

牛磺酸通过调控 miR-126 对高糖诱导的大鼠内皮细胞凋亡的影响及其作用机制*

谢雯雯, 何志凌**, 招煦杰, 罗 锐

(广州中医药大学第二临床医学院 广州 510000)

摘 要:目的 探讨牛磺酸通过调控 miR-126 对高糖诱导的大鼠内皮细胞凋亡的影响及其作用机制。方法 体外培养的大鼠胸主动脉内皮细胞,分为 NC 组(葡萄糖浓度 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、HG 组(葡萄糖浓度为 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、HG+低浓度牛磺酸组(葡萄糖浓度为 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,牛磺酸浓度为 $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、HG+中浓度牛磺酸组(葡萄糖浓度为 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,牛磺酸浓度为 $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 HG+高浓度牛磺酸组(葡萄糖浓度为 $30.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,牛磺酸浓度为 $20.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。将模拟物(miR-126 mimics)及其阴性对照(miR-NC)、miR-126 抑制物(anti-miR-126)及其阴性对照(anti-miR-NC)分别转染至大鼠胸主动脉内皮细胞。细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞活力;流式细胞术检测细胞凋亡。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-126 表达水平。蛋白质印迹(Western blot)检测细胞裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Cleaved-caspase3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 前体(Pro-caspase3)蛋白表达。结果 与 NC 组比较,HG 组大鼠胸主动脉内皮细胞活性显著降低($P<0.05$);与 HG 组比较,HG+低浓度牛磺酸组、HG+中浓度牛磺酸组、HG+高浓度牛磺酸组大鼠胸主动脉内皮细胞活性显著升高($P<0.05$)。与 NC 组比较,HG 组大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著上升,Pro-caspase3 蛋白表达显著降低($P<0.05$);与 HG 组比较,HG+低浓度牛磺酸组、HG+中浓度牛磺酸组、HG+高浓度牛磺酸组大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著降低,Pro-caspase3 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与 NC 组比较,HG 组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著降低($P<0.05$);与 HG 组比较,HG+低浓度牛磺酸组、HG+中浓度牛磺酸组、HG+高浓度牛磺酸组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著升高($P<0.05$)。与 HG+miR-NC 组比较,HG+miR-126 组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著升高,细胞活性、Pro-caspase3 蛋白表达显著升高($P<0.05$);凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。与 HG+牛磺酸组和 HG+牛磺酸+anti-miR-NC 组比较,HG+牛磺酸+anti-miR-126 组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著降低,细胞活性、Pro-caspase3 蛋白表达显著降低,凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。结论 牛磺酸通过上调 miR-126 促进高糖诱导的大鼠内皮细胞凋亡,为治疗糖尿病提供了理论依据。

关键词:牛磺酸 miR-126 大鼠内皮细胞 细胞凋亡 作用机制

doi: 10.11842/wst.20210105001 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

