

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.23.004

内皮祖细胞损伤来源微粒对内皮祖细胞的影响机制研究^{*}

马艺萍¹,阿不都热合曼·米吉提²,袁玉娟¹,吐尔孙阿依·依斯米提拉¹,

阿卜拉江·艾合麦提¹,穆叶赛·尼加提^{3△}

(1. 新疆医科大学研究生院,乌鲁木齐 830000;2. 喀什地区第二人民医院心血管内科,新疆喀什 844099;3. 新疆维吾尔自治区人民医院急救中心,乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的** 研究不同损伤处理的内皮祖细胞(EPC)来源微粒(MPs)对 EPC 的影响。**方法** 培养 EPC 并使用流式细胞术鉴定,用高糖(HG)、肿瘤坏死因子(TNF)-α 重组蛋白处理 EPC,进而提取 MPs。用透射电镜观察 EPC 内微管、高尔基体等细胞器的结构变化,MTT 检测细胞增殖情况,细胞划痕实验评价细胞迁移能力,细胞管腔形成实验检测管腔形成情况。用实时荧光定量 PCR(qPCR)和 Western blot 检测不同处理后 EPC 中内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)、沉默信息调节因子 1(SIRT1)、大鼠肉瘤(RAS)和细胞外调节蛋白激酶(ERK)的表达水平。**结果** 与 control-EPC-MPs 组比较,HG-EPC-MPs 组、TNF-α-EPC-MPs 组微管结构完整,长度有所缩短,高尔基体结构相对完整。与 control-EPC-MPs 组比较,HG-EPC-MPs 组、TNF-α-EPC-MPs 组 EPC 增殖率下调,细胞迁移能力降低,成管减少($P<0.05$)。与 control-EPC-MPs 组比较,HG-EPC-MPs 组、TNF-α-EPC-MPs 组 eNOS、SIRT1、RAS 和 ERK 的 mRNA 及其蛋白表达下调($P<0.05$)。**结论** HG 和 TNF-α 介导 EPC 损伤来源的 MPs 可能通过调控 SIRT1/ERK1 通路蛋白的表达,使 EPC 内含细胞器的结构改变,从而影响 EPC 的生物学功能。

[关键词] 内皮祖细胞;微粒;SIRT1;ERK1;细胞损伤;机制研究

[中图法分类号] R541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)23-3538-08

Study on the mechanism of the effect of endothelial progenitor cell injury-derived microparticles on endothelial progenitor cells^{*}

MA Yiping¹,ABUDUREHEMAN Mijiti²,YUAN Yujuan¹,TUERSUNAYI Yisimitila¹,

ABULAJIANG Aihemati¹,MUYESAI Nijjati^{3△}

(1. Graduate School, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Department of Cardiovascular, the Second People's Hospital of Kashgar, Kashgar, Xinjiang 844099, China;

3. Emergency Center, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of endothelial progenitor cells (EPC) -derived microparticles (MPs) with different injury treatments on EPC. **Methods** EPC cells were cultured and EPCs were identified by flow cytometry. EPCs were treated with high glucose (HG) and tumor necrosis factor (TNF) -α recombinant protein, and MPs were extracted. The structural changes of microtubules, Golgi bodies and other organelles in EPC were observed by transmission electron microscopy. MTT assay was used to detect cell proliferation. Cell scratch assay was used to evaluate cell migration ability. Cell lumen formation assay was used to detect lumen formation. The expression levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), silent information regulator 1 (SIRT1), rat sarcoma (RAS) and extracellular regulated protein kinase (ERK) in EPC after different treatments were detected by quantitative real-time fluorescence PCR (qPCR) and Western blot. **Results** Compared with the control-EPC-MPs group, the microtubule structure of the HG-EPC-MPs group and the TNF-α-EPC-MPs group was complete, the length was shortened, and the Golgi structure was relatively complete.

^{*} **基金项目:**国家自然科学基金地区基金项目(82060076);新疆维吾尔自治区研究生创新项目(XJ2023G202)。 **作者简介:**马艺萍(1990—),主治医师,博士,主要从事心血管基础研究。 [△] **通信作者,** E-mail: muyassar11@aliyun.com。

Compared with the control-EPC-MPs group, the proliferation rate of EPC in the HG-EPC-MPs group and the TNF- α -EPC-MPs group was down-regulated, the cell migration ability was decreased, and the tube formation was decreased ($P < 0.05$). Compared with the control-EPC-MPs group, the mRNA and protein expressions of eNOS, SIRT1, RAS and ERK in the HG-EPC-MPs group and the TNF- α -EPC-MPs group were down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** HG and TNF- α mediated MPs derived from EPC injury may change the structure of organelles in EPC by regulating the expression of SIRT1/ERK1 pathway proteins, thus affecting the biological function of EPC.

