

# miR-330-5p 调控 Nox4 对缺氧复氧大鼠胚胎心肌细胞损伤影响的实验研究

黄毅, 王琮翰 (西安市人民医院心血管内科, 西安 710004)

**摘要:** 目的 研究 miR-330-5p 调控烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, Nox4) 对缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 大鼠胚胎心肌细胞损伤的影响及可能机制。方法 将大鼠胚胎心肌细胞 H9C2 分为对照组 (Con)、模型组 (H/R)、H/R+anti-miR-NC 组、H/R+anti-miR-330-5p 组、H/R+pcDNA3.1 组、H/R+pcDNA3.1-Nox4 组、H/R+anti-miR-330-5p+si-NC 组和 H/R+anti-miR-330-5p+si-Nox4 组。实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测 miR-330-5p 在 H/R 诱导心肌细胞中的表达; MTT 法和流式细胞术检测心肌细胞增殖活力和细胞凋亡; Western blot 检测 Nox4 蛋白及凋亡相关蛋白 [细胞周期素 D1 (Cyclin D1)、B 淋巴细胞瘤-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X, Bax)、P21] 表达; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-330-5p 和 Nox4 的靶向关系。结果 与 Con 组比较, H/R 组细胞中 miR-330-5p 表达 ( $1.96 \pm 0.20$  vs  $1.01 \pm 0.11$ ), P21 ( $0.89 \pm 0.07$  vs  $0.21 \pm 0.03$ ) 和 Bax ( $0.80 \pm 0.05$  vs  $0.18 \pm 0.02$ ) 蛋白水平及细胞凋亡率 ( $26.67\% \pm 2.68\%$  vs  $7.22\% \pm 0.68\%$ ) 明显升高 ( $t=7.029, 12.591, 12.790, 12.102$ ), 而 Cyclin D1 ( $0.20 \pm 0.03$  vs  $0.78 \pm 0.06$ ) 和 Bcl-2 ( $0.11 \pm 0.02$  vs  $0.71 \pm 0.06$ ) 蛋白水平及细胞增殖活性显著降低 ( $t=13.671; 11.047; 11.333, 11.485, 12.511$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。Nox4 是 miR-330-5p 的靶基因, miR-330-5p 负调控 Nox4 表达。抑制 miR-330-5p 表达或过表达 Nox4 可促进 Cyclin D1 和 Bcl-2 蛋白表达 ( $t=9.664, 7.548$ ), 抑制 P21 和 Bax 蛋白表达 ( $t=10.184, 10.314$ ), 增强心肌细胞增殖活力 ( $t=6.667-9.126$ )、抑制细胞凋亡 ( $t=10.341$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。抑制 Nox4 表达能够逆转抑制 miR-330-5p 对 H/R 心肌细胞增殖 ( $t=4.146-7.941$ ) 和凋亡 ( $t=6.285-11.358$ ) 的影响 (均  $P<0.01$ )。结论 H/R 诱导的大鼠心肌细胞中 miR-330-5p 表达上调, 抑制 miR-330-5p 可能通过靶向 Nox4 抑制心肌细胞凋亡, 对 H/R 大鼠心肌细胞损伤起到保护作用。

**关键词:** 微小 RNA-330-5p; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4; 缺氧/复氧; 心肌细胞; 凋亡

中图分类号: R-332 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2024)06-048-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.06.008

## Experimental Study on the Effect of miR-330-5p Regulated Nox4 on the Damage of Fetal Cardiomyocytes in Hypoxic-reoxygenated Rats

HUANG Yi, WANG Conghan (Department of Cardiovascular Medicine, Xi'an People's Hospital, Xi'an 710004, China)

**Abstract:** **Objective** To study the effect of miR-330-5p on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (Nox4) on hypoxia/reoxygenation (H/R) effect and possible mechanism of myocardial cell injury in rat embryo. **Methods** Rat embryonic cardiomyocytes H9C2 were divided into control group (Con), model group (H/R), H/R+anti-miR-NC group, H/R+anti-miR-330-5p group, H/R+pcDNA3.1 group, H/R+PCDNA3.1-NOX4 group, and H/R+anti-miR-330-5p+si-NC group and H/R+anti-miR-330-5p+si-Nox4 group. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-330-5p in H/R-induced cardiomyocytes. The proliferation and apoptosis of cardiomyocytes were detected by MTT and flow cytometry. Western blot was used to detect Nox4 protein and apoptosis-related protein [Cyclin D1 (Cyclin D1), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 Associated X (Bcl-2 Associated X), P21] expression, and the dual luciferase reporter gene assay verified the targeting relationship between miR-330-5p and Nox4. **Results** Compared with Con group, the expression of miR-330-5p ( $1.96 \pm 0.20$  vs  $1.01 \pm 0.11$ ), P21 ( $0.89 \pm 0.07$  vs  $0.21 \pm 0.03$ ) and Bax ( $0.80 \pm 0.05$  vs  $0.18 \pm 0.02$ ) protein levels and cell apoptosis rate ( $26.67\% \pm 2.68\%$  vs  $7.22\% \pm 0.68\%$ ) in H/R group were increased ( $t=7.029, 12.591, 12.790, 12.102$ ), while Cyclin D1 ( $0.20 \pm 0.03$  vs  $0.78 \pm 0.06$ ) and Bcl-2 ( $0.11 \pm 0.02$  vs  $0.71 \pm 0.06$ ) protein levels and cell proliferation activity were decreased ( $t=13.671; 11.047; 11.333, 11.485, 12.511$ ), the differences were statistically significant (all  $P<0.01$ ). Nox4 was a target gene of miR-330-5p, and miR-330-5p negatively regulates Nox4 expression. Inhibition of miR-330-5p expression or overexpression of Nox4 can promote the expression of Cyclin D1 and Bcl-2 proteins ( $t=9.664, 7.548$ ), inhibit the expression

