

## 研究论文

# miR-494-3p通过下调胰岛素受体底物-1促糖尿病大鼠心肌细胞胰岛素抵抗

吴洁, 秦兴华, 侯作旭, 付子豪, 李国华, 杨红燕, 张星\*, 高峰

中国人民解放军空军军医大学航空航天医学系, 西安 710032

**摘要:** 越来越多的证据表明microRNA广泛参与调控心血管功能。我们预实验结果显示糖尿病大鼠心肌miR-494-3p增加, 且有研究表明miR-494-3p与肥胖等代谢异常有关。因此, 本研究旨在探讨miR-494-3p在糖尿病心肌胰岛素敏感性改变中的作用及其机制。利用高脂饲料联合链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠模型, 提取心肌组织RNA进行qPCR检测, 结果显示糖尿病大鼠的心肌miR-494-3p表达水平与正常大鼠相比明显上调( $P < 0.05$ )。体外高糖高脂诱导H9c2细胞胰岛素抵抗模型, qPCR结果显示细胞中miR-494-3p水平明显升高( $P < 0.01$ ), 并随高脂程度加重而增加; 抑制miR-494-3p表达可以增加胰岛素刺激下细胞对葡萄糖的摄取( $P < 0.01$ ), 并提高胰岛素刺激后Akt磷酸化水平( $P < 0.05$ ); 单纯过表达H9c2细胞中的miR-494-3p可以抑制胰岛素刺激的葡萄糖摄取, 并降低Akt磷酸化水平( $P < 0.01$ )。生物信息学联合蛋白免疫印迹实验证实胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate 1, IRS1)是miR-494-3p负性调节胰岛素信号转导的靶分子之一。上述结果提示, miR-494-3p通过下调IRS1促进糖尿病大鼠心肌细胞胰岛素抵抗的形成。

**关键词:** miR-494-3p; 2型糖尿病; 心肌细胞; 胰岛素受体底物-1; 胰岛素抵抗

**中图分类号:** R332; R363.2; R329.2

## miR-494-3p reduces insulin sensitivity in diabetic cardiomyocytes by down-regulation of insulin receptor substrate 1

WU Jie, QIN Xing-Hua, HOU Zuo-Xu, FU Zi-Hao, LI Guo-Hua, YANG Hong-Yan, ZHANG Xing\*, GAO Feng  
*School of Aerospace Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*

**Abstract:** More and more evidence suggests that microRNA is widely involved in the regulation of cardiovascular function. Our preliminary experiment showed that miR-494-3p was increased in heart of diabetic rats, and miR-494-3p was reported to be related to metabolism such as obesity and exercise. Therefore, this study was aimed to explore the role of miR-494-3p in diabetic myocardial insulin sensitivity and the related mechanism. The diabetic rat model was induced by high fat diet (45 kcal% fat, 12 weeks) combined with streptozotocin (STZ, 30 mg/kg), and cardiac tissue RNA was extracted for qPCR. The results showed that the level of miR-494-3p was significantly up-regulated in the myocardium of diabetic rats compared with the control ( $P < 0.05$ ). The level of miR-494-3p in H9c2 cells cultured in high glucose and high fat medium (HGHF) was significantly increased ( $P < 0.01$ ) with the increase of sodium palmitate concentration, whereas down-regulation of miR-494-3p in HGHF treated cells led to an increase in insulin-stimulated glucose uptake ( $P < 0.01$ ) and the ratio of p-Akt/Akt ( $P < 0.05$ ). Over-expression of miR-494-3p in H9c2 cell line significantly inhibited insulin-stimulated glucose uptake and phosphorylation of Akt ( $P < 0.01$ ). Bioinformatics combined with Western blotting experiments confirmed insulin receptor substrate 1 (IRS1) as a target molecule of miR-494-3p. These results suggest that miR-494-3p reduces insulin sensitivity in diabetic cardiomyocytes by down-regulating IRS1.

**Key words:** miR-494-3p; type 2 diabetes; cardiomyocyte; insulin receptor substrate 1; insulin resistance

Received 2018-07-21 Accepted 2018-10-30

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 816770253, 31500932).

\*Corresponding author. Tel: +86-29-84776423; E-mail: zhangxing@fmmu.edu.cn

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,其发病率在全球范围内逐年上升,心肌胰岛素抵抗在糖尿病相关心血管疾病的发生和发展中发挥重要作用<sup>[1]</sup>,主要标志是胰岛素刺激下的心肌细胞葡萄糖摄取减少、胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 下调<sup>[2]</sup>、蛋白激酶 B (Akt) 磷酸化减弱及胰岛素所致的心肌正性变力作用降低<sup>[3]</sup>。IRS 作为胰岛素受体下游的多位点停靠蛋白,在胰岛素与胰岛素受体结合后发生磷酸化,与包含 SH2 结构域的效应分子紧密结合,启动下游信号通路的传递,促使多个下游信号分子被激活,最终将胰岛素信号传送到细胞内信号通路的各个分支上。其中 IRS1 分布最广,在介导胰岛素在外周组织代谢、细胞增殖分化效应中发挥重要作用,其表达不足或者磷酸化异常均会导致胰岛素抵抗<sup>[4]</sup>。本研究组前期报道了多种大鼠疾病模型上存在心肌胰岛素抵抗的证据<sup>[5-7]</sup>,并证实了改善心血管胰岛素敏感性在心血管保护方面具有重要作用。

