



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for induction culture, respectively; the HUVECs in each group were cultured for 3 h, and cell viability was detected by methyl thiazolyltetrazolium (MTT) assay. Inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group were also set up. After transfected with miR-543 inhibitor, HUVECs in inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group were induced by 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 h. HUVECs in inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group were transfected with inhibitor-NC and then induced by 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 h. HUVECs in the control group, 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group were taken, and the cell viability was detected by MTT assay, miR-543 level was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction, and the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), the levels of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were detected by microplate reader method, the relative expression levels of interleukin (IL)-1β, intercellular adhesion molecule (ICAM1), vascular cell adhesion molecule (VCAM1), thromboregulatory protein (TM), tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were detected by Western blot. The luciferase activity of HUVECs was detected by luciferase reporter assay. **Results** Compared with the control group, the cell viability of HUVECs in 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group was significantly decreased, the relative expression level of miR-543 was markedly increased, the levels of SOD, GSH-Px, NO and the relative expression levels of TM, TFPI, eNOS protein were significantly decreased, the level of MDA and the relative expression levels of IL-1β, ICAM1 and VCAM1 protein were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, the cell viability of HUVECs in inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group was significantly increased, the relative expression level of miR-543 was markedly decreased, the activity of SOD and GSH-Px, the levels of NO and the relative expression levels of TM, TFPI, eNOS protein were significantly increased, the level of MDA and the relative expression levels of IL-1β, ICAM1 and VCAM1 protein were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in the cell viability, the relative expression levels of miR-543, the activity of SOD and GSH-Px, the levels of NO and MDA, the relative expression levels of TM, TFPI, eNOS, IL-1β, ICAM1 and VCAM1 protein in HUVECs between the 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group ( $P > 0.05$ ). the luciferase activity in the miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR group was significantly lower than that in the miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR mut group ( $P < 0.05$ ); the luciferase activity in the miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR group was significantly lower than that in the miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR mut group ( $P < 0.05$ ). The expression level of miR-543 in the miR-543 mimic group was significantly higher than that in the control group and mimic-NC group ( $P < 0.05$ ); the relative expression levels of TFPI and eNOS in the miR-543 mimic group were significantly lower than those in the control group and mimic-NC group ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference in the expression level of miR-543, TFPI and eNOS between the control group and mimic-NC group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Inhibition of miR-543 expression could be resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HUVECs injury, increase cell viability, inhibit oxidative stress and inflammatory factor levels, and elevate antithrombotic ability.

**Key words:** microRNA-543; endothelial cell injury; oxidative stress; inflammatory factors; thrombosis-related factors

异常的氧化应激导致的血管内皮细胞形态与功能受损是促进血管内血栓形成的重要原因,可诱发血栓性疾病<sup>[1]</sup>。微RNA(microRNA, miRNA)是一类高度保守的、长约18~25个核苷酸的非编码单链RNA,能够在转录后水平调节靶基因的表达,是一类重要的基因负向调控因子。研究表明,miRNA参与广泛的病理生理过程,在各种各样的疾病中均具有重要的作用<sup>[2-5]</sup>。研究发现,miR-543在肿瘤发生、发展过程中具有重要的促癌作用<sup>[6-9]</sup>,但其在血管内皮氧化损伤中的作用研究报道较少。因此,本研究通过观察miR-543对过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的人静脉内皮细胞(human venous endothelial cells, HUVECs)中氧化应激、炎症反应和血栓形成相关因子的影响,初步探索其潜在的调控机制,旨在为血管内皮氧化损伤的分子机制研究提供新的依据,及临床血栓性疾病的防治提供新的靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、试剂与仪器** HUVECs购自美国典型培养物保藏中心;达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国Gibco公司,miR-543 mimic及其阴性对照mimic-NC、miR-543 inhibitor及其阴性对照inhibitor-NC均购自上海吉玛制药技术有限公司,转染试剂Lipofectamine 2000和RNA提取试剂TRIzol购自美国Invitrogen公司,反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测试剂盒购自日本TaKaRa公司,四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyltetrazolium, MTT)试剂盒购自南京凯基生物有限公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化

氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)和二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量测定试剂购自上海碧云天生物技术研究,抗白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule, VCAM)1、细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)1、血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)、组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial type nitric oxide synthase, eNOS)一抗购自美国 Abcam 公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记兔抗山羊、罗丹明标记兔抗山羊购自北京中衫金桥生物有限公司,抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗、FITC 标记小鼠抗兔二抗、FITC 标记羊抗兔等二抗购自武汉博士德生物工程有限公司,荧光素酶报告基因检测试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司;细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,ABI 7500 实时聚合酶链反应系统购自美国 Applied Biosystems 公司,多功能电泳仪购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司,Odyssey 红外激光成像系统购自美国 LICOR Bio-science 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 HUVECs 的体外培养** 将 HUVECs 置于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 中,置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,当细胞生长至 80% ~ 90% 融合时以 2.5 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶进行消化传代,每 2 ~ 3 d 传代 1 次,选用 4 ~ 8 代对数生长期细胞进行后续实验。

**1.2.2 HUVECs 分组及处理** 取对数生长期 HUVECs 依据不同处理方法分组。(1)对照组:按每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔细胞板中,加入含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM,置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中常规培养,不给予其他任何处理。(2)100、200、300、400 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组:按每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔细胞板中,加入含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 DMEM,使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度分为 100、200、300、400 μmol · L<sup>-1</sup>,然后滴加到相应细胞孔板,置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中诱导培养 3 h。(3)inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组:按每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔细胞板中,将 miR-543 inhibitor 和 inhibitor-NC 通过 Lipofectamine

2000 转染试剂分别转染到 HUVECs 中,细胞转染 24 h 后,再将终浓度为 300 μmol · L<sup>-1</sup> 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 滴加到相应细胞孔板,置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中诱导培养 3 h。(4)mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR 组、mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组及 mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR 组、mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组:通过 microRNA. org (<http://www.microRNA.org/>) 软件预测出 TFPI 和 eNOS 的 3'-UTR 区域均含有 miR-543 的结合位点。通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增出含有 miR-543 结合位点的 TFPI 3'-UTR 序列和 eNOS 3'-UTR 序列,将这 2 段序列分别克隆到 pGL3-basic 载体中,命名为 pGL3-TFPI 3'-UTR 载体和 pGL3-eNOS 3'-UTR 载体。通过基因定点诱变构建出 pGL3-TFPI 3'-UTR mut 载体和 pGL3-eNOS 3'-UTR mut 载体作为阴性对照。取对数生长期 HUVECs 随机分为 mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR 组、mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组,将 miR-543 mimic 或 mimic-NC 与 pGL3-TFPI 3'-UTR 或 pGL3-TFPI 3'-UTR mut 载体,连同 pRL-TK 载体共转染到相应的各组细胞中。取对数生长期 HUVECs 随机分为 mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR 组、mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组,将 miR-543 mimic 或 mimic-NC 与 pGL3-eNOS 3'-UTR 或 pGL3-eNOS 3'-UTR mut 载体,连同 pRL-TK 载体共转染到各组细胞中。(5)mimic-NC 组和 miR-543 mimic 组:按每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔细胞板中,24 h 后将 mimic-NC 和 miR-543 mimic 通过 Lipofectamine 2000 转染试剂分别转染到各组 HUVECs 中。

**1.2.3 MTT 法检测 HUVECs 活性** 取“1.2.2”对照组及 100、200、300、400 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 HUVECs,每孔加入 10 μL MTT 试剂(0.5 g · L<sup>-1</sup>),在培养箱中孵育 4 h 后弃去培养基,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷溶液,震荡溶解 15 min,使用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度值,计算细胞活性,细胞活性 = [1 - (对照组吸光度值 - 实验组吸光度值)/对照组吸光度值] × 100%。另取“1.2.2”中对照组、

300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组、inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组和 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs 采用上述方法检测细胞活性。

**1.2.4 qRT-PCR 检测 HUVECs 中 miR-543 相对表达量** 取“1.2.2”对照组、300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组、inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组和 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs, TRIzol 试剂提取各组细胞 RNA, 根据反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA, 然后用 SYBR Green 进行 qRT-PCR。miR-543 引物序列: 正向引物序列为 5'-CCAGCTACACTGGGCAGCAGCAATTCATGTTT-3', 反向引物序列为 5'-CTCAACTGGTGTCTGTGGA-3'; U6 作为内参, 正向引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCA-3', 反向引物序列为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 40 个循环。实验重复 3 次, 采用 ABI 7500 实时聚合酶链反应系统对 qRT-PCR 产物进行分析,  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 miR-543 的相对表达量, 取均值。

