

心血管疾病的实验室检测专题·论著 DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2024.18.008

miR-19b 对冠心病大鼠血管内皮细胞损伤的影响
及 PTEN/PI3K/AKT 信号通路的作用何娟, 蒋肖潇, 何秀波[△]

湖南省长沙市第四医院超声医学科, 湖南长沙 410006

摘要:目的 探讨微小 RNA(miR)-19b 对冠心病大鼠血管内皮细胞损伤的影响及磷酸酶及张力蛋白同源物/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PTEN/PI3K/AKT)信号通路的作用。方法 选取 72 只大鼠随机分为正常组、模型组、模拟对照物(NC)组、miR-19b 组、miR-19b+质粒互补 DNA(pcDNA)3.1 组、miR-19b+PTEN 组。采用高脂饲料+垂体后叶素建立冠心病模型,尾静脉注射 miR-19b mimic、pcDNA3.1-PTEN 慢病毒液构建 miR-19b、PTEN 过表达大鼠。采用荧光定量聚合酶链反应检测冠状动脉组织 miR-19b 和 PTEN 信使 RNA(mRNA)水平,测定大鼠心功能,观察大鼠冠状动脉病理变化,检测心肌组织细胞凋亡情况、血管内皮功能、冠状动脉中 PTEN/PI3K/AKT 信号通路、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cleaved Caspase)-3、cleaved Caspase-9 水平。分离培养冠心病大鼠冠状动脉内皮细胞,根据转染方式分为野生型质粒(WT)+NC 组、WT+miR-19b mimic 组、突变型质粒(MUT)+NC 组、MUT+miR-19b mimic 组,采用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-19b 与 PTEN 的靶向关系。将冠心病大鼠冠状动脉内皮细胞分为正常细胞组、NC 细胞组和 miR-19b 细胞组,检测 PTEN mRNA 和 PTEN 蛋白水平。结果 miR-19b 组左心室射血分数(LVEF)、miR-19b、血清血管内皮生长因子(VEGF)、一氧化氮(NO)、磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶(p-PI3K)/PI3K 蛋白、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)/AKT 蛋白水平高于模型组,左心室收缩末期容积(LVESV)、舒张末期容积(LVEDV)、细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9、PTEN mRNA、内皮素-1(ET-1)、PTEN 蛋白水平低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miR-19b+PTEN 组 LVESV、LVEDV、细胞凋亡率、PTEN mRNA、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、ET-1、VEGF、PTEN 蛋白水平高于 miR-19b 组,LVEF、NO、p-PI3K/PI3K 蛋白和 p-AKT/AKT 蛋白水平低于 miR-19b 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。模型组 LVEF、miR-19b、VEGF、NO、p-PI3K/PI3K 蛋白、p-AKT/AKT 蛋白水平低于正常组,LVESV 和 LVEDV、细胞凋亡率、PTEN mRNA、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、ET-1、PTEN 蛋白水平高于正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠冠状动脉内皮细胞排列紊乱,并伴有明显的水肿。与模型组比较,miR-19b 组冠状动脉组织病理损伤明显减轻。WT+miR-19b mimic 组细胞中荧光素酶相对活性低于 WT+NC 组、MUT+NC 组、MUT+miR-19b mimic 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miR-19b mimic 细胞组 PTEN mRNA 和 PTEN 蛋白水平低于正常细胞组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 miR-19b 靶向抑制 PTEN,激活 PI3K/AKT 信号通路,保护冠心病大鼠心功能和血管内皮功能,减少心肌细胞凋亡。

关键词:冠心病; 微小 RNA-19b; 磷酸酶及张力蛋白同源物; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白激酶 B; 内皮细胞损伤

中图分类号:R541.4; R363.2+1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)18-2657-08

Effect of miR-19b on vascular endothelial cell injury and the role of PTEN/PI3K/AKT
signaling pathway in rats with coronary heart diseaseHE Juan, JIANG Xiaoxiao, HE Xiubo[△]

Department of Ultrasound Medicine, the Fourth Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410006, China

Abstract: Objective To investigate the effects of microRNA (miR)-19b on vascular endothelial cell injury in rats with coronary heart disease and the role of phosphatase and tensin homology/phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PTEN/PI3K/AKT) signaling pathway. **Methods** A total of 72 rats were randomly divided into normal group, model group, simulated control (NC) group, miR-19b group, miR-19b+plasmid complementary DNA (pcDNA)3.1 group and miR-19b+PTEN group. The coronary heart disease model was established using high-fat diet and pituitin. miR-19b and PTEN overexpression rats were constructed by tail vein injection of miR-19b mimic and pcDNA3.1-PTEN lentivirus solution. Fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the levels of miR-19b and PTEN messenger RNA(mRNA) in coronary tis-