[Key words] endothelial progenitor cells; microparticles; SIRT1; ERK1; cell damage; mechanism research

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是一种与内皮细胞 (endothelial cell, EC) 水平相关的疾病^[1]。EC 损伤、血小板黏附和循环血液中的白细胞侵袭内皮下层是动脉粥样硬化形成的关键早期事件。内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 是一种多功能干细胞, 具有向 EC 分化的潜能^[2]。当组织缺血或损伤时, EPC 从骨髓被动员到外周血中进行分化。研究发现, EPC 能有效减轻心绞痛和心力衰竭, 改善左心室射血分数, 并显示出组织器官再生和恢复缺血相关器官功能的前景^[3]。微粒 (microparticles, MPs) 是由各种活化和凋亡细胞产生、直径为 100 ~ 1 000 nm 的小膜囊泡^[4-6]。MPs 是细胞间物质交换和信号转导的重要介质, 携带表面抗原、蛋白质和各种生物活性分子, 在细胞通讯中发挥关键作用^[7]。有研究发现, EPC 来源 MPs 可以保护心肌细胞免受血管紧张素-Ⅱ诱导的肥大和凋亡^[8], 并将微小 RNA 转移到 EPC 和 EC, 修复 CVD 中的组织损伤^[9]。WU 等^[10]发现 miR-126 通过细胞外调节蛋白激酶 (extra-cellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2 信号通路来增强氧化应激下 EPC 的生物学功能, 这可能为急性心肌梗死的治疗提供新的策略。然而, 损伤的 EPC 来源 MPs 对 EPC 的作用及具体作用机制尚缺乏深入研究, 因此, 本研究通过体外实验, 损伤处理 EPC, 提取 MPs 对 EPC 进行干预, 为减少细胞组织损伤, 开发阻断损伤 EPC 来源 MPs 试剂盒提供理论依据, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料

EPC 购于武汉普诺赛生命科技有限公司; 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)-CD34 (11-0349-42) 购于美国 eBioscience 公司; 内皮细胞生长培养基 (endothelial cell growth medium, EGM)-2 (Promocell, C22121)、胎牛血清 (Wisent, 086-150) 及青链霉素 (Wisent, 450-201-EL) 均购于北京毕特博生物技术有限责任公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 重组蛋白购于上海泽叶生物科技

有限公司。检测设备: AcurriC6 流式细胞仪购于美国 BD 公司; JEM1011 透射电镜仪购于日本 JEOL 公司; Multiskan 51119000 酶标仪购于美国 Thermo fisher 公司; Ts2R 倒置显微镜购于日本 Nikon 公司; Veriti PCR 仪购于美国 Applied Biosystems 公司; Mini Protean 3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 仪器购于美国 Bio-Rad 公司; 化学发光成像分析仪购于上海天能生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

EPC 为贴壁细胞, 培养于 EGM-2 中, 含有 10% 胎牛血清, 100 U/mL 的青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中。当细胞长至 80% ~ 90% 时, 去除培养基, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 1 ~ 2 次, 去除 PBS 后, 加入 1 mL 胰酶消化 1 ~ 3 min 后, 加入 3 mL 完全培养基中和胰酶终止消化, 将消化的细胞转移至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min。倒掉上清液, 加入 3 mL 培养基重悬细胞, 1 : 3 传代至培养皿中培养。

1.2.2 流式细胞仪检测

取分离培养的 EPC, 去除培养基, 加入 PBS 洗 1 ~ 2 次, 去除 PBS 后加入 1 mL 胰酶消化 1 ~ 3 min, 加入 3 mL 完全培养基中和胰酶终止消化, 将消化的细胞转移至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min。倒掉上清液后, 加入 3 mL PBS 重悬细胞。加入 PBS-1% 牛血清白蛋白 (BSA) 重悬细胞, 加入 CD34 抗体按照 1 : 50 的比例稀释, 空白对照细胞加入同型对照抗体, 冰上孵育 30 min。细胞中加入 400 μ L PBS 混匀, 1 000 r/min 离心, 去除上清液, 加入 PBS 洗 3 次, 加入 500 μ L PBS 缓冲液重悬细胞。CD34 是 EPC 的特征性分子标志物, 采用流式细胞仪检测分离细胞中的 CD34 阳性细胞群, 见图 1。

1.2.3 HG、TNF- α 损伤处理

将 EPC 培养于培养皿中, 待细胞贴壁后分别进行正常培养、高糖 (high glucose, HG) 培养、加入

TNF- α 重组蛋白培养 24 h 后收集上清液并提取 MPs,此为 HG、TNF- α 损伤的 EPC 来源 MPs。将 1×10^6 个正常 EPC 接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,将 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 正常培养 EPC 来源 MPs(control-EPC-MPs 组)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HG 培养 EPC 来源 MPs(HG-EPC-MPs 组)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TNF- α 培养 EPC 来源 MPs(TNF- α -EPC-MPs 组)分别加入正常培养的 EPC 后,收集细胞进行检测。

1.2.4 透射电镜检测

3 组细胞用胰酶消化后,收集到离心管中,2 000 r/min 离心 5 min,去除培养基。向收集的细胞中加入戊二醛稀释液固定备用;取 5~10 μL 细胞悬液加到 Formvar-carbon 载样铜网上;取 100 μL PBS 加到封口膜上,用镊子将铜网(Formvar 膜面朝下)放在 PBS 液滴上清洗。在所有步骤中,保持 Formvar 膜面湿润而另一面干燥。铜网放在 50 μL 1%戊二醛液滴

