

miR-29b 对缺血损伤心肌细胞模型的自噬影响及分子机制研究

张 蕾¹, 王 诚²(1. 陇县人民医院心血管内科, 陕西宝鸡 721200; 2. 宁强县天津医院心内科, 陕西宁强 724400)

摘要: **目的** 探讨与研究微RNA-29b (miR-29b) 对缺血损伤心肌细胞模型自噬的影响及分子机制。**方法** 将已经建立缺氧/复氧模型的心肌细胞系(H9C2)随机分为三组:空白组、对照组与实验组,以 life2000TM 为载体体外转染磷酸盐缓冲液(PBS), miRNA 对照质粒(miR-NC)与 miR-29b, 检测细胞自噬、增殖水平与氧化自由基等表达变化情况。**结果** 细胞转染后 24h 与 36h, 三组 miR-29b mRNA 表达水平, 细胞增殖指数相比差异有统计学意义($F=9.284\sim81.871$, 均 $P<0.05$), 其中实验组与空白组及对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$), 空白组与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。细胞转染后 24h 与 36h, 三组 HIF-1 α , LC-3 蛋白相对表达量及 SOD 活力, MDA 含量相比差异具有统计学意义($F=9.133\sim15.693$, 均 $P<0.05$), 其中实验组与空白组及对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$), 空白组与对照组对比差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** miR-29b 能通过正向调节 HIF-1 α 和 LC-3 的相对表达量来提高 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 从而促进细胞自噬, 发挥对缺血损伤心肌细胞的保护作用。

关键词: miR-29b; 缺血再灌注损伤; 心肌细胞; 细胞自噬

中图分类号: R541; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 06-135-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.033

Effects of miR-29b on Autophagy in Ischemic Myocardial Cells Models and Its Molecular Mechanism

ZHANG Lei¹, WANG Cheng²

(1. Department of Cardiology, Longxian People's Hospital, Shaanxi Longxian 721200, China; 2. Department of Cardiology, Tianjin Hospital of Ningqiang County, Shaanxi Ningqiang 724400, China)

Abstract: **Objective** To explore and study the effect and molecular mechanism of miR-29b on autophagy in ischemic myocardial cells models. **Methods** The myocardial cell line (H9C2) with established hypoxia / reoxygenation model were randomly divided into three groups-blank group, control group and experimental group, and were transfected with PBS, miR-NC and miR-29b mimic in vitro by the life 2000TM. The changes of cell autophagy, proliferation level and expression of oxidative free radicals were detected. **Results** There were statistically significant differences in miR-29b mRNA expression level and cell proliferation index between the three groups 24h and 36h after cell transfection ($F=9.284\sim81.871$, all $P<0.05$). There were statistically significant differences between the experimental group and the blank group and the control group ($P<0.05$), while there were no statistically significant differences between the blank group and the control group ($P>0.05$). At 24h and 36h after transfection, HIF-1, LC-3 protein expression level, SOD activity and MDA content in the three groups were significantly different ($F=9.133\sim15.693$, all $P<0.05$). The differences between the experimental group and the blank group and the control group were statistically significant ($P<0.05$), while the differences between the blank group and the control group were not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** MiR-29b can increase the SOD activity and decrease the MDA content by positively regulate the relative transcript level of HIF-1 α and LC-3, thereby promoting cell autophagy and protecting the ischemic myocardial cells.

Keywords: miR-29b; ischemia-reperfusion injury; cardiomyocytes; cell autophagy

心肌缺血再灌注损伤为常见的心血管病, 为心肌组织缺血导致局部心肌损伤, 由于机体自身的代偿机制实现缺血区域的再灌注, 从而导致组织器官的进一步损伤^[1-2]。该病的发生机制还不明确, 涉及到免疫炎症损伤、线粒体损伤、细胞凋亡、氧化应激损伤、兴奋性氨基酸毒性等多种机制^[3-4]。细

胞自噬是指受损细胞器、错误折叠蛋白质产生的废弃物被自噬小体包裹起来, 并运送到溶酶体中进行消化与降解。当细胞受到外界刺激处于应激状态时, 自噬流被激活, 可引起细胞内环境稳态紊乱, 从而诱发心血管疾病的发生。微 RNAs (microRNAs, miRNAs) 在机体心血管疾病中有特定的表达谱,

