

· 基础研究 ·

黄芪多糖修复 LPS 诱导的内皮祖细胞
功能损伤机制的实验研究张 婧¹ 万晓青¹ 苏慧丽¹ 张忠山² 毛根祥¹

摘要 目的 运用 microRNA 芯片方法检测黄芪多糖对脂多糖(LPS)刺激下内皮祖细胞(EPCs)细胞功能损伤的诱导作用及相关的 miRNA 表达变化,分析其分子机制。方法 将 EPCs 分为 3 组:对照组、LPS 处理组(LPS 组)和黄芪多糖预处理组(APS 组),进行 miRNA 表达谱分析与验证,并利用生物信息方法分析 miRNA 调控的靶基因功能与信号通路。结果 有 15 个 miRNA 与 LPS 诱导的细胞功能损伤相关。19 个 miRNA 在黄芪多糖预处理后表达发生了改变。7 个 miRNA 分子即 hsa-miR-146a-5p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-7977、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-377-3p、hsa-miR-7114-5p 及 hsa-miR-424-5p 在 LPS 组与 APS 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中 3 个 miRNA 经 RT-PCR 验证结果与芯片结果相符。7 个 miRNA 的靶基因主要参与蛋白泛素化调节等基因本体(GO)功能分类以及 PI3K-Akt 等信号通路。结论 APS 对 LPS 诱导的 EPCs 功能损伤有保护修复作用,该作用可能与 miRNA 分子的表达改变相关。

关键词 黄芪多糖;脂多糖;内皮祖细胞;microRNA 芯片

Effect of Astragalus Polysaccharides on LPS-induced EPCs Functional Damage ZHANG Jing¹, WAN Xiao-qing¹, SU Hui-li¹, ZHANG Zhong-shan², and MAO Gen-xiang¹ 1 Zhejiang Provincial Key Lab of Geriatrics, Zhejiang Hospital, Hangzhou (310030); 2 School of Life Sciences, Huzhou Normal College, Zhejiang (313000)

ABSTRACT Objective To analyze the relative miRNA network of *Astragalus Polysaccharides* (APS) protective effect on lipopolysaccharide (LPS)-induced functional damage of endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** For miRNA expression profile analysis, endothelial progenitor cells were divided into three groups: Control group, LPS treatment group, and APS pretreatment group. Real-time PCR were used for microarray data validation. Bioinformatics methods were used for miRNA network analysis. **Results** Totally 15 miRNAs were found to be associated with LPS-induced cellular functional impairment. Expressions of 19 miRNAs were changed after APS pretreatment with LPS stimulation. Seven miRNAs including hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-7977, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-7114-5p, and hsa-miR-424-5p, showed significant differences between the LPS group and the APS pretreatment group ($P < 0.05$). Expressions of 3 miRNAs verified by RT-PCR were consistent with the microarray results. GO analysis found that mRNA targets of the 7 miRNAs were enriched in protein ubiquitination functional group and PI3K-Akt signaling pathway. **Conclusions** APS had protective effects on LPS-induced functional damage of EPCs. The molecular mechanism of this effect was related to expression changes of miRNAs.

KEYWORDS *Astragalus Polysaccharides*; lipopolysaccharide; endothelial progenitor cell; microRNA microarray

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81771520); 浙江省自然科学基金青年项目(No. LQ16H020006); 浙江省中医药科学研究基金项目(No. 2015ZA002); 浙江省医药卫生科技计划平台带头人项目(No. 2015DTA001)

作者单位: 1. 浙江医院浙江省老年医学重点实验室(杭州 313000); 2. 湖州师范学院生命科学学院(浙江 313000)

通讯作者: 毛根祥, Tel: 0571-87377772, E-mail: maogengxiang@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20190910. 275

血管生成或修复能力受损是心血管疾病、糖尿病和中风等疾病并发症的主要原因^[1]。国内外研究表明,心血管疾病患者炎症因子水平的升高将直接损害血管内皮,增加血黏度,易于形成血栓和栓塞,加重了患者的血脂紊乱,从而加速了血管病变的发展,大大的影响了患者生活质量及预后^[2]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一种存在于循环外周血中能够分化为血管内皮细胞的前体细胞,主要来源于骨髓、脐血或胎肝^[3]。在血管损伤或组织缺血的情况下,存在于骨髓中的 EPCs 可以应答于局部释放的生长因子和细胞因子而增殖,分化并动员至外周血液循环,特异性的归巢于损伤或缺血部位,进一步增殖、分化为成熟的内皮细胞,参与血管新生和再内皮化^[4]。