**1.2.5 酶标仪法检测 HUVECs 中 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 和 NO 水平** 取“1.2.2”中对照组、300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组、inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组和 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs, 分别按照 SOD、GSH-Px、MDA、NO 检测试剂盒说明书进行细胞处理, 使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值并计算 SOD 活性, 使用酶标仪测定 340 nm 处吸光度值并计算 GSH-Px 活性, 使用酶标仪测定波长 532 nm 处吸光度值并计算 MDA 水平, 使用酶标仪测定波长 540 nm 处吸光度值并计算 NO 水平, 实验重复 3 次, 取均值。

**1.2.6 Western blot 法检测 HUVECs 中 IL-1 $\beta$ 、ICAM1、VCAM1、TM、TFPI 及 eNOS 蛋白相对表达量** 取“1.2.2”中对照组、300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组、inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组和 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs, 去除培养基, 用磷酸缓冲盐溶液洗涤 1 次, 然后每孔加入 RIPA 裂解液与 PMSF 的混合液 (100 : 1), 裂解细胞 15 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  下 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心, 收集上清液提取总蛋白, 根据试剂盒说明书提取核蛋白, BCA 蛋白试剂盒进行蛋白定量, 然后取 20  $\mu\text{g}$  样品蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用半干转方法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 用 50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别加入抗 IL-1 $\beta$ 、VCAM1、ICAM1、TM、TFPI、eNOS、GAPDH 一抗 (稀释度分别为 1 : 1 000、1 : 500、1 : 500、1 : 500、1 : 500、1 : 500、1 : 1 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, 之后加入 FITC 或罗丹明标记的二抗 (稀释度为 1 : 10 000), 室温孵育 1 h。Tris-HCl-吐温缓冲盐溶液洗涤 3 次后, 使用 Odyssey 红外激光成像系统进行扫描并分析灰度值, 以待测目的蛋白与内参 GAPDH 灰度值比值表示蛋白相对表达量。实验重复 3 次, 取均值。

**1.2.7 双荧光素酶报告基因法检测 HUVECs 中荧光素酶活性** 取“1.2.2”中 mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR 组、mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组及 mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR 组、mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组转染 48 h 后 HUVECs, 采用双荧光素酶报告基因法检测各组 HUVECs 中荧光素酶活性, 严格按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行检测。

**1.2.8 对照组、mimic-NC 组和 miR-543 mimic 组 HUVECs 中 miR-543 及 TFPI、eNOS 蛋白相对表达量检测** 取“1.2.2”中对照组、mimic-NC 组和 miR-543 mimic 组 HUVECs, 采用 qPCR 检测细胞 miR-543 相对表达量, 方法同“1.2.4”; 采用 Western blot 检测细胞 TFPI、eNOS 蛋白相对表达量, 方法同“1.2.6”。

**1.3 统计学处理** 应用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行数据统计与分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 Bonferroni 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 5 组 HUVECs 细胞活性比较** 对照组及 100、200、300、400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs 细胞活性分别为: (100.00  $\pm$  13.23)%、(91.25  $\pm$  11.64)%、(75.44  $\pm$  8.41)%、(56.15  $\pm$  6.73)%、(31.74  $\pm$  4.36)%, HUVECs 细胞活性呈浓度依赖性降低 ( $P < 0.05$ )。当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 细胞活性约为对照组的 50%, 该浓度用来诱导后续实验中的内皮细胞损伤。对照组、300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组、inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组和 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs 细胞活性分别为 (100.00  $\pm$  14.12)%、(54.63  $\pm$  6.25)%、(80.27  $\pm$  9.11)%、(53.57  $\pm$  6.48)%; 与对照组比较, 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组、inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组和 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs 细胞活性显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs 细胞活性显著高于 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组和 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组与 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs 细胞活性比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 4 组 HUVECs 中 miR-543 相对表达量比较** 对照组、300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  组、inhibitor +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组和 inhibitor-NC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  组 HUVECs 中 miR-543 相对表达量分别为 1.00  $\pm$  0.12、3.54  $\pm$  0.42、