上 5 min;铜网放在 100 μL ddH₂O 洗 2 min(洗 8 次);铜网放在 50 μL 草酸双氧铀液滴上(pH 7.0)5 min;铜网放在 50 μL 甲基纤维素液滴上 10 min,冰上操作;铜网放到样品台顶端的不锈钢环上,在滤纸上吸去多余液体。空气干燥 5~10 min;铜网放在样品盒里,拍摄透射电镜照片。

1.2.5 MTT 检测

3 组细胞培养 24 h 后,加入 10 μL MTT(5 mg/mL),在细胞培养箱中继续培养 3 h。去除培养基,每孔加入 100 μL Formazan 溶解液,适当混匀,在细胞培养箱内继续孵育,直至普通光学显微镜下观察发现 Formazan 全部溶解。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,紫色结晶全部溶解。如果紫色结晶较小、较少,溶解时间较短;如果紫色结晶较大、较多,溶解时间延长,可适当振摇数次。在 570 nm 测定吸光度(A)值;如无 570 nm 滤光片,可使用 560~600 nm 滤光片。

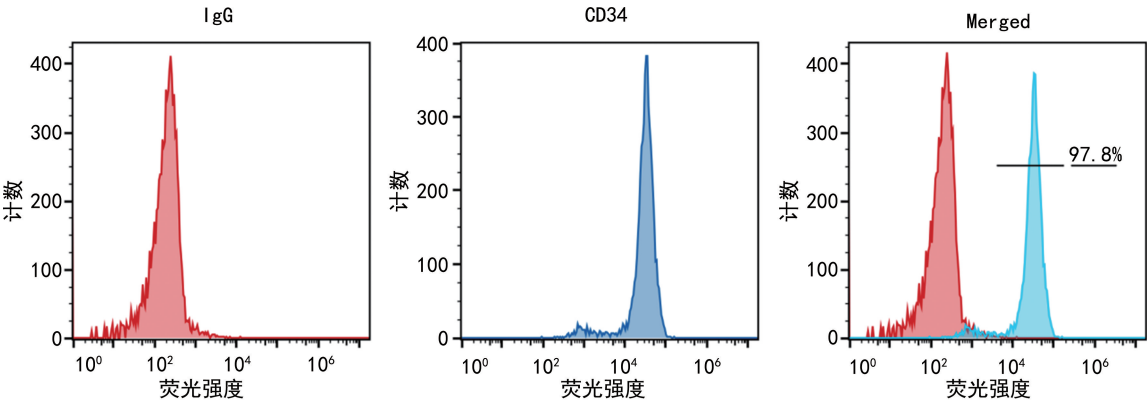


图 1 EPC 流式鉴定

1.2.6 细胞划痕实验

将 5×10^6 个 EPC 接种于 6 孔板中,摇晃均匀后放入培养箱中培养。待细胞长满后,去除培养基,用 PBS 洗 1 次;200 μL 枪头在 6 孔板中划 3 道直线,PBS 洗 2 次,去掉划出的细胞;用 PBS 洗 2 次,将残余的细胞洗干净;在显微镜下拍照,加入无血清培养基,再分别加入 control-EPC-MPs 组、HG-EPC-MPs 组、TNF- α -EPC-MPs 组细胞,摇晃均匀后放入培养箱中常规培养 12、24 h 后拍照。

1.2.7 细胞管腔形成实验

3 组细胞用胰酶消化,1 000 r/min 离心,去除上清液,加入完全培养基重悬细胞,将细胞分别种在 24 孔板中,每孔种 1×10^5 个细胞。培养 6 h 后,观察 EC 管腔形成情况并拍照。拍照后,使用 Image J 软件 Angiogenesis Analyzer Plugin 插件对管腔形成情况进行分析。

1.2.8 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测

3 组细胞去除培养基,加入 PBS 洗 1 次,加入 1

mL TRIzol 裂解细胞,将裂解液转移至 EP 管中。加入氯仿 200 μL ,用力振摇 15 s,室温静置 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min。离心后液体分为 3 层,小心吸取上层无色液体移入 1 个新的 EP 管中。加入等体积异丙醇,上下颠倒混匀,室温静置 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min。去除上清液,沉淀加入 75%乙醇 1 mL,轻微振荡 15 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 r/min 离心 5 min。小心去除上清液,管内沉淀在超净台中鼓风静置干燥 3~5 min。加入 50 μL DEPC 水溶解,nanodrop 检测浓度水平,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。RNA 纯度根据 nanodrop 检测结果和 230、260、280 nm A 值决定。内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)、沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1,SIRT1)、ERK、大鼠肉瘤(rat sarcoma,RAS)引物情况见表 1。

1.2.9 Western blot

3 组细胞加入 200 μL RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min。裂解后将裂解产物转移到预冷的 1.5 mL 离心