黄芪是一种传统的补益类中药,主要生物活性物质成分包括多糖、蛋白质、生物碱、氨基酸、黄酮类、苷类、微量元素等,具有突出的免疫调节功能。黄芪多糖(Astragalus Polysaccharides, APS)是从黄芪根部提取一种白色粉末状物质,主要由 α -1, 4 (1, 6) 葡聚糖、阿拉伯-半乳糖、鼠李-半乳糖醛酸多糖和阿拉伯-半乳糖蛋白多糖所组成,能够有效调节机体的免疫功能并且抑制肿瘤的生长^[5]。APS 还可降低糖尿病大鼠血糖水平,对早期糖尿病大鼠血管内皮细胞具有良好的保护作用^[6]。

microRNAs 主要通过靶基因 mRNA 3' UTR 区域的完全或不完整配对引起 mRNA 降解或翻译抑制,从而在转录后水平调控基因的表达,进而参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生物过程^[7, 8]。本研究初步探讨了 APS 对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 EPCs 损伤的保护作用,并从 miRNA 水平揭示 APS 保护 EPCs 的分子机制。

材料与方法

1 细胞 原代培养的 EPCs 由本实验室从外周血分离培养。

2 药物 APS,购自北京索莱宝科技有限公司。

3 试剂及仪器 EGM-2 培养基(美国 Lonza 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);Trizol 试剂(In-vitrogen 公司);miScript Reverse Transcription Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司);miScript SYBR Green PCR kit 200 试剂盒(德国 Qiagen 公司);CCK-8 细胞活性检测试剂盒(日本同仁化学研究所);miRNA 模拟物(上海吉玛公司);BD matrigel 基质胶(德国 BD Biosciences 公司),其他生化试剂均为国产分析纯。荧光倒置显微镜(德国徕卡仪器公司)。

4 方法

4.1 细胞分离与培养 抽取志愿者外周静脉血 30 mL,采用密度梯度离心法分离纯化出外周血单个核细胞,重悬于 EGM-2 培养基(含 20% 胎牛血清、青霉素 100/mL、链霉素 0.1 mg/mL、血管内皮生长因子 50 ng/mL),接种于预先包被好纤维连接蛋白的细胞培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养;3 天后移除未贴壁悬浮细胞,换培养液继续培养;每 3 天换液,在倒置显微镜下动态观察细胞形态的变化,培养至 14 天左右的贴壁细胞即为实验所用的 EPCs^[9]。

4.2 EPCs 鉴定 将贴壁细胞与浓度为 2.4 μ g/mL Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)在 37 °C 孵育 1 h 后用 2% 多聚甲醛固定;再将浓度为 10 μ g/mL FITC 标记的荆豆凝集素 1(FITC-UEA-1)滴加于上述标本中 37 °C 孵育 1 h,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗 3 次,蒸馏水冲洗 1 次,滴加缓冲甘油封片。通过荧光倒置显微镜鉴定 FIT-UEA-1、Dil-ac-LDL 双染色阳性细胞为正在分化的 EPCs。

4.3 分组干预 将贴壁细胞消化、重悬后分为 3 组:对照组,EGM-2 培养 48 h;LPS 处理组(简称 LPS 组),EGM-2 培养 24 h 后,加 1 mg/mL LPS 继续培养 24 h;APS 预处理组(简称 APS 组),EGM-2 培养基加 APS(800 μ g/mL)培养细胞 24 h 后换液,继续用 EGM-2 培养基加 1 mg/mL LPS,培养 24 h。处理后即刻收集细胞进行下一步检测。

5 观察项目及检测方法

5.1 细胞增殖能力检测 将分组处理好的细胞消化,以 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^4$ 细胞/孔的密度在 96 孔培养板上将细胞接种,每组 6 孔,每孔 100 μ L。分别于 0、24、48、72 h 加 CCK-8 孵育 2 h,在酶标仪上 450 nm 波长处测定吸光度值。

