



中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856, CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：循环压力降低 miR-126-3p 甲基化增加内皮细胞外泌体神经保护作用
作者：谭莉明, 李卫, 张邵菡, 邵国, 王小洁, 杨文典
收稿日期：2025-12-18
网络首发日期：2026-06-03
引用格式：谭莉明, 李卫, 张邵菡, 邵国, 王小洁, 杨文典. 循环压力降低 miR-126-3p 甲基化增加内皮细胞外泌体神经保护作用[J/OL]. 中国比较医学杂志.
<https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260603.1328.004>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

循环压力降低 miR-126-3p 甲基化增加内皮细胞外泌体神经保护作用

谭莉明^{1✉}, 李卫^{2,3,4✉}, 张邵菡⁵, 邵国^{2,3,4}, 王小洁^{3,4,6#}, 杨文典^{7#}

(1.吉首大学医学院, 湖南 吉首 523000; 2.内蒙古低氧转化医学重点实验室, 内蒙古 包头 014040; 3.首都医科大学宣武医院北京低氧适应转化医学重点实验室, 北京 100053; 4.深圳市龙岗区第三人民医院转化医学中心, 深圳 512118; 5.天津中医院大学中医系, 天津 301617; 6.深圳市前海蛇口自贸区医院神经内科, 深圳 518067; 7.深圳市龙岗区第二人民医院 ICU, 深圳 512118)

*通信作者 谭莉明 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 神经外科护理。E-mail: 39606605@qq.com; 李卫 (2000—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脑血管病。E-mail: liwei219@163.com; 王小洁 (1975—), 女, 在读博士研究生, 主任医师, 研究方向: 脑血管病。E-mail: xiaojiew0315@126.com; 杨文典 (1978—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 脑血管病。E-mail: yangwendianlgey@163.com

摘要 目的 内皮细胞 (ECs) 可以通过分泌因子提高神经细胞低氧/缺血耐受, 机械力可以影响 ECs 基因表达。本研究探究循环压力对人微血管内皮细胞 (HMEC-1) miR-126-3p 表达的影响, 并阐明 DNA 甲基化对 miR-126-3p 的作用。同时探究循环压力下 HMEC-1 细胞外泌体对神经细胞糖氧剥夺条件下的保护作用。方法 将 HMEC-1 细胞暴露于 5 个周期的循环压力 (100/0 mm Hg) 下。通过 Real-time qPCR 和亚硫酸氢盐修饰 DNA 测序 (BMDS) 检测 miR-126-3p 及其启动子 DNA 甲基化水平。测量 HMEC-1 中的 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 和整体甲基化水平。将人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 与 HMEC-1 来源的外泌体一起孵育, 然后进行低氧-葡萄糖剥夺/再灌注 (OGD/R) 处理。通过 MTS 和流式细胞术检测 SH-SY5Y 细胞活性和凋亡。通过蛋白免疫印迹检测 spectrin 和 caspase-3 水平, 评估细胞损伤。结果 循环压力降低 HMEC-1 细胞中 DNMT 的活力 ($P<0.05$), 降低 miR-126-3p 启动子区 DNA 甲基化并增加其表达 ($P<0.05$)。来自循环压力处理的 HMEC-1 外泌体减少了 OGD/R 下 SH-SY5Y 的损伤 ($P<0.05$)。结论 循环压力处理通过降低 DNA 甲基化的方式诱导 ECs 表达神经保护分子 miR-126-3p, ECs 外泌体中高水平的 miR-126-3p 可能是减少体外缺血/低氧神经细胞损伤的重要因子。

关键词 远隔缺血预处理; 神经保护; miR-126-3p; 内皮细胞; 高血压

Cyclic pressure enhances the neuroprotective effect of endothelial cells-derived exosomes by regulating miR-126-3p promoter methylation

TAN Liming^{1✉}, LI Wei^{2,3,4✉}, ZHANG Shaohan⁵, SHAO Guo^{2,3,4}, WANG Xiaojie^{3,4,6#}, YANG Wendian^{7#}

(1. Medical School of Jishou University, Jishou 523000, China; 2. Inner Mongolia Key Laboratory of Hypoxic Adaptation Translational Medicine, Baotou 014040; 3. Beijing Key Laboratory of Hypoxic Adaptation Translational Medicine, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053; 4. Translational Medicine Center, The Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 512118; 5. Department of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 6. Department of Neurology, Shenzhen Qianhai Shekou Free Trade Zone Hospital, Shenzhen 518067; 7. ICU, the Second People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 512118)

Abstract Objective Endothelial cells (ECs) can enhance neuronal tolerance to hypoxia and ischemia through secreted factors; mechanical forces can influence EC gene expression. This study investigated the effect of cyclic pressure on miR-126-3p expression in human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and elucidated the role of DNA methylation in

收稿日期: 2025-12-18

基金项目: 国家自然科学基金 (82060337); 深圳市科技计划项目基础研究面上项目 (JCYJ20220531092412028, JCYJ20230807121306012); 深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目 (LGKCYLWS2023025); 深圳市南山区科技局 (NSZD2024052)。