microRNA 是生物体内源的小 RNA 分子,可以在转录、转录后、表观遗传学等水平调控基因组的表达,参与多种心血管疾病的发生和发展<sup>[8]</sup>。有研究报道具有高糖尿病患病风险的肥胖病人血液中 miR-494-3p 的含量升高,并在运动后下调,提示 miR-494-3p 与代谢相关联<sup>[9]</sup>。我们的预实验结果显示糖尿病大鼠心肌组织中 miR-494-3p 的表达水平显著升高,但是对于 miR-494-3p 的升高是否参与糖尿病性心肌胰岛素抵抗的形成及其作用机制尚不清楚。本研究通过对比糖尿病大鼠与正常大鼠心肌 miR-494-3p 的表达水平,了解其在糖尿病性心肌病中的表达改变,并通过体外实验干预 H9c2 细胞内 miR-494-3p 的水平,检测 miR-494-3p 对 H9c2 细胞系在胰岛素刺激下葡萄糖摄取的影响以及对胰岛素信号通路的作用,进而明确其作用的靶分子,探索治疗糖尿病心肌胰岛素抵抗的新靶点。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂** 45% 脂肪热量 (45 kcal%) 高脂饲料 (D12451) 购于美国 Research Diet 公司,链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)、牛胰岛素与棕榈酸钠 (sodium palmitate, PA) 购于美国 Sigma 公司。DMEM 培养基与胎牛血清购自 Gibco 公司。甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒、血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒、血游离脂肪酸 (free fatty acid,

FFA) 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。Trizol 试剂购自日本 TaKaRa 公司,扩增引物购自广州锐博生物科技公司,转染试剂 Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Reagent 购自 Thermo Fisher 公司,p-Akt<sup>Ser473</sup>、Akt、 $\beta$ -actin、IRS-1 抗体以及 HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 CST 公司,增强发光剂购自 Millipore 公司,2-脱氧荧光葡萄糖类似物 (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxyglucose, 2-NBDG) 和脱脂牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购自 Invitrogen 公司。

**1.2 大鼠糖尿病模型的建立与鉴定** SPF 级 6 周龄 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 12 只,体重 200~250 g,由空军军医大学实验动物中心提供。参照文献报道的方法<sup>[10]</sup>,将 SD 大鼠适应性饲养 3 天后,随机分为两组:正常对照组和糖尿病模型组。正常对照组给予普通饲料喂养,糖尿病模型组给予高脂饲料喂养 12 周后腹腔注射 30 mg/kg 的 STZ,于第 13 周对大鼠进行空腹血糖浓度以及腹腔注射糖耐量测定,筛选空腹血糖浓度高于 16.7 mmol/L 或糖耐量实验中 2 h 血糖大于 11.1 mmol/L 的大鼠为糖尿病模型,用于后续实验。

**1.3 细胞培养与转染** H9c2 细胞购自 ATCC,冻存于液氮中。复苏时将 H9c2 细胞从液氮中取出后,37 °C 水浴融化,转移至含有培养基 (DMEM, 10% 胎牛血清, 1% 青霉素、链霉素) 的培养瓶中,放入培养箱中 (37 °C、5% CO<sub>2</sub>)。转染前 1 天将细胞接种入培养板,24 h 后待细胞生长密度达到 60%~80% 左右即可转染。采用转染试剂脂质体 Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Reagent,参照其说明书转染 miR-494-3p 的类似物 (mimic)、miR-494-3p 的反义序列 (inhibitor) 以及随机对照序列 (miR-494-3p ctrl, miR-494-3p inhib-ctrl)。

**1.4 RNA 提取及 real-time PCR** RNA 的提取按照 TaKaRa 公司 Trizol 说明书操作;microRNA 的反转录以及 miR-494-3p 的 real-time PCR 依照 TaKaRa 公司 Mir-X<sup>™</sup> miRNA First-Strand Synthesis and SYBR<sup>®</sup> qRT-PCR 说明书操作;以 U6 snRNA 作为参照,U6 与 miR-494-3p 扩增引物购自广州锐博生物科技公司。总反应体积 20.0  $\mu$ L,其中 mRQ Buffer 5.0  $\mu$ L, mRQ Enzyme 1.25  $\mu$ L, RNA 样品 3.75  $\mu$ L, SYBR Advantage Premix 5.0  $\mu$ L,正向引物 0.5  $\mu$ L,反向引物 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L。扩增条件为:50 °C 逆转录 1 h,95 °C 初始化 10 s,94 °C 变性 5 s,62 °C

退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 进行 39 个循环。

**1.5 高脂培养基的配制** 取 0.0137 g PA 溶解于 1 mL 甲醇溶液, 振荡助溶, 于 95 °C 加热 5 min 内完全溶解, 即配制成 50 mmol/L 母液。1 g 脱脂 BSA 溶于 10 mL 无菌 PBS 中, 过滤制成 10% BSA 母液。向普通培养基中加入 10% BSA 配制成含有 1% BSA 的培养基, 然后根据所需浓度加入适量 50 mmol/L 的 PA 母液, 55 °C 水浴振荡助溶。