5.2 microRNA 芯片检测 EPCs 予处理后,立即收集细胞,Trizol 试剂提取细胞总 RNA,采用生物分析仪(安捷伦,2100)鉴定 RNA 的纯度和质量。对 RNA 3' 端加 poly(A),并进行荧光标记,进行杂交反应。本实验采用 LC Sciences microRNA 微阵列(单色,miRbase 19.0 版本),用激光共聚焦扫描仪对杂交结束后的芯片进行扫描,对杂交信号值进行背景扣除,归一化。

5.3 荧光定量 PCR 验证芯片结果 选取芯片结果中显著差异表达的 miRNA 进行验证。PCR 引物购自德国 Qiagen 公司。按照 miScript Reverse Transcription Kit 试剂盒说明书,将各例 RNA 样本逆转录为 cDNA,反应程序为:37 °C 60 min,95 °C

5 min, 冰上保存。按照 miScript SYBR Green PCR kit 的说明, 进行定量 PCR, 反应程序为: 95 °C 5 min 预变性, 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 70 °C 34 s (采集信号) 重复 40 个循环进行扩增; 溶解曲线采用 ABI 7000 默认程序。反应结束后仪器自动计算出 Ct (threshold cycles) 值。每个样本设置 3 个重复管, 同时设无模板阴性对照。2^{-ΔΔCt} 法计算各组之间 miRNA 的表达差异。

5.4 细胞转染 取生长至对数期的 EPCs, 参考 Invitrogen 公司的脂质体 Lipofectamine 2000 转染方法分别将 miRNA-424 mimics、mimics control 转染至细胞中, 转染后室温放置 20 min, 6 h 后换成 EGM-2 完全培养液, 继续培养 48 h 进行后续实验。

5.5 血管形成实验 于冰上向 96 孔板每孔中加入 50 μL 基质胶, 5% CO₂ 的 37 °C 孵箱中孵育 60 min。消化 EPCs, 每孔中加入 2×10⁴ 个细胞, 培养 2 h 后, 每隔 1 h 在光学显微镜下观察细胞成管情况, 并拍照记录^[10]。

5.6 靶基因预测与分析 采用生物信息学软件 (mirtarbase <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>) 和 microT-CDS (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index) 对芯片检测的差异表达 miRNA ($P<0.05$) 进行靶基因预测。基于 GO (gene ontology) 功能数据库和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库, 利用 David 软件 (the database for annotation, visualization and integrated discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>) 对靶基因进行 GO 显著性分析和信号通路显著性分析。

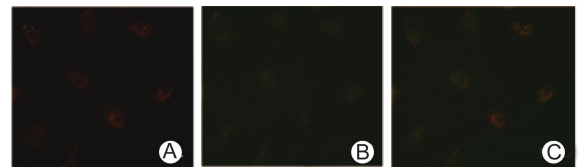
6 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 方法。两组间比较采用 *t* 检验。作图使用 Graph Pad Prism 5 软件。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 EPCs 鉴定结果 (图 1) EPCs 具有摄取 ac-LDL 和结合 UEA-1 的能力, 收集培养 14 天的贴壁细胞, 经 FITC-UEA-1 和 Dil-ac-LDL 单克隆抗体标记, 荧光倒置显微镜下鉴定 Dil-ac-LDL 染色阳性细胞呈红色, FITC-UEA-1 染色阳性细胞呈绿色, FITC-UEA-1 和 Dil-ac-LDL 双染色阳性细胞视为 EPCs, 呈黄色。

2 3 组 EPCs 增殖能力比较 (表 1) 处理 96 h 后, LPS 组及 APS 组 EPCs 的增殖能力较对照组明

显降低 ($P<0.05$)。与 LPS 组比较, APS 组 EPCs 增殖能力增强 ($P<0.05$)。



注: A 为细胞 Dil-ac-LDL 染色; B 为细胞 UEA-1 FITC 染色; C 为双染色

图 1 EPCs 鉴定结果 (×200)