全球糖尿病发病率不断上升,中国有超过 1.5 亿的糖尿病患者^[1]。糖尿病是由高血糖引起的慢性疾病,临床表现为高血糖,可出现多尿、多饮、多食、消瘦,

即三多一少症状。糖尿病可分为 1 型和 2 型糖尿病,1 型糖尿病主要是由 β 细胞破坏和胰岛素绝对缺乏引起的自身免疫性疾病,2 型糖尿病主要是胰岛素抵抗,伴

收稿日期:2021-01-05

修回日期:2022-03-12

* 广东省中医药局科研项目(20181126):丹参酮 IIA 磺酸钠对急性冠脉综合征患者冠脉微循环影响的临床研究,负责人:招煦杰。

** 通讯作者:何志凌,副主任医师,主要研究方向:中医药防治冠状动脉粥样硬化性心脏病。

随摄入过多糖分而导致胰岛素分泌不足^[2-3]。血管内皮细胞是被覆于血管内膜的一群细胞,代谢活跃且可合成及分泌大量的血管活性物质,对维持血管正常生理功能具有重要作用^[4-5]。糖尿病并发症与血管内皮功能损伤有关。糖尿病是全球性的重大公共卫生问题,严重威胁人类健康,因此,亟待研究糖尿病的致病机理,寻找更有效的治疗策略。牛磺酸又名牛胆酸、牛胆碱、牛胆素,是中药牛黄的活性成分。牛磺酸具有防止心血管病的作用,在循环系统中可抑制血小板凝集,降低血脂,保持人体正常血压和防止动脉硬化;对心肌细胞有保护作用,对降低血液中胆固醇含量有明显作用^[6-8]。牛磺酸可显著降低糖尿病大鼠的血糖水平,减轻胰岛素抵抗,改善功能失调的神经传导^[9]。miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它们在动植物中参与转录后基因表达调控。有研究表明,miRNA 在血管内皮细胞中有一定程度的表达,且对细胞的生长修复起到极其重要的调节作用^[10-11]。miR-126 表达水平降低参与了胰岛素抵抗及 2 型糖尿病的发生和发展^[12]。miR-126 表达降低与妊娠期糖尿病患者的胰岛素抵抗相关^[13]。1 型糖尿病患者血浆中 miR-126 呈低表达,miR-126 参与了 1 型糖尿病患者的炎症反应及脂质代谢异常,且其水平随年龄增长而下降^[14]。过表达 miR-126 可促进高糖诱导的人视网膜内皮细胞 HREC 增殖,并抑制其凋亡^[15]。尽管已有研究发现牛磺酸、miR-126 对糖尿病具有一定缓解作用,但牛磺酸是否可通过调控 miR-126 表达缓解糖尿病细胞损伤还尚未可知。研究表明,急、慢性的高糖状态可抑制血管内皮细胞生长,并诱发内皮细胞的凋亡,从而加重血管内皮损伤^[16-17]。本实验主要探讨牛磺酸通过调控 miR-126 对高糖诱导的大鼠内皮细胞凋亡的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牛磺酸购自 Sigma 公司;大鼠胸主动脉内皮细胞购自美国 ATCC 细胞库;细胞培养 DMEM 培养基购自 HyClone 公司;miR-126 模拟物和抑制物购自北京华大基因公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)购自南京凯基公司;膜联蛋白 V (Annexin-V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒购自美国

Cell signaling technology 公司;Cleaved-caspase3、Pro-caspase3 一抗及二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。逆转录试剂盒、SYBR Green master mix 购自北京宝日医生物技术公司。二氧化碳培养箱购自美国 Thermo 公司;ABI7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;酶标仪购自德国 Eppendorf 公司;BG-sub MIDI 型多用途水平电泳仪购自美国 Baygene 公司。

1.2 细胞培养和实验分组

大鼠胸主动脉内皮细胞在 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素)和细胞培养箱(37℃、5% CO₂)中培养和传代。待细胞贴壁生长至约 80% 融合时,更换培养基对细胞做 12 h 的饥饿处理(培养液中的血清浓度从 10% 降到无血清或 2%,使培养液因缺乏血清中的生长因子而不能使细胞分裂),之后加药干预。细胞分组和处理如下:NC 组(用 5.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖培养基培养)、HG 组(用含 30.0 mmol·L⁻¹ 葡萄糖培养基培养 24 h)、HG+低浓度牛磺酸组、HG+中浓度牛磺酸组和 HG+高浓度牛磺酸组(分别用含 5.0、10.0、20.0 μmol·L⁻¹ 牛磺酸和含 30.0 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的培养基培养 24 h)。miR-NC+HG 组、miR-126+HG 组、anti-miR-NC+HG 组、anti-miR-126+HG 组分别将 miR-NC、miR-126 mimics、anti-miR-NC、anti-miR-126 转染至大鼠胸主动脉内皮细胞(用含 30.0 mmol·L⁻¹ 葡萄糖培养基转染细胞 24 h);牛磺酸+anti-miR-NC+HG 组、牛磺酸+anti-miR-126+HG 组分别将 anti-miR-NC、anti-miR-126 转染大鼠胸主动脉内皮细胞(用含 30.0 mmol·L⁻¹ 葡萄糖和 20.0 μmol·L⁻¹ 牛磺酸培养液转染细胞 24 h)。

1.3 CCK-8 法检测细胞活力

将各组细胞培养 24 h 后,每组取 100 μL 密度为 5×10³/mL 的大鼠胸主动脉内皮细胞,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,二氧化碳培养箱孵育 2 h 后。用酶标仪测定各孔在 450 nm 处吸光度(A)值,各实验组设置 3 个复孔,细胞活性(%)=(A_{对照组}-A_{实验组})/A_{对照组}×100%。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