sue, determine the cardiac function of rats and observe the pathological changes of rat coronary arteries. Apoptosis of myocardial tissue cells, vascular endothelial function, PTEN/PI3K/AKT signaling pathway and cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (cleaved Caspase-3) and cleaved Caspase-9 levels after cleavage in coronary arteries were detected. The coronary endothelial cells of coronary heart disease rats were isolated and cultured. They were divided into wild-type plasmid (WT) + NC group, WT + miR-19b mimic group, mutant plasmid (MUT) + NC group and MUT + miR-19b mimic group according to transfection mode. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-19b and PTEN. The coronary endothelial cells of coronary heart disease rats were divided into normal cell group, NC cell group and miR-19b cell group, and the levels of PTEN mRNA and PTEN protein were detected. **Results** The levels of left ventricular ejection fraction (LVEF), miR-19b, serum vascular endothelial growth factor (VEGF), nitric oxide (NO), phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K)/PI3K protein and phosphorylated protein kinase B (p-AKT)/AKT protein in miR-19b group were higher than those in model group, and left ventricular end-systolic volume (LVESV), end-diastolic volume (LVEDV), apoptosis rate, cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9, PTEN mRNA, endothelin-1 (ET-1), and PTEN protein levels in miR-19b group were lower than those in the model group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of LVESV, LVEDV, apoptosis rate, PTEN mRNA, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9, ET-1, VEGF and PTEN protein in miR-19b + PTEN group were higher than those in miR-19b group, and the levels of LVEF, NO, p-PI3K/PI3K protein and p-AKT/AKT protein in miR-19b + PTEN group were lower than those in miR-19b group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of LVEF, miR-19b, VEGF, NO, p-PI3K/PI3K protein and p-AKT/AKT protein in the model group were lower than those in the normal group, and LVESV and LVEDV, apoptosis rate, PTEN mRNA, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9, ET-1, and PTEN protein levels in the model group were higher than those of normal group, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the coronary endothelial cells in the model group were disordered and accompanied with obvious edema. Compared with the model group, the pathological damage of coronary artery tissue in miR-19b group was significantly reduced. The relative activity of luciferase in cells of WT + miR-19b mimic group was lower than that of WT + NC group, MUT + NC group and MUT + miR-19b mimic group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The levels of PTEN mRNA and PTEN protein in miR-19b mimic cell group were lower than those in normal cell group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-19b can inhibit PTEN, activate PI3K/AKT signaling pathway, protect cardiac function and vascular endothelial function and reduce myocardial cell apoptosis in coronary heart disease rats.

Key words: coronary heart disease; microRNA-19b; phosphatase and tensin homolog; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B; endothelial cell injury

冠心病是临床常见的循环系统疾病,该病主要由动脉内膜脂质沉积引发的动脉堵塞,导致心肌急性缺血损伤,出现心绞痛、胸闷、呼吸短促等临床表现^[1]。近年来,我国冠心病发病率日益升高,且发病年龄也呈年轻化趋势发展^[2]。目前,临床主要通过抗血栓类药物治^[3],但需要长期使用药物控制病情。因此,临床亟需根据发病机制开发针对性药物。微小 RNA 是内源性小 RNA 分子链,可作用靶基因 3'UTR 调控其表达,在冠心病发生、发展过程中有重要的调控作用^[4]。已有研究表明,微小 RNA-19b(miR-19b)水平在冠心病患者中异常降低,并可作为评估冠状动脉病变程度的指标^[5]。磷酸酶及张力蛋白同源物/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PTEN/PI3K/AKT)信号通路表达与心肌损伤密切相关^[6]。据报道,miR-19b 在儿童肾癌中可靶向 PTEN/PI3K/AKT 信号通路发挥

促癌作用^[7]。但 miR-19b 对冠心病的影响是否通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路尚未明确,故本研究分析了 miR-19b 对冠心病大鼠血管内皮细胞损伤的影响,以及对 PTEN/PI3K/AKT 信号通路的作用,为冠心病的诊断与治疗提供新的理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 72 只,清洁级,6~8 周龄,体质量为 200~260 g,购自北京维通利华实验动物公司 [SCXK(京)2022-0006]。本研究已通过实验动物伦理审核批准(ZSLL-KY-2023-029)。

1.2 主要材料和试剂 高脂及普通饲料购自北京博奥派公司,模拟物对照物(NC)、miR-19b mimic、互补质粒 DNA(pcDNA)3.1 及 pcDNA3.1-PTEN、miR-19b 和 PTEN 引物由上海钦诚生物公司提供。苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、TUNEL 染色试剂盒均购

自南京诺唯赞公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 内皮素-1(ET-1)、血管内皮生长因子(VEGF)和一氧化氮(NO)酶联免疫吸附试验试剂盒均购自南京建成公司, 反转录试剂盒、荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自北京百奥莱博公司, RIPA 裂解液购自上海恒斐公司, 兔抗 PTEN 抗体、PI3K 抗体、磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶(p-PI3K)抗体、AKT 抗体、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)抗体、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cleaved Caspase)-3 抗体、cleaved Caspase-9 抗体及鼠抗 β 肌动蛋白(β -actin)抗体均购自美国 Abcam 公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天公司。

1.3 方法

1.3.1 构建冠心病大鼠模型 将大鼠饲养于通风的动物房中, 室温为 23~25 °C, 相对湿度为 50%, 每 12 小时昼夜交替, 适应性喂养 1 周后再进入后续实验。先用高脂饲料喂养大鼠 6 周, 再换用普通饲料, 隔日大鼠腹腔注射 30 μ g/kg 垂体后叶素, 连续注射 3 d。当心电图监测到大鼠 II 导联心电图中 J 点位移超过 0.2 mV 则模型构建成功^[8]。