表 1 3 组 EPCs 增殖能力比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 h	24 h	48 h	96 h
对照	4	0.61±0.04	0.85±0.06	1.55±0.11	2.02±0.08
LPS	4	0.67±0.05	0.72±0.08	1.31±0.01	1.65±0.05*
APS	4	0.52±0.03	0.81±0.01	1.50±0.04	1.79±0.06* ^Δ

注: 与对照组同期比较, * $P<0.05$; 与 LPS 组同期比较, $^{\Delta}P<0.05$

3 3 组 EPCs 的 miRNA 表达谱差异比较 (表 2)

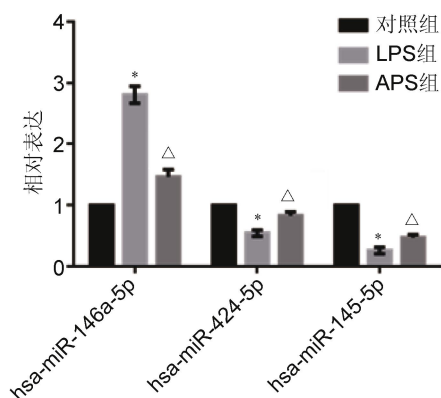
与对照组比较, LPS 组有 15 个 miRNA 表达差异显著 ($P<0.05$)。与 LPS 组比较, APS 组有 19 个 miRNA 发生了改变 ($P<0.05$)。其中 hsa-miR-146a-5p 表达量在 LPS 刺激后表达升高 ($P<0.05$); 而在 APS 干预后表达降低 ($P<0.05$)。hsa-miR-145-5p、hsa-miR-7977、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-377-3p、hsa-miR-7114-5p、hsa-miR-424-5p 在

表 2 3 组 EPCs 的 miRNA 表达谱差异比较

miRNA	对照组/LPS 组	P 值	APS 组/LPS 组	P 值
hsa-miR-155-5p	—	—	0.56	0.00
hsa-miR-146a-5p	0.57	0.03	0.24	0.03
hsa-miR-8069	—	—	0.59	0.04
hsa-miR-575	—	—	0.60	0.01
hsa-miR-376b-3p	—	—	1.51	0.05
hsa-miR-154-3p	1.52	0.04	—	—
hsa-miR-337-5p	—	—	1.52	0.01
hsa-miR-590-5p	—	—	1.53	0.01
hsa-miR-145-5p	1.55	0.03	1.50	0.05
hsa-miR-130a-3p	—	—	1.55	0.05
hsa-miR-299-3p	—	—	1.56	0.03
hsa-miR-5194	—	—	1.57	0.02
hsa-miR-424-5p	1.58	0.02	1.79	0.02
hsa-miR-6085	1.61	0.05	—	—
hsa-miR-210-3p	—	—	1.61	0.05
hsa-miR-18a-5p	—	—	1.62	0.01
hsa-miR-136-5p	—	—	1.62	0.01
hsa-miR-377-3p	1.68	0.03	1.66	0.04
hsa-miR-19a-3p	1.71	0.04	1.65	0.03
hsa-miR-21-3p	1.77	0.03	—	—
hsa-miR-6826-5p	1.78	0.01	—	—
hsa-miR-5100	1.78	0.02	—	—
hsa-miR-4286	1.78	0.01	—	—
hsa-miR-1260a	1.91	0.04	—	—
hsa-miR-1260b	2.04	0.02	—	—
hsa-miR-7114-5p	2.07	0.04	1.70	0.03
hsa-miR-7977	2.10	0.01	1.59	0.04

LPS 刺激后表达降低 ($P<0.05$), 在 APS 干预后表达升高 ($P<0.05$)。

4 3 组芯片验证结果 (图 2) hsa-miR-146a-5p、hsa-miR-145-5p、hsa-miR-424-5p 表达趋势与芯片结果相符。



注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 LPS 组比较, Δ $P<0.05$

图 2 3 组芯片验证结果

5 差异表达 miRNA 靶基因 显著富集的 GO 与信号通路 APS 调控的 miRNA 分子的靶基因功能明显富集到包括蛋白泛素化调节 (GO: 0016567)、wnt 信号通路 (GO: 0016055)、细胞凋亡 (GO: 0097190)、细胞应激反应的调节 (GO: 0080135) 等多