取各组大鼠胸主动脉内皮细胞加入预冷 PBS 洗涤,4℃条件下经 3000 r·min⁻¹ 离心 6 min,弃上清,收集细胞沉淀,向细胞沉淀中加入 500 μL 结合缓冲液,加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI,室温振荡孵育 10 min,应用 FACS Calibur 流式细胞仪及应用 Cellaquest 软

件检测各组细胞凋亡率。

1.5 RT-qPCR检测miR-126的表达水平

各组细胞培养48 h,提取总RNA,使用逆转录试剂盒降RNA合成cDNA,按照SYBR Green master mix试剂盒说明进行PCR,反应条件为95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s;72℃ 30 s,共40个循环。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。miR-126分别U6为内参,miR-126上游引物:5'-TACTTTTGGTACGCGCTGTG-3',下游引物:5'-GCTAGCTACGATCAGACTACG-3';U6上游引物:5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTA-3',下游引物:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3';引物由上海生工生物工程公司合成。

1.6 Western blot检测Cleaved-caspase3、pro-caspase3蛋白表达

各组大鼠胸主动脉内皮细胞中加入400 μL RIPA裂解液,提取细胞总蛋白,采用BCA法检测蛋白浓度,蛋白变性,采用SDS-PAGE电泳分离蛋白,转膜、封闭2 h,分别孵育一抗稀释液(稀释比1:1000,条件:4℃孵育24 h)与二抗稀释液(稀释比1:2000,条件:室温孵育1 h),滴加ECL,暗室内曝光显影,应用ImageJ软件分析各条带灰度值。

1.7 统计学分析

采用SPSS 22.0进行统计学分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较行 t 检验,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 牛磺酸对HG处理的大鼠胸主动脉内皮细胞活性的影响

由表1可知,与NC组比较,HG组大鼠胸主动脉内皮细胞活性显著降低($P<0.05$);与HG组比较,HG+低浓度牛磺酸组、HG+中浓度牛磺酸组、HG+高浓度牛磺酸组大鼠胸主动脉内皮细胞活性显著升高($P<0.05$)。

2.2 牛磺酸对HG处理的大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡的影响

由表2和图1、2可知,与NC组比较,HG组大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡率、Cleaved-caspase3蛋白表达显著上升,Pro-caspase3蛋白表达显著降低($P<0.05$);与HG组比较,HG+低浓度牛磺酸组、HG+中浓度牛磺酸组、HG+高浓度牛磺酸组大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡

表1 牛磺酸对HG处理的大鼠胸主动脉内皮细胞活性的影响($\bar{x}\pm s$,n=9)

组别	药物浓度	细胞活性	吸光度(A)值
NC		99.88±10.65	0.982±0.08
HG		36.58±3.68*	0.387±0.03*
HG+低浓度牛磺酸组	5.0 μmol·L ⁻¹	68.96±5.58 [#]	0.632±0.06 [#]
HG+中浓度牛磺酸组	10.0 μmol·L ⁻¹	76.98±6.31 [#]	0.766±0.07 [#]
HG+高浓度牛磺酸组	20.0 μmol·L ⁻¹	85.62±8.80 [#]	0.856±0.08 [#]

注:与NC比较,* $P<0.05$;与HG比较,[#] $P<0.05$ 。

表2 牛磺酸对HG处理的大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$,n=9)

组别	药物浓度	凋亡率(%)	Cleaved-caspase3 蛋白	Pro-caspase3 蛋白
NC		7.44±0.69	0.25±0.03	0.89±0.09
HG		35.61±5.80*	0.85±0.08*	0.29±0.02*
HG+低浓度牛磺酸组	5.0 μmol·L ⁻¹	20.37±2.89 [#]	0.66±0.06 [#]	0.41±0.04 [#]
HG+中浓度牛磺酸组	10.0 μmol·L ⁻¹	13.85±1.94 [#]	0.51±0.05 [#]	0.53±0.05 [#]
HG+高浓度牛磺酸组	20.0 μmol·L ⁻¹	10.69±1.07 [#]	0.43±0.04 [#]	0.67±0.07 [#]