网络首发时间: 2026-06-03 15:17:28 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260603.1328.004>

regulating miR-126-3p. The protective effect of exosomes derived from cyclic pressure-treated HMEC-1 on neuronal cells under oxygen-glucose deprivation and reperfusion (OGD/R) conditions was also investigated. Methods HMEC-1 cells were exposed to five cycles of cyclic pressure (100/0 mmHg). Real-time qPCR and bisulfite-modified DNA sequencing (BMDS) were used to detect miR-126-3p expression and its promoter DNA methylation levels, respectively. DNA Methyltransferase (DNMT) activity and global methylation levels were measured in HMEC-1 cells. SH-SY5Y cells were incubated with exosomes derived from HMEC-1 culture medium and subjected to OGD/R. SH-SY5Y cell viability and apoptosis were assessed using MTS assay and flow cytometry, respectively. Cell damage was evaluated by detecting spectrin and caspase-3 levels using Western blot. Results Cyclic pressure reduced DNMT activity ($P<0.05$), decreased miR-126-3p promoter region DNA methylation, and increased expression of miR-126-3p in HMEC-1 cells ($P<0.05$). Cyclic pressure-treated HMEC-1-derived exosomes reduced OGD/R-induced damage in SH-SY5Y cells ($P<0.05$). Conclusions Cyclic pressure treatment induced the expression of the neuroprotective molecule miR-126-3p in ECs by reducing DNA methylation. The high level of miR-126-3p in EC-derived exosomes might be a key factor in reducing *in vitro* ischemia and hypoxia-induced neuronal cell damage.

Key words remote ischemic preconditioning; neuroprotection; miR-126-3p; endothelial cells; high pressure

内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 以单层排列在所有血管壁的内侧, 作为血液和周围间质组织之间的活跃且具有选择性的屏障^[1]。由于其特殊的位置和结构, 血管 ECs 会随时间变化经历不同的生物力学刺激, 包括压力、拉伸和剪切应力^[2]。SHIN 等^[3]研究表明, ECs 能够检测并响应生理水平的循环压力, 从而以压力特异性的方式调节细胞增殖和凋亡。在神经血管单元中, ECs 不仅参与血脑屏障稳态, 还可通过分泌多种生物因子调控神经细胞功能^[4]。除传统可溶性因子外, 细胞外囊泡或外泌体介导的核酸转运被认为是内皮—神经细胞通讯的重要方式之一; 在脑缺血再灌注等应激过程中, 外泌体递送物 (包括 miRNAs) 会发生动态改变, 并参与炎症、血管反应与神经修复等关键环节^[5]。既往的研究指出 ECs 分泌的 miRNA 在神经低氧/缺血耐受中有重要作用^[6]。

miRNA-126-3p 是一种 ECs 特异性 miRNA^[7], 被认为是维持血管完整性以及在脑缺血再灌注后神经保护中的关键 miRNA 之一^[8]。值得注意的是, miR-126-3p 表达与血压相关的病理改变时具有临床相关性: KONTARAKI 等^[9]发现 miR-126-3p 表达与人类原发性高血压之间存在密切关联; LIU 等^[10]研究发现高血压患者的 miR-126-3p 表达增加。从机制层面看, 血流动力学/力学刺激可通过 PIEZO1 等机械敏感通道触发 Ca^{2+} 信号并诱导 KLF2/KLF4 等机械响应转录因子, 从而重塑内皮的抗炎与稳态基因网络^[11]; 同时, 这些机械敏感转录因子也被认为可驱动包括 miR-126-3p 在内的保护性 miRNA 程序^[12]。因此, 循环压力与高血压相关的力学环境变化, 可能通过机械转导—转录调控轴影响 miR-126-3p 的表达与输出。

课题组前期研究显示, 远隔缺血预适应可以增加血清外泌体 miR-126-3p 水平, 该外泌体可以增加神经细胞低氧/缺血耐受^[13]。本研究的目标是探究循环压力刺激对 miR-126-3p 表达的影响及其机制, 同时初步探讨通过循环压力增加 miR-126-3p 的表达来提高低氧/缺血神经保护的策略。

1 材料和方法

1.1 细胞

人微血管内皮细胞 (HMEC-1) 购自中国医学科学院和北京协和医学院 (CRL-3243); 人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 购自苏州海星生物科技有限公司 (TCH-C325)。

1.2 主要试剂与仪器

M199 内皮生长培养基 (11150059)、1640 培养基 (11875119)、胎牛血清 (FBS) (10099141)、EDGS (S0125)、EGF(PHG0311L)、bFGF(13256-029)、肝素(H7482)、氢化可的松 (A16292)、青霉素/链霉素溶液(15140163)均购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 组织和细胞总 RNA 提取试剂盒购自吉玛基因公司(QPG-061); 外泌体分离试剂盒 (赛默飞世尔科技, 4484450); PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 6210A); DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 1 (24206-1-AP)、DNMT3A(20954-1-AP)、DNMT3B(26971-1AP)、Caspase-3(19677-1-AP)、 β -actin 抗体 (20536-1-AP) 均购自武汉三鹰生物技

术有限公司；HSP70 (GB15241-100)、TSG101 (GB113817-100)、CD63 抗体 (GB12620-100) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司；CCK8 试剂盒 (碧云天生物科技有限公司, C0038)；RIPA 裂解液 (碧云天生物科技有限公司, P0013B)；DNA 甲基转移酶活性检测试剂盒 (美国 Epigentek 公司, P-3139)。

Naturethink 细胞压力系统装置 (上海泉众机电科技有限公司)；实时定量 PCR 仪 (ABI 7900, 美国应用生物系统公司)；蛋白电泳印迹系统 (美国 Bio-Rad Laboratories, Inc., Mini protean)；Tanon 4600 全自动化学发光成像分析系统 (上海天能科技有限公司)；透射电子显微镜 (日本 JEOL Ltd., JEM-1400)；流式细胞仪 (美国 Becton, Dickinson and Company, FACSCalibur)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