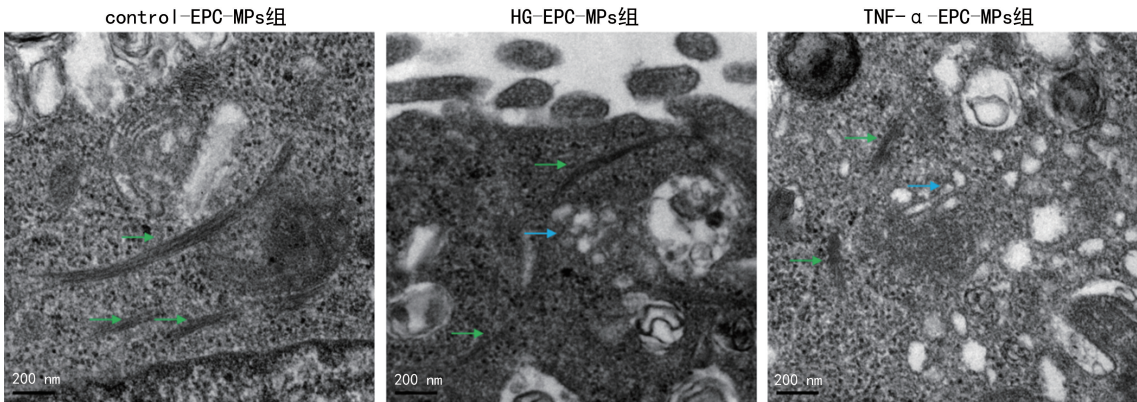
管(冰上)并在4℃下以12 000 r/min离心10 min。将离心后的上清液转移至1.5 mL离心管中,-20℃保存。采用BCA法检测总蛋白水平,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate, polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白。浓缩胶黏剂层电压为80 V,电泳时间为30 min。样品进入分离胶黏剂后,在120 V下电泳90 min,然后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。在脱脂乳中封闭后,将膜与一抗在4℃孵育过夜。根据一抗,将膜与二抗在25℃孵育2 h。使用化学发光成像分析仪进行扫描成像。

1.3 统计学处理

采用SPSS20.0软件分析数据,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;非正态分布的计量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,组间比较采用秩和检验。计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3组EPC电镜下细胞器变化

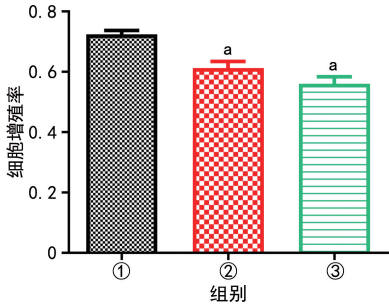


绿色箭头:微管;蓝色箭头:高尔基体。

图2 3组电镜检测结果

2.2 3组EPC细胞增殖情况比较

与control-EPC-MPs组比较,HG-EPC-MPs组、TNF- α -EPC-MPs组细胞增殖率明显下调,差异有统计学意义($P<0.01$),见图3。



①: control-EPC-MPs 组; ②: HG-EPC-MPs 组; ③: TNF- α -EPC-MPs 组; ^a: $P<0.01$,与 control-EPC-MPs 组比较。

图3 3组EPC细胞增殖情况比较

control-EPC-MPs组细胞微管结构完整,整体较长,高尔基体结构完整;HG-EPC-MPs组细胞微管结构完整,长度无明显差异,高尔基体结构相对完整;TNF- α -EPC-MPs微管结构完整,长度有所缩短,高尔基体结构相对完整,部分高尔基体出现囊泡状散在分布在细胞质中,见图2。

表1 PCR检测引物序列

基因	方向	引物序列(5'-3')	大小(bp)
GAPDH	正向	GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT	21
	反向	GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG	23
eNOS	正向	AAC CAG CAC ATT TGG GAA TGG	21
	反向	TAA CTC TTG TGC TGT TCC GGC	21
SIRT1	正向	ACA GGT TGC GGG AAT CCA AA	20
	反向	GTT CAT CAG CTG GGC ACC TA	20
ERK1	正向	CTA CAC GCA GTT GCA GTA CAT	21
	反向	CAG CAG GAT CTG GAT CTC CC	20
RAS	正向	CCA CGT CCC GGA AAT ATG AAG	21
	反向	AGT CCC CTG CAT CTA CAT AGC	21