**1.6 2-NBDG 吸收的测定** 采用 2-NBDG 作为光学探针检测 H9c2 心肌细胞葡萄糖摄取的能力。将 H9c2 细胞接种于 96 孔板, 每孔约  $1 \times 10^5$  个细胞, 每组 6 孔, 孵育 48 h 待细胞密度达到约 90% 后, 先换无血清培养基饥饿 6 h, 后每孔加入溶解有  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 2-NBDG、含或不含  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 胰岛素的无血清培养基 200  $\mu$ L 孵育 1 h。最后快速用预冷的 PBS 洗细胞 3 次, 荧光酶标仪读数, 在激发波长 / 发射波长 (Ex/Em) 为 488 nm/520 nm 的条件下测值, 通过检测细胞内荧光强度变化来评估 H9c2 心肌细胞摄 2-NBDG 的情况。最后每组细胞内加入 CCK-8 10  $\mu$ L 孵育细胞 4 h, 再用酶标仪读数 (波长为 490 nm)。通过 CCK-8 来校正每组荧光强度因细胞数量差异而导致的误差。

**1.7 Western blot 分析** 每组细胞给予处理结束后用无血清 DMEM 培养基饥饿 6 h, 随后给予溶解有  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 胰岛素的无血清 DMEM, 孵箱中孵育 30 min。刺激结束于冰上, 用冰 PBS 清洗 3 次, 用裂解液 4 °C 裂解 15 min, 用细胞刮刮下板内细胞离心, 12 000 r/min 离心 20 min, 蛋白定量变性后, 加 30  $\mu$ g 样品入 SDS-PAGE 凝胶电泳槽中, 经电泳转膜, 孵育 p-Akt<sup>Ser473</sup>、Akt、IRS1、 $\beta$ -actin 等抗体 (1:1 000), 4 °C 过夜。用 PBST 洗 6 遍后, 用 HRP 标记的抗兔 IgG (1:5 000) 在室温孵育 1 h, 经化学发光凝胶成像仪分析蛋白表达情况。

**1.8 统计学分析** 用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。所有数据均采用 mean  $\pm$  SD 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 进一步两两比较用 Bonferroni 校正的 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 糖尿病大鼠心肌组织 miR-494-3p 水平升高

造模结束时, 19 周龄的高脂饲料联合 STZ 诱导糖尿病大鼠体重显著高于对照组大鼠 (P < 0.05),

平均体重比对照组高约 141.66 g (图 1A), 腹腔注射糖耐量实验中 2 h 血糖明显高于对照组, 提示糖耐量受损 (图 1B), 糖尿病模型组大鼠血浆 TC、TG 和 FFA 均显著高于对照组 (图 1C)。利用 real-time PCR 对心肌组织中 miR-494-3p 表达量进行检测, 结果显示糖尿病模型组大鼠心肌中 miR-494-3p 的表达上调, 约为对照组的 2.34 倍 (P < 0.05) (图 1D)。

### 2.2 高糖高脂可致 H9c2 心肌细胞 miR-494-3p 的表达水平升高, 糖摄取减低

体外实验中, 提高培养基含糖量模拟糖尿病大鼠体内高糖环境, 并在此基础上通过 PA 模拟高糖高脂的培养环境, 检测不同糖脂培养条件下 H9c2 细胞中 miR-494-3p 的表达水平。实验分为正常糖对照组 (NC, 5.6 mmol/L 葡萄糖)、高渗对照组 (high osmolarity, HO, 5.6 mmol/L 葡萄糖 + 20 mmol/L 甘露醇)、高糖培养组 (high glucose, HG, 25 mmol/L 葡萄糖)、高渗高脂培养组 (high osmolarity high fatty acid, HOHF, 5.6 mmol/L 葡萄糖 + 20 mmol/L 甘露醇, 300  $\mu$ mol/L PA) 以及高糖高脂培养组 (high glucose high fatty acid, HGHF, 25 mmol/L 葡萄糖, 300  $\mu$ mol/L PA), 分别处理 H9c2 细胞 24 h。Real-time PCR 检测细胞中 miR-494-3p 的表达量。结果显示, 与 HO 组相比, HG 组细胞内 miR-494-3p 的表达量无明显改变。HOHF 与 HGHF 组 H9c2 细胞 miR-494-3p 的表达上调幅度较为显著, 其中 HGHF 组上调最为明显, 与 HOHF 组有显著差异 (P < 0.01), 是 HO 组的 1.95 倍 (图 2A)。在 HG 培养的基础上采用 0、50、150、300、500  $\mu$ mol/L PA 进行干预, 细胞中 miR-494-3p 的表达随 PA 浓度升高而升高 (图 2B)。500  $\mu$ mol/L PA 组 miR-494-3p 的表达是 0  $\mu$ mol/L PA 培养组的 2.4 倍 (P < 0.01)。该结果提示 miR-494-3p 的表达与高脂刺激更为相关, 并在高糖的基础上对高脂有更高的响应。故在后续实验中均采用 25 mmol/L 葡萄糖 + 500  $\mu$ mol/L PA 的培养条件作为高糖高脂组 (HGHF) 处理条件, 对照组 (NC) 采用 5.6 mmol/L 葡萄糖 + 20 mmol/L 甘露醇的高渗对照处理。另外, 2-NBDG 荧光吸收强度反映胰岛素刺激 1 h 的葡萄糖摄取水平随 PA 浓度升高而下降 (图 2C), 提示细胞胰岛素敏感性随培养基中 PA 浓度升高而下降。