注:与NC比较,* $P<0.05$;与HG比较,[#] $P<0.05$ 。

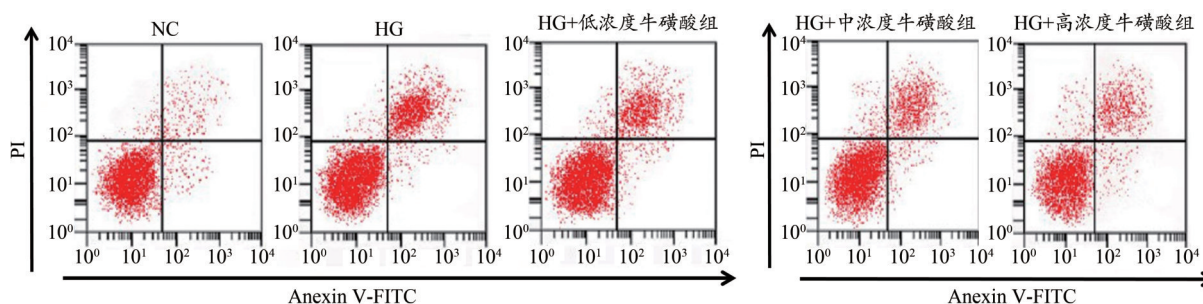


图1 牛磺酸对HG处理的大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡的影响凋亡图

率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著降低,Pro-caspase3 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。

2.3 牛磺酸对 miR-126 表达的影响

由表 3 可知,与 NC 组比较,HG 组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著降低($P<0.05$);与 HG 组比较,HG+低浓度牛磺酸组、HG+中浓度牛磺酸组、HG+高浓度牛磺酸组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著升高($P<0.05$)。

2.4 过表达 miR-126 对 HG 处理的大鼠胸主动脉内皮细胞活性、凋亡的影响

由表 4 和图 3 可知,与 HG +miR-NC 组比较,HG +

miR-126 组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著升高,细胞活性、Pro-caspase3 蛋白表达显著升高($P<0.05$);凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。

2.5 低表达 miR-126 可以逆转牛磺酸对 HG 处理的大鼠胸主动脉内皮细胞活性、凋亡影响

由表 5 和图 4 可知,与 HG+牛磺酸组和 HG+牛磺酸+ anti-miR-NC 组比较,HG+牛磺酸+ anti-miR-126 组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著降低,细胞活性、Pro-caspase3 蛋白表达显著降低,凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。

3 讨论

牛磺酸具有多种生理活性。研究表明,牛磺酸可缓解多种细胞损伤。如牛磺酸可通过调控 Keap1-Nrf2 通路关键基因的表达和抑制氧化应激来减轻棕榈酸诱导的胰岛素抵抗细胞模型损伤^[18]。牛磺酸可通

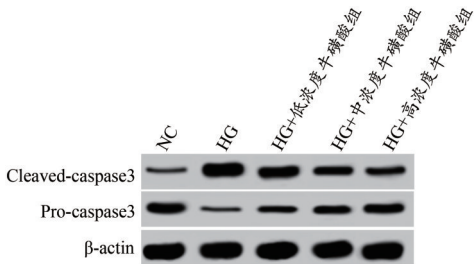


图2 牛磺酸对 HG 处理的大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡的影响蛋白图

表 3 牛磺酸对 miR-126 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	药物浓度	miR-126 表达水平
NC		1.01±0.09
HG		0.36±0.03 [*]
HG+低浓度牛磺酸组	5.0 μmol·L ⁻¹	0.64±0.06 [#]
HG+中浓度牛磺酸组	10.0 μmol·L ⁻¹	0.77±0.07 [#]
HG+高浓度牛磺酸组	20.0 μmol·L ⁻¹	0.86±0.08 [#]

注:与 NC 比较,^{*} $P<0.05$;与 HG 比较,[#] $P<0.05$ 。

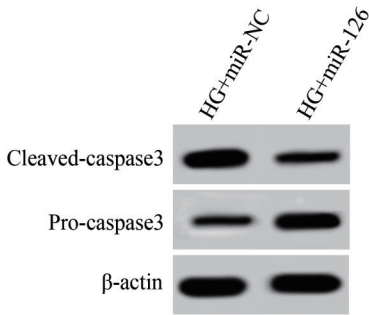


图3 过表达 miR-126 对 HG 处理的大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡相关蛋白表达的影响

表 4 过表达 miR-126 对 HG 处理的大鼠胸主动脉内皮细胞活性、凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	miR-126 表达水平	细胞活性(%)	吸光度(A)值	凋亡率(%)	Cleaved-caspase3 蛋白	Pro-caspase3 蛋白
HG+miR-NC	1.00±0.10	34.61±2.81	0.392±0.03	37.51±4.22	0.91±0.09	0.30±0.03
HG+miR-126	2.29±0.18 [*]	81.07±7.20 [*]	0.841±0.09 [*]	11.39±1.25 [*]	0.45±0.04 [*]	0.88±0.08 [*]
<i>t</i>	98.324	112.084	101.965	85.641	82.014	108.643
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 HG +miR-NC 比较,^{*} $P<0.05$ 。