2.3 3组EPC细胞迁移情况比较

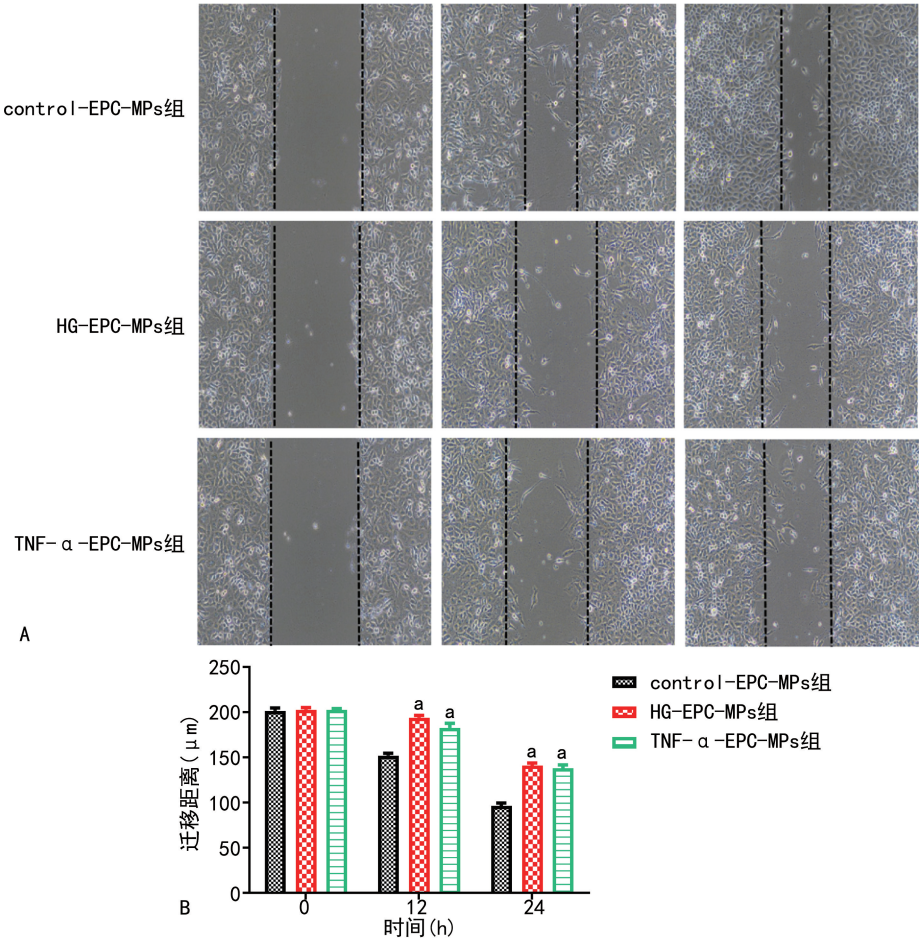
与control-EPC-MPs组比较,HG-EPC-MPs组、TNF- α -EPC-MPs组0 h细胞迁移能力无明显变化($P>0.05$),12、24 h细胞迁移能力明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图4。

2.4 3组EPC管腔形成情况比较

与control-EPC-MPs组比较,HG-EPC-MPs组、TNF- α -EPC-MPs组成管明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$),见图5。

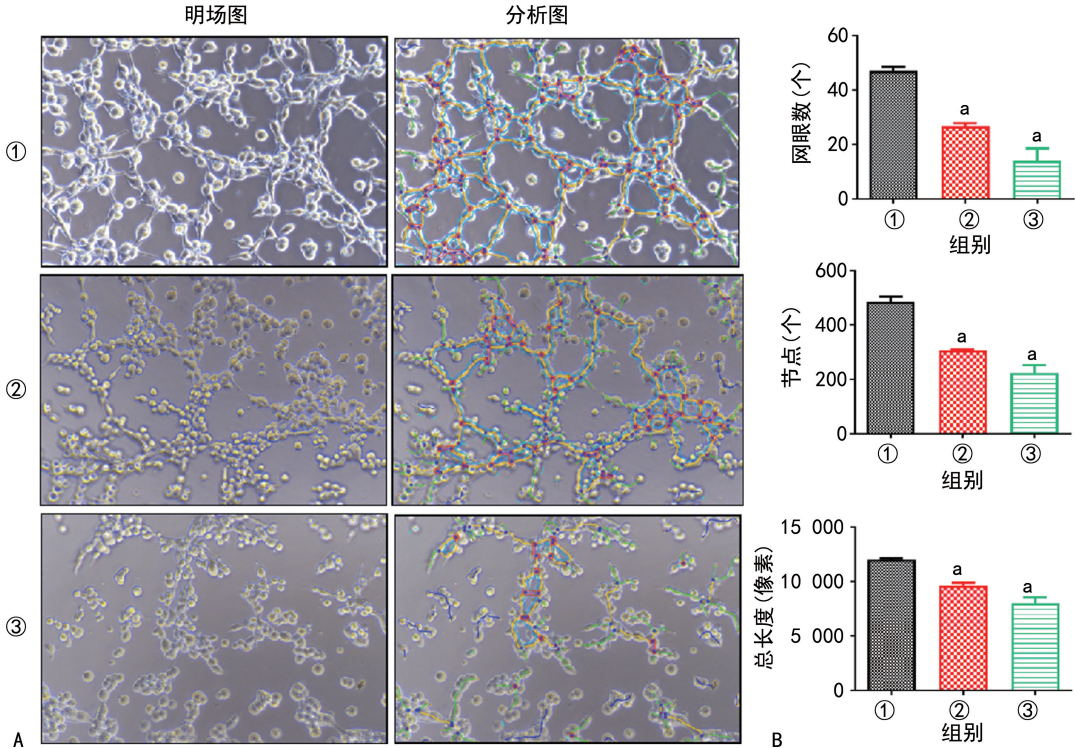
2.5 3组EPC的mRNA和蛋白表达水平比较

与control-EPC-MPs组比较,HG-EPC-MPs组、TNF- α -EPC-MPs组eNOS、SIRT1、RAS和ERK的mRNA和蛋白表达水平下调,差异有统计学意义($P<0.05$),见图6~7。