个 GO 分类中, 以及包括 PI3K-Akt 信号通路 (hsa04151)、调节干细胞多能性的信号通路 (hsa04550)、FoxO 信号通路 (hsa04068)、Hippo 信号通路 (hsa04390) 等信号通路中。其中有 65 个靶基因富集在调节干细胞多能性的信号通路 (hsa04550)。

6 7 个 miRNAs 与靶基因的对应关系 (图 3) 原癌基因 c-myc 是 hsa-miR-377-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-145-5p 的靶基因; 丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1) 是 hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-377-3p 的靶基因; 分化抑制因子 4 (transcription factor inhibitor of differentiation 4, ID4) 及胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R) 是 hsa-miR-145-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-424-5p 的靶基因; 糖原合成酶激酶-3β (glycogen synthase kinase 3 Beta, GSK3B) 是 hsa-miR-145-5p、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-424-5p、hsa-miR-146a-5p 的共同靶基因。

7 过表达 hsa-miR-424 的 EPCs 和对照组 EPCs 血管形成能力比较 (图 4) 对照组光镜下显示为多个散在的孤立细胞, 细胞间未见明显连接或连接很少, 而过表达 miR-424 的 EPCs 间出现连接, 可见少量细胞呈环形结构, 形成管腔。光镜下计数 (3 个随机视野血管数之和) 差异显著。

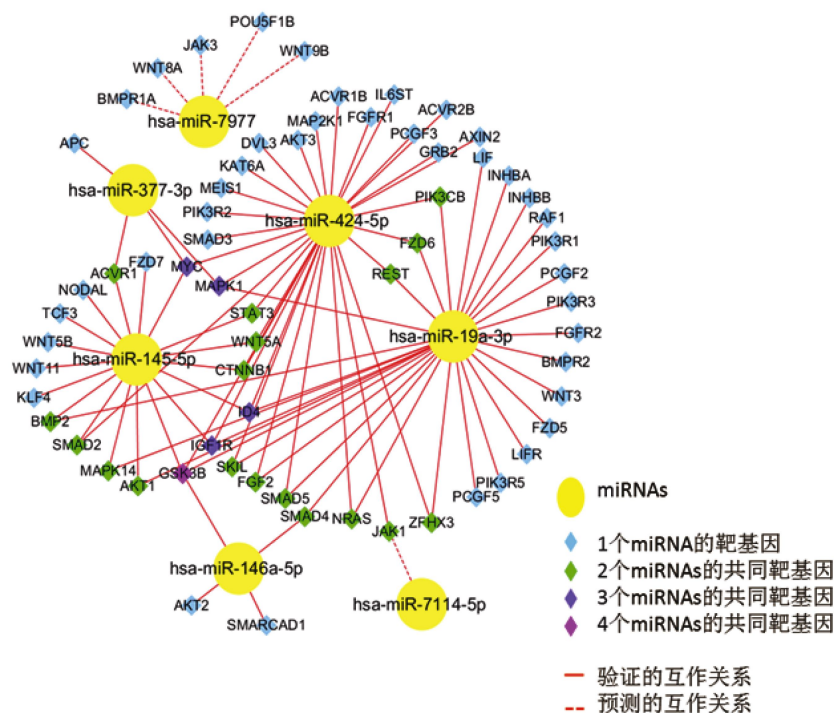
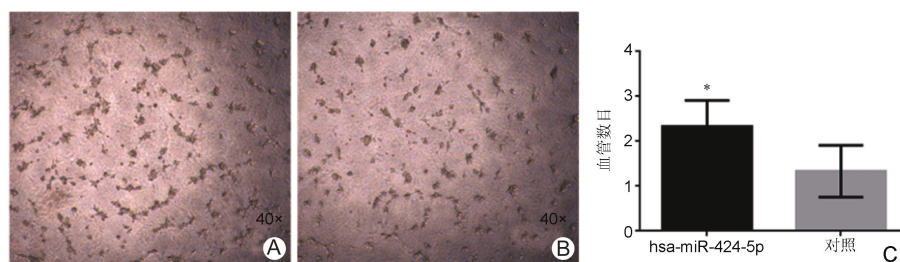


