[16]。miR-21不仅被称为“炎性miR”,而且已经被证实可以介导RANK1诱导的破骨细胞分化并抑制破骨细胞凋亡^[17]。本研究结果发现,糖尿病大鼠血清中miR-21水平明显高于Con组,其Micro-CT也显示糖尿病大鼠胫骨有更多的空隙,同时高通量测序结果也显示糖尿病大鼠血清中miR-233和miR-125这两种被认为是破骨细胞形成的有效抑制剂的microRNA水平并没有明显变化,所以破骨细胞存活时间较长导致骨丢失大于骨生成,进而引发糖尿病性骨质疏松的发生。综上,在糖尿病大鼠中检测到的microRNA图谱似乎构成了一个整体加速衰老的过程,其体征是氧化应激增加,葡萄糖和脂质代谢失调。

在本项研究中,miR-382-3p在DOP组大鼠相对

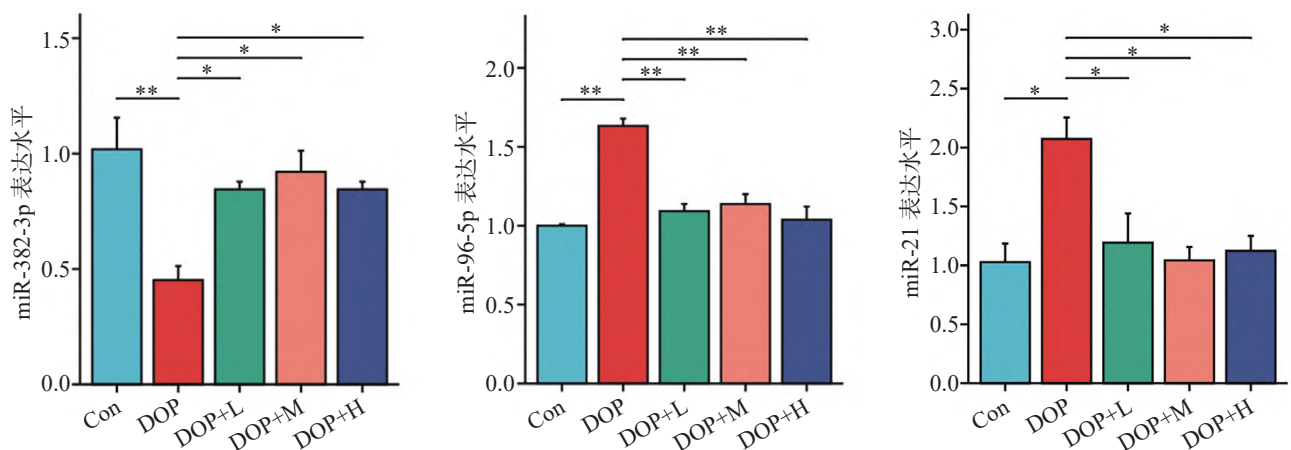


图8 各组间miR-382-3p、miR-96-5p和miR-21表达水平的比较(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Con组下降明显,这与He等^[18]高通量测序骨质疏松小鼠骨组织中miR-382-3p的表达减少的研究结果一致。在一项糖尿病骨质疏松症的特征性研究中发现,糖尿病发生骨折组患者的血清中miR-382-3p水平低于正常人群的7倍,表明糖尿病患者可能较少受到miR-382-3p对成骨的刺激作用^[19],可能会使糖尿病患者成骨能力下降。Hu等^[20]通过实验验证了核因子IA(NFIA)是miR-382-3p下调的靶点。NFIA在功能上是脂肪细胞分化和脂滴形成所必需的。结果符合目前学术界的观点,即与年龄相关的骨病,如骨质疏松症,其特征是骨形成减少和骨髓脂肪积累增加^[21],衰老激活脂肪生成并抑制成骨程序^[22]。在本实验中,经过茶多酚治疗后,治疗组的糖尿病大鼠血浆中的miR-382-3p的表达有所提高,提示miR-382-3p有可能是茶多酚防治糖尿病大鼠骨丢失的作用靶点。