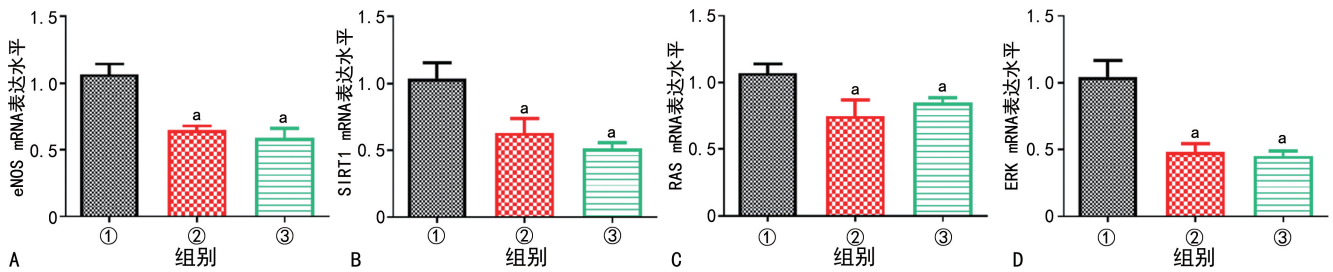
A:细胞划痕图(100×);B:3组EPC迁移距离比较;^a: $P<0.01$,与control-EPC-MPs组比较。

图4 3组EPC细胞迁移情况比较



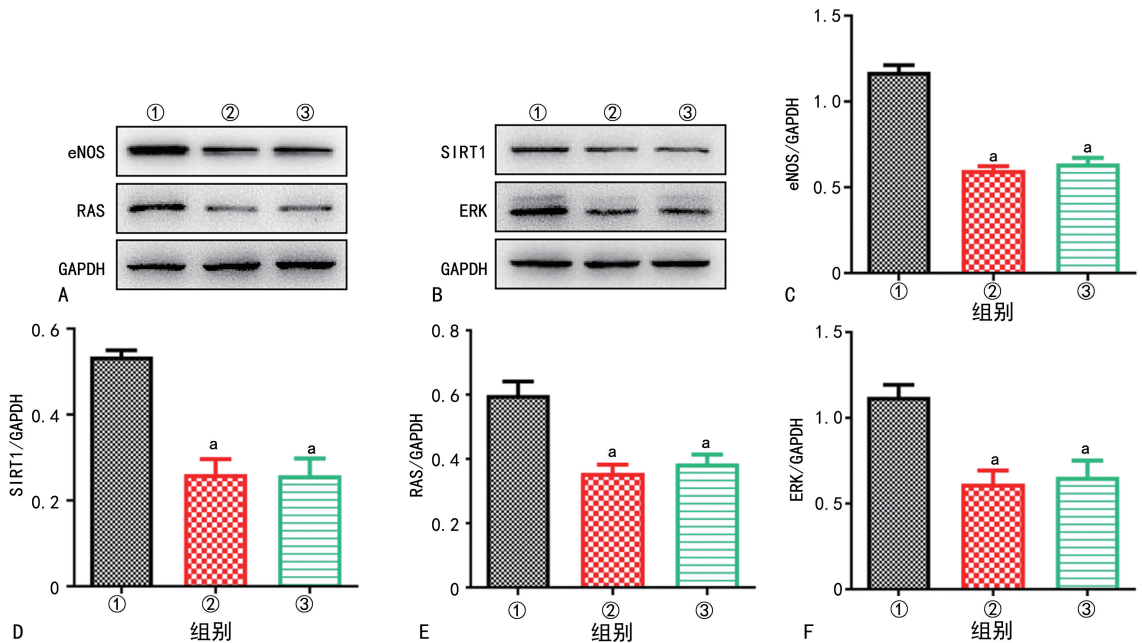
A:管腔形成图(100×);B:成管分析结果;①:control-EPC-MPs组;②:HG-EPC-MPs组;③:TNF-α-EPC-MPs组;^a: $P<0.01$,与control-EPC-MPs组比较。

图5 EPC细胞管腔形成结果



A:3 组 eNOS mRNA 表达比较;B:3 组 SIRT1 mRNA 表达比较;C:3 组 RAS mRNA 表达比较;D:3 组 ERK mRNA 表达比较;①:control-EPC-MPs 组;②:HG-EPC-MPs 组;③:TNF- α -EPC-MPs 组;^a: $P<0.05$,与 control-EPC-MPs 组比较。

图 6 EPC 细胞不同处理后 eNOS、SIRT1、RAS、ERK1 mRNA 表达的变化



A:3 组 eNOS、RAS Western blot 图;B:3 组 SIRT1、ERK Western blot 图;C:3 组 eNOS 蛋白表达分析;D:3 组 SIRT1 蛋白表达分析;E:3 组 RAS 蛋白表达分析;F:3 组 ERK 蛋白表达分析;①:control-EPC-MPs 组;②:HG-EPC-MPs 组;③:TNF- α -EPC-MPs 组;^a: $P<0.05$,与 control-EPC-MPs 组比较。

图 7 EPC 细胞不同处理后 eNOS、ERK、RAS 和 SIRT1 蛋白的表达情况及灰度分析

3 讨论

从骨髓动员进入循环的 EPC 对血管修复、管壁组织重塑和血管生成^[11]具有重要意义。前期研究发现,MPs 在 CVD 的发生、发展中发挥极其重要的作用^[12]。研究人员已经证实,EPC 来源 MPs 可以修复 CVD 中的组织损伤^[9-10]。本研究应用 HG 和 TNF- α 介导 EPC 损伤来源 MPs,探索 EPC 功能障碍的机制,这可能为将来阻断 EPC 损伤来源 MPs、减少 EPC 损伤提供理论依据。