表 5 低表达 miR-126 可以逆转牛磺酸对 HG 处理的大鼠胸主动脉内皮细胞活性、凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	药物浓度	miR-126 表达水平	细胞活性(%)	吸光度(A)值	凋亡率(%)	Cleaved-caspase3 蛋白	Pro-caspase3 蛋白
HG+牛磺酸	20.0 μmol·L ⁻¹	1.03±0.10	85.21±9.20	0.851±0.08	10.62±0.82	0.42±0.04	0.89±0.09
HG+牛磺酸+anti-miR-NC	20.0 μmol·L ⁻¹	0.99±0.09	84.28±5.55	0.388±0.03	11.29±1.00	0.43±0.03	0.88±0.08
HG+牛磺酸+anti-miR-126	20.0 μmol·L ⁻¹	0.37±0.03 ^{*#}	34.28±2.16 ^{*#}	0.393±0.04 ^{*#}	36.54±3.85 ^{*#}	0.89±0.08 ^{*#}	0.31±0.04 ^{*#}

注:与 HG+牛磺酸比较,^{*} $P<0.05$;与 anti-miR-NC+HG+牛磺酸,[#] $P<0.05$ 。

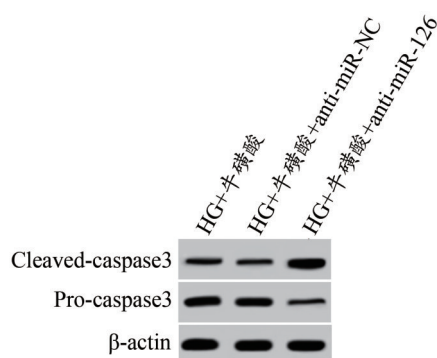


图4 低表达 miR-126 可以逆转牛磺酸对 HG 处理的大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡相关蛋白表达的影响

过抑制内质网应激活化显著改善胡萝卜素诱导的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 损伤^[19]。牛磺酸预处理可显著降低脂多糖引起的奶牛肝脏原代细胞 BHEC 炎症反应^[20]。牛磺酸处理对百草枯诱导的帕金森小鼠模型损伤具有缓解作用^[21]。牛磺酸可抑制白介素诱导的大鼠椎间盘退变模型髓核细胞的凋亡、炎症和氧化应激^[22]。糖尿病的病理机制非常复杂,受高血压、非酶糖化、血脂异常、肾血流动力学改变、氧化应激和细胞因子等多种因素影响^[23]。糖尿病发病时糖脂代谢紊乱,血管紧张素 II 释放增加,均可刺激活性氧产生而损伤血管内膜,引起内皮细胞凋亡,进而促进血管病变的发生^[24-25]。牛磺酸不仅参与维持机体内环境的稳态,而且对多种组织细胞有明显的保护作用。研究显示,牛磺酸能预防高糖诱导的内皮细胞凋亡,其抗凋亡效应与降低细胞内活性氧簇和稳定细胞内钙水平相关^[26]。miRNAs 广泛参与了机体多种生理病理过程的调控,miRNAs 已成为生命科学研究领域的热点^[27-28]。

细胞凋亡是程序性细胞死亡,是为维持内环境稳定由基因控制的细胞自主死亡。Caspase 蛋白家族广泛存在于细胞质中,参与调控细胞凋亡过程,Caspase 3 的激活标志着细胞凋亡进入不可逆阶段^[29]。本实验研究发现,高糖诱导的大鼠胸主动脉内皮细胞活性显著降低;但牛磺酸显著升高高糖诱导组大鼠胸主动脉内皮细胞活性。高糖诱导的大鼠胸主动脉内皮细胞

凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著上升,Pro-caspase3 蛋白表达显著降低;但牛磺酸显著降低糖诱导的大鼠胸主动脉内皮细胞凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达,显著升高 Pro-caspase3 蛋白表达。说明,牛磺酸提高高糖诱导的大鼠内皮细胞活性,并促进凋亡。有类似的研究表明,牛磺酸能抑制内皮细胞氧化应激,减少细胞凋亡,对防治糖尿病并发血管疾病具有重要临床意义^[30]。梁栋等^[31]研究表明,牛磺酸通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡。