1.3.2 分组与处理 将 72 只大鼠随机分为正常组、模型组、NC 组、miR-19b 组、miR-19b + pcDNA3.1 组、miR-19b + PTEN 组, 造模前 24 h 和造模后每周, NC 组尾静脉注射 50 μ g/100 mL 空载慢病毒液, miR-19b 组尾静脉注射 50 μ g/100 mL miR-19b mimic, miR-19b + pcDNA3.1 组尾静脉注射 50 μ g/100 mL 空载质粒, miR-19b + PTEN 组尾静脉注射 50 μ g/100 mL pcDNA3.1-PTEN, 均为 100 μ L, 正常组和模型组以生理盐水替代。除正常组外, 其他组构建冠心病大鼠模型。干预结束后进行心功能检测, 再取腹主动脉血进行血管内皮功能检测, 采用颈椎脱臼法处死大鼠, 分离冠状动脉、心肌组织, 随机从各组中随机选取 6 只大鼠完成荧光定量 PCR、HE 染色、TUNEL 染色及蛋白质印迹法检测。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测冠状动脉组织中 miR-19b 和 PTEN 信使 RNA(mRNA)水平 颈椎脱臼法处死大鼠, 分离剖取冠状动脉, 加入 Trizol 试剂冰上匀浆, 经氯仿-异丙醇处理后提取总 RNA, 反转录合成互补 DNA(cDNA), 再分别以 U6 和 GAPDH 为内参, 进行荧光定量 PCR。miR-19b 正向引物序列: 5'-TGTGCAAATCCATG-3'; miR-19b 反向引物序列: 5'-UGUGCAUCAUGCAACUGA-3'; PTEN 正向引物序列: 5'-GGAAAGGACGGACTGGTGTA-3'; PTEN 反向引物序列: 5'-CGCCTCTGACTGGGAATAGT-3'。反应条件: 95 °C 60 s, 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-19b 和 PTEN mRNA 水平。

1.3.4 心功能指标检测 采用 VEVO2100 小动物超

声成像系统(加拿大 VISUALSONICS 公司)测定大鼠心功能指标, 包括左心室收缩末期容积(LVESV)和舒张末期容积(LVEDV)、左心室射血分数(LVEF)。

1.3.5 HE 染色观察大鼠冠状动脉病理变化 取冠状动脉组织固定 24 h, 制备 4 μ m 石蜡切片, 进行 HE 染色, 在光镜下观察冠状动脉病理变化。

1.3.6 TUNEL 染色检测心肌组织细胞凋亡 剖取大鼠心肌组织固定 24 h, 制备 4 μ m 石蜡切片, 脱蜡处理后, 将切片置于蛋白酶 K 溶液中孵育 30 min, 再放入 TUNEL 工作液中, 以 37 °C 避光反应 1 h, 然后添加二氨基联苯胺复染, 呈棕黄色染色为凋亡细胞, 细胞凋亡率=细胞凋亡数/细胞总数 $\times$ 100%。

1.3.7 血管内皮功能指标检测 取大鼠腹主动脉血, 室温静置 1 h, 再离心分离上清液, 参照酶联免疫吸附试验试剂盒说明书操作, 检测血清 ET-1、VEGF、NO 水平。

1.3.8 蛋白质印迹法检测冠状动脉和心肌组织相关蛋白水平 取冠状动脉、心肌组织, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, 测定蛋白含量后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、电转、封闭, 再分别置于兔抗 PTEN 抗体(1 : 1 500)、PI3K 抗体(1 : 1 000)、p-PI3K 抗体(1 : 1 000)、AKT 抗体(1 : 1 500)、p-AKT 抗体(1 : 1 500)、cleaved Caspase-3 抗体(1 : 2 000)、cleaved Caspase-9 抗体(1 : 1 000)、鼠抗 β -actin 抗体(1 : 1 000), 置于 4 °C 环境下孵育过夜, 次日清洗后置于蛋白二抗(1 : 3 000), 室温孵育 1 h, 最后发光显影。

1.3.9 双荧光素酶报告基因实验 通过在线网站 TargetScanHuman 查询 miR-19b 与 PTEN 的结合位点, 构建野生型质粒(WT)和突变型质粒(MUT)。分离培养冠心病大鼠冠状动脉内皮细胞, 分别用 miR-19b mimic 及 NC 与上述质粒共转染细胞, 根据转染方式分为 WT + NC 组、WT + miR-19b mimic 组、MUT + NC 组、MUT + miR-19b mimic 组, 各组细胞培养 24 h, 参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书操作, 计算各组细胞荧光素酶相对活性。另外, 用 NC 及 miR-19b mimic 转染细胞作为 NC 细胞组和 miR-19b 细胞组, 另正常培养细胞作为正常细胞组, 检测 PTEN mRNA 和 PTEN 蛋白水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件分析数据。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 各组冠状动脉组织中 miR-19b 和 PTEN mRNA 水平比较 miR-19b 组冠状动脉组织 miR-19b 水平高于模型组, PTEN mRNA 水平低于模型组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。miR-19b + PTEN 组冠状动脉组织 PTEN mRNA 水平高于 miR-19b 组