作者简介: 黄毅 (1984-), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 冠心病、心律失常、高血压, E-mail: huangyiyx@163.com。

通讯作者: 王琮翰 (1989-), 男, 硕士研究生, 中级职称, 研究方向: 心血管内科相关疾病, E-mail: 511856036@qq.com。

of P21 and Bax proteins, enhance the proliferation activity of cardiomyocytes ( $t=10.184, 10.314$ ), enhance the proliferation activity of myocardial cells ( $t=6.667\sim 9.126$ ) and inhibit cell apoptosis ( $t=10.341$ ), and the differences were statistically significant (all  $P<0.01$ ). Inhibition of Nox4 expression can reverse the effects of miR-330-5p on proliferation( $t=4.146\sim 7.941$ , all  $P<0.05$ ) and apoptosis of H/R cardiomyocytes ( $t=6.285\sim 11.358$ , all  $P<0.01$ ). **Conclusion** H/R-induced expression of miR-330-5p is up-regulated in rat cardiomyocytes. Inhibition of miR-330-5p may inhibit cardiomyocyte apoptosis through targeting Nox4, and play a protective role in myocardial cell damage in H/R rats.

**Keywords:** miR-330-5p; Nox4; hypoxia/reoxygenation; cardiomyocytes; apoptosis

缺血性心脏病是心血管疾病死亡的主要原因,再灌注治疗作为心肌缺血最有效的治疗方法,可导致额外的组织损伤和病理重塑,即心肌缺血再灌注损伤<sup>[1]</sup>。近年研究发现,心肌细胞凋亡在心肌缺血再灌注损伤的病理过程中发挥重要作用,其可扩大心肌梗死范围,进而引起心室重构<sup>[2-3]</sup>。因此,抑制心肌细胞凋亡是防治缺血性心脏病的有效途径。微小RNA(miRNA)是一类在不同组织器官中广泛表达的短链非编码RNA,其表达水平与心脏功能密切相关,参与调控血管生成、心脏发育以及缺血再灌注损伤<sup>[4-6]</sup>。研究显示,miR-330-5p可介导参与心肌缺血再灌注损伤,与心肌细胞抗炎、抗氧化作用密切相关<sup>[7]</sup>。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, Nox4)是NOX家族成员之一,研究发现Nox4在缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的心肌细胞中表达增加,下调Nox4可加重H/R诱导的氧化应激和心肌细胞损伤<sup>[8]</sup>。生物学在线软件预测也显示,miR-330-5p与Nox4互为靶标,但miR-330-5p是否靶向Nox4参与心脏心肌缺血再灌注损伤尚未可知。因此本研究通过构建H/R大鼠心肌细胞损伤模型,拟探讨miR-330-5p和Nox4对心肌细胞损伤的影响及其可能的潜在作用机制,现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 大鼠胚胎心肌细胞H9C2(南京科佰生物),采用含10 g/dl胎牛血清的DMEM培养液在37℃,5%(v/v)CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养,胰酶消化后进行传代,取第三代长势良好的对数生长期细胞进行实验。

1.2 主要试剂和仪器 DMEM培养液、胎牛血清和Hank's液(批号:171102,181401,180513,美国Hyclone公司);anti-miR-NC,miR-NC,miR-330-5p mimics,anti-miR-330-5p,pcDNA3.1,pcDNA3.1-Nox4,si-NC,WT-Nox4,si-Nox4,MUT-Nox4质粒以及PCR引物由上海生工生物工程公司提供;Lipofectamine™ 2000(批号:171123,美国Invitrogen公司);MTT试剂盒,BCA检测试剂盒,凋亡试剂盒(批号:151101,160224,170203,上海

碧云天生物科技有限公司);SYBR Green 荧光试剂盒(批号:161120,美国Biomiga公司);Nox4抗体,细胞周期素D1(Cyclin D1)抗体,P21抗体,B淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)抗体,Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X, Bax)抗体,GAPDH抗体、山羊抗兔IgG(批号:ab109225,ab16663,ab109520,ab194583,ab9485,ab32503,ab205718,英国Abcam美国分公司);7500型荧光定量PCR仪(美国ABI公司);Elx800酶标仪(美国BIO-TEK公司);EPICS® ALTRA™型流式细胞仪(美国Beckman公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 H/R模型的构建:参照文献[9]构建H9C2细胞H/R模型,将Hank's液置于缺氧培养箱[含95%(v/v)的N<sub>2</sub>和5%(v/v)的CO<sub>2</sub>]内30 min,使缺氧气体充分进入Hank's液,用Hank's液替换细胞培养液置于缺氧培养箱内缺氧2h,更换新鲜糖DMEM培养液在37℃,5%(v/v)的CO<sub>2</sub>培养箱中复氧培养16h。

