

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 miRNA-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 ($F=9.284\sim 81.871$, 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 ($F=9.133\sim 15.693$, 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 ($F=9.284\sim 81.871$, 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 ($F=9.133\sim 15.693$, 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: lxrmyynw@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-1α (hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α), 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^{-ΔΔCt} 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 μl 不同浓度的样品, 培养特定的时间以后, 每孔加 MTT 溶液 20 μl, 继续孵育 4h 后吸弃上清液, 每孔加 150 μl 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 ± 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 α=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 ± 10.11*	0.92 ± 0.13	0.95 ± 0.11	45.284	0.000
	36 h	78.34 ± 10.09*	0.93 ± 0.12	0.96 ± 0.18	59.882	0.000
细胞增殖指数	24 h	1.33 ± 0.11	3.45 ± 0.13	3.44 ± 0.21	9.284	0.001
	36 h	1.34 ± 0.09	3.44 ± 0.12	3.48 ± 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-1α, 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-1α, 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.