1.38 ± 0.19、3.83 ± 0.45;与对照组比较,300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组 HUVECs 中 miR-543 相对表达量显著增高,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组 HUVECs 中 miR-543 相对表达量显著低于 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组与 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组 HUVECs 中 miR-543 相对表达量比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

**2.3 4组 HUVECs 中 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 和 NO 水平比较** 结果见表 1。与对照组比较,300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组

HUVECs 中 SOD 和 GSH-Px 活性、NO 水平显著降低,MDA 水平显著升高,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组与对照组 HUVECs 中 SOD 和 GSH-Px 活性、MDA、NO 水平比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组 HUVECs 中 SOD 和 GSH-Px 活性、NO 水平显著高于 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组,MDA 水平显著低于 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组与 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组 HUVECs 中 SOD 和 GSH-Px 活性、MDA 和 NO 水平比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

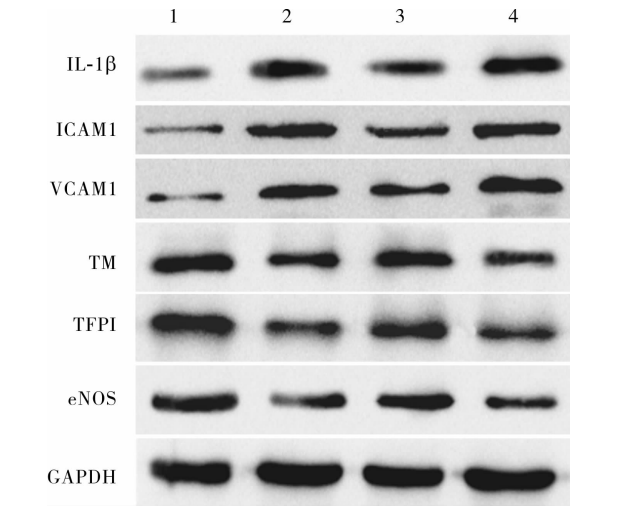
表 1 4组细胞中 SOD 和 GSH-Px 活性、MDA 和 NO 水平比较

Tab.1 Comparison of the activity of SOD and 6SH-Px and the levels of MDA and NO among the four groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	SOD/(U · mg <sup>-1</sup> )	GSH-Px/(U · mg <sup>-1</sup> )	MDA/(pmol · L <sup>-1</sup> )	NO/(pmol · L <sup>-1</sup> )
对照组	3	25.12 ± 3.11	152.46 ± 20.11	2.11 ± 0.28	45.67 ± 5.23
300 μmol · L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	3	16.91 ± 1.98 <sup>a</sup>	79.36 ± 9.23 <sup>a</sup>	4.02 ± 0.50 <sup>a</sup>	24.45 ± 3.11 <sup>a</sup>
inhibitor-NC + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	3	16.85 ± 2.01 <sup>a</sup>	75.68 ± 9.01 <sup>a</sup>	4.21 ± 0.54 <sup>a</sup>	23.96 ± 2.98 <sup>a</sup>
inhibitor + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	3	23.34 ± 2.97 <sup>b</sup>	132.45 ± 16.69 <sup>b</sup>	2.87 ± 0.37 <sup>b</sup>	36.12 ± 4.36 <sup>b</sup>

注:与对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较;与 inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05。

**2.4 4组 HUVECs 中 IL-1β、ICAM1、VCAM1、TM、TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量比较** 结果见表 2 和图 1。300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组 HUVECs 中 IL-1β、ICAM1 和 VCAM1 蛋白相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);TM、TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量显著低于对照组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组 HUVECs 中 IL-1β、ICAM1 和 VCAM1 蛋白相对表达量显著低于 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);TM、TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量显著高于 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组与 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组 HUVECs 中 IL-1β、ICAM1、VCAM1、TM、TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量比较差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。



1: 对照组; 2: 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组; 3: inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组; 4: inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组。

图 1 4组 HUVECs 细胞中 IL-1β、ICAM1、VCAM1、TM、TFPI 和 eNOS 蛋白表达

Fig.1 Expression of IL-1β, ICAM1, VCAM1, TM, TFPI and eNOS protein in HUVECs among the four groups