本研究发现,高糖诱导的大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著降低;但牛磺酸显著升高大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达。说明,牛磺酸提升了高糖诱导的大鼠内皮细胞 miR-126 表达。有类似研究发现,miR-96-5p 在高糖诱导的脉络膜视网膜内皮细胞应激中表达显著下调^[32]。miR-126 可通过 NF-κB 信号通路减轻脓毒症大鼠脑损伤^[33]。miR-126 通过促进归巢和维持晚期生长内皮祖细胞的干性来缓解血管损伤^[34]。外泌体来源的 miR-126 可降低急性心肌梗塞缺血/再灌注损伤引起的氧化应激和凋亡^[35]。miR-126-3p 在小鼠纤维化肾脏和心脏组织中下调,miR-126-3p 过表达可抑制内皮细胞向间充质细胞转化^[36]。

本实验研究显示,HG+miR-126 组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著升高,细胞活性、Pro-caspase3 蛋白表达显著升高;凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著降低。HG+牛磺酸+anti-miR-126 组大鼠胸主动脉内皮细胞中 miR-126 表达显著降低,细胞活性、Pro-caspase3 蛋白表达显著降低,凋亡率、Cleaved-caspase3 蛋白表达显著升高。说明,牛磺酸通过上调 miR-126 表达促进高糖诱导的大鼠内皮细胞凋亡。

综上所述,牛磺酸通过上调 miR-126 抑制了高糖诱导的大鼠内皮细胞凋亡,为治疗糖尿病提供了理论依据。本论文的创新点主要在中药通过调控非编码 RNA 的表达来促进细胞凋亡,抑制增殖。

参考文献

- 1 Ma Y, Dong C, Chen X, et al. Silencing of miR-20b-5p Exerts Inhibitory Effect on Diabetic Retinopathy via Inactivation of THBS1 Gene Induced VEGF/Akt/PI3K Pathway. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14:1183-1193.
- 2 Ammon H P T. Boswellic extracts and 11-keto-ss-boswellic acids prevent type 1 and type 2 diabetes mellitus by suppressing the