1.3.2 细胞分组及转染:将H9C2细胞分为对照组(Con,不做任何处理)、模型组(H/R组)、转染anti-miR-NC+缺氧/复氧组(H/R+anti-miR-NC组)、转染anti-miR-330-5p+缺氧/复氧组(H/R+anti-miR-330-5p组)、转染pcDNA3.1+缺氧/复氧组(H/R+pcDNA3.1组)、转染pcDNA3.1-Nox4+缺氧/复氧组(H/R+pcDNA3.1-Nox4组)、共转染anti-miR-330-5p+si-NC+缺氧/复氧组(H/R+anti-miR-330-5p+si-NC组)、共转染anti-miR-330-5p+si-Nox4+缺氧/复氧组(H/R+anti-miR-330-5p+si-Nox4组)。将对数期H9C2细胞按照 $2\times 10^5$ /孔接种于6孔板,当细胞汇合度约为60%时,采用脂质体转染法利用Lipofectamine™ 2000按照以上分组分别将待转染物转染至H9C2细胞中。

1.3.3 实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测miR-330-5p表达水平:收集各组细胞,使用TRIzol试剂提取细胞总RNA,逆转为cDNA,荧光定量PCR试剂盒进行PCR扩增,反应条件为95℃ 5min,95℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 30s,共40个循环。引物序列如下:miR-330-5p上游引

物 5'-TCTCTGGGCCTGTGTCTTAGGC-3', 下游引物 5'-GCTATCTCAGGGCTTGTGCTTCAGTCCTCCTGGG-3'; 内参 GAPDH 上游引物 5'-GCCC CAGACGATTCGCT-3', 下游引物 5'-CCACGAAGA ATTCTCTTGGT-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 miR-330-5p 的相对表达水平。

1.3.4 MTT 法检测细胞增殖活力: 将各组对数期 H9C2 细胞按照  $1 \times 10^5$ /孔接种于 96 孔板, 分别在培养 24, 48, 72h 时向每孔加入 20  $\mu$ l 的 MTT 试剂, 继续培养 4h。终止培养, 吸取孔内培养液, 每孔加入 150  $\mu$ l 的 DMSO, 摇床低速震荡 10 min, 当结晶充分溶解后, 酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度值 ( $A$  值)。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡: 采用膜联蛋白 V / 碘化丙啶 (Annexin V /PI) 进行检验。用磷酸盐缓冲液洗各组细胞, 悬浮于适量结合缓冲液, 将  $5 \times 10^5$  个/孔的细胞收集, 按照 FITC-Annexin V 试剂盒说明书用 Annexin V /PI 染色细胞, 避光孵育 15 min, 采用流式细胞术对标记的细胞进行分析。

1.3.6 Western blot 检测 Nox4, Cyclin D1, P21, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达: 采用放射免疫沉淀测定法 (RIPA) 裂解液提取各组细胞总蛋白, 二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白浓度。凝胶电泳蛋白, 电转至 PVDF 膜, 封闭, 加稀释的 Nox4 (1 : 1 000), Cyclin D1 (1 : 500), P21 (1 : 1 000), Bax (1 : 500), Bcl-2 (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 2 500) 一抗, 4℃孵育过夜。次日加入二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 1h, 化学发光试剂显色, 拍照, 计算目的蛋白的表达量。

1.3.7 双荧光素酶报告基因检测: 运用 Targetscan 生物信息学网站 ([https://www.targetscan.org/vert\\_72/](https://www.targetscan.org/vert_72/)) 预测 miR-330-5p 与 Nox4 间的结合位点。构建包含 miR-330-5p 结合位点在内的 Nox4 3'-UTR 荧光素酶报告基因载体, 包括野生型 Nox4

(WT-Nox4) 和突变型 Nox4 (MUT-Nox4) 质粒, 用 Lipofectamine 3000 将野生型和突变型 Nox4 质粒和 miR-NC, miR-330-5p 共转染至 H9C2 细胞 48 h, 收集细胞, 使用双荧光素酶报告基因系统测量荧光素酶活性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 进行统计分析, 实验数据经 K-S 法检验符合正态分布, 故采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较采用 SNK- $q$  检验。  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 miR-330-5p 在 H/R 心肌细胞模型中的表达 qRT-PCR 检测显示, 与 Con 组相比, H/R 组细胞中 miR-330-5p 相对表达 ( $1.96 \pm 0.20$  vs  $1.01 \pm 0.10$ ) 明显升高, 差异具有统计学意义 ( $t=7.029$ ,  $P < 0.01$ )。