### 2.3 抑制 miR-494-3p 改善高糖高脂培养的 H9c2 细胞胰岛素刺激的糖摄取及 p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt 比值

2-NBDG 荧光吸收强度检测结果显示 HGHF 组

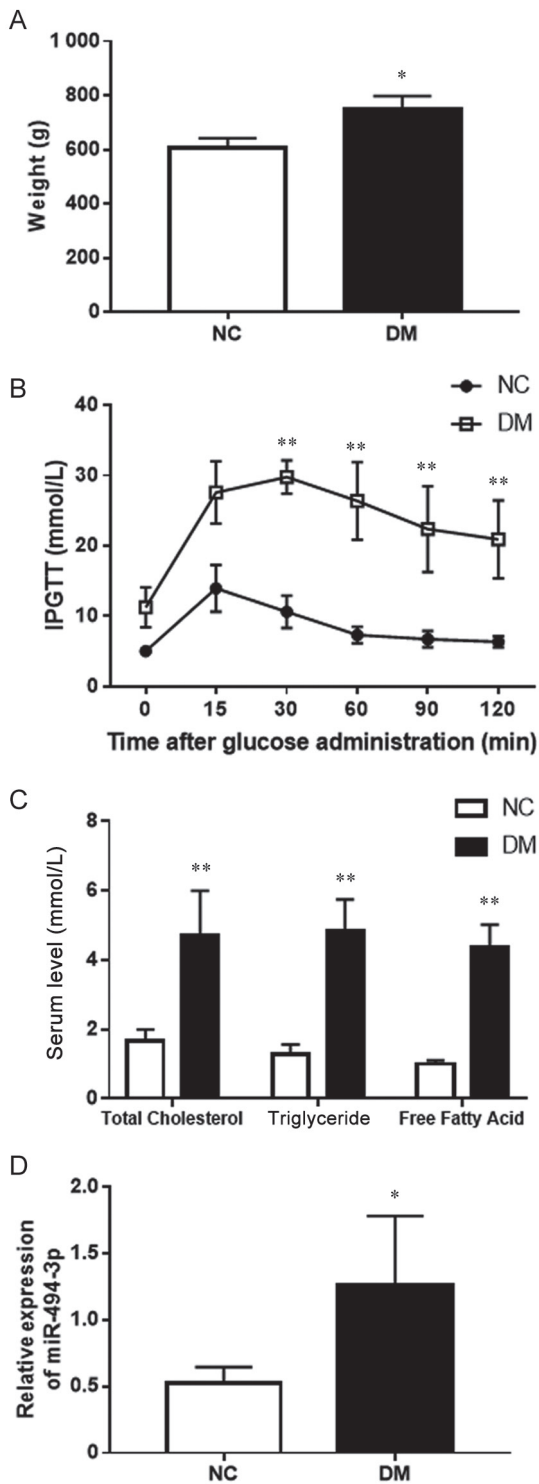


图 1. miR-494-3p在糖尿病大鼠心脏组织中表达升高  
 Fig. 1. Diabetic rats (19 weeks) had higher body weight, worse glucose tolerance, higher total cholesterol (TC), triglyceride (TG), free fatty acids (FFA) and higher miR-494-3p in the heart. A: Body weight of the rats. B: Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) of the rats. C: TG, TC and FFA levels in serum of the diabetic and control rats. D: miR-494-3p expression levels in the heart. NC: normal control group; DM: diabetic model group. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group.