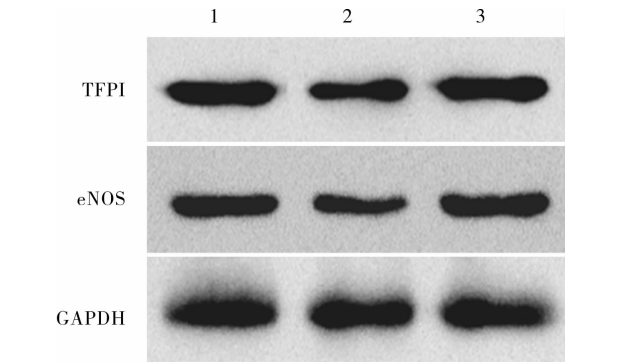
表 2 4组 HUVECs 中 IL-1β、ICAM1、VCAM1、TM、TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量比较

Tab.2 Comparison of the relative expression of IL-1β, ICAM1 and VCAM1 protein of HUVECs among the four groups

组别	<i>n</i>	IL-1β 蛋白相对表达量	ICAM1 蛋白相对表达量	VCAM1 蛋白相对表达量	TM 蛋白相对表达量	TFPI 蛋白相对表达量	eNOS 蛋白相对表达量
对照组	3	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.13
300 μmol · L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	3	3.12 ± 0.38 <sup>a</sup>	2.78 ± 0.32 <sup>a</sup>	3.02 ± 0.38 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.05 <sup>a</sup>
inhibitor-NC + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	3	3.32 ± 0.41 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.35 <sup>a</sup>	3.21 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>a</sup>
inhibitor + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	3	1.87 ± 0.20 <sup>ab</sup>	1.89 ± 0.24 <sup>ab</sup>	2.12 ± 0.30 <sup>ab</sup>	0.82 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.76 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.72 ± 0.09 <sup>ab</sup>

注:与对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和 inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05。

**2.5 3 组 HUVECs 中荧光素酶活性、miR-543 相对表达量及 TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量比较** 结果见图 2 和表 3。mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组、mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR 组荧光素酶活性分别为  $1.00 \pm 0.11$ 、 $0.96 \pm 0.11$ 、 $0.98 \pm 0.11$ 、 $0.58 \pm 0.07$ ；mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组、mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组荧光素酶活性比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )；miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR 组荧光素酶活性显著低于 mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组、mimic-NC + pGL3-TFPI 3'-UTR 组和 miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组、mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR 组荧光素酶活性分别为  $1.00 \pm 0.11$ 、 $0.97 \pm 0.12$ 、 $0.98 \pm 0.13$ 、 $0.51 \pm 0.07$ ；mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组、mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR 组、miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组荧光素酶活性比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )；miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR 组荧光素酶活性显著低于 mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组、mimic-NC + pGL3-eNOS 3'-UTR 组和 miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。miR-543 mimic 组 miR-543 相对表达量显著高于对照组和 mimic-NC 组，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；对照组与 mimic-NC 组 miR-543 表达水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。miR-543 mimic 组 TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量显著低于对照组和 mimic-NC 组，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；对照组与 mimic-NC 组 TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



1:对照组;2:miR-543 mimic 组;3:mimic-NC 组。  
**图 2 对照组、miR-543 mimic 组、mimic-NC 组 HUVECs 中 TFPI 和 eNOS 蛋白表达**  
**Fig.2 Expression of TFPI and eNOS protein of HUVECs in the control group,miR-543 mimic group and mimic-NC group**

**表 3 对照组、miR-543 mimic 组、mimic-NC 组 HUVECs 中 miR-543 及 TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量比较**  
**Tab.3 Comparison of relative expression of miR-543, TFPI and eNOS among the control group,miR-543 mimic group and mimic-NC group**

组别	n	miR-543 相对表达量	TFPI 相对表达量	eNOS 相对表达量
对照组	3	$1.00 \pm 0.12$	$1.00 \pm 0.12$	$1.00 \pm 0.13$
mimic-NC 组	3	$1.10 \pm 0.14$	$0.99 \pm 0.12$	$1.02 \pm 0.13$
miR-543 mimic 组	3	$3.56 \pm 0.44^a$	$0.43 \pm 0.06^a$	$0.37 \pm 0.05^a$