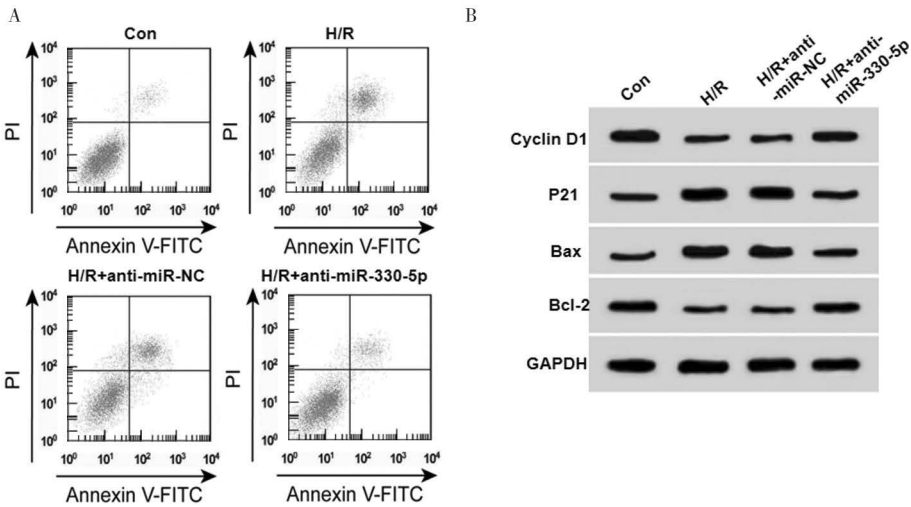
2.2 抑制 miR-330-5p 对 H/R 模型细胞损伤的影响 见表 1 和图 1。qRT-PCR 检测显示, 与 Con 组相比, H/R 组细胞中 miR-330-5p 相对表达水平明显升高 ( $t=6.838$ ,  $P < 0.01$ ); 与 H/R 组和 (或) H/R+anti-miR-NC 组相比, H/R+anti-miR-330-5p 组细胞中 miR-330-5p 相对表达则明显降低 ( $t=4.679$ ,  $4.823$ , 均  $P < 0.01$ ), 说明抑制 miR-330-5p 表达的 H/R 细胞模型建立成功。MTT 法、流式细胞术及 Western blot 检测发现, 与 Con 组比较, H/R 组细胞增殖活性 ( $t=11.333$ ,  $11.485$ ,  $12.511$ ) 及凋亡相关蛋白 Cyclin D1 和 Bcl-2 水平显著降低 ( $t=13.671$ ,  $11.047$ ), 细胞凋亡率及 P21 和 Bax 蛋白水平升高 ( $t=12.102$ ,  $12.591$ ,  $12.790$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 与 H/R 组相比, H/R+anti-miR-330-5p 组细胞增殖活性 ( $t=6.667$ ,  $7.951$ ,  $9.384$ ) 及 Cyclin D1 和 Bcl-2 蛋白表达明显升高 ( $t=9.664$ ,  $7.548$ ), 细胞凋亡率、P21 和 Bax 蛋白表达明显降低 ( $t=10.341$ ,  $10.184$ ,  $10.314$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。

表 1 抑制 miR-330-5p 对 H/R 模型细胞增殖和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	Con 组	H/R 组	H/R+anti-miR-NC 组	H/R+anti-miR-330-5p 组	F 值	P 值
miR-330-5p mRNA	$1.01 \pm 0.11$	$1.96 \pm 0.20$	$1.98 \pm 0.21$	$1.31 \pm 0.14$	25.595	$< 0.001$
细胞活性 ( $A$ 值)						
24h	$0.55 \pm 0.05$	$0.21 \pm 0.02$	$0.23 \pm 0.03$	$0.41 \pm 0.04$	63.347	$< 0.001$
48h	$0.84 \pm 0.07$	$0.32 \pm 0.04$	$0.34 \pm 0.03$	$0.68 \pm 0.07$	60.427	$< 0.001$
72h	$1.03 \pm 0.04$	$0.39 \pm 0.05$	$0.40 \pm 0.04$	$0.87 \pm 0.10$	77.319	$< 0.001$
细胞凋亡率 (%)	$7.22 \pm 0.68$	$26.67 \pm 2.68$	$26.57 \pm 2.61$	$10.05 \pm 1.02$	84.523	$< 0.001$
Cyclin D1 蛋白	$0.78 \pm 0.06$	$0.20 \pm 0.03$	$0.18 \pm 0.02$	$0.61 \pm 0.07$	99.880	$< 0.001$
P21 蛋白	$0.21 \pm 0.03$	$0.89 \pm 0.07$	$0.92 \pm 0.08$	$0.34 \pm 0.04$	92.754	$< 0.001$
Bax 蛋白	$0.18 \pm 0.02$	$0.80 \pm 0.05$	$0.78 \pm 0.06$	$0.30 \pm 0.05$	87.915	$< 0.001$
Bcl-2 蛋白	$0.71 \pm 0.06$	$0.11 \pm 0.02$	$0.12 \pm 0.03$	$0.52 \pm 0.06$	60.584	$< 0.001$

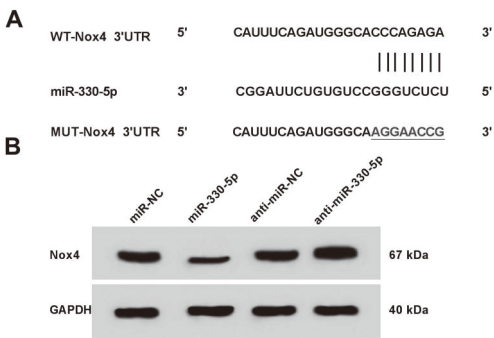
2.3 miR-330-5p 靶向调控 Nox4 表达 在线软件预测显示, miR-330-5p 与 Nox4 存在结合位点 (见图 2A)。双荧光素酶报告基因检测分析发现, 与 miR-NC 组比较, miR-330-5p mimics 组 ( $0.33 \pm 0.04$  vs  $1.02 \pm 0.10$ ) 细胞中 WT-Nox4 荧光素酶活性显著下降 ( $t=4.765, P<0.01$ ), 而 miR-330-5p mimics 组的 MUT-Nox4 荧光素酶活性较 miR-NC 组 ( $1.03 \pm 0.10$  vs  $1.01 \pm 0.10$ ) 无