① HMEC-1 细胞实验分组：正常对照组 (C 组)，细胞在标准条件下培养；循环高血压 (circulating high pressure, CHP) 组，细胞接受循环压力刺激。

② SH-SY5Y 细胞实验分组：对照组 (Control 组)，细胞在完全培养基中培养；氧糖剥夺/再灌注组 (OGD/R 组)；OGD/R+对照外泌体组 (OGD/R+C-Exo 组)，在 OGD/R 处理前与正常 HMEC-1 来源的外泌体共孵育；OGD/R+循环压力外泌体组 (OGD/R+CHP-Exo 组)，在 OGD/R 处理前与 CHP 处理的 HMEC-1 来源的外泌体共孵育。

1.3.2 循环压力处理、外泌体的提取与鉴定

CHP 组 HMEC-1 细胞置于细胞压力系统中，施加重复高血压刺激 (5 个周期，每周期 5 min，压力在 100 mmHg 与 0 mmHg 之间循环)。处理结束后，细胞更换新鲜培养基继续培养 24 h，收集细胞上清液。使用外泌体分离试剂盒提取外泌体，具体操作按说明书进行。外泌体鉴定：取 10 μ L 外泌体悬液滴于铜网，2%磷钨酸负染，透射电镜观察其形态与大小；采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测外泌体标志蛋白 HSP70、TSG101 和 CD63 的表达。

1.3.3 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

使用 TRIzol 法提取 HMEC-1 细胞或 SH-SY5Y 细胞总 RNA，测定其浓度与纯度。使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。以 β -actin 为内参基因，检测 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 的 mRNA 表达水平；以 U6 为内参，检测 miR-126-3p 的表达水平。使用 SYBR Green 法在 ABI 7900 系统上进行 RT-qPCR 反应，反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；95 $^{\circ}$ C 30 s，56 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，共 40 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达水平。

1.3.4 亚硫酸氢盐修饰 DNA 测序 (Bisulfite-modified DNA sequencing, BMDS)

使用基因组 DNA 提取试剂盒提取 HMEC-1 细胞基因组 DNA。使用 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 对 DNA 进行亚硫酸氢盐处理。使用 MethPrimer 在线软件设计针对 miR-126-3p 基因启动子区 CpG 岛的引物。PCR 扩增处理后的 DNA，将产物克隆至 pCR2.1 载体，转化感受态细胞，挑取至少 10 个阳性克隆送上海桑尼生物技术有限公司进行测序分析，计算各 CpG 位点的甲基化比例。

1.3.5 DNMT 活性及整体 DNA 甲基化水平检测

使用核蛋白提取试剂盒从 HMEC-1 细胞中提取核蛋白。采用 DNA 甲基转移酶活性/抑制检测试剂盒 (比色法)，严格按照说明书操作，检测总 DNMT、DNMT1 及 DNMT3B 的酶活性。为评估整体 DNA 甲基化水平，采用联合亚硫酸氢盐限制性内切酶分析法 (combined bisulfite restriction analysis, COBRA) 分析重复序列 Alu 和 LINE-1 的甲基化状态。使用特异性引物对亚硫酸氢盐处理后的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，PCR 产物分别用 MboI (用于 Alu) 和 TaqI (用于 LINE-1) 进行酶切，通过 3% 琼脂糖凝胶电泳分离片段，使用凝胶成像系统分析并计算甲基化水平。

1.3.6 Western blot

使用 RIPA 裂解液 (含 PMSF) 提取 HMEC-1 细胞或 SH-SY5Y 细胞总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后，转印至 PVDF 膜。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h，分别与 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、caspase-3、cleaved caspase-3、spectrin 及其降解产物、 β

-actin 等一抗 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后, 与相应 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光试剂显影, Tanon 4600 成像系统采集图像, 使用 ImageJ 1.54p 软件分析条带灰度值, 以 β -actin 为内参计算目标蛋白的相对表达量。

1.3.7 细胞活力与凋亡检测

将 SH-SY5Y 细胞以适宜密度接种于 96 孔板或 6 孔板, 待细胞贴壁后, 分别与对照外泌体 (C-Exo) 或循环压力外泌体 (CHP-Exo) (约 35 μ g/mL) 共孵育 24 h。随后, 进行氧糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 处理: 更换为无糖、无血清培养基, 置于三气培养箱 (94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂) 中培养 6 h 以模拟缺血; 之后更换为正常完全培养基, 在正常条件下 (74% N₂, 5% CO₂, 21% O₂, 37 °C) 再培养 24 h。

细胞活力检测: 采用 MTS 法。OGD/R 处理后, 向每孔加入 10 μ L MTS 溶液, 37 °C 孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值。

细胞凋亡检测: 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法。OGD/R 处理后, 用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤, 按照凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 重悬细胞后上流式细胞仪检测, ModFit 3.0 软件分析细胞凋亡率。