($P<0.05$)。模型组冠状动脉组织 miR-19b 水平低于正常组,PTEN mRNA 水平高于正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组冠状动脉组织中 miR-19b 和 PTEN mRNA 水平比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	miR-19b	PTEN mRNA
正常组	6	1.00±0.13	1.00±0.16
模型组	6	0.23±0.07 [*]	2.37±0.28 [*]
NC 组	6	0.25±0.06	2.34±0.30
miR-19b 组	6	2.68±0.34 [#]	1.25±0.25 [#]
miR-19b+pcDNA3.1 组	6	2.70±0.37	1.28±0.24
miR-19b+PTEN 组	6	2.65±0.31	2.12±0.36 [△]
<i>F</i>		145.096	30.824
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与 miR-19b 组比较,[△] $P<0.05$ 。

2.2 各组心功能指标比较 miR-19b 组 LVESV、LVEDV 低于模型组,LVEF 高于模型组,差异均有统

计学意义($P<0.05$)。miR-19b+PTEN 组 LVESV 和 LVEDV 高于 miR-19b 组,LVEF 低于 miR-19b 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。模型组 LVESV 和 LVEDV 高于正常组,LVEF 低于正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

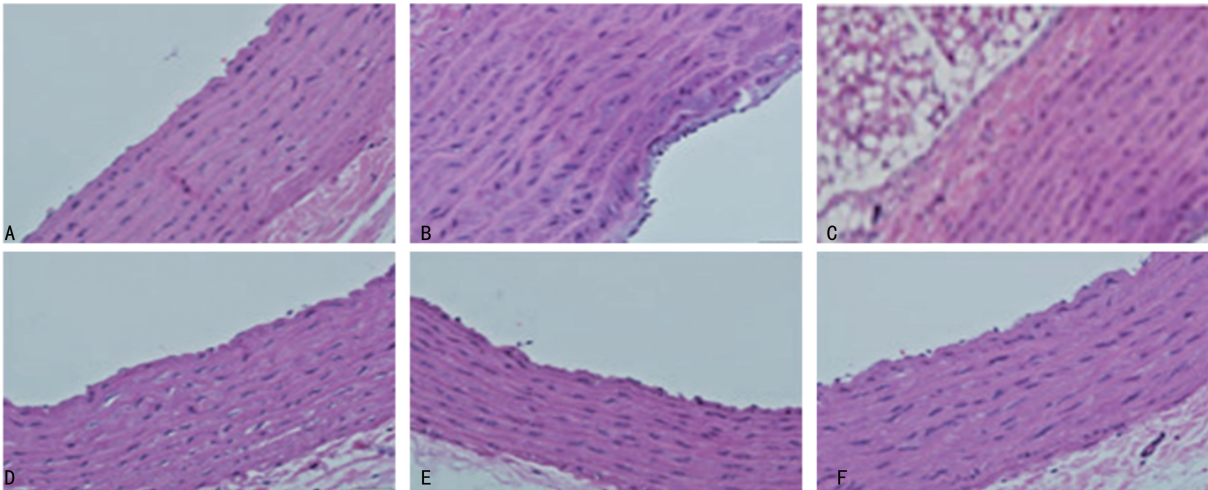
2.3 各组冠状动脉病理变化比较 与正常组比较,模型组大鼠冠状动脉内皮细胞排列紊乱,并伴有明显的水肿;与模型组比较,miR-19b 组冠状动脉组织病理损伤明显减轻;与 miR-19b 组比较,miR-19b+PTEN 组冠状动脉组织病理损伤加重。见图 1。

2.4 各组大鼠心肌组织细胞凋亡率和凋亡蛋白水平比较 miR-19b 组心肌组织细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 水平低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miR-19b+PTEN 组心肌组织细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 水平高于 miR-19b 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。模型组心肌组织细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 水平高于正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2、3 及表 3。