明显变化 ( $t=-0.245, P>0.05$ )。进一步 Western blot 检测显示, miR-330-5p 组细胞中 Nox4 蛋白 ( $0.23 \pm 0.04$ ) 水平较 miR-NC 组 ( $1.01 \pm 0.10$ ) 明显降低 ( $t=9.553, P<0.01$ ), anti-miR-330-5p 组细胞中 Nox4 蛋白水平 ( $1.55 \pm 0.13$ ) 较 anti-miR-NC 组 ( $1.03 \pm 0.10$ ) 明显升高 ( $t=-8.363, P<0.01$ ), 见图 2B, 说明 miR-330-5p 靶向负调控 Nox4 蛋白表达。



A. 流式细胞术检测各组 H/R 模型细胞凋亡; B. Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白表达。

图 1 抑制 miR-330-5p 对 H/R 模型细胞凋亡及相关蛋白表达的影响



A. 在线软件预测 miR-330-5p 与 Nox4 的结合位点; B. miR-330-5p 对 Nox4 蛋白表达的影响。

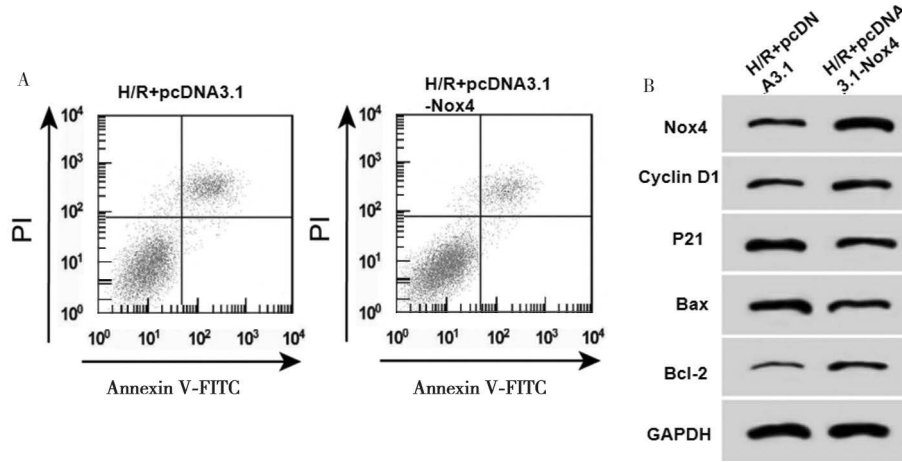
图 2 miR-330-5p 与 Nox4 靶向调控关系验证

表 2		过表达 Nox4 对 H/R 模型细胞活性和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )				
项目		H/R 组	H/R+pcDNA3.1 组	H/R+pcDNA3.1-Nox4 组	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
Nox4 mRNA		0.26 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.89 ± 0.06	250.959	<0.001
	24h	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.48 ± 0.05	55.500	<0.001
细胞活性 ( <i>A</i> 值)	48h	0.32 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.60 ± 0.05	37.316	<0.001
	72h	0.39 ± 0.05	0.41 ± 0.06	0.92 ± 0.07	73.827	<0.001
细胞凋亡率 (%)		26.67 ± 2.68	26.64 ± 2.57	12.23 ± 1.12	41.501	<0.001
Cyclin D1 蛋白		0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.53 ± 0.06	55.230	<0.001
P21 蛋白		0.89 ± 0.07	0.93 ± 0.06	0.46 ± 0.05	55.555	<0.001
Bax 蛋白		0.80 ± 0.05	0.79 ± 0.06	0.38 ± 0.04	67.130	<0.001
Bcl-2 蛋白		0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.46 ± 0.05	126.100	<0.001

2.4 过表达 Nox4 对 H/R 模型细胞损伤的影响 见图 3 和表 2。qRT-PCR 检测显示, 与 H/R 组相比, H/R+pcDNA3.1-Nox4 组细胞中 Nox4 相对表达明显升高 ( $t=19.092, P<0.01$ ), 说明过表达 Nox4 的 H/R 模型细胞建立成功。MTT 法、流式细胞术及 Western blot 检测显示, 与 H/R 组相比, H/R+pcDNA3.1-Nox4 组细胞增殖活性( $t=9.291, 7.867, 10.720$ ) 及 Cyclin D1, Bcl-2 蛋白表达明显升高 ( $t=8.963, 13.555$ ), 而细胞凋亡率及 P21, Bax 蛋白表达明显降低 ( $t=7.898, 8.697, 10.153$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。

2.5 抑制 Nox4 能逆转抑制 miR-330-5p 对 H/R 模型细胞损伤的影响 见表 3 和图 4。qRT-PCR 检测显示,与 H/R+anti-miR-330-5p 组相比,共转染抑制 Nox4 表达显著促进 miR-330-5p 相对表达,降低 Nox4 相对表达水平(均  $P<0.01$ )。MTT 法、流式

细胞术及 Western blot 检测发现,与 H/R+anti-miR-330-5p 组相比,共转染抑制 Nox4 表达显著抑制了细胞增殖活性及 Cyclin D1 和 Bcl-2 蛋白表达,促进了细胞凋亡及 P21 和 Bax 蛋白表达,差异具有统计学意义(均  $P<0.01$ )。