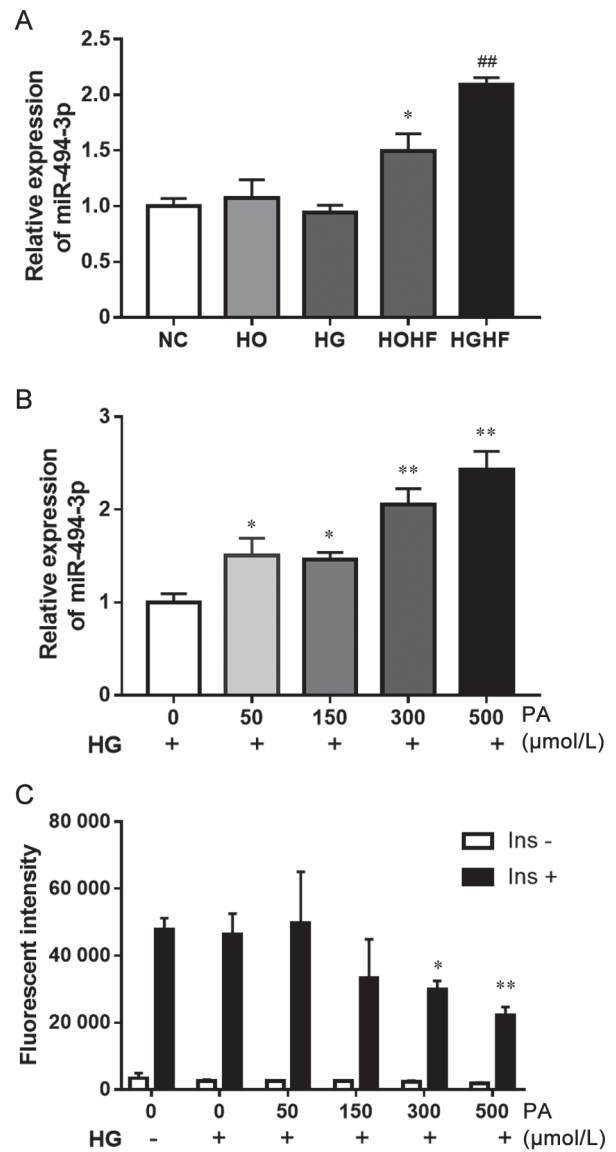


图 2. 高糖高脂可致H9c2心肌细胞miR-494-3p的表达水平升高及糖摄取减低  
 Fig. 2. High glucose and high fat (HGHF) increased the level of miR-494-3p and decreased insulin-stimulated 2-NBDG uptake in H9c2 cells. A: The PCR results of miR-494-3p in the H9c2 cells cultured in different medium (NC: normal control, 5.6 mmol/L glucose; HO: high osmolarity, 5.6 mmol/L glucose + 20 mmol/L mannitol; HG: high glucose, 25 mmol/L glucose; HOHF: high osmolarity high fatty acid, 5.6 mmol/L glucose + 20 mmol/L mannitol + 300  $\mu$ mol/L PA; HGHF: high glucose high fatty acid, 25 mmol/L glucose + 300  $\mu$ mol/L PA). \* $P < 0.05$  vs HO group; ## $P < 0.01$  vs HOHF group. B: The PCR results of miR-494-3p in the H9c2 cells cultured in high glucose and PA gradient medium. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu$ mol/L PA. C: The 2-NBDG uptake of the H9c2 cells cultured in high glucose and PA gradient medium. PA: sodium palmitate. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs no PA no HG group. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ .

细胞胰岛素刺激的糖摄取较对照组下调约 37.73% ( $P < 0.01$ ), 而转染 miR-494-3p inhibitor 抑制其内源性 miR-494-3p 后, 与 HGHF + miR-494-3p ctrl 组相比, 胰岛素刺激的葡萄糖摄取升高约 0.56 倍 ( $P < 0.01$ ) (图 3A)。Western blot 结果显示, HGHF 组 p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt 比值较对照组显著下降 46% ( $P < 0.05$ ), 给予 miR-494-3p inhibitor 后, p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt 比值有所恢

复 ( $P < 0.05$ ) (图 3B), 提示抑制 miR-494-3p 可以改善高糖高脂培养的 H9c2 细胞胰岛素敏感性。

### 2.4 过表达miR-494-3p下调H9c2细胞胰岛素刺激的葡萄糖摄取, 并降低胰岛素信号通路Akt的磷酸化水平

给含 5.6 mmol/L 葡萄糖的普通培养基培养的 H9c2 细胞转染 miR-494-3p mimic 后检测 2-NBDG 荧光吸收强度, 结果显示, 与转染 miR-494-3p ctrl 细胞相比, 胰岛素刺激后 1 h 内细胞葡萄糖的摄取下降约 30% (图 4A)。Western blot 结果显示, 相比于 miR-494-3p ctrl 组, miR-494-3p mimic 组 p-Akt<sup>Ser473</sup>/

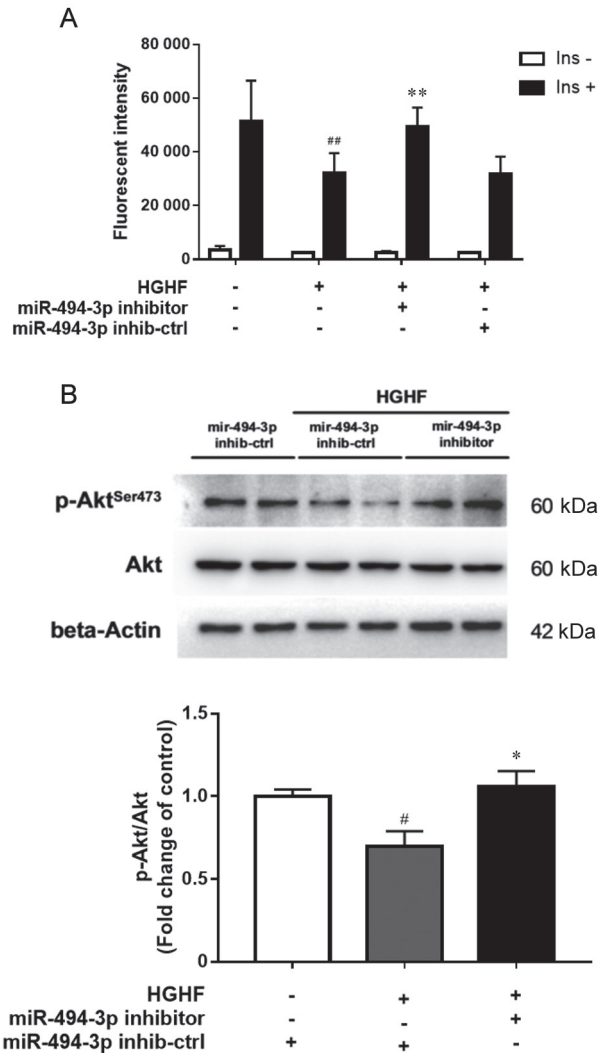


图 3. 抑制miR-494-3p改善高糖高脂培养的H9c2细胞胰岛素刺激的糖摄取及p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt比值