作者简介: 张蕾 (1975-), 女, 大学本科, 副主任医师, 研究方向: 心血管疾病, E-mail: lxrmynw@163.com。

通讯作者: 王诚 (1968-), 男, 大学本科, 副主任医师, 研究方向: 心血管内科, E-mail: 15891061658@163.com。

大鼠大脑中动脉栓塞模型中有上百个 miRNAs 异常表达,说明 miRNA 与心肌缺血再灌注损伤密切相关^[5]。微 RNA-29b(microRNA-29b, miR-29b)是一个与胚胎心血管系统的发育生长密切相关的 miRNA,在心肌梗死大鼠中表达下降并可调节缺血性心肌损伤^[6]。因此,本文探讨与研究了 miR-29b 对缺血损伤心肌细胞模型自噬的影响及分子机制,旨在为缺血损伤心肌损伤的预防治疗提供新的途径和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 研究时间为 2019 年 1~2019 年 12 月,心肌细胞系(H9C2)购自中国医学科学院基础医学研究所,在温度为 37℃,5% (v/v) CO₂,湿润的细胞培养箱中孵育。

1.2 仪器与试剂 培养基为含 10ml/dl 胎牛血清(中国康源生物公司)的 DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶购于美国 Millipore 公司;酶标仪购自美国 BD 公司;蛋白杂交与凝胶成像系统购自美国 Bio-rad 公司;蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所;兔抗 β -actin, 乏氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α), 微管相关轻链蛋白-3(microtubule associated protein light chain3, LC-3) 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)与丙二醛(malondialdehyde, MAD)检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;miR-29b 与 miR-NC 购自上海吉玛生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 缺血损伤心肌细胞建立与分组:所有 H9C2 细胞先用 PBS(Gibco 公司)清洗细胞 2 次,加入用 95% (v/v) N₂+5% (v/v) CO₂ 置换 30min 的无糖 DMEM,置于 37℃, 94%N₂+1% (v/v) O₂+5% (v/v) CO₂ 低氧培养箱中缺氧培养 8h,然后放入 37℃, 5% (v/v) CO₂ 细胞培养箱给予复氧 24h。将已经建立缺氧/复氧模型的 H9C2 细胞随机分为三组:空白组、对照组与实验组。

1.3.2 细胞转染方法:待细胞贴壁生长融合度达 80%~90% 时,空白组、对照组与实验组以

life2000™ 为载体体外转染 PBS, miR-NC 与 miR-29b 等,转染后终浓度均为 50nmol/L/孔,转染后 4~6h 换液。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测方法:收集心肌细胞用 Trizol 提取总 RNA,逆转录后采用 SYBR-Green 染料法进行定量 PCR,反应条件为:95℃ 2min; 95℃ 15s, 60℃ 32s, 40 个循环,检测结果以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 值进行。

1.3.4 Western blot 检测方法:细胞收集后用 PBS 洗涤 2 次,加入 RIPA buffer 裂解细胞,蛋白样品定量后,于 10g/dl SDS-PAGE 上进行分离,并电转至 PVDF 膜上,采用 5g/dl 脱脂奶粉封闭过夜,加入稀释到合适浓度的一抗,4℃孵育过夜,清洗后加入辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗,37℃孵育 2h,清洗后采用化学发光检测底物,显影检测。

1.3.5 细胞增殖检测:将细胞消化后配成单个细胞悬液,调整好活细胞的浓度接种到 96 孔板,培养 24h 后每孔加入 100 μ l 不同浓度的样品,培养特定的时间以后,每孔加 MTT 溶液 20 μ l,继续孵育 4h 后吸弃上清液,每孔加 150 μ l DMSO,振荡培养 10min,选择 490nm 波长,在酶标仪上测定吸光度,计算细胞增殖指数。

1.3.6 SOD 活力与 MDA 含量检测:取细胞上清,采用酶联免疫法检测 SOD 活力与 MDA 含量。上述实验都重复 3 次,取平均值。

1.4 统计学分析 选择 SPSS20.00 软件对本研究所有数据进行分析,数据录入和处理均按照各个实验设计要求,符合正态分布的计量数据使用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两两对比采用 *t* 检验,多组间对比采用单因素方差分析等,非正态分布数据采用非参数检验方法,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-29b mRNA 表达及细胞增殖水平对比 见表 1。细胞转染后 24h 与 36h,三组 miR-29b mRNA 表达水平、细胞增殖指数相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),其中实验组与空白组及对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),空白组与对照组对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 转染后不同时间点 miR-29b mRNA 表达及细胞增殖指数水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