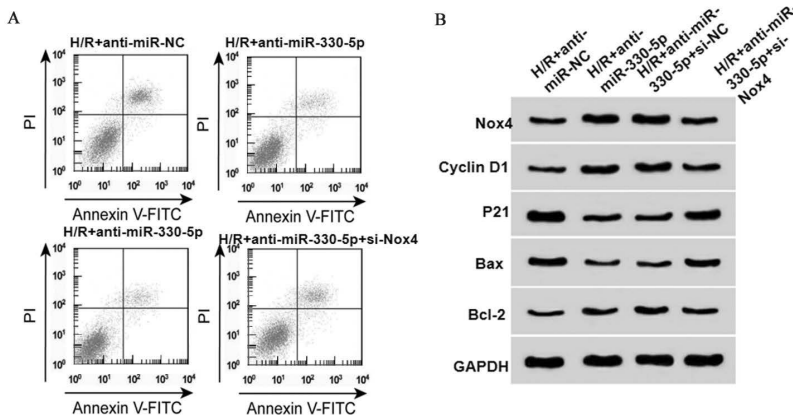
A. 流式细胞术检测各组 H/R 模型细胞凋亡; B. Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白表达。

图 3 过表达 Nox4 对 H/R 模型细胞凋亡及相关蛋白表达的影响

表 3 抑制 Nox4 能逆转抑制 miR-330-5p 对 H/R 模型细胞活性和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

项 目	H/R+anti-miR-NC 组	H/R+anti-miR-330-5p 组	H/R+anti-miR-330-5p+si-NC 组	H/R+anti-miR-330-5p+si-Nox4 组	F 值	P 值	
miR-330-5p mRNA	1.98 ± 0.21	1.31 ± 0.14 <sup>*</sup>	1.34 ± 0.12	1.81 ± 0.15 <sup>#</sup>	13.511	<0.001	
Nox4 mRNA	0.24 ± 0.02	0.81 ± 0.08 <sup>*</sup>	0.79 ± 0.08	0.36 ± 0.03 <sup>#</sup>	73.021	<0.001	
细胞活性 (A 值)	24h	0.23 ± 0.03	0.41 ± 0.04 <sup>*</sup>	0.43 ± 0.05	0.28 ± 0.03 <sup>#</sup>	19.441	<0.001
	48h	0.34 ± 0.03	0.68 ± 0.07 <sup>*</sup>	0.70 ± 0.06	0.39 ± 0.04 <sup>#</sup>	38.936	<0.001
	72h	0.40 ± 0.04	0.87 ± 0.10 <sup>*</sup>	0.90 ± 0.10	0.55 ± 0.06 <sup>#</sup>	28.540	<0.001
细胞凋亡率 (%)	26.57 ± 2.61	10.05 ± 1.02 <sup>*</sup>	10.10 ± 1.03	19.27 ± 2.00 <sup>#</sup>	59.362	<0.001	
Cyclin D1 蛋白	0.18 ± 0.02	0.61 ± 0.07 <sup>*</sup>	0.63 ± 0.06	0.27 ± 0.03 <sup>#</sup>	65.418	<0.001	
P21 蛋白	0.92 ± 0.08	0.34 ± 0.04 <sup>*</sup>	0.32 ± 0.03	0.76 ± 0.07 <sup>#</sup>	79.159	<0.001	
Bax 蛋白	0.78 ± 0.06	0.30 ± 0.05 <sup>*</sup>	0.32 ± 0.03	0.73 ± 0.04 <sup>#</sup>	92.779	<0.001	
Bcl-2 蛋白	0.12 ± 0.03	0.52 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.53 ± 0.05	0.20 ± 0.03 <sup>#</sup>	69.101	<0.001	

注: \* 与 H/R+miR-NC 组比较,  $t_{\text{miR-330-5p}}=5.174$ ,  $t_{\text{Nox4}}=11.758$ ,  $t_{\text{细胞活性}}=5.740, 7.941, 7.252$ ,  $t_{\text{凋亡率}}=11.261$ ,  $t_{\text{Cyclin D1}}=10.640$ ,  $t_{\text{P21}}=12.094$ ,  $t_{\text{Bax}}=12.678$ ,  $t_{\text{Bcl-2}}=11.024$ , 均  $P<0.05$ ; # 与 H/R+anti-miR-330-5p 组比较,  $t_{\text{miR-330-5p}}=3.861$ ,  $t_{\text{Nox4}}=9.283$ ,  $t_{\text{细胞活性}}=4.146, 6.773, 4.938$ ,  $t_{\text{凋亡率}}=6.285$ ,  $t_{\text{Cyclin D1}}=8.413$ ,  $t_{\text{P21}}=8.758$ ,  $t_{\text{Bax}}=11.358$ ,  $t_{\text{Bcl-2}}=8.819$ , 均  $P<0.05$ 。



A. 流式细胞术检测各组 H/R 模型细胞凋亡; B. Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白表达。

图 4 共转染抑制 Nox4 和 miR-330-5p 对 H/R 模型凋亡及相关蛋白表达的影响

### 3 讨论

近年随着对 miRNA 研究的不断深入,发现 miRNA 在心血管疾病中发挥重要作用,例如 miR-122, miR-496, miR-98 等异常表达已被证实与心肌缺血再灌注损伤密切相关<sup>[10-11]</sup>。miR-330-5p 是一种多能 miRNA,其表达改变与非小细胞肺癌、胶质瘤等<sup>[12-13]</sup>肿瘤细胞的恶性表型相关。且既往研究显示,下调 miR-330-5p 表达可减轻阿霉素诱导的心肌细胞损伤和功能障碍<sup>[14]</sup>。本研究显示,在 H/R 诱导的大鼠心肌细胞损伤模型中 miR-330-5p 表达上调,抑制其表达明显促进了大鼠心肌细胞增殖,抑制了细胞凋亡,与 HAN 等<sup>[14]</sup>报道观点一致,提示 miR-330-5p 在心肌缺血再灌注损伤中发挥心脏保护作用,有望成为心肌缺血再灌注损伤的治疗靶点。