综上,识别和评估糖尿病相关或骨质疏松症相关脆性骨折风险增加的患者对疾病预防和管理至关重要。本研究结果表明,循环中的microRNA差异表达可能是糖尿病性骨质疏松症的主要影响因素;茶多酚能提高糖尿病大鼠的骨密度和改善其骨微结构;高通量测序和生信分析结果揭示了血中循环microRNA的变化情况。靶基因预测、GO和KEGG富集分析、蛋白互作网络预测实验为miR-96-5p、miR-21、miR-382-3p是否可以成为茶多酚防治糖尿病骨质疏松症骨折风险的临床应用以及潜在的药物靶向生物标志物提供了实验基础。

参考文献:

- [1] ALA M, JADARAI R M, DEHPUR A R. Diabetes mellitus and osteoporosis correlation: Challenges and hopes[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2020, 16(9): 984-1001.
- [2] EBELING P R, NGUYEN H H, ALEKSOVA J, et al. Secondary osteoporosis[J]. *Endocr Rev*, 2022, 43(2): 240-313.
- [3] VINTHER D, THOMSEN R W, FURNES O, et al. Impact of diabetes on the risk of subsequent fractures in 926000 patients with an incident hip fracture: A Danish nationwide cohort study 2004-2018[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 21-37.
- [4] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [5] BEUZELIN D, KAEFFER B. Exosomes and microRNA-loaded biomimetic nanovehicles, a focus on their potentials preventing type-2 diabetes linked to metabolic syndrome[J]. *Front Immunol*, 2018, 11(21): 9-27.
- [6] YANG Y, YUJIAO W, FANG W, et al. The roles of microRNA, LncRNA and circRNA in the development of osteoporosis[J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 40-49.
- [7] CHISARI E, SHIVAPPA N, VYAS S. Polyphenol-rich foods and osteoporosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(22): 2459-2466.
- [8] WANG L, ZENG B H, LIU Z W, et al. Green tea polyphenols modulate colonic microbiota diversity and lipid metabolism in high-fat diet treated HFA mice[J]. *J Food Sci*, 2018, 83(3): 864-873.
- [9] CAO H, OU J Y, CHEN L, et al. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human study and clinical trial[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(20): 3371-3379.
- [10] GUO Y M, WU J C, CHEN L F, et al. Tea polyphenol-engineered hybrid cellular nanovesicles for cancer immunotherapy and androgen deprivation therapy[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 192-202.
- [11] 车晓明, 陈亮, 顾勇, 等. 茶多酚治疗骨质疏松症的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(2): 235-240.
- [12] SIES H. Glutathione and its role in cellular functions[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(9-10): 916-921.
- [13] SONG Y L, WANG Z G, JIANG J Z, et al. miR-181-5p attenuates neutrophilic inflammation in asthma by targeting DEK[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 11(112): 243-252.
- [14] LI Z Y, LIU C, LI S, et al. BMSC-Derived exosomes inhibit dexamethasone-induced muscle atrophy via the miR-486-5p/FoxO1 axis[J]. *Front Endocrinol*, 2021, 1(12): 1267-1277.
- [15] PENGJIE Y, RONG J, PENGFEI N. miR-378a-5p exerts tumor-suppressive effects on esophageal squamous cell carcinoma after neoadjuvant immunotherapy by downregulating APOC1/CEP55[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 305-317.
- [16] LI C J, CHENG P, LIANG M K, et al. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1509-1522.
- [17] LIU Y H, LUO D, LIU E Z, et al. MicroRNA21 and IL-18 levels in left atrial blood in patients with atrial fibrillation undergoing cryoablation and their predictive value for recurrence of atrial fibrillation[J]. *J Interv Card Electrophysiol*, 2022, 64(1): 111-120.
- [18] HE X, ZHANG W, LIAO L, et al. Identification and characterization of microRNAs by high through-put sequencing in mesenchymal stem cells and bone tissue from mice of age-related osteoporosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): 71895-71912.
- [19] LESLIE W D, RUBIN M R, SCHWARTZ A V, et al. Type 2 diabetes and bone[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(11): 2231-2238.
- [20] HU Y W, ZHAO J Y, LI S F, et al. RP5-833A20.1/miR-382-5p/NFIA dependent signal transduction pathway contributes to the regulation of cholesterol homeostasis and inflammatory reaction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 87-101.