注:与对照组和 mimic-NC 组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

血栓性疾病主要包括急性心肌梗死、脑血栓、动脉血栓和缺血性休克等,因其较高的发病率及致死率成为严重危害人类健康的疾病之一。血管内膜的内皮细胞具有促凝和抗凝 2 种作用。正常情况下,完整的内皮细胞能够抗凝血、抑制血小板黏附,但当内皮细胞损伤或者被激活时,会引起局部凝血,导致血栓形成。因此,内皮细胞结构和功能的完整与否,对血栓发生起着至关重要的作用<sup>[10]</sup>。目前,因 HUVECs 具有与动脉血管内皮相似的生物学特征,从而成为体外实验研究的重要对象。本研究通过体外  $H_2O_2$  诱导 HUVECs,构建体外内皮细胞氧化应激损伤模型,进而探讨 miR-543 在这种细胞损伤中的表达和功能。

本研究结果显示,  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  组、inhibitor +  $H_2O_2$  组和 inhibitor-NC +  $H_2O_2$  组 HUVECs 细胞活性显著低于对照组,miR-543 相对表达量显著高于对照组;inhibitor +  $H_2O_2$  组 HUVECs 细胞活性显著高于  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  组和 inhibitor-NC +  $H_2O_2$  组, miR-543 相对表达量显著低于  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  组和 inhibitor-NC +  $H_2O_2$  组;说明在  $H_2O_2$  诱导的 HUVECs 中,miR-543 表达显著上调,细胞活性显著降低;而抑制 miR-543 表达后,细胞活性显著提高,提示 miR-543 在血管内皮氧化损伤中可能发挥重要的作用。生理情况下,机体不断生成亦不断地清除 ROS,使 ROS 保持稳态。机体内抗氧化酶如 SOD、GSH-Px 是有效增强细胞抗氧化防御系统的物质,MDA 是脂质过氧化产物,其含量高可反映自由基水平及细胞损伤程度,被广泛作为氧化应激的生物标志物<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  组和 inhibitor-NC +  $H_2O_2$  组 HUVECs 中 SOD 和 GSH-Px 活性、NO 水平显著低于对照组,MDA 水平显著高于对照组;inhibitor +  $H_2O_2$  组 HUVECs 中 SOD 和 GSH-Px 活性、NO 水平显著高于  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  组和 inhibitor-NC +  $H_2O_2$  组,MDA 水平显著低于  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  组和 inhibitor-NC +  $H_2O_2$  组;这说明抑制 miR-543 的过表达能够阻碍  $H_2O_2$  引起的 HUVECs 损伤中 SOD 和 GSH-Px 活性下降,降低 MDA 水平,证实抑制

miR-543过表达能够抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的血管内皮氧化损伤。血管内皮的炎症反应是血栓形成过程中的重要一环,内皮细胞在外界环境刺激下,能够诱导多种炎症因子和黏附分子的产生,加速白细胞向内皮细胞的黏附和炎症反应<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,与对照组比较,300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 HUVECs 中 IL-1β、ICAM1 和 VCAM1 相对表达量显著升高;inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 HUVECs 中 IL-1β、ICAM1 和 VCAM1 相对表达量显著低于 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组,说明抑制 miR-543 的过表达能够阻碍 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 HUVECs 中 IL-1β、ICAM1 和 VCAM1 表达水平上调,进而抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的 HUVECs 的炎症反应。以上研究结果表明,抑制 miR-543 过表达能够降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起内皮细胞氧化应激和炎症反应。

在病理过程中,炎症细胞过度释放炎症介质,凝血因子表达增加,自然的抗凝血作用受到抑制,而凝血因子过度活化又促进炎症介质的释放,从而导致难以控制的血栓形成和炎症损伤<sup>[13]</sup>。TM 是广泛分布于血管内皮细胞的一种跨膜糖蛋白,其通过抑制细胞增殖、黏附和炎症反应来维持内皮微环境,同时也可激活蛋白 C 及凝血酶而发挥抗凝作用<sup>[14]</sup>。TFPI 是一种跨膜单链蛋白,高表达于血管内皮细胞膜表面,也可被释放于血浆中,能够阻断外源性凝血途径级联反应<sup>[15]</sup>。NO 为内皮衍生的松弛因子,具有扩张血管和抗血小板聚集作用,可发挥抗凝血、抗氧化、抗炎以及抑制平滑肌细胞增殖等多种作用<sup>[16]</sup>。当血管内皮细胞受氧自由基等损伤时,NO 释放减少,易致血栓形成。本研究结果显示,300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 HUVECs 中 TM、TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量及 NO 水平显著低于对照组;inhibitor + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 HUVECs 中 TM、TFPI 和 eNOS 蛋白相对表达量及 NO 水平显著高于 300 μmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组和 inhibitor-NC + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组,说明抑制 miR-543 的过表达能够阻碍 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 TM、TFPI、eNOS 及 NO 表达水平的降低,提示抑制 miR-543 表达能够通过调控 TM、TFPI、eNOS 和 NO 的表达来阻碍血栓的形成。进一步研究发现,miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR 组荧光素酶活性显著低于 miR-543 mimic + pGL3-TFPI 3'-UTR mut 组,miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR 组荧光素酶活性显著低于 miR-543 mimic + pGL3-eNOS 3'-UTR mut 组;miR-543 mimic 组 miR-543 相对表达量显著高于对照组和 mimic-NC 组,而 miR-543 mimic 组 TFPI 和 eNOS 相对表达量显著低于对照组和 mimic-NC 组,说明 miR-543 能够通过直接靶向 TFPI 和 eNOS 的 3'-UTR 区域来抑