为探讨 miR-330-5p 在 H/R 诱导的心肌细胞损伤中的作用机制,研究利用 TargetScan 生物信息学网站进行靶基因预测,发现 Nox4 是 miR-330-5p 潜在靶基因。既往研究显示, Nox4 在心肌细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞中均呈不同程度的表达,与心血管疾病的发生关系密切<sup>[15]</sup>。内皮细胞 Nox4 缺失导致白细胞黏附增加,加速动脉粥样硬化模型中斑块的形成, Nox4 是抗动脉粥样硬化进展的内源性保护系统<sup>[16]</sup>。Nox4 通过抑制血管内皮细胞凋亡,促进其迁移和血管形成对抗 H/R 损伤<sup>[17]</sup>。本研究证实 miR-330-5p 负性调控 Nox4 表达,进一步研究显示,过表达 Nox4 可以促进 H/R 诱导的心肌细胞增殖,抑制细胞凋亡,同时发现抑制 Nox4 能够逆转抑制 miR-330-5p 对 H/R 模型细胞增殖和凋亡的影响。以上结果提示, miR-330-5p 靶向 Nox4 在心肌细胞 H/R 损伤中发挥重要作用,为心肌缺血再灌注损伤研究提供了可靠的靶标。然而本研究仅通过细胞实验分析了 miR-330-5p 在心肌细胞 H/R 损伤中的作用及可能机制,仍有待进一步通过设计大鼠体内实验进行验证分析,其次本研究主要探究了 miR-330-5p 与下游靶基因间的调控关系,且下游靶基因较多,其调控机制仍需进一步研究,而研究 miR-330-5p 上游靶标也是今后分析其发挥作用的新的思路和方向。

综上所述, H/R 诱导的大鼠心肌细胞中 miR-330-5p 表达上调,抑制 miR-330-5p 可能通过靶向 Nox4 抑制心肌细胞凋亡,对缺氧复氧大鼠心肌细胞损伤起到保护作用。

### 参考文献:

[1] STONE P H, LIBBY P, BODEN W E. Fundamental pathobiology of coronary atherosclerosis and clinical implications for chronic ischemic heart disease

management-the plaque hypothesis: a narrative review[J]. JAMA Cardiology, 2023, 8(2): 192-201.

- [2] DU Yunhui, ZHANG Shihan, YU Haicun, et al. Autoantibodies against  $\beta$ 1-adrenoceptor exaggerated ventricular remodeling by inhibiting CTRP9 expression[J]. Journal of the American Heart Association, 2019, 8(4): e010475.
- [3] XIA Peng, CHEN Jingrui, LIU Yuening, et al. Doxorubicin induces cardiomyocyte apoptosis and atrophy through cyclin-dependent kinase 2-mediated activation of forkhead box O1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(13): 4265-4276.
- [4] VISHNOI A, RANI S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an updated overview[J]. Methods in Molecular Biology, 2023, 2595: 1-12.
- [5] 刘龙梅, 石懿玉, 杨霞, 等. 急性缺氧诱导小鼠心肌细胞微小 RNA-34a 升高和凋亡实验研究 [J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(10): 1295-1298, 1303.
- LIU Longmei, SHI Yiyu, YANG Xia, et al. Experimental study of microRNA-34a elevation and apoptosis in mouse cardiomyocytes induced by acute hypoxia[J]. Shaanxi Medical Journal, 2023, 52(10): 1295-1298, 1303.
- [6] 李敏, 陈霞, 何偲, 等. 缺血性心力衰竭患者血清 miR-34 表达水平与心室重构和预后的相关性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(4): 67-71.
- LI Min, CHEN Xia, HE Si, et al. Correlation between serum miR-34 expression and ventricular remodeling and prognosis in patients with ischemic heart failure[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(4): 67-71.
- [7] ZUO Wei, TIAN Ran, CHEN Qian, et al. MiR-330-5p inhibits NLRP3 inflammasome-mediated myocardial ischaemia-reperfusion injury by targeting TIM3[J]. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2021, 35(4): 691-705.
- [8] SHI Yan, HOU Shuai. Protective effects of metformin against myocardial ischemia-reperfusion injury via AMPK-dependent suppression of NOX4[J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 24(4): 712.
- [9] 陈悦, 李青, 吕文君, 等. miR-206-3p 在缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤中的作用及机制的研究 [J]. 解剖科学进展, 2022, 28(05):543-546, 550.
- CHEN Yue, LI Qing, LÜ Wenjun, et al. Effect of miR-206-3p in H9C2 cardiomyocyte injury induced by hypoxia/reoxygenation[J]. Progress of Anatomical Sciences, 2022, 28(05): 543-546, 550.
- [10] JIN Yongping, NI Shimao. MiR-496 remedies hypoxia reoxygenation-induced H9C2 cardiomyocyte apoptosis via hook3-targeted PI3k/Akt/mTOR signaling pathway activation[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 121(1): 698-712.
- [11] ZHAI Changlin, TANG Guanmin, QIAN Gang, et al. MicroRNA-98 attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury through inhibiting DAPK1 expression[J]. IUBMB Life, 2019, 71(2): 166-176.
- [12] CHEN Jiansheng, CHEN Taoliang, ZHU Yubo, et al.