- expression of proinflammatory cytokines. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153002.
- 3 Alyafei F, Soliman A, Falkhalafet *al.* Prevalence of β -cell antibodies and associated autoimmune diseases in children and adolescents with type 1 diabetes (T1DM) versus type 2 diabetes (T2DM) in Qatar. *Acta Biomed*, 2018, 89(S5):32-39.
 - 4 Silva C, Rodrigues I, Andrade S, *et al.* Metformin reduces vascular assembly in high glucose-treated human microvascular endothelial cells in an AMPK-independent manner. *Cell J*, 2021, 23(2):174-183.
 - 5 Yu T, Jing M, Gao Y, *et al.* Study on the relationship between hyperthyroidism and vascular endothelial cell damage. *Sci Rep*, 2020, 10(1):6992.
 - 6 吴晓. 牛磺酸对宫内生长受限大鼠肠道发育的作用研究. 沈阳: 沈阳农业大学硕士研究生学位论文, 2020.
 - 7 彭燕. 牛磺酸对LPS诱导小鼠急性肺损伤的治疗效果. 医学信息, 2020, 33(3):79-81.
 - 8 袁静, 闫晨静, 周茜, 等. 牛磺酸对抑郁症模型小鼠的预防性干预作用. 食品科学, 2020, 41(3):138-143.
 - 9 Zhang M, Shi X, Luo M, *et al.* Taurine ameliorates axonal damage in sciatic nerve of diabetic rats and high glucose exposed DRG neuron by PI3K/Akt/mTOR-dependent pathway. *Amino Acids*, 2021, 53(3): 395-406.
 - 10 Fu S, Liu J, Xu J, *et al.* The effect of baicalin on microRNA expression profiles in porcine aortic vascular endothelial cells infected by *Haemophilus parasuis*. *Mol Cell Biochem*, 2020, 472(1-2):45-56.
 - 11 Qin X, Guo J. MicroRNA-328-3p protects vascular endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein induced injury via targeting forkhead box protein O4 (FOXO4) in atherosclerosis. *Med Sci Monit*, 2020, 26:e921877.
 - 12 张跃栋, 高成全, 赵睿, 等. 新诊断2型糖尿病患者血清miR-126、VEGF水平与胰岛素抵抗的相关性分析. 国际检验医学杂志, 2020, 41(8):935-938.
 - 13 施凤涟, 司焕焕, 黄杰. 妊娠期糖尿病患者血清miR-126表达与胰岛素抵抗的关系. 中国糖尿病杂志, 2020, 28(6):423-427.
 - 14 黄婷, 任彦红, 邢玉荣, 等. 血浆miR-126在1型糖尿病患者中的变化及其临床意义. 中国糖尿病杂志, 2015, 23(10):899-902.
 - 15 Chen X, Yu X, Li X, *et al.* MiR-126 targets IL-17A to enhance proliferation and inhibit apoptosis in high-glucose-induced human retinal endothelial cells. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(2):277-283.
 - 16 Xu E, Hu X, Li X, *et al.* Analysis of long non-coding RNA expression profiles in high-glucose treated vascular endothelial cells. *BMC Endocr Disord*, 2020, 20(1):107.
 - 17 Zhou M, Li G, Zhu L, *et al.* Arctiin attenuates high glucose-induced human retinal capillary endothelial cell proliferation by regulating ROCK1/PTEN/PI3K/Akt/VEGF pathway in vitro. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(10):5695-5706.
 - 18 曹志龙, 李德龙, 陈冰婷, 等. 牛磺酸对胰岛素抵抗HepG2细胞氧化应激的保护作用及机制研究. 现代医药卫生, 2021, 37(13):2157-2160, 2165.
 - 19 王晶, 宋云飞. 牛磺酸对毒胡萝卜素致人神经母细胞瘤细胞凋亡的保护作用研究. 中医药导报, 2021, 27(5):54-57, 77.
 - 20 张宏竹, 汪艳, 常广军, 等. 牛磺酸对脂多糖引起的奶牛肝脏原代细胞炎症的保护作用. 畜牧与兽医, 2021, 53(6):128-134.
 - 21 田甜, 张冰洋, 王楷栋, 等. 牛磺酸对百草枯诱导的帕金森病样小鼠神经元及小胶质细胞的保护作用. 中华劳动卫生职业病杂志, 2020, 38(11):801-808.
 - 22 史锐, 朱振军, 杨永波. 牛磺酸调节白介素水平对椎间盘退变大鼠模型髓核细胞凋亡、炎症和氧化应激的保护作用. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9):1097-1102.
 - 23 Vikram A, Tripathi D N, Kumar A, *et al.* Oxidative stress and inflammation in diabetic complications. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014: 679754.
 - 24 Jiang T, Gu J, Chen W, *et al.* Resveratrol inhibits high-glucose-induced inflammatory "metabolic memory" in human retinal vascular endothelial cells through SIRT1-dependent signaling. *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, 97(12):1141-1151.
 - 25 Ding X, Yao W, Zhu J, *et al.* Resveratrol attenuates high glucose-induced vascular endothelial cell injury by activating the E2F3 pathway. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:6173618.
 - 26 孟鹭. 牛磺酸对高脂高糖所致INS-1细胞系内质网应激作用研究. 沈阳: 沈阳农业大学硕士研究生学位论文, 2020.
 - 27 Khor E S, Wong P F. The roles of MTOR and miRNAs in endothelial cell senescence. *Biogerontology*, 2020, 21(5):517-530.
 - 28 Lazzara F, Trotta M C, Platania C B M, *et al.* Stabilization of HIF-1 α in human retinal endothelial cells modulates expression of miRNAs and proangiogenic growth factors. *Front Pharmacol*, 2020, 11:1063.
 - 29 梁辰, 戴静, 周福祥, 等. 苦参碱促进胃癌细胞凋亡及对STAT3、Cleaved-caspase3、MMP-2蛋白表达的影响. 肿瘤药学, 2017, 7(1): 28-32.
 - 30 陈海英, 杨文, 张艳. 牛磺酸对高糖诱导的大鼠血管内皮细胞氧化应激与凋亡的保护作用. 中国生化药物杂志, 2011, 32(4):309-310.
 - 31 梁栋, 刘云峰, 章毅, 等. 牛磺酸通过激活PI3K/Akt信号通路抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡. 国际内分泌代谢杂志, 2015, 35(35):76.
 - 32 李欢, 路璐. miR-96-5p靶向FOXO4对高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞增殖和凋亡的影响. 国际眼科杂志, 2020, 20(8):1331-1338.
 - 33 Nong A, Li Q, Huang Z, *et al.* MicroRNA miR-126 attenuates brain injury in septic rats via NF- κ B signaling pathway. *Bioengineered*, 2021, 12(1):2639-2648.
 - 34 Pei C Z, Liu B, Li Y T, *et al.* MicroRNA-126 protects against vascular injury by promoting homing and maintaining stemness of late outgrowth endothelial progenitor cells. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):28.
 - 35 Wang W, Zheng Y, Wang M, *et al.* Exosomes derived miR-126 attenuates oxidative stress and apoptosis from ischemia and reperfusion injury by targeting ERRF1. *Gene*, 2019, 690:75-80.
 - 36 Jordan N P, Tingle S J, Shuttleworth V G, *et al.* MiR-126-3p is dynamically regulated in endothelial-to-mesenchymal transition during fibrosis. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16):8629.