制 TFPI 和 eNOS 的表达。

综上所述,miR-543 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVECs 中表达上调,抑制 miR-543 表达能够降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激和炎症反应,阻碍 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 TM、TFPI、eNOS 和 NO 表达下调,并且 miR-543 能够直接靶向调控 TFPI 和 eNOS 的表达。本研究可能为研究血管内皮氧化损伤的分子机制提供新的依据,miR-543 可作为临床防治血栓形成的新靶点。

**参考文献:**

[1] 陈静宜,叶子芯,崔姝雅,等.一氧化氮生物利用度失调与动脉粥样硬化[J].基础医学与临床,2017,37(2):251-255.

[2] 李勇,徐卫星,徐军,等. MiR-101 表达上调对视网膜母细胞瘤细胞的增殖及侵袭能力的抑制作用 [J]. 眼科新进展,2018,38(6):527-532.

[3] 王志杰,郭晓玲,王天仪,等. 微小 RNA-92b 在儿童急性横贯性脊髓炎发生机制中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(24):1859-1863.

[4] 赵延兵,张玮,苏瑜恒,等. 微小 RNA-30b-3p 在肝脏缺血再灌注损伤小鼠肝组织中的表达及意义 [J]. 新乡医学院学报,2018,35(5):361-367.

[5] 成力,陈文江,姚峰,等. MiRNA-505-3p 在原发性高血压发病机制中的作用[J]. 新乡医学院学报,2018,35(11):965-970.

[6] BI M, WEI C, YU H, et al. MiR-543 is up-regulated in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation and invasion via phosphatase and tensin homolog [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2016,480(3):369-374.

[7] LI J, DONG G, WANG B, et al. Mir-543 promotes gastric cancer cell proliferation by targeting SIRT1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2016,469(1):15-21.

[8] ZHAI F, CAO C, ZHANG L, et al. MiR-543 promotes colorectal cancer proliferation and metastasis by targeting KLF4 [J]. *Oncotarget*,2017,8(35):59246-59256.

[9] 董红玲. miR-543 在宫颈癌中的表达及其对宫颈癌细胞侵袭与转移的影响[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(2):178-182.

[10] 范红晶,李敏,万海同,等. 丹红注射液抗血栓药理作用的研究进展[J]. 中国中医急症,2015,24(12):2160-2164.

[11] 郭先先. 参附注射液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激诱导人脐静脉血管内皮细胞损伤的保护作用[D]. 南昌:南昌大学,2014.

[12] 康桂兰,景增秀. 山奈酚通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路缓解 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(4):525-530.

[13] 陈平,袁耀宗. 血栓调节素-活化蛋白 C-内皮细胞蛋白 C 受体系统抗炎症作用研究进展[J]. 国际内科学杂志,2007,34(6):347-350.

[14] 聂晶,孔英君. 血栓调节蛋白在肺血栓栓塞症、急性呼吸窘迫综合征及肺癌中的作用研究进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(21):133-135. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.21.062.

[15] 侯英健,韩艳梅,史小琴,等. 瑞舒伐他汀对内皮细胞中组织因子途径抑制物表达的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(8):1146-1149.

[16] PALMER R M J, FERRIGE A G, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor[J]. *Nature*,1987,327(6122):524-526.

( 本文编辑:周二强 )