表 2 各组心功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

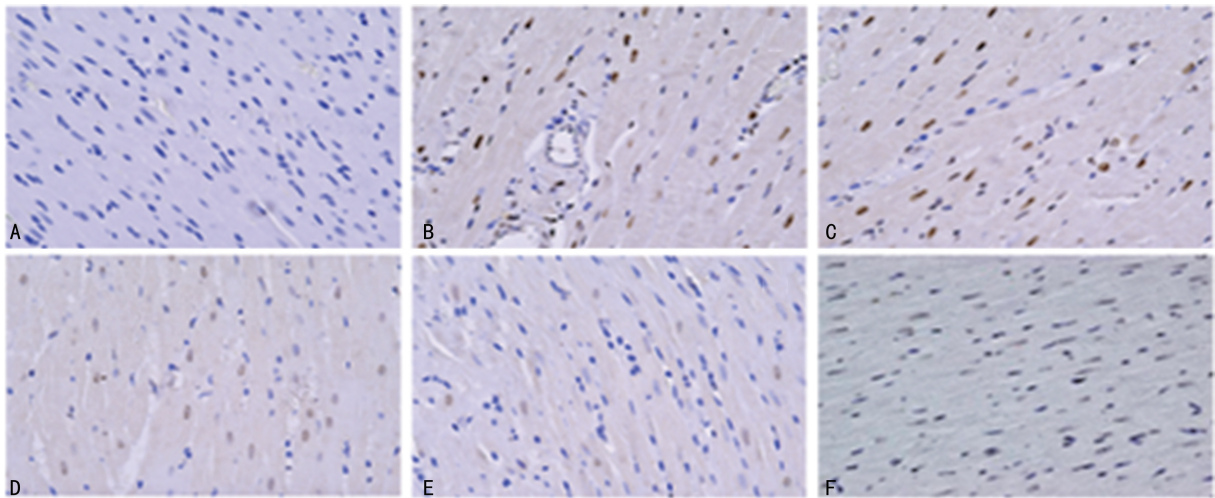
组别	<i>n</i>	LVESV(mL)	LVEDV(mL)	LVEF(%)
正常组	12	1.26±0.15	3.25±0.41	0.95±0.12
模型组	12	4.71±0.42 [*]	6.73±0.69 [*]	0.26±0.08 [*]
NC 组	12	4.75±0.44	6.68±0.75	0.27±0.05
miR-19b 组	12	1.89±0.25 [#]	4.14±0.58 [#]	0.82±0.16 [#]
miR-19b+pcDNA3.1 组	12	1.82±0.29	4.19±0.61	0.84±0.13
miR-19b+PTEN 组	12	4.28±0.37 [△]	6.06±0.65 [△]	0.37±0.11 [△]
<i>F</i>		281.036	69.073	93.267
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与 miR-19b 组比较,[△] $P<0.05$ 。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为 NC 组;D 为 miR-19b 组;E 为 miR-19b+pcDNA3.1 组;F 为 miR-19b+PTEN 组。

图 1 各组冠状动脉病理检查结果(HE 染色,×200)



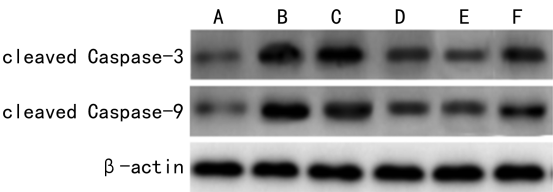
注:A 为正常组;B 为模型组;C 为 NC 组;D 为 miR-19b 组;E 为 miR-19b+pcDNA3.1 组;F 为 miR-19b+PTEN 组。

图 2 各组心肌组织细胞凋亡检测结果(TUNEL 染色,×200)

表 3 各组大鼠心肌组织细胞凋亡率和凋亡蛋白水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞凋亡率(%)	cleaved Caspase-3	cleaved Caspase-9
正常组	6	3.26±0.88	0.21±0.07	0.25±0.08
模型组	6	31.54±5.27 [*]	1.27±0.29 [*]	1.39±0.30 [*]
NC 组	6	30.16±6.41	1.22±0.25	1.32±0.31
miR-19b 组	6	12.47±2.23 [#]	0.43±0.12 [#]	0.48±0.15 [#]
miR-19b+pcDNA3.1 组	6	11.86±2.05	0.38±0.09	0.52±0.17
miR-19b+PTEN 组	6	22.74±4.56 [△]	0.75±0.16 [△]	0.81±0.20 [△]
<i>F</i>		46.010	36.527	27.942
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^{*}*P*<0.05;与模型组比较,[#]*P*<0.05;与 miR-19b 组比较,[△]*P*<0.05。



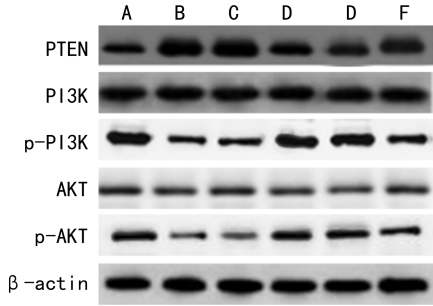
注:A 为正常组;B 为模型组;C 为 NC 组;D 为 miR-19b 组;E 为 miR-19b+pcDNA3.1 组;F 为 miR-19b+PTEN 组。

图 3 各组心肌组织细胞凋亡蛋白表达

2.5 各组血管内皮功能指标比较 miR-19b 组血清 ET-1 水平低于与模型组,VEGF 和 NO 水平高于模型组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。miR-19b+PTEN 组血清 ET-1 水平高于 miR-19b 组,VEGF 和 NO 水平低于 miR-19b 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。模型组血清 ET-1 水平高于正常组,VEGF 和 NO 水平低于正常组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 4。

2.6 各组冠状动脉组织中 PTEN/PI3K/AKT 信号通路各蛋白水平比较 miR-19b 组冠状动脉组织 PTEN 蛋白水平低于模型组,p-PI3K/PI3K 蛋白和 p-AKT/AKT 蛋白水平高于模型组,差异均有统计学区