Taurine Regulates the Effect of miR-126 on Rat Endothelial Cell Apoptosis Induced by High Glucose and Its Mechanism

Xie Wenwen, He Zhiling, Zhao Xujie, Luo Rui

(Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of taurine on rat endothelial cell apoptosis induced by high glucose and its mechanism by regulating miR-126. **Methods** Rat thoracic aortic endothelial cells cultured *in vitro* were divided into NC group (glucose concentration of 5.5 mmol·L⁻¹), HG group (glucose concentration of 30.0 mmol·L⁻¹), HG + low concentration taurine group (glucose concentration of 30.0 mmol·L⁻¹, taurine concentration is 5.0 μmol·L⁻¹), HG + medium concentration taurine group (glucose concentration 30.0 mmol·L⁻¹, taurine concentration 10.0 μmol·L⁻¹) and HG + high concentration taurine group (glucose concentration 30.0 mmol·L⁻¹, taurine concentration 20.0 μmol·L⁻¹). The mimics (miR-126 mimics) and its negative control (miR-NC), miR-126 inhibitor (anti-miR-126) and its negative control (anti-miR-NC) were transfected into the rat chest arterial endothelial cells. Cell counting kit (CCK-8) detected cell viability; flow cytometry detected cell apoptosis. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression level of miR-126. Western blot was used to detect the expression of Cleaved-caspase3 and Pro-caspase3 protein of cell lysis. **Results** Compared with the NC group, the rat thoracic aortic endothelial cell activity in the HG group was significantly reduced ($P<0.05$); compared with the HG group, the HG + low concentration taurine group, HG + medium concentration taurine group, HG + high concentration cattle, the endothelial cell activity of the thoracic aorta in the sulfonic acid group increased significantly ($P<0.05$). Compared with the NC group, the apoptosis rate of thoracic aortic endothelial cells and the expression of Cleaved-caspase3 protein in the HG group increased significantly, and the expression of Pro-caspase3 protein decreased significantly ($P<0.05$); compared with the HG group, the apoptosis rate and Cleaved-caspase3 protein expression of rat thoracic aortic endothelial cells in the HG + low concentration taurine, HG + medium concentration taurine group and HG + high concentration taurine group were significantly decreased, and the expression of Pro-caspase3 protein was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the NC group, the expression of miR-126 in the endothelial cells of the thoracic aorta of the HG group was significantly reduced ($P<0.05$); compared with the HG group, the HG + low concentration taurine group, HG + medium concentration taurine group, HG + high concentration taurine group, the expression of miR-126 in the endothelial cells of the thoracic aorta of rats in the taurine group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the HG + miR-NC group, the expression of miR-126 in the endothelial cells of the thoracic aorta of rats in the HG+miR-126 group was significantly increased, and the cell viability and Pro-caspase3 protein expression were significantly increased ($P<0.05$); The rate and Cleaved-caspase3 protein expression were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the HG + taurine group and the HG + taurine + anti-miR-NC group, the expression of miR-126 in rat thoracic aortic endothelial cells in the HG + taurine + anti-miR-126 group was significantly reduced, and the cell activity, Pro -caspase3 protein expression was significantly reduced, and apoptosis rate and Cleaved-caspase3 protein expression were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Taurine promotes rat endothelial cell apoptosis induced by high glucose by up-regulating miR-126, which provides a theoretical basis for the treatment of diabetes.

Keywords: Taurine, miR-126, Rat endothelial cells, Apoptosis, Mechanism of action

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)