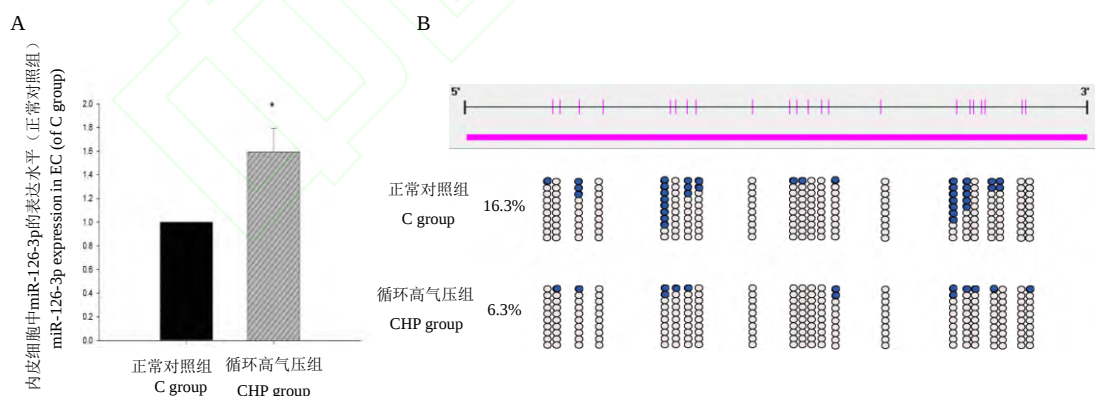
1.4 统计学方法

所有实验均独立重复至少 3 次。数据以平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析。两组间比较采用独立样本 *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 Tukey 检验。P<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 循环压力上调 miR-126-3p 表达并降低其启动子甲基化水平

循环压力处理后, HMEC-1 细胞内 miR-126-3p 相对表达量显著升高至 1.59 ± 0.20 (正常对照组设为 1, P<0.05, 图 1A)。BMDs 显示, 循环高压组 miR-126-3p 启动子区 DNA 甲基化水平为 6.3%, 显著低于正常对照组的 16.3% (P<0.05, 图 1B)。结果表明, 循环压力可能通过降低 miR-126-3p 启动子甲基化水平促进其表达。



注: A: ECs 中 miR-126-3p 的表达水平; B: CpG 岛甲基化水平。对 HMEC-1 细胞中 miR-126-3p CpG 岛甲基化水平进行 BMDs 分析; 每份样本展示 10 个单克隆。每个圆圈代表 1 个单独的 CpG 位点, 实心圆圈表示甲基化的 CpG, 空心圆圈表示未甲基化的 CpG。与正常对照组相比, *P<0.05。

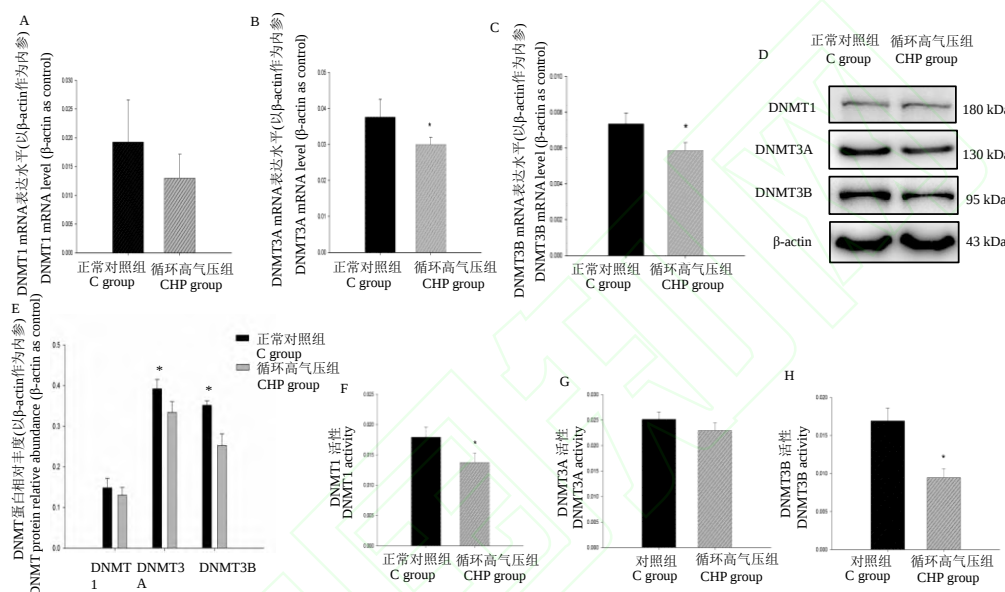
图 1 CHP 对 HMEC-1 细胞中 miR-126-3p 表达水平及 CpG 岛甲基化水平的影响

Note. A, miR-126-3p expression levels in ECs. B, CpG island methylation levels. BMDs was performed to analyze the methylation status of the miR-126-3p CpG island in HMEC-1 cells. Ten independent clones are shown for each sample. The schematic represents the CpG island, with each circle indicating an individual CpG site. Filled circles denote methylated CpG sites, whereas open circles denote unmethylated CpG sites. Compared with the C group, *P<0.05.