图 3 7 个 miRNAs 与靶基因的对应关系



注:A 为过表达 hsa-miR-424 的 EPCs ($\times 40$); B 为对照组 EPCs ($\times 40$); C 为过表达 hsa-miR-424 的 EPCs 与对照组 EPCs 血管数目比较;与对照组比较, * $P < 0.05$; $n=3$

图 4 血管形成能力比较

讨 论

Asahara T 等^[3]首次研究发现,循环外周血中存在一种能分化为血管内皮细胞的前体细胞,并将其命名为 EPCs。EPCs 对稳定血管内膜、修复受损血管,促进血管新生与缺血区侧支循环的建立,改善缺血区域血供发挥了重要作用。LPS 是革兰阴性菌细胞壁主要成分,可导致血管内皮的炎症反应,进而造成血管内皮细胞损伤,是心脑血管疾病、糖尿病等疾病发生发展的主要病理因素和炎症反应过程的早期事件。外周血循环 EPCs 可作为生物标志物预测心血管疾病的疗效^[11]。血管修复功能的调节不仅和循环中的 EPCs 数量有关,更和 EPCs 的活性相关^[12]。

黄芪是一种传统的补益类中药,主要生物活性物质成分包括多糖、蛋白质、生物碱、氨基酸、黄酮类、苷类、微量元素等。其多糖成分的免疫学活性已经逐渐受到重视,APS 是从黄芪根部提取一种白色粉末状物质,主要由 α -1, 4 (1, 6) 葡聚糖、阿拉伯-半乳糖、鼠李-半乳糖醛酸多糖和阿拉伯-半乳糖蛋白多糖所组成,能够有效调节机体的免疫功能并且抑制肿瘤的生长^[5],其中免疫调节功能尤为突出。在大鼠 H9c2 心肌细胞中,APS 通过下调 miR-127 表达,抑制核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK),减轻 LPS 诱导炎症对细胞的损伤^[13]。APS 通过抑制 TLR-4/NF- κ B 信号通路,保有效抑制柯萨奇 B 组 3 型病毒 (coxsackievirus group B type3, CVB3) 引起的小鼠心肌损伤,并抑制炎症因子 IL-6、TNF- α 、INF- γ 的表达^[14]。APS 还可降低糖尿病大鼠血糖水平,对早期糖尿病大鼠血管内皮细胞具有良好的保护作用^[6]。然而 APS 对内毒素、炎症因子等导致的血管损伤的保护和修复作用机制尚不明确。本研究发现 LPS 刺激后 EPCs 的增殖能力减弱,而加入 APS 对 EPCs 的增殖能力具有一定的保护作用。本研究进一步利用 mi-

croRNA Microarray 对 APS 保护 LPS 造成的 EPCs 功能损伤进行机制研究。

miR-146a 是 LPS/TLR4 信号的关键调控分子之一。多项研究报道,在 LPS 刺激下,细胞内 miR-146a 受到 NF- κ B 转录激活表达升高^[15]。白细胞介素 1 受体相关激酶 1 (IL-1 receptor associated kinase 1, IRAK1) 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 是 miR-146a 的下游靶基因,受到其负调控^[16],进而抑制 NF- κ B 表达,形成负反馈环路。在人 LX2 肝星状细胞中,高表达的 miR-146a-5p 抑制了 LPS 诱导的促炎症因子分泌和细胞增殖,并通过下调 TLR4、IRAK1、TRAF6、NF- κ B 表达,促进细胞凋亡^[16]。然而也有报道,miR-146a 具有促进炎症因子表达的作用,受 LPS 刺激后,小鼠 ATDC5 前软骨细胞的活性降低,大量产生 IL-6、IL-8、TNF- α ,同时 hsa-miR-146a-5p 表达量显著升高;在体外过表达 hsa-miR-146a-5p 后,ATDC5 细胞的活性降低,炎症因子增加,而抑制该 miRNA 细胞则表现出相反的表现^[17]。

miR-145 在多种肿瘤中被报道是抑癌 miRNA 分子。在多种肿瘤细胞中高表达该 miRNA 可以抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡^[18,19]。在结肠癌中,miR-145 通过抑制靶基因核糖体 S6 蛋白激酶 1 (ribosomal protein S6 kinase, 70 kDa, polypeptide 1, p70S6K1) 表达,进而抑制下游基因低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF),抑制血管形成^[20]。在 H_2O_2 诱导下,miR-145 通过抑制其靶基因 Bcl2 相互作用蛋白 3 (Bcl2 interacting protein 3, BNIP3),抑制线粒体凋亡通路从而保护心肌细胞^[21]。

miR-424 表达与血管生成相关。在缺氧环境下,miR-424 受到转录因子嘌呤核苷酸富集区结合蛋白 1 (purine-rich nucleic acid binding protein 1,