本研究发现,HG 和 TNF- α 介导 EPC 损伤来源 MPs 下调了 EPC 细胞增殖,降低了细胞迁移能力,细胞成管明显减少;HG-EPC-MPs 组和 TNF- α -EPC-MPs 组 EPC 损伤加重,并引起 EPC 微管和高尔基体等细胞器轻微改变;HG-EPC-MPs 组和 TNF- α -EPC-MPs 组 EPC 变化可能与 SIRT1/ERK1 信号通路有关。有研究强调了线粒体和内质网在维持内皮功能中的核心作用^[13]。然而,关于微管和高尔基体在内皮

功能中的作用鲜有报道。本研究发现,HG-EPC-MPs 组、TNF- α -EPC-MPs 组的 EPC 微管结构完整,长度有所缩短,高尔基体结构相对完整,部分高尔基体出现囊泡状散在分布在细胞质中,提示 HG 和 TNF- α 介导 EPC 损伤来源的 MPs 可能会导致微管和高尔基体结构改变,从而加重应激损伤反应。因此,高尔基体损伤可能在 EPC 的损伤中发挥重要作用。

SIRT1 是哺乳动物 NAD 依赖的 sirtuin 脱乙酰基酶组成部分,影响炎症、线粒体生物发生、细胞衰老和凋亡等多个过程^[14-15]。CAO 等^[16]证明了原儿茶酚醛通过调节 SIRT1 诱导自噬和抑制凋亡来挽救氧糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 诱导的 EC 损伤。此外,LI 等^[17]提出 miR-126 过表达通过促进 SIRT1/Nrf2 信号通路来减轻氧化应激和炎症反应,从而减轻 OGD/R 诱导的人脐静脉 EC (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的神经毒性。本研究中,与 control-EPC-

MPs 组比较, HG-EPC-MPs 组、TNF- α -EPC-MPs 组 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达水平下调。此外, HG-EPC-MPs 组和 TNF- α -EPC-MPs 组的 EPC 增殖率、细胞迁移能力降低, 细胞成管明显减少。BI 等^[18]证明, 血管生成素-1 通过 Tie2 受体/ERK1/2-p38MAPK 通路减轻了肾小球 EC 中内质网应激诱导的细胞功能障碍和凋亡。WANG 等^[19]研究表明, 碱性成纤维细胞生长因子参与了缺血氧化损伤模型中内质网应激和线粒体功能障碍的抑制, 这是 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路激活的基础。与 control-EPC-MPs 组比较, HG-EPC-MPs 组、TNF- α -EPC-MPs 组 ERK1 的 mRNA 及其蛋白表达下调, 表明 HG 和 TNF- α 介导 EPC 损伤来源的 MPs 可以通过影响 SIRT1/ERK1 的表达和改变高尔基体结构来抑制 EPC 的生物学功能。

eNOS 是一种产生 NO 的酶, 在心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 中具有重要意义。CAPE-oNO₂ 通过 SIRT1/eNOS 通路抑制氧化应激、炎症反应和细胞坏死, 从而减轻 MIRI^[20]。PENG 等^[21]证明 CC 基元配体 2 促进 MAPK/ERK1/2/MMP-9、PI3K/AKT 和 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达, 并以浓度依赖方式促进 HUVECs 的增殖、迁移和管形成。醛糖还原酶通过 SIRT1/AMPK- α 1/mTOR 通路抑制 HG 诱导的 eNOS 和血管细胞黏附因子 1 表达, 调控单核细胞白血病单核细胞与 HUVECs 的黏附, 从而调控 HG 诱导的 HUVECs 死亡^[22]。本研究中, 与 control-EPC-MPs 组比较, HG-EPC-MPs 组、TNF- α -EPC-MPs 组 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达水平下调。RAS 的激活在 MIRI 的发生、发展中发挥重要作用^[23]。当 MIRI 发生时, 肾素-血管紧张素-醛固酮系统的最终代谢产物血管紧张素 II 与血管紧张素 I 型受体结合, 刺激线粒体氧化应激损伤反应, 导致活性氧过度产生^[24]。活性氧过度产生可能诱发强烈的炎症反应, 增加心肌梗死面积, 导致心功能异常。LI 等^[25]研究表明, 高尔基体参与了钙超载的形成和缓解, 并对神经细胞的缺血和再灌注有强烈的反应。因此, 本研究证实 HG 和 TNF- α 介导 EPC 损伤来源 MPs 可能通过影响 EPC 中 eNOS、RAS 的表达, 促进氧化应激、炎症反应和细胞坏死, 从而加重 EPCs 的损伤。

综上所述, HG 和 TNF- α 介导 EPC 损伤来源 MPs 可能通过调控 SIRT1/ERK1 通路蛋白的表达, 使 EPC 内含细胞器的结构改变, 从而影响 EPC 的生物学功能。

参考文献

[1] BENINCASA G, COSCIONI E, NAPOLI C.

Cardiovascular risk factors and molecular routes underlying endothelial dysfunction; novel opportunities for primary prevention[J]. Biochem Pharmacol, 2022, 202; 115108.