Figure 1 Effects of CHP on miR-126-3p expression and CpG island methylation in HMEC-1 cells

2.2 循环压力降低 DNMT3A 和 DNMT3B 表达与活性

RT-qPCR 与 Western blot 结果显示, 循环压力显著降低 HMEC-1 细胞中 DNMT3A 和 DNMT3B 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P<0.05$), 而对 DNMT1 无显著影响 (图 2A~2E)。酶活检测进一步证实, 循环压力组总 DNMT 活性及 DNMT3B 特异性活性均显著下降 ($P<0.05$), DNMT1 活性未见明显变化 (图 2F~2H)。提示循环压力可能通过特异性抑制 DNMT3A 和 DNMT3B 影响 DNA 甲基化。这些变化与课题组已发表的 miR-126-3p/DNMT 调控轴一致, 从而在逻辑上将分子变化与外泌体神经保护效应连为一体。值得注意的是, 课题组前期研究中已通过功能性实验验证 DNMT 下调与 miR-126-3p 上调之间存在明确联系^[13]。在本研究中, 循环压力同时引起 DNMT3A 和 DNMT3B 表达与活性降低以及 miR-126-3p 启动子甲基化水平下降并伴随 miR-126-3p 表达上调, 从结果层面形成一致的分子链证据, 为后续研究提供了上游机制支撑。



注: A~C: 采用 RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平; D: Western blot 检测蛋白表达水平; E: 蛋白表达半定量分析; F~H: DNMT、DNMT1 与 DNMT3B 酶活性。与正常对照组相比, * $P<0.05$ 。

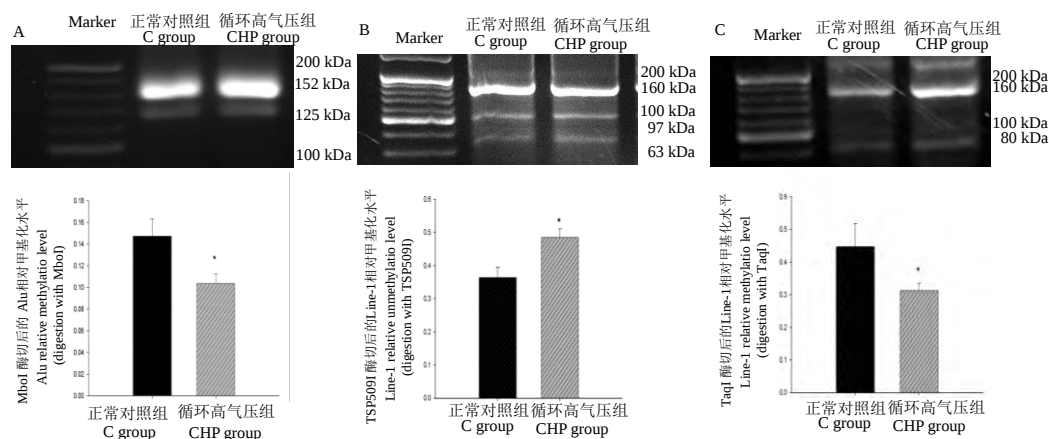
图 2 CHP 对 HMEC-1 细胞中 DNMT 表达与活性的影响

Note. A~C, mRNA expression level was determined by RT-qPCR. D, Protein expression level was detected by Western blot. E, Densitometric semi-quantification analysis. F~H, Enzymatic activities of total DNMT, DNMT1, and DNMT3B. Compared with the C group, * $P<0.05$.

Figure 2 Effects of CHP on DNMT expression and activity in HMEC-1 cells

2.3 循环压力降低整体基因组 DNA 甲基化水平

COBRA 结果显示, 循环压力短重复序列 Alu 甲基化水平显著低于正常对照组 ($P<0.05$, 图 3A)。重复序列 LINE-1 在循环高血压组中非甲基化水平显著上升, 甲基化水平显著下降 ($P<0.05$) (图 3B、3C)。结果表明循环压力可降低 ECsHMEC-1 细胞基因组整体 DNA 甲基化水平。



注: A: Alu DNA 序列+MboI 酶切产物电泳图及甲基化率分析; B: LINE-1 DNA 序列+TSP509I 酶切产物电泳图及甲基化率分析; C: LINE-1 DNA 序列+TaqI 酶切产物电泳图及非甲基化率分析。与正常对照组相比, * $P<0.05$ 。

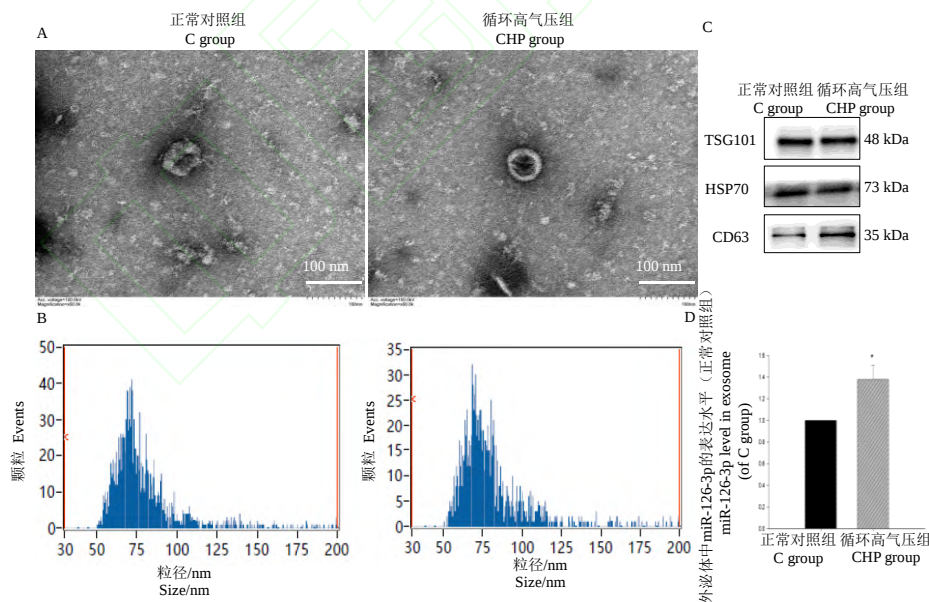
图 3 CHP 对 HMEC-1 细胞整体甲基化的影响

Note. A, Gel electrophoresis of Alu DNA fragments digested with MboI and quantification of methylation levels. B, Gel electrophoresis of LINE-1 DNA fragments digested with TSP509I and quantification of methylation levels. C, Gel electrophoresis of LINE-1 DNA fragments digested with TaqI and quantification of unmethylation levels. Compared with the C group, * $P<0.05$.