Fig. 3. Inhibiting miR-494-3p in HGHF cultured H9c2 cells improved the 2-NBDG uptake and p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt ratio after insulin stimulation. A: The fluorescence intensity of 2-NBDG in HGHF-cultured H9c2 cells transfected with miR-494-3p inhibitor. <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control (no HGHF) group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs HGHF + miR-494-3p inhib-ctrl group. B: Western blot result of p-Akt<sup>Ser473</sup> and Akt after HGHF-cultured H9c2 cells were transfected with miR-494-3p inhibitor. <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs control (no HGHF) group. <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs HGHF + miR-494-3p inhib-ctrl group. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

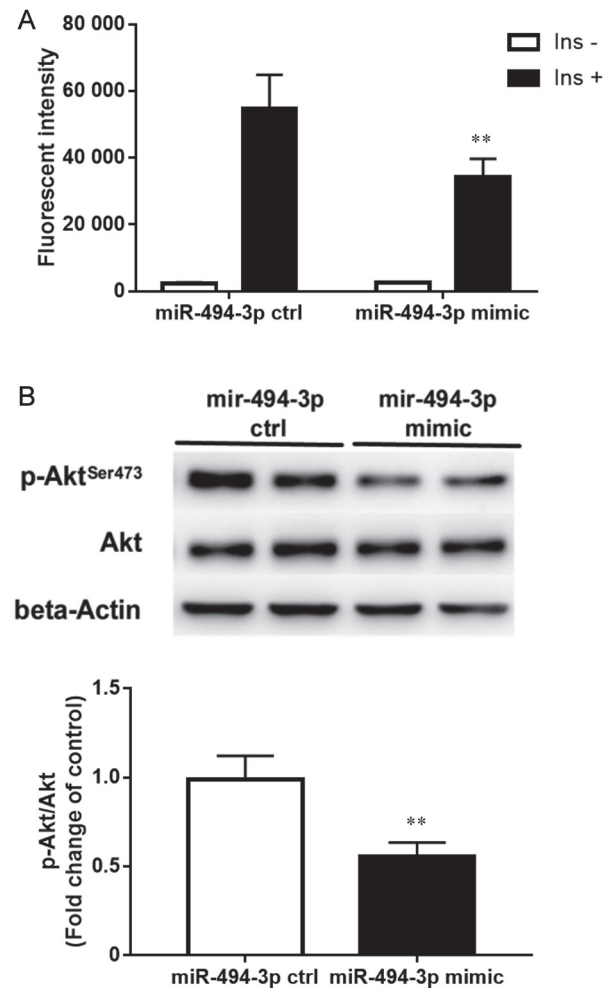


图 4. miR-494-3p mimic抑制H9c2细胞胰岛素刺激的糖摄取与Akt磷酸化水平

Fig. 4. The 2-NBDG uptake and Akt phosphorylation in H9c2 cells were decreased after transfection of miR-494-3p mimic. A: The fluorescence intensity of 2-NBDG in H9c2 cells after transfection of miR-494-3p mimic. B: Western blot result of p-Akt<sup>Ser473</sup> and Akt after transfection of miR-494-3p mimic in H9c2 cells. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs miR-494-3p ctrl group.

Akt 水平显著下降 37.55% ( $P < 0.05$ ) (图 4B), 提示单纯升高 miR-494-3p 水平可以抑制 H9c2 对胰岛素的敏感性。

### 2.5 miR-494-3p 抑制 IRS1 水平, 负性调节胰岛素信号通路

利用 miRDB (<http://www.miRdb.org/>)、miRwalker3.0 (<http://www.miRwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)、TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 在线预测 miR-494-3p 的靶基因, 取交集并进行 Pathway 通路分析后得到的结果提示, IRS1 可能是 miR-494-3p 调控胰岛素信号通路的靶基因 (图 5A)。Western blot 法检测 IRS1 蛋白表达情况, 结果显示与对照组相比, 转染 miR-494-3p mimic 的细胞组 IRS1 蛋白表达下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 相应地, 胰岛素刺激后 p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt 比例明显下降。HGHF 培养条件

下转染 miR-494-3p inhibitor 可提高 IRS1 蛋白表达量约 40.13% ( $P < 0.01$ ), 相应地, 胰岛素刺激后 p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt 比例明显升高 (图 5B)。

### 3 讨论

胰岛素抵抗作为多种代谢性疾病的共同基础, 参与肥胖、高血压、糖尿病、冠心病等多种疾病的发生和发展<sup>[1]</sup>。以往认为胰岛素抵抗主要发生于经典的胰岛素靶器官, 导致机体糖耐量异常、血脂异常等全身性变化。随着器官特异胰岛素抵抗概念的提出, 已有研究表明 2 型糖尿病患者通常也存在心血管胰岛素抵抗<sup>[11]</sup>。本研究组前期工作报道了在急性心肌梗死模型大鼠<sup>[5]</sup>、老龄大鼠<sup>[6]</sup>、自发性高血压大鼠<sup>[7]</sup> 体内心肌胰岛素抵抗的证据, 并且提出心肌胰岛素抵抗是心脏结构及功能改变、进而促发心