指标		实验组	对照组	空白组	<i>F</i>	<i>P</i>
miR-29b mRNA 表达水平	24 h	56.33 \pm 10.11*	0.92 \pm 0.13	0.95 \pm 0.11	45.284	0.000
	36 h	78.34 \pm 10.09 *	0.93 \pm 0.12	0.96 \pm 0.18	59.882	0.000
细胞增殖指数	24 h	1.33 \pm 0.11	3.45 \pm 0.13	3.44 \pm 0.21	9.284	0.001
	36 h	1.34 \pm 0.09	3.44 \pm 0.12	3.48 \pm 0.18	81.871	0.000

注: *miR-29b mRNA 表达水平 24h vs 36h, $t=59.566$, $P=0.000$, 差异有统计学意义。

2.2 HIF-1 α , LC-3 蛋白相对表达量及 SOD, MDA 水平对比 见表 2。细胞转染后 24h 与 36h,

三组 HIF-1 α , LC-3 蛋白相对表达量及 SOD 活力、MDA 含量相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),

其中实验组与空白组及对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白组与对照组对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表2 转染后不同时间点 HIF-1 α , LC-3 蛋白相对表达量及 SOD, MDA 水平对比 ($\bar{x} \pm s$)

指标		实验组	对照组	空白组	F	P
HIF-1 α	24 h	4.54 \pm 0.33*	1.09 \pm 0.22	1.00 \pm 0.09	13.493	0.000
	36 h	5.72 \pm 0.44*	1.34 \pm 0.16	1.21 \pm 0.11	12.898	0.000
LC-3	24 h	4.51 \pm 0.25 *	1.11 \pm 0.17	1.13 \pm 0.09	12.223	0.000
	36 h	5.70 \pm 0.32*	1.37 \pm 0.18	1.32 \pm 0.09	15.693	0.000
SOD(U/mg)	24h	8.24 \pm 0.66	2.33 \pm 0.19	2.33 \pm 0.11	9.133	0.001
	36h	8.56 \pm 0.51	2.49 \pm 0.18	2.28 \pm 0.09	9.672	0.000
MDA(μ mol/g)	24h	44.59 \pm 4.10	79.87 \pm 3.17	80.22 \pm 6.28	12.482	0.000
	36h	44.09 \pm 4.41	80.09 \pm 3.19	80.98 \pm 5.67	10.093	0.000

注: *HIF-1 α , LC-3 蛋白相对表达量 24h vs 36h, $t=7.048, 10.306, P=0.02, 0.009$, 差异有统计学意义。

3 讨论

心血管疾病是严重危害人体健康的主要疾病之一, 具有死亡率高、发病危急、起病重和预后差等特点, 其中心肌缺血/再灌注损伤为主要的血管疾病^[7]。当机体的心肌组织受到缺血等刺激时, 可启动内源性抗氧化与抗缺血机制, 保护濒临死亡的心肌细胞, 促进心功能的恢复^[8]。而在缺血再灌注过程中, 损伤机制占绝对优势, 保护性介质水平与持续作用时间有限, 从而造成心肌组织的继发性损伤^[9]。miRNAs 是一类长度约为 23nt 的保守的小 RNA, 能够在转录后水平调控基因的表达, 从而参与细胞生长、增殖、凋亡、分化的调控。miR-29b 定位于染色体 1q32.2, 是在心肌缺血再灌注损伤中出现明显上调表达的 miRNA 之一, 在成肌细胞的增殖和分化的调节过程中起着中心作用, 也可由各种各样的转录调节者和信号通路所调节^[10-11]。有研究显示^[12], miR-29b 的过表达对心肌细胞具有保护作用, 而低表达更易导致心血管损伤。