Figure 3 Effects of CHP on global DNA methylation in HMEC-1 cells

2.4 循环压力促进 ECs 分泌富含 miR-126-3p 的外泌体

透射电镜显示分离囊泡呈典型外泌体形态, 直径 40~150 nm (图 4A、4B)。Western blot 验证其表达外泌体标志蛋白 CD63、HSP70 和 TSG101 (图 4C)。RT-qPCR 检测显示, 循环高血压组外泌体中 miR-126-3p 含量显著高于对照组 ($P<0.05$, 图 4D), 表明循环压力诱导 ECs 分泌富含 miR-126-3p 的外泌体。



注: A: 外泌体的电子显微镜图像; B: 外泌体粒径分析; C: Western blot 检测外泌体标志蛋白 HSP70、TSG101 和 CD63 的表达; D: 外泌体 miR-126-3p 表达水平检测。与正常对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 4 外泌体特征和外泌体中的 miR-126-3p

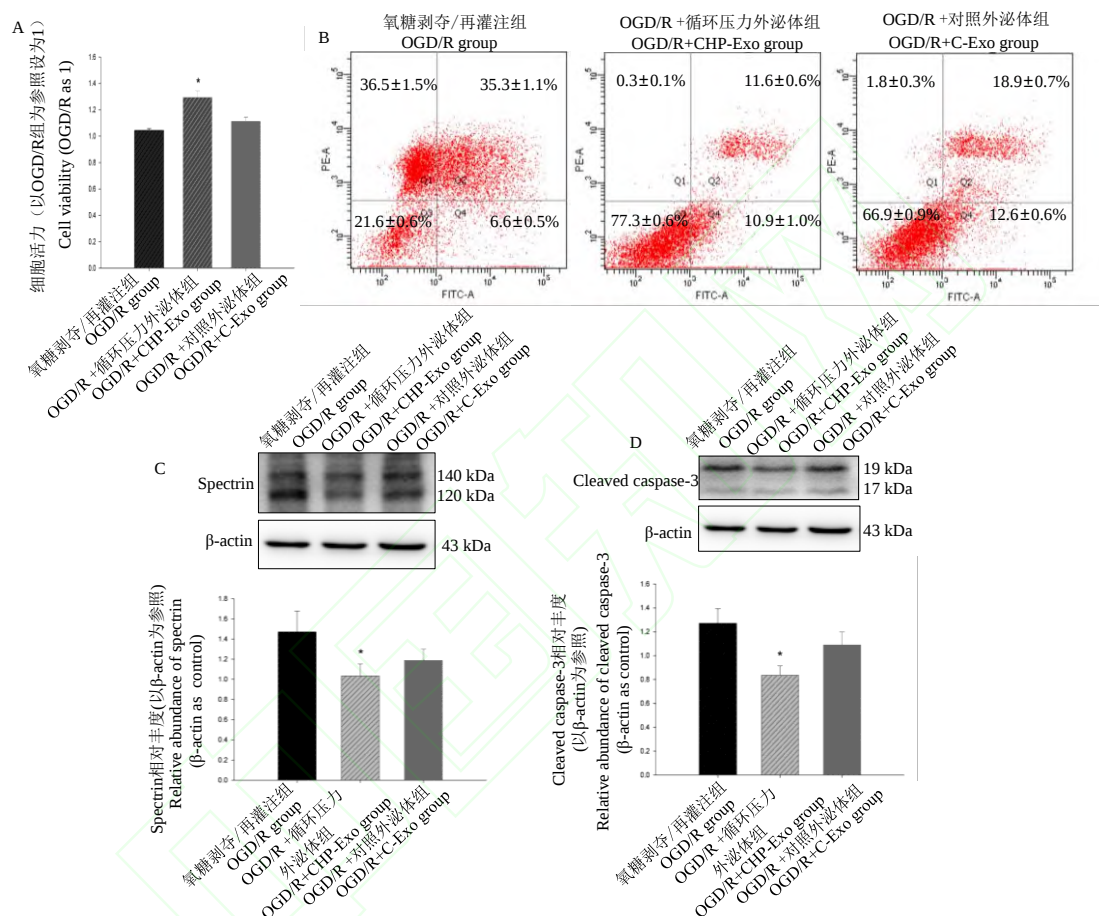
Note. A, Transmission electron microscopy (TEM) images of exosomes. B, Particle size distribution analysis of exosomes. C, Western blot analysis of exosomal marker proteins (HSP70, TSG101, and CD63). D, CHP treatment increased miR-126-3p levels in exosomes derived from the culture medium of HMEC-1 cells. Compared with the C group, * $P<0.05$.