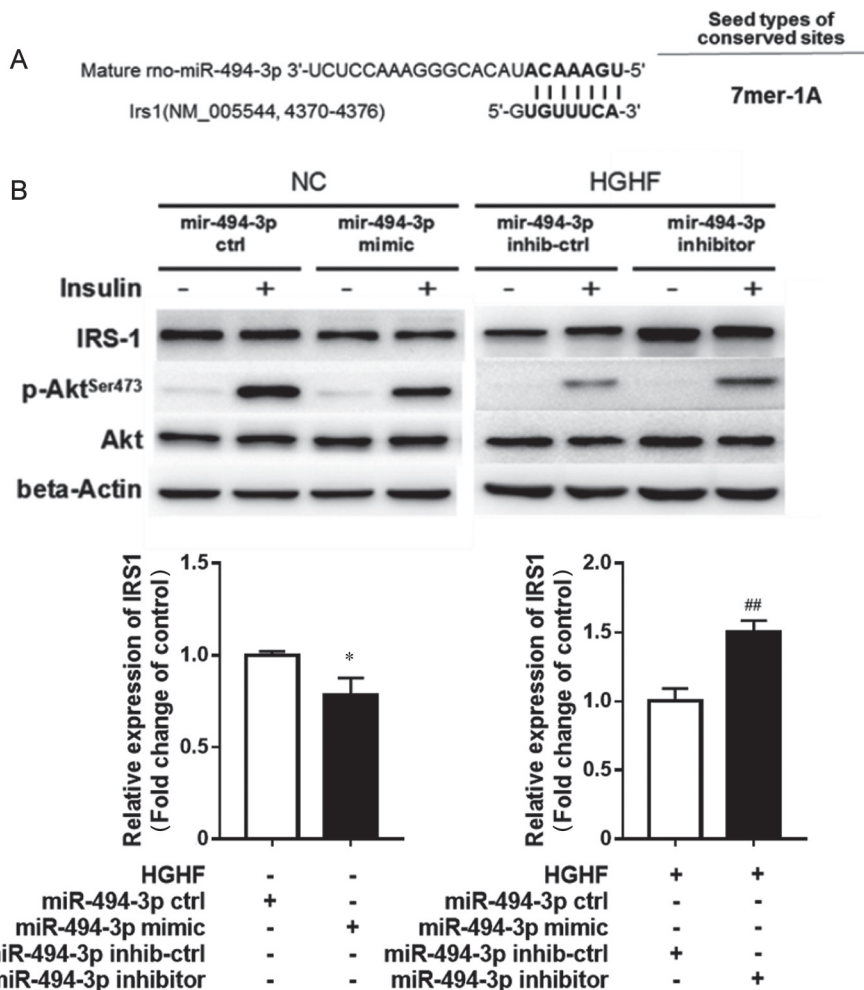


图 5. miR-494-3p 靶基因预测与 Western blot 验证

Fig. 5. Target gene prediction and Western blot verification of IRS1 as a target for miR-494-3p. A: Alignment of complementary sequences between the miR-494-3p and IRS1. B: Western blot result of p-Akt<sup>Ser473</sup>, Akt, and IRS1. Mean ± SD, n = 3. \*P < 0.05 vs the miR-494-3p ctrl group. ##P < 0.01 vs the miR-494-3p inhib-ctrl group.

血管病的重要病理生理机制之一,提示恢复心血管胰岛素信号的正常激活能力具有重要的心血管保护作用。

microRNA 主要在转录后水平参与蛋白质编码基因的表达调控,进而影响到诸多生命活动。已发现许多 microRNA 直接参与胰岛素信号通路各环节的调节,其中,miR-223<sup>[12]</sup>、miR-451<sup>[13]</sup>、miR-483-3p<sup>[14]</sup>等均被报道参与调节了糖尿病心肌的胰岛素敏感性。miR-494-3p 被报道促进肿瘤的增殖、迁移与侵袭<sup>[15]</sup>,在代谢方面报道较少,有文献报道血液中的 miR-494-3p 在具有高糖尿病患病风险的肥胖人群出现上调,并可于运动后下调<sup>[9]</sup>,并有研究发现 miR-494-3p 的升高参与体外诱导的骨骼肌炎症反应<sup>[16]</sup>,提示 miR-494-3p 可能在代谢方面也发挥一定的作用。

本研究结果显示,miR-494-3p 在糖尿病大鼠心肌组织表达明显上调。体外实验证实 H9c2 细胞中 miR-494-3p 的表达在高糖高脂培养条件下明显升高,并随脂肪酸浓度的增加而升高,而在单纯高糖处理条件下无明显改变。抑制 miR-494-3p 的水平可以一定程度恢复胰岛素刺激的糖摄取与 Akt 磷酸化水平,提示 miR-494-3p 的升高可能参与了高糖高脂诱导的胰岛素敏感性的下降。直接转染 miR-494-3p mimic 即可下调细胞对胰岛素的响应能力,提示 miR-494-3p 对胰岛素信号通路发挥负性调控作用。进一步研究 miR-494-3p 发挥作用的可能机制,我们通过序列预测联合 Western blot 实验证实,胰岛素信号通路关键分子 IRS1 是 miR-494-3p 作用的靶分子之一,提示 miR-494-3p 可以通过下调 IRS1 降低心肌细胞对胰岛素的敏感性。