PNABP1) 的激活高表达,促进血管内皮细胞的增殖和迁移能力,有助于血管生成。miR-424 靶向结合在泛素连接酶支架蛋白 CUL2(cullin2)的 3' UTR 区域,抑制 CUL2 表达,使 HIF-1 α 不被降解。在内皮细胞中过表达 miR-424 能够增加 HIF-1 α 和 HIF-2 α 在细胞中的含量,促进内皮细胞的增殖和迁移^[22]。Lee A 等^[23]发现,miR-424 受到过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors gamma, PPAR γ) 的转录调控,在炎症因子的刺激下表达 PPAR γ 下降导致 miR-424 表达下降,从而 miR-424 靶基因 B 细胞表面抗原 CD40(B cell surface antigen CD40,CD40) 的表达上升,CD40 受体二聚体在内皮细胞的促血管炎症反应中起到重要作用。

功能聚类 and 信号通路分析进一步揭示了 APS 调控的 miRNA 分子的靶基因可能发挥的分子机制。原癌基因 c-myc、MAPK1、ID4、IGF1R 和 GSK3B 是多个受 APS 调控的 miRNA 分子的共同靶基因。Zhang L 等^[24]发现,APS 通过调节 MAPK/NF- κ B 抑制电离辐射导致的旁观者效应。在糖尿病小鼠模型中,APS 可以抑制 GSK3B 的表达从而提高胰岛素的敏感性,在一定程度上缓解病情^[25]。原癌基因 c-myc 对细胞增殖和转化有促进作用,是重要的血管生成调控因子,在肿瘤血管生成有重要作用^[26]。Florea V 等^[27]发现,敲除原癌基因 c-myc 可以诱导内皮细胞衰老,损害内皮功能和血管内平衡,该现象与转录激活信号通路促炎症反应有关。ID4 是维持干细胞自我更新的关键分子^[28],其通过消除促活化因子无刚毛鳞甲复合体同源物样蛋白 1(achaete-scute homolog-1, ASCL1)从而维持成体海马干细胞的静息状态^[29]。IGF1R 与细胞增殖、发育、分化密切相关,并参与抑制细胞凋亡,促进细胞分裂^[30]。

综上,APS 通过调控 miRNA 修复 LPS 诱导的 EPCs 损伤,本研究结合 miRNA 靶基因的功能对 APS 的调控机制进行了初步探讨,为进一步深入研究 APS 对 LPS、炎症因子等导致的血管损伤的保护和修复作用机制提供了基础。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Grisar JC, Haddad F, Gomari FA, et al. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent[J]. Biomark Med, 2011, 5(6): 731-744.
- [2] Wu W, Wang M, Sun Z, et al. The predictive value of TNF- α and IL-6 and the incidence of macrovascular complications in patients with type 2 diabetes[J]. Acta Diabetol, 2012, 49(1): 3-7.
- [3] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.
- [4] Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use[J]. Circ Res, 2012, 110(4): 624-637.
- [5] 马占好, 张春艳, 刘旭, 等. 黄芪多糖对小鼠体内六种细胞系瘤株抑瘤作用的实验研究[J]. 中医药学报, 1996, 4(1): 55-56.
- [6] 涂淑珍, 吴欧. 黄芪多糖对糖尿病大鼠血管内皮细胞的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2002, (1): 22-23.
- [7] Zahnow CA, Baylin SB. Epigenetic networks and miRNAs in stem cells and cancer[J]. Mol Cell, 2010, 39(5): 661-663.
- [8] Duru N, Gernapudi R, Eades G, et al. Epigenetic regulation of miRNAs and breast cancer stem cells[J]. Curr Pharmacol Rep, 2015, 1(3): 161-169.
- [9] Tao J, Yang Z, Wang JM, et al. Shear stress increases Cu/Zn SOD activity and mRNA expression in human endothelial progenitor cells[J]. J Hum Hypertens, 2007, 21(5): 353-358.
- [10] Chen JK, Deng YP, Jiang GJ, et al. Establishment of tube formation assay of bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19(7): 533-535.
- [11] Shaundee S, McDonald SP, Coates PTH, et al. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 120(7): 263-283.
- [12] Briasoulis A, Tousoulis D, Antoniadis C, et al. The role of endothelial progenitor cells in vascular repair after arterial injury and atherosclerotic plaque development[J]. Cardiovasc Ther, 2011, 29(2): 125-139.
- [13] Ren Q, Zhao S, Ren C, et al. Astragalus Polysaccharides alleviates LPS-induced inflammation injury by regulating miR-127 in H9c2 cardiomyoblasts[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018, 32: 2058738418759180.
- [14] Liu T, Zhang M, Niu H, et al. Astragalus Polysaccharides from astragalus melittin ameliorates inflammation via suppressing the activation of TLR-4/NF- κ B p65 signal pathway and protects mice from CVB3-induced virus myocarditis[J]. Int J Bi-