Figure 4 Exosome characterization and miR-126-3p levels in exosomes

2.5 循环压力外泌体增强神经细胞 OGD/R 耐受

MTS 实验显示, 循环压力外泌体能显著提升 OGD/R 条件下 SH-SY5Y 细胞活力 ($P<0.05$, 图 5A)。流式细胞术结果表明, 该外泌体可显著降低 OGD/R 诱导的细胞凋亡率, 且保护作用强于对照组外泌体 ($P<0.05$) (图 5B)。证明循环压力外泌体具有更强的神经保护能力。

Western blot 分析显示, 循环压力外泌体显著抑制 OGD/R 引起的 spectrin 降解片段 (145/150 kDa) 表达 ($P<0.05$, 图 5C), 同时显著降低 cleaved caspase-3 水平 ($P<0.05$, 图 5D)。表明该外泌体可通过抑制细胞坏死性损伤和凋亡通路激活发挥神经保护作用。



注: A: MTS 检测细胞存活率; B: 流式细胞术检测细胞凋亡; C: spectrin 蛋白水解产物 140/120 kDa 水平; D: caspase-3 水平裂解产物 19/17kDa 水平。与对照组和氧糖剥夺/再灌注组相比, * $P<0.05$ 。

图 5 CHP 处理 HMEC-1 细胞培养基外泌体对 SH-SY5Y 神经细胞 OGD/R 的保护作用

Note. A, Cell viability assessed by the MTS assay. B, Apoptosis measured by flow cytometry. C, Levels of spectrin cleavage products (140 and 120 kDa). D, Levels of cleaved caspase-3 products (19 and 17 kDa). Compared with Control group and OGD/R group, * $P<0.05$.

Figure 5 Protective effects of exosomes derived from the conditioned medium of CHP-treated HMEC-1 cells on OGD/R-induced injury in SH-SY5Y neuronal cells

3 讨论

ECs 可能通过分泌多种因子, 发挥保护神经元免受缺血或低氧损伤的作用^[14]。而机械压力可影响 ECs 基因表达变化, miR-126-3p 参与动脉压力诱导的血管壁重构适应性变化^[15]。miR-126-3p 是 ECs 分泌的对神经细胞低氧缺血环境下生死存亡的重要因子之一, 抑制 miR-126-3p 会加重低氧/复氧诱导的细胞死亡并降低细胞活力^[8]。已有研究表明, SH-SY5Y 细胞若与过表达 miR-126-3p 的 HMEC-1 细胞培养基共孵育, 可提高对 OGD/R 的耐受性^[16]。本研究中, 来自循环压力处理 ECs 的培养基中

所提取的外泌体 miR-126-3p 增强了 SH-SY5Y 细胞对 OGD/R 的抵抗力。

miR-126-3p 的启动子区域含有 CpG 岛, 其表达水平可能受 DNA 甲基化状态的调控。有研究表明, 多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 可通过去甲基化 miR-126-3p 启动子区域来上调其表达^[17]。POTUS 等^[18]进一步发现, 在右心室肥厚 (right ventricular hypertrophy, RVH) 模型中, miR-126-3p 启动子区域高度甲基化, 导致其表达水平下降。然而, 也有文献指出, 低氧并不显著影响 miR-126-3p 的表达。在本研究中发现体外五轮高压循环刺激可显著诱导 miR-126-3p 的表达, 并伴随其启动子区域 DNA 甲基化水平的下降。这一结果提示, 机械性刺激作用于 ECs 可通过 DNA 甲基化变化诱导神经保护因子 miR-126-3p 表达。

DNA 甲基化是表观遗传调控的重要机制之一, 其调节依赖于 DNMT 的活性。已有研究表明, DNMT 可调控基因启动子区域的甲基化状态, 进而影响基因表达。具体而言, miR-126-3p 甲基化水平的降低与 DNMT3A 和 DNMT3B 表达的上调有关^[18]。此外, ZHOU 等^[19]通过体内外实验发现, 不同的血流动力学条件可差异性地调节 ECs 中 DNMT1 的表达和 DNA 高甲基化水平。在体外研究中, 振荡性紊乱血流可显著上调 DNMT3A 的蛋白表达, 而对 DNMT1 和 DNMT3B 无明显影响^[20]。基于上述研究推测, 生物力学力 (如血管壁压力) 可能通过调控 DNMT 的表达参与 DNA 甲基化水平的变化。在本研究中, 循环压力刺激可下调 ECs 中 DNMT3A 和 DNMT3B 的表达, 推测这可能是 miR-126-3p 启动子区域甲基化水平降低的潜在机制之一。

ECs 分泌的 miR-126-3p 可能主要通过外泌体进行神经保护。外泌体是通过内体途径产生的 40~160 nm 大小的囊泡, 所有类型细胞均分泌, 通过细胞间通讯在多种生理过程中发挥关键作用^[21]。人羊膜上皮细胞来源的外泌体 (human amniotic epithelial cell-derived exosomes, hAECs-Exos) 通过 FoxM1 依赖机制降低 HT22 在 OGD/R 条件下神经损伤来发挥神经保护作用^[22]。miR-126-3p 可以通过多种方式产生神经保护^[6], WANG 等^[23]报道 miR-126-3p 可调控 PIK3R2 介导的 PI3K/Akt 及 NF- κ B 信号通路产生神经保护。因此, 内皮来源的携带较高水平 miR-126-3p 的外泌体被神经细胞摄入后, 在神经细胞内通过其靶向基因或通路产生神经保护作用。