- [21]PACCOU J, HARDOUIN P, COTTEN A, et al. The role of bone marrow fat in skeletal health: Usefulness and perspectives for clinicians[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(10): 3613-3621.
- [22]MOERMAN E J, TENG K, LIPSCHITZ D A, et al. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: The role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways[J]. *Aging Cell*, 2004, 3(6): 379-389.
- (责任编辑: 李 晓)

红景天苷调控线粒体自噬抵抗冠状动脉内皮细胞缺血再灌注损伤

梁 政, 黄瑶英, 温 文, 钟剑锋, 莫少门, 侯高星, 黎明亮 (广东医科大学附属医院, 广东湛江 524001)

摘 要: **目的** 探讨红景天苷(Sal)对心肌梗死后冠状动脉内皮细胞(CoECs)线粒体自噬的调控机制。**方法** CoECs分为正常对照组(Control组)、阴性对照组(PBS组)、红景天苷组(Sal组)、红景天苷+氯喹组(Sal+CQ组),其中Control组用常氧处理,其余3组进行氧糖剥夺及恢复处理(OGD/R);CCK-8法、荧光探针法、Western Blot检测细胞活性、凋亡、线粒体溶酶体共定位、线粒体膜电位(MMP)、ROS及自噬相关蛋白表达。18只C57/BL6小鼠随机分为假手术(Sham组)、缺血再灌注组(MIRI组)和缺血再灌注+红景天苷组(MIRI+Sal组),其中MIRI组、MIRI+Sal组在LAD结扎手术前后28d分别腹腔注射生理盐水、50 mg/(kg·d) Sal;利用小动物超声成像系统、Masson染色和Western Blot检测射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)、心肌纤维化和小鼠梗死冠状动脉中自噬相关蛋白表达。**结果** 与PBS组比较,Sal组细胞活力、MMP、线粒体溶酶体共定位和PINK1、Beclin1、Parkin表达增加,而细胞凋亡率、ROS含量和Mtf1r1、P62、LC3 II/LC3 I表达下降($P<0.05$);与Sal组比较,Sal+CQ组细胞活力、线粒体溶酶体共定位和PINK1、Beclin1、Parkin表达下降,而细胞凋亡率、ROS含量和Mtf1r1、P62、LC3 II/LC3 I表达增加($P<0.05$)。与MIRI组比较,Sal+MIRI组FS、EF和梗死区域冠状动脉PINK1、Parkin和Beclin1表达增加,而心肌纤维化和Mtf1r1、P62/SQSTM1和LC3 II/LC3 I表达下降($P<0.05$)。**结论** Sal对OGD/R的CoECs和MIRI小鼠梗死区域冠状动脉内皮具有抑制氧化应激和促进线粒体自噬的保护作用。

关键词: 红景天苷;缺血再灌注损伤;氧化应激;线粒体自噬;细胞凋亡

中图分类号: R 285.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 04-0375-09

Salidroside protects coronary endothelial cells against ischemia-reperfusion injury by regulating mitophagy

LIANG Zheng, HUANG Yao-ying, WEN Wen, ZHONG Jian-feng, MO Shao-men, HOU Gao-xing, LI Ming-liang (Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhangjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the modulation of salidroside (Sal) on mitophagy in coronary endothelial cells (CoECs) after myocardial infarction. **Methods** CoECs were divided into normal control, negative control (PBS), Sal, and Sal + Chloroquine (Sal+CQ) groups; Control group was treated with normoxic condition, while the other groups with oxygen/glucose deprivation and reperfusion (OGD/R). Cell viability, apoptosis, mitochondrial-lysosomal colocalization (MLCL), mitochondrial membrane potential (MMP), ROS, and autophagy-related protein levels were detected using CCK-8, fluorescent probe, and Western blot. Eighteen C57/BL6 mice were randomized to Sham, ischemia-reperfusion (MIRI), and MIRI+Sal groups. MIRI or MIRI+Sal group was intraperitoneally injected with normal saline or 50 mg/(kg·d) Sal 28 days before and after LAD ligation. Ejection fraction (EF), left ventricular fractional shortening (FS), myocardial fibrosis, and expression of autophagy-related proteins in infarcted coronary arteries were determined by small animal ultrasound imaging system, Masson stain and Western blot. **Results** Compared with PBS group, cell viability, MMP, MLCL, and expression of PINK1, Beclin1, and Parkin were increased ($P<0.05$), while apoptosis, ROS content, and expression of Mtf1r1, P62, and LC3 II/I decreased

收稿日期: 2024-04-16

基金项目: 广东省中医药局科研项目(20221208)

作者简介: 梁 政,男,硕士,主任医师, E-mail: 471185143@qq.com