义(*P*<0.05)。miR-19b+PTEN 组冠状动脉组织 PTEN 蛋白水平高于 miR-19b 组,p-PI3K/PI3K 蛋白和 p-AKT/AKT 蛋白水平低于 miR-19b 组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。模型组冠状动脉组织 PTEN 蛋白水平高于正常组,p-PI3K/PI3K 蛋白和 p-AKT/AKT 蛋白水平低于正常组,差异均有统计学区



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为 NC 组;D 为 miR-19b 组;E 为 miR-19b+pcDNA3.1 组;F 为 miR-19b+PTEN 组。

图 4 各组冠状动脉组织中 PTEN/PI3K/AKT 信号通路表达

2.7 miR-19b 与 PTEN 的靶向关系 miR-19b 与

PTEN 结合位点见图 5。WT+NC 组、WT+miR-19b mimic 组、MUT+NC 组、MUT+miR-19b mimic 组细胞荧光素酶相对活性分别为 1.00±0.12、0.32±0.09、0.97±0.15、1.05±0.14。各组细胞中荧光素酶相对活性比较,差异有统计学意义($F=44.198, P<0.05$)。WT+miR-19b mimic 组细胞中荧光素酶相对活性低于 WT+NC 组、MUT+NC 组、

MUT+miR-19b mimic 组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.8 各组冠状动脉内皮细胞 PTEN mRNA 及 PTEN 蛋白水平比较 miR-19b mimic 细胞组冠状动脉内皮细胞 PTEN mRNA 和 PTEN 蛋白水平低于正常细胞组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 6 及表 6。

表 4 各组血管内皮功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ET-1(ng/L)	VEGF(ng/L)	NO(μmol/L)
正常组	12	4.26±0.75	137.59±10.42	44.72±5.63
模型组	12	13.59±1.92 [*]	56.23±7.19 [*]	21.84±3.91 [*]
NC 组	12	13.51±1.87	57.61±7.73	22.37±3.67
miR-19b 组	12	6.94±1.23 [#]	116.83±9.51 [#]	39.61±4.52 [#]
miR-19b+pcDNA3.1 组	12	7.02±1.39	115.62±9.88	39.26±4.10
miR-19b+PTEN 组	12	11.74±1.65 [△]	82.74±8.54 [△]	28.44±4.27 [△]
<i>F</i>		80.715	172.591	59.382
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与 miR-19b 组比较,[△] $P<0.05$ 。

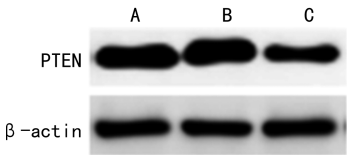
表 5 各组冠状动脉组织中 PTEN/PI3K/AKT 信号通路各蛋白水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PTEN 蛋白	p-PI3K/PI3K 蛋白	p-AKT/AKT 蛋白
正常组	6	0.67±0.14	1.05±0.18	0.71±0.15
模型组	6	1.48±0.22 [*]	0.20±0.05 [*]	0.12±0.03 [*]
NC 组	6	1.53±0.27	0.22±0.07	0.14±0.03
miR-19b 组	6	0.89±0.16 [#]	0.86±0.19 [#]	0.60±0.16 [#]
miR-19b+pcDNA3.1 组	6	0.92±0.19	0.83±0.16	0.58±0.14
miR-19b+PTEN 组	6	1.35±0.23 [△]	0.33±0.09 [△]	0.29±0.09 [△]
<i>F</i>		18.137	45.873	30.278
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与 miR-19b 组比较,[△] $P<0.05$ 。

PTEN 3'UTR 5'-...CACUUAUAUGGGCUUUUGCACU...-3'
miR-19b 5'-...AGUCAAAACGUACCUAACCGUGU...-3'

图 5 miR-19b 与 PTEN 结合位点



注:A 为正常细胞组;B 为 NC 细胞组;C 为 miR-19b 细胞组。

图 6 各组冠状动脉内皮细胞 PTEN 表达

表 6 各组冠状动脉内皮细胞 PTEN mRNA 及 PTEN 蛋白水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PTEN mRNA	PTEN 蛋白
正常细胞组	6	1.00±0.13	1.36±0.21
NC 细胞组	6	0.95±0.17	1.39±0.25

续表 6 各组冠状动脉内皮细胞 PTEN mRNA 及 PTEN 蛋白水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PTEN mRNA	PTEN 蛋白
miR-19b 细胞组	6	0.35±0.09 [*]	0.72±0.17 [*]
<i>F</i>		43.692	19.027
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与正常细胞组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3 讨论

本研究采用高脂饲料+垂体后叶素构建冠心病模型,结果显示模型组 LVESV 和 LVEDV 高于正常组,LVEF 低于正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$),提示大鼠造模后出现心脏收缩和泵血功能障碍,而且冠状动脉组织内皮细胞排列紊乱,并伴有明显的水肿,表明冠心病模型构建成功。