综上所述, 本研究揭示了循环压力作为一种机械性刺激, 能够通过表观遗传机制调控 ECs 中 miR-126-3p 的表达, 并通过外泌体形式介导其对神经元的保护作用。结果表明, 循环压力不仅降低了 miR-126-3p 启动子区域的 DNA 甲基化水平, 还下调了相关 DNA 甲基转移酶 (DNMT3A 和 DNMT3B) 的表达, 进而增强了 miR-126-3p 的表达和外泌体中 miR-126-3p 的水平, 增加的 miR-126-3p 提高神经细胞对低氧/缺血的耐受。

参考文献

- [1] JAFFE E A. Physiologic functions of normal endothelial cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1985, 454(1): 279-291.
- [2] KATOH K. Effects of mechanical stress on endothelial cells *in situ* and *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16518.
- [3] SHIN H Y, GERRITSEN M E, BIZIOS R. Regulation of endothelial cell proliferation and apoptosis by cyclic pressure [J]. *Ann Biomed Eng*, 2002, 30(3): 297-304.
- [4] MILLER L N, WALTERS A E, DENNINGER J K, et al. Neural stem and progenitor cells support and protect adult hippocampal function *via* vascular endothelial growth factor secretion [J]. *Mol Psychiatry*, 2025, 30(5): 2152-2167.
- [5] ZHOU C, ZHOU F, HE Y, et al. Exosomes in cerebral ischemia-reperfusion injury: current perspectives and future challenges [J]. *Brain Sci*, 2022, 12(12): 1657.
- [6] SHAO Y, ZHANG S, ZHANG P, et al. microRNA-126 as an endogenous molecule for hypoxic/ischemic tolerance in neuroprotection [J]. *Neurol Sci*, 2025, 46(11): 5671-5679.
- [7] EBRAHIMI V, RASTEGAR-MOGHADDAM S H, MOHAMMADIPOUR A. Therapeutic potentials of microRNA-126 in cerebral ischemia [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(4): 2062-2069.
- [8] XIAO Z H, WANG L, GAN P, et al. Dynamic changes in miR-126 expression in the hippocampus and penumbra following experimental transient global and focal cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(5): 1107-1119.
- [9] KONTARAKI J E, MARKETOU M E, ZACHARIS E A, et al. microRNA-9 and microRNA-126 expression levels in patients with essential hypertension: potential markers of target-organ damage [J]. *J Am Soc Hypertens*, 2014, 8(6): 368-375.
- [10] LIU J, LIU J, SHI L, et al. Preliminary study of microRNA-126 as a novel therapeutic target for primary hypertension [J]. *Int J Mol Med*, 2018: 1835-1844.
- [11] ZHENG Q, ZOU Y, TENG P, et al. Mechanosensitive channel PIEZO1 senses shear force to induce KLF2/4 expression *via* CaMKII/MEKK3/ERK5 axis in endothelial cells [J]. *Cells*, 2022, 11(14): 2191.
- [12] MARIN T, GONGOL B, ZHEN C, et al. Mechanosensitive microRNAs—role in endothelial responses to shear stress and redox state [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 64: 61-68.
- [13] CUI J, LIU N, CHANG Z, et al. Exosomal microRNA-126 from RIPC serum is involved in hypoxia tolerance in SH-SY5Y cells by downregulating DNMT3B [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 649-660.

- [14] KONG Z, HONG Y, ZHU J, et al. Endothelial progenitor cells improve functional recovery in focal cerebral ischemia of rat by promoting angiogenesis *via* VEGF [J]. *J Clin Neurosci*, 2018, 55: 116-121.
- [15] NAZARI-JAHANTIGH M, WEI Y, SCHOBER A. The role of microRNAs in arterial remodelling [J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(4): 611-618.
- [16] ZHANG P, FU G, XU W, et al. Up-regulation of miR-126 *via* DNA methylation in hypoxia-preconditioned endothelial cells may contribute to hypoxic tolerance of neuronal cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 808.
- [17] MORADI SARABI M, ZAHEDI S A, PAJOUHI N, et al. The effects of dietary polyunsaturated fatty acids on miR-126 promoter DNA methylation status and VEGF protein expression in the colorectal cancer cells [J]. *Genes Nutr*, 2018, 13(1): 32.
- [18] POTUS F, RUFFENACH G, DAHOU A, et al. Downregulation of microRNA-126 contributes to the failing right ventricle in pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2015, 132(10): 932-943.
- [19] ZHOU J, LI Y S, WANG K C, et al. Epigenetic mechanism in regulation of endothelial function by disturbed flow: induction of DNA hypermethylation by DNMT1 [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2014, 7(2): 218-224.
- [20] JIANG Y Z, JIMÉNEZ J M, OU K, et al. Hemodynamic disturbed flow induces differential DNA methylation of endothelial kruppel-like factor 4 promoter *in vitro* and *in vivo* [J]. *Circ Res*, 2014, 115(1): 32-43.
- [21] HASSANZADEH A, RAHBARGHAZI R, VERDI J, et al. Targeting ischemic stroke with neural stem cells: insights into endogenous repair mechanisms, biomaterial-based delivery, and exosome therapies [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 63(1): 140.
- [22] WANG D, LIU J, WU L, et al. Transcriptomic investigation of FoxM1-mediated neuroprotection by hAEC-derived exosomes in an *in vitro* ischemic stroke model [J]. *Biology*, 2025, 14(10): 1368.
- [23] WANG H, CHEN F S, ZHANG Z L, et al. miR-126-3p-enriched extracellular vesicles from hypoxia-preconditioned VSC 4.1 neurons attenuate ischaemia-reperfusion-induced pain hypersensitivity by regulating the PIK3R2-mediated pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(2): 821-834.