本研究显示细胞转染后 24h 与 36h, 实验组的 miR-29b mRNA 表达水平显著高于空白组与对照组, 空白组与对照组对比差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。细胞转染后 24h 与 36h, 实验组的 SOD 活力显著高于对照组与空白组 ($P < 0.05$), MDA 含量显著低于对照组与空白组 ($P < 0.05$), 对照组与空白组对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SOD 活力增加不但能显著减轻心肌组织损害程度, 而且也具有重要的预防性脑保护作用, 以及改善相关并发症^[13]。而 MDA 是细胞膜脂质被活性氧化后的副产物, MDA 含量降低可使得机体氧化应激损伤作用减少; 而提高 miR-29b 表达能清除心肌缺血再灌注损伤所产生的氧化应激产物, 并提高抗氧化酶活性^[14]。高英英^[15]的研究显示, miR-29b 表达上调可减少缺血再灌注损伤引起的心肌细胞凋亡, 与本研究结果一

致。miRNAs 通过 RNA 诱导的沉默复合体来调节靶基因的降解和/或翻译抑制。目前认为 miRNAs 直接调控哺乳动物基因组中 1/3 以上基因的表达, 特别是 miRNAs 的异常表达与心血管病的发生发展密切相关^[16]。本研究显示细胞转染后 24h 与 36h, 实验组的细胞增殖指数显著低于空白组与对照组 ($P < 0.05$), 空白组与对照组对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明促进 miR-29b 的表达能促进心肌细胞增殖。

氧化应激是心肌缺血再灌注损伤的最主要因素, 过度累积的氧自由基还可增加细胞通透性, 引起钙离子内流发生交换障碍, 诱发心律失常的发生。HIF-1 α 是缺氧诱导因子家族的一员, 在缺氧时上调表达以适应缺氧环境^[17-18]。正常的心脏组织保留着低水平的自噬, 保障细胞的能量与物质代谢。在心肌缺血再灌注过程中, 自噬可导致心肌细胞降解过度, 加重心肌损伤。过度激活的自噬流可加快心肌细胞的死亡, 如何控制细胞自噬处于平衡的状态, 使其向着保护心肌细胞的方向发展具有重要价值^[19-20]。本研究显示细胞转染后 24h 与 36h, 实验组的 HIF-1 α , LC-3 蛋白相对表达量显著高于空白组与对照组 $P < 0.05$, 空白组与对照组对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明 miR-29b 的过表达可以调控 HIF-1 α , LC-3 蛋白的相对表达, 从而影响心肌细胞的自噬与氧化应激水平。不过本研究没有明确 miR-29b 的直接作用靶基因, 对信号通路的调控分析还不够深入, 下一步的实验将着重于相关信号通路分析。

总之, miR-29b 能通过正向调节 HIF-1 α , LC-3 蛋白的相对表达量来提高 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 从而促进细胞自噬, 发挥对缺血损伤心肌细胞的保护作用。

参考文献:

- [1] 刘叶, 潘玥, 郑魏, 等. miR-186-5p 在酒精诱导的心肌细胞中高表达并通过靶基因 XIAP 调控细胞凋亡水平 [J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(5): 53-62.
LIU Ye, PAN Yue, ZHENG Wei, et al. MiR-186-5p is expressed highly in ethanol-induced cardiomyocytes and regulates apoptosis by target gene XIAP [J]. China Biotechnology, 2019, 39(5): 53-62.
- [2] 付勇, 毛亮, 李妙龄, 等. miR-1 调控靶基因 HCN4 在风湿性心脏病心房颤动中的作用 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(15): 2419-2423.
FU Yong, MAO Liang, LI Miaoling, et al. Mechanism of miR-1 regulation target genes HCN4 in atrial fibrillation of rheumatic heart disease patients [J]. The Journal of Practical Medicine, 2019, 35(15): 2419-2423.
- [3] 周咏梅, 舒燕, 唐艺加, 等. microRNA-423-5p 调节 PI3K/AKT 通路在大鼠心力衰竭进展中的作用探究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(2): 128-133.
ZHOU Yongmei, SHU Yan, TANG Yijia, et al. Study of the effect and mechanism of microRNA - 423 - 5p in heart failure through regulation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2019, 18(2): 128-133.
- [4] 于慧, 杨晓敏, 屈双丽, 等. miR-139-3p 在低氧诱导凋亡的心肌细胞中的表达及其作用研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(4): 667-672.
YU Hui, YANG Xiaomin, QU Shuangli, et al. Expression and effect of miR-139-3p in apoptotic neonatal rat cardiomyocytes induced by hypoxia [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2019, 35(4): 667-672.
- [5] 郑常龙, 符永玫, 詹浩洪, 等. miR-124 过表达对肺动脉高压大鼠右心重构的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(9): 1594-1599.
ZHENG Changlong, FU Yongmei, ZHAN Hao-hong, et al. Effects of miR-124 over-expression on right ventricular remodeling in rats with pulmonary hypertension [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2019, 35(9): 1594-1599.
- [6] WANG Tingxia, LI Yun, CHEN Juan, et al. TGF- β 1/Smad3 signaling promotes collagen synthesis in pulmonary artery smooth muscle by down-regulating miR-29b [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2018, 11(12): 5592-5601.
- [7] 翁震, 何杨. 外泌体蛋白质组学分析在心血管疾病中应用的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(4): 157-159.
WENG Zhen, HE Yang. Research progress of proteomic analysis of exosomes and its application in cardiovascular disease [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(4): 157-159.
- [8] 伍斌, 王军奎. 微 RNA 与急性心肌梗死关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(13): 2579-2582, 2587.
WU Bin, WANG Junkui. Research progress in relationship between miRNA and acute myocardial infarction [J]. Medical Recapitulate, 2019, 25(13): 2579-2582, 2587.
- [9] 陈旭翔, 侯婧瑛, 龙会宝, 等. ELA/APJ 通过上调 miR-133a 抑制心肌细胞在缺血缺氧条件下凋亡的机制研究 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(15): 12-17, 封 3.
CHEN Xuxiang, HOU Jingying, LONG Huibao, et al. Research on the mechanism of ELA/APJ inhibiting the apoptosis of cardiomyocyte under the condition of ischemia and hypoxia by up-regulating miR-133a [J]. China Medical Journal, 2019, 16(15): 12-17, Sealing 3.
- [10] 张苗苗, 毛雯, 仝其广, 等. 缺血后适应对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制 [J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(7): 616-620.
ZHANG Miaomiao, MAO Wen, TONG Qiguang, et al. Protective effect and mechanism of ischemic postconditioning in rats underwent myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Chinese Journal of Cardiology, 2016, 44(7): 616-620.
- [11] 贾红梅. 微小 RNA-21/29a 和 D-二聚体对心肌缺血再灌注的诊断价值研究 [J]. 中国医师进修杂志, 2020, 43(5): 415-417.
JIA Hongmei. Diagnosis value of microRNA-21/29a and D-dimer in myocardial ischemia-reperfusion [J]. Chinese Journal of Advanced Medical Practitioners, 2020, 43(5): 415-417.
- [12] ZHONG Fengying, HUANG Ting, LENG Jingxing. Serum miR-29b as a novel biomarker for glioblastoma diagnosis and prognosis [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2019, 12(11): 4106-4112.
- [13] 李静, 武敏, 朱海慧, 等. miR-204 改善心肌缺血再灌注大鼠炎症及氧化应激 [J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(5): 414-421.
LI Jing, WU Min, ZHU Haihui, et al. MiR-204 improves inflammation and oxidative stress in rats with myocardial ischemia-reperfusion [J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2019, 16(5): 414-421.
- [14] 刘超群, 张新生, 许何丽, 等. 阿霉素对 H9C2 心肌细胞活力和 miRNA 表达水平影响 [J]. 社区医学杂志, 2019, 17(8): 450-452.
LIU Chaoqun, ZHANG Xinsheng, XU Heli, et al. Effect of doxorubicin on viability and miRNA expression of H9C2 cardiomyocyte [J]. Journal of Community Medicine, 2019, 17(8): 450-452.
- [15] 高英英. 微 RNA-29b 在心肌缺血再灌注损伤中的作用及机制研究 [J]. 安徽医药, 2019, 23(12): 2463-2467, 后插 2 页.
GAO Yingying. The role and mechanism of miR-29b in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2019, 23(12): 2463-2467, Insert 2 pages later.
- [16] 李家睿, 闫波. 抑制 LncRNA MALAT1 靶向促进 miR-200 a 表达减少心肌细胞凋亡 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(18): 4527-4530.
LI Jiarui, YAN Bo. Inhibiting LncRNA MALAT1 targeting promoting the expression of miR-200 a and reducing cardiomyocyte apoptosis [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2019, 39(18): 4527-4530.
- [17] 王少霞. 长链非编码 RNA H19 靶向 miR-194-5p 抑制 LPS 诱导心肌细胞炎症反应 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(19): 4839-4842.