微小 RNA 可广泛参与细胞生长、凋亡、内皮细胞功能、新生血管形成等多种生理过程,从而在冠状动脉疾病、心力衰竭等心血管疾病中存在差异表达^[9]。miR-19b 属于 miR-17-92 基因簇,位于人 13 号染色体、C13orf25 基因第 3 个内含子区^[10]。有研究表明,miR-17-92 基因簇在血管内皮损伤患者中显著下调,miR-19b 可抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的内皮细胞凋亡,在动脉粥样硬化中起着关键作用^[11]。SINGH 等^[12]研究发现,miR-19b 亚型 miR-19b-1-5p 低表达可能与急性冠状动脉综合征患者阿司匹林耐药密切相关,可预测患者复发。本研究结果显示,模型组冠状动脉组织 miR-19b 水平低于正常组($P < 0.05$),与上述研究结果相符。miR-19b 过表达后大鼠心脏收缩和泵血功能明显提高,冠状动脉组织病理损伤明显减轻,表明 miR-19b 过表达可有效改善冠心病大鼠心功能和冠状动脉病变,有望成为冠心病潜在的治疗靶点。

内皮细胞损伤是动脉粥样硬化的重要病理机制^[13],拮抗内皮细胞损伤是治疗冠心病的有效途径之一。据报道,心肌缺血诱导的心肌细胞凋亡,可损伤内皮细胞,加剧冠心病病情^[14]。本研究结果显示,相较于正常组大鼠,模型组大鼠心肌组织细胞凋亡率升高,心肌组织中凋亡关键蛋白 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 表达也上调;而 miR-19b 过表达可降低心肌细胞凋亡率、cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 表达,提示 miR-19b 过表达可抑制心肌细胞凋亡,减轻内皮细胞损伤。ET-1 和 NO 是内皮细胞分泌的活性物质,血管内皮功能障碍时 NO 释放减少或(和)其活性降低,ET-1 增多,导致血管舒缩调节失衡,诱发炎症应激和循环高凝,参与冠心病发生、发展过程^[15]。VEGF 则是重要的血管内皮生长因子,可拮抗血管内皮细胞损伤,发挥促血管再生、抗血栓形成、抗炎症等作用^[16]。本研究中,miR-19b 组血清 ET-1 水平低于与模型组,VEGF 和 NO 水平高于模型组,表明 miR-19b 过表达可纠正 ET-1 和 NO 表达失衡,并促进 VEGF 表达,改善冠心病大鼠内皮细胞功能障碍。

越来越多的研究表明,PTEN 参与心肌损伤机制的相关调控^[17-18]。正常生理状态下,PI3K/AKT 信号通路激活可促使下游与细胞存活及死亡平衡相关的底物,在心肌损伤中发挥保护作用,但 PTEN 可直接抑制 PI3K/AKT 信号通路,促进心肌损伤^[19]。本研究通过在线软件发现,miR-19b 与 PTEN 存在靶向结合位点。而且 miR-19b 组冠状动脉组织中 PTEN 蛋白水平低于模型组,p-PI3K/PI3K 蛋白和 p-AKT/

AKT 蛋白水平高于模型组,miR-19b+PTEN 组冠状动脉组织中 PTEN 蛋白水平高于 miR-19b 组,p-PI3K/PI3K 蛋白和 p-AKT/AKT 蛋白水平低于 miR-19b 组,提示过表达 miR-19b 可抑制 PTEN 表达,促进 PI3K/AKT 信号通路磷酸化,而猜测 miR-19b 可能通过此途径参与冠心病的病理机制。本研究在 miR-19b 过表达的基础上对 PTEN 过表达,发现 PTEN 过表达可部分逆转 miR-19b 过表达对冠心病大鼠心功能改善作用,表现为 LVESV、LVEDV 和血清 ET-1 水平升高,LVEF、VEGF 和血清 NO 水平降低,冠状动脉病理损伤加重,心肌细胞凋亡增多。

综上所述,miR-19b 上调可保护冠心病大鼠心功能,减轻血管内皮损伤,可能通过靶向抑制 PTEN,激活 PI3K/AKT 信号通路。本研究结果丰富了冠心病的发病机制及病理基础,miR-19b 有望成为冠心病治疗过程中的重要靶点,但 miR-19b 在冠心病中是否还涉及其他作用机制,仍有待深入分析。

参考文献

- [1] SIGAMANI A, GUPTA R. Revisiting secondary prevention in coronary heart disease[J]. Indian Heart J, 2022, 74 (6): 431-440.
- [2] 中国心血管健康与疾病报告编写组, 胡盛寿. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要[J]. 中国循环杂志, 2023, 38 (6): 583-612.
- [3] DOENST T, THIELE H, HAASENBITTER J, et al. The treatment of coronary artery disease[J]. Dtsch Arztebl Int, 2022, 119(42): 716-723.
- [4] 赵焱婧, 彭红玉, 刘建勋, 等. 急性冠脉综合征不同气证证候亚型病人 miRNAs 表达谱检测及生物信息学分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(20): 3448-3454.
- [5] 王双双, 张斌强, 钱航, 等. 血清 miR-92a, miR-17, miR-19b 对冠心病患者冠状动脉病变程度的评估价值[J]. 山东医药, 2023, 63(7): 76-79.
- [6] XING X, GUO S, ZHANG G, et al. miR-26a-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(2): e9106.
- [7] LIU G L, YANG H J, LIU B, et al. Effects of microRNA-19b on the proliferation, apoptosis and migration of Wilms' tumor cells via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(10): 3424-3434.
- [8] 郭施勉, 楚英杰. 人参皂苷 Rg1 对冠心病大鼠心肌细胞凋亡的影响及机制研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(23): 4054-4059.
- [9] GE X, MENG Q, WEI L, et al. Myocardial ischemia-reperfusion induced cardiac extracellular vesicles harbour proinflammatory features and aggravate heart injury[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(4): e12072.