[2] XING Z, ZHAO C, LIU H, et al. Endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles; a novel candidate for regenerative medicine and disease treatment [J]. Adv Healthc Mater, 2020, 9(12); e2000255.

[3] YE H J N, YANG R R, WALLACE C G, et al. Impact of one versus two consecutive doses of endothelial cells(EPCs) and EPCs-derived condition medium on protecting myocardium from acute ischemia-reperfusion injury in rat[J]. Cell Transplant, 2021, 30; 9636897211007049.

[4] WANG B, LI T, HAN X, et al. The level of circulating microparticles in patients with coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2020, 13(5); 702-712.

[5] HU Y, SUN Y, WAN C, et al. Microparticles: biogenesis, characteristics and intervention therapy for cancers in preclinical and clinical research[J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1); 189.

[6] CHEN Y T, YUAN H X, OU Z J, et al. Microparticles (exosomes) and atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2020, 22(6); 23.

[7] STAMPOULOGLOU P K, SIASOS G, BLETSA E, et al. The role of cell-derived microparticles in cardiovascular diseases: current concepts [J]. Curr Pharm Des, 2022, 28(21); 1745-1757.

[8] GU S, ZHANG W, CHEN J, et al. EPC-derived microvesicles protect cardiomyocytes from Ang II-induced hypertrophy and apoptosis[J]. PLoS One, 2014, 9(1); e85396.

[9] ALEXANDRU N, ANDREI E, SAFCIUC F, et al. Intravenous administration of allogenic cell-derived microvesicles of healthy origins defend against atherosclerotic cardiovascular disease development by a direct action on endothelial progenitor cells[J]. Cells, 2020, 9(2); 423.

[10] WU Q, QI B, DUAN X, et al. MicroRNA-126 enhances the biological function of endothelial progenitor cells under oxidative stress via PI3K/Akt/GSK3beta and ERK1/2 signaling

- pathways[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2021, 21 (1):71-80.
- [11] CHISTIakov D A, OREKHOV A N, BO-BRYSHEV Y V. The role of miR-126 in embryonic angiogenesis, adult vascular homeostasis, and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97:47-55.
- [12] MA Y, YUAN Y, AILI Z, et al. Proteomics analysis of coronary blood microparticles in patients with acute myocardial infarction[J]. *Cardiol J*, 2023, 30(2):286-296.
- [13] PERROTTA I. The microscopic anatomy of endothelial cells in human atherosclerosis: focus on ER and mitochondria[J]. *J Anat*, 2020, 237(6):1015-1025.
- [14] LIU X, LIU J, XIAO W, et al. SIRT1 regulates N6-methyladenosine RNA modification in hepatocarcinogenesis by inducing RANBP2-dependent FTO SUMOylation[J]. *Hepatology*, 2020, 72(6):2029-2050.
- [15] TABRIZI F B, YARMOHAMMADI F, HAYES A W, et al. The modulation of SIRT1 and SIRT3 by natural compounds as a therapeutic target in doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36 (1):e22946.
- [16] CAO S, CHEN S, QIAO X, et al. Protocatechu-aldehyde rescues oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced endothelial cells injury by inducing autophagy and inhibiting apoptosis via regulation of SIRT1[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:846513.
- [17] LI J, YANG C, WANG Y. miR-126 overexpression attenuates oxygen glucose deprivation/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and inflammatory response via the activation of SIRT1/Nrf2 signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(2):165.
- [18] BI X, NIU J, DING W, et al. Angiopoietin-1 attenuates angiotensin II-induced ER stress in glomerular endothelial cells via a Tie2 receptor/ERK1/2-p38 MAPK-dependent mechanism[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 428:118-132.
- [19] WANG Z, WANG Y, YE J, et al. bFGF attenuates endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury on myocardial ischaemia/reperfusion via activation of PI3K/Akt/ERK1/2 pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19 (3): 595-607.
- [20] LI D, WANG X, HUANG Q, et al. Cardioprotection of CAPE-oNO₂ against myocardial ischemia/reperfusion induced ROS generation via regulating the SIRT1/eNOS/NF-κB pathway in vivo and in vitro[J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 62-73.
- [21] PENG Z, PANG H, WU H, et al. CCL2 promotes proliferation, migration and angiogenesis through the MAPK/ERK1/2/MMP9, PI3K/AKT, Wnt/beta catenin signaling pathways in HUVECs[J]. *Exp Ther Med*, 2023, 25(2):77.
- [22] PAL P B, SONOWAL H, SHUKLA K, et al. Aldose reductase regulates hyperglycemia-induced HUVEC death via SIRT1/AMPK-alpha1/mTOR pathway[J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 63(1):11-25.
- [23] XIE J X, HU J, CHENG J, et al. The function of the ACE2/Ang(1-7)/Mas receptor axis of the renin-angiotensin system in myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26:1852-1859.
- [24] VERMA K, PANT M, PALIWAL S, et al. An insight on multicentric signaling of angiotensin II in cardiovascular system: a recent update[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:734917.
- [25] LI L H, TIAN X R, HU Z P. The key target of neuroprotection after the onset of ischemic stroke: secretory pathway Ca²⁺-ATPase 1[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10:1271-1278.

(收稿日期:2023-07-07 修回日期:2023-11-30)

(编辑:张芃捷)