IRS1 是胰岛素信号中最重要的信号分子之一,调节细胞的代谢和生存。高脂喂养以及糖尿病小鼠 (db/db) 的心肌组织均有 IRS1 的下调,心脏特异敲除 IRS1 会导致心脏质量下降、心肌凋亡增加、纤维化,最终导致心功能衰竭;心肌组织对胰岛素刺激的 Akt<sup>Ser473</sup> 磷酸化水平显著减弱,胰岛素下游糖原合成有关的基因(如 Gsk3b)、蛋白合成有关的基因(如 p70S6K)以及代谢相关基因的转录因子(如 FOXO1)等均被抑制,表现出心肌细胞胰岛素抵抗<sup>[2]</sup>。该研究表明,糖尿病时高胰岛素水平可能是心肌 IRS1 下调的原因。本实验结果提示,高糖高脂也可以导致 IRS1 的下调,而其中 miR-494-3p 可能在 IRS1 的下调中发挥了一定的作用。

综上所述,本研究结果显示 miR-494-3p 在糖尿病大鼠的心脏中表达水平升高,体外实验证实高糖高脂诱导的 miR-494-3p 可通过下调 IRS1 参与对细胞胰岛素敏感性的负性调节,提示糖尿病时 miR-494-3p 在心脏组织中的上调可能是糖尿病心肌胰岛素抵抗的机制之一,对探索改善糖尿病性心肌胰岛素敏感性的新治疗靶点有重要意义。但是本研究仅发现了糖尿病大鼠心肌细胞 miR-494-3p 的上调,并在体外验证了 miR-494-3p 对 H9c2 细胞胰岛素敏感性的影响,要证实它可以作为改善糖尿病心肌胰岛素敏感性的靶点,还需要进一步在体抑制心肌 miR-494-3p,观察糖尿病大鼠心肌胰岛素敏感性以及心脏功能的改变。

### 参考文献

- 1 Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 2007; 28(5): 463–491.
- 2 Qi Y, Xu Z, Zhu Q, Thomas C, Kumar R, Feng H, Dostal DE, White MF, Baker KM, Guo S. Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38alpha MAPK during insulin resistance. *Diabetes* 2013; 62(11): 3887–3900.
- 3 Yu Q, Gao F, Ma XL. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2011; 89(3): 516–524.
- 4 Lavin DP, White MF, Brazil DP. IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia* 2016; 59(11): 2280–2291.
- 5 Fu F, Zhao K, Li J, Xu J, Zhang Y, Liu C, Yang W, Gao C, Li J, Zhang H, Li Y, Cui Q, Wang H, Tao L, Wang J, Quon MJ, Gao F. Direct evidence that myocardial insulin resistance following myocardial ischemia contributes to post-ischemic heart failure. *Sci Rep* 2015; 5: 17927.
- 6 Li QX, Xiong ZY, Hu BP, Tian ZJ, Zhang HF, Gou WY, Wang HC, Gao F, Zhang QJ. Aging-associated insulin resistance predisposes to hypertension and its reversal by exercise: the role of vascular vasorelaxation to insulin. *Basic Res Cardiol* 2009; 104(3): 269–284.
- 7 Zhang H, Li J, Li R, Zhang Q, Ma H, Ji Q, Guo W, Wang H, Lopez BL, Christopher TA, Ma X, Gao F. Reduced cardiotropic response to insulin in spontaneously hypertensive rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-initiated signaling. *J Hypertens* 2008; 26(3): 560–569.
- 8 Najafi-Shoushtari SH. MicroRNAs in cardiometabolic disease. *Curr Atheroscler Rep* 2011; 13(3): 202–207.
- 9 Iwasaki H, Imamura T, Morino K, Shimamoto T, Tawa M, Ugi S, Sakurai H, Maegawa H, Okamura T. MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis in

- human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 468(1–2): 208–213.
- 10 Skovso S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig* 2014; 5(4): 349–358.
- 11 Zhang HF (张海锋), Zhang X, Gao F. Insulin and cardiovascular protection: from bench to bedside. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2018; 70(1): 61–70 (in Chinese with English abstract).
- 12 Lu H, Buchan RJ, Cook SA. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovasc Res* 2010; 86(3): 410–420.
- 13 Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe S, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Otsu K, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-451 exacerbates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy in mice through suppression of the LKB1/AMPK pathway. *Circ Res* 2015; 116(2): 279–288.
- 14 Qiao Y, Zhao Y, Liu Y, Ma N, Wang C, Zou J, Liu Z, Zhou Z, Han D, He J, Sun Q, Liu Y, Xu C, Du Z, Huang H. miR-483-3p regulates hyperglycaemia-induced cardiomyocyte apoptosis in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 477(4): 541–547.
- 15 Li XT, Wang HZ, Wu ZW, Yang TQ, Zhao ZH, Chen GL, Xie XS, Li B, Wei YX, Huang YL, Zhou YX, Du ZW. miR-494-3p regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by PTEN/AKT signaling in human glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 2015; 35(5): 679–687.
- 16 Lee H, Jee Y, Hong K, Hwang GS, Chun KH. MicroRNA-494, upregulated by tumor necrosis factor-alpha, desensitizes insulin effect in C2C12 muscle cells. *PLoS One* 2013; 8(12): e83471.