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.18.009

HP 联合 CVVH 治疗脓毒症相关急性肾损伤
患者预后不良的预测模型构建*王亚丽,周晋萌,王美霞[△],姚哲放,赵 兰,王彩虹,李小洋
山西医科大学第一临床医学院重症医学科,山西太原 030000

摘要:目的 构建血液灌流(HP)联合连续性血液滤过(CVVH)治疗脓毒症相关急性肾损伤(SA-AKI)患者预后不良的预测模型。方法 选取 2020 年 12 月至 2023 年 1 月山西医科大学第一临床医学院收治的 150 例 SA-AKI 患者作为研究对象,均对其进行 HP 联合 CVVH 治疗,观察治疗 7 d 后临床指标变化情况。根据治疗 28 d 后患者是否死亡分为预后不良组和预后良好组,比较预后良好组和预后不良组的临床资料。采用 LASSO 回归初筛 SA-AKI 患者经 HP 联合 CVVH 治疗后预后不良的影响因素,将筛选出的指标作为因变量,采用多因素 Logistic 回归分析 SA-AKI 患者 HP 联合 CVVH 治疗后预后不良的危险因素,根据结果构建模型并采用受试者工作特征(ROC)曲线分析评估模型的预测价值。结果 治疗 7 d 后 SA-AKI 患者尿量多于治疗前,血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平及入院序贯器官衰竭(SOFA)评分低于治疗前,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。SA-AKI 患者进行 HP 联合 CVVH 治疗的住院时间为 6~28 d,平均 (16.79 ± 5.08) d,严重出血事件发生率为 10.67%(16/150)。治疗 28 d 后,预后良好组有 103 例患者,预后不良组有 47 例患者,病死率为 31.33%(47/150)。两组脓毒症来源、入院 SOFA 评分、急性肾损伤(AKI)分期、ICU 住院时间、可溶性血栓调节蛋白(sTM)、肝素结合蛋白(HBP)、Dickkopf 相关蛋白 3(DKK3)水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。LASSO 回归分析筛选出 5 个变量(入院 SOFA 评分、AKI 分期、sTM、HBP、DKK3)进行多因素 Logistic 回归分析。结果显示,入院 SOFA 评分、AKI 分期、sTM、HBP、DKK3 水平升高是 SA-AKI 患者 HP 联合 CVVH 治疗后预后不良的危险因素($P < 0.05$)。构建模型为 $\text{Log}(P) = 1.570 \times X_{\text{入院SOFA评分}} + 1.629 \times X_{\text{AKI分期}} + 1.324 \times X_{\text{sTM}} + 1.541 \times X_{\text{HBP}} + 1.449 \times X_{\text{DKK3}} - 7.108$ 。ROC 曲线分析结果显示,5 项指标联合预测 SA-AKI 患者 HP 联合 CVVH 治疗后预后不良的曲线下面积(AUC)为 0.936。结论 对 SA-AKI 患者进行 HP 联合 CVVH 治疗效果明显,以入院 SOFA 评分、AKI 分期、sTM、HBP、DKK3 构建 A-AKI 患者 HP 联合 CVVH 治疗后预后不良的预测模型有较高的预测价值。

关键词:脓毒症相关急性肾损伤; 血液灌流; 连续性血液滤过; 可溶性血栓调节蛋白; Dickkopf 相关蛋白 3; 肝素结合蛋白

中图法分类号:R692.5;R459.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)18-2664-06

Construction of a predictive model for poor prognosis in patients with sepsis associated acute
kidney injury treated with HP combined with CVVH*WANG Yali, ZHOU Jinmeng, WANG Meixia[△], YAO Zhefang,
ZHAO Lan, WANG Caihong, LI XiaoyangDepartment of Critical Care Medicine, the First Clinical College of Shanxi Medical University,
Taiyuan, Shanxi 030000, China

Abstract: **Objective** To construct a prediction model for poor prognosis of patients with sepsis associated acute kidney injury (SA-AKI) treated with hemoperfusion (HP) combined with continuous hemofiltration (CVVH). **Methods** A total of 150 SA-AKI patients admitted to the First Clinical College of Shanxi Medical University from December 2020 to January 2023 were selected as the study objects, and all of them were treated with HP combined CVVH, and the clinical indicators were observed after 7 days of treatment. According to whether the patients died after 28 days of treatment, they were divided into poor prognosis group and good prognosis group. The clinical data of good prognosis group and poor prognosis group were compared. LASSO regression was used to initially screen the factors of poor prognosis in SA-AKI patients after HP combined

* 基金项目:山西省基础 Research 计划项目(202203021222376)。

作者简介:王亚丽,女,医师,主要从事血液灌流联合血液滤过治疗脓毒症相关急性肾损伤方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail: fengsh-enzhizi@126.com。