- ol Macromol, 2019, 126: 179–186.
- [15] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kap-paB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(33): 12481–12486.
- [16] Chen Y, Wu Z, Yuan B, et al. microRNA-146a-5p attenuates irradiation-induced and LPS-induced hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis through inhibition of TLR4 pathway[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 22.
- [17] Jiang R, Hao P, Yu G, et al. Kaempferol protects chondrogenic ATDC5 cells against inflammatory injury triggered by lipopolysaccharide through down-regulating miR-146a[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 69: 373–381.
- [18] Chen X, Gong J, Zeng H, et al. microRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression[J]. Cancer Res, 2010, 70(7): 2728–2738.
- [19] Spizzo R, Lupini L, Rossi S, et al. miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 246–254.
- [20] Xu Q, Liu LZ, Qian X, et al. miR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(2): 761–774.
- [21] Ruotian L, Guijun Y, Qiaoling L, et al. microRNA-145 protects cardiomyocytes against hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced apoptosis through targeting the mitochondria apoptotic pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44907.
- [22] Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis[J]. J Clin Invest, 2010, 120(11): 4141–4154.
- [23] Lee A, Papangeli I, Park Y, et al. A PPARgamma-dependent miR-424/503-CD40 axis regulates inflammation mediated angiogenesis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2528.
- [24] Zhang L, Luo Y, Lu Z, et al. *Astragalus Polysaccharides* inhibits ionizing radiation-induced bystander effects by regulating MAPK/NF-κB signaling pathway in bone mesenchymal stem cells (BMSCs)[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 4649–4658.
- [25] Liu D, Li Y, Wang X, et al. *Astragalus Polysaccharides* combined with cisplatin inhibits growth of recurrent tumor and down-regulates the expression of CD44, CD62P and osteopontin in tumor tissues in mice bearing Lewis lung cancer[J]. Chin J Cell Molec Immunol, 2018, 34(12): 1105–1110.
- [26] Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, et al. c-myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression[J]. Genes Dev, 2002, 16(19): 2530–2543.
- [27] Florea V, Bhagavatula N, Simovic G, et al. c-myc is essential to prevent endothelial pro-inflammatory senescent phenotype[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73146.
- [28] Junankar S, Baker LA, Roden DL, et al. ID4 controls mammary stem cells and marks breast cancers with a stem cell-like phenotype[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6548.
- [29] Blomfield I, Rocamonde B, Masdeu M, et al. ID4 eliminates the pro-activation factor ASCL1 to maintain quiescence of adult hippocampal stem cells[EB/OL]. <https://ssrn.com/abstract=3219271> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3219271>.
- [30] Romano G. The complex biology of the receptor for the insulin-like growth factor-1[J]. Drug News Perspect, 2003, 16(8): 525–531.

(收稿: 2019-03-07 在线: 2019-10-18)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