- of Ophthalmologist Branch of Chinese Medical Doctor Association. Evidence-based guidelines for diagnosis and treatment of diabetic retinopathy in China(2022)[J]. Chinese Journal of Ocular Fundus Diseases, 2023, 39(2): 99-124.
- [9] 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南 (2014 年)[J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(11): 851-865.
- Fundus Disease Group of Ophthalmology Society of Chinese Medical Association. Evidence-based guidelines for diagnosis and treatment of diabetic retinopathy in China(2014)[J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 2014, 50(11): 851-865.
- [10] KLOPF J, BROSTJAN C, EILENBERG W, et al. Neutrophil extracellular traps and their implications in cardiovascular and inflammatory disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 559.
- [11] 金忆瀛, 李玲, 厉平. 中性粒细胞胞外陷阱及其抑制剂 SerpinB1 与 2 型糖尿病的关系 [J]. 中国医师杂志, 2020, 22(9): 1438-1440, F0003.
- JIN Yiyang, LI Ling, LI Ping. Relationship between neutrophil extracellular trap and its inhibitor serpinb1 and type 2 diabetes mellitus[J]. Journal of Chinese Physician, 2020, 22(9): 1438-1440, F0003.
- [12] 郑桂莲, 耿晓慧, 张莎莎, 等. 中性粒细胞胞外陷阱、炎症蛋白水平对全膝关节置换术后下肢深静脉血栓形成预测价值分析 [J]. 安徽医药, 2022, 26(6): 1128-1132.
- ZHENG Guilian, GENG Xiaohui, ZHANG Shasha, et al. Analysis of the predictive value of neutrophil extracellular traps and inflammatory protein levels for lower extremity deep vein thrombosis after total knee arthroplasty[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2022, 26(6): 1128-1132.
- [13] BASYREVA L Y, SHMELEVA E V, IVANOV V A, et al. The effect of vitamin D3 on neutrophil extracellular trap formation in high-glucose conditions[J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2023, 176(2): 137-142.
- [14] 陈加玉, 滕岩, 杨明明. 炎症调控因子在糖尿病视网膜病变新生血管形成中的作用 [J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(8): 1390-1393.
- CHEN Jiayu, TENG Yan, YANG Mingming. Role of inflammatory regulators in neovascularization of diabetic retinopathy[J]. International Eye Science, 2021, 21(8): 1390-1393.
- [15] MARTÍNEZ-ALBERQUILLA I, GASULL X, PÉREZ-LUNA P, et al. Neutrophils and neutrophil extracellular trap components: Emerging biomarkers and therapeutic targets for age-related eye diseases[J]. Ageing Research Reviews, 2022, 74: 101553.
- [16] 庄宪丽, 张莹, 杨家干, 等. 基于 VEGF-VEGFR 通路探究 Avastin 对 DR 模型大鼠干预效果 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(4): 955-959.
- ZHUANG Xianli, ZHANG Ying, YANG Jiagan, et al. Explore the intervention effect of Avastin on DR model rats based on VEGF-VEGFR pathway[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2023, 43(4): 955-959.
- [17] WANG Luo ziyi, ZHOU Xin, YIN Yizhou, et al. Hyperglycemia induces neutrophil extracellular traps formation through an NADPH oxidase-dependent pathway in diabetic retinopathy[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 3076.
- [18] 王罗梓怡. 高糖诱导中性粒细胞胞外陷阱在糖尿病性视网膜病变中的作用机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019: 1-53.
- WANG Luoziyi. Hyperglycemia induces neutrophil extracellular traps formation through an NADPH oxidase-dependent pathway in diabetic retinopathy[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2019: 1-53.
- [19] MAGAÑA-GUERRERO F S, AGUAYO-FLORES J E, BUENTELLO-VOLANTE B, et al. Spontaneous neutrophil extracellular traps release are inflammatory markers associated with hyperglycemia and renal failure on diabetic retinopathy[J]. Biomedicine, 2023, 11(7): 1791.
- 收稿日期: 2023-11-27  
修回日期: 2024-03-05
- (上接第 53 页)
- CircPTN sponges miR-145-5p/miR-330-5p to promote proliferation and stemness in glioma[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2019, 38(1): 398.
- [13] WANG Yuanyong, XU Rongjian, ZHANG Dongyang, et al. Circ-ZKSCAN1 regulates FAM83A expression and inactivates MAPK signaling by targeting miR-330-5p to promote non-small cell lung cancer progression[J]. Translational Lung Cancer Research, 2019, 8(6): 862-875.
- [14] HAN Dong, WANG Yongjun, WANG Yabin, et al. The tumor-suppressive human circular RNA circITCH sponges miR-330-5p to ameliorate Doxorubicin-induced cardiotoxicity through upregulating SIRT6, survivin, and SERCA2a[J]. Circulation Research, 2020, 127(4): e108-e125.
- [15] 梁雨亭, 刘文秀, 塔娜, 等. NOX4 在心血管疾病中的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2019, 40(2): 212-215.
- LIANG Yuting, LIU Wenxiu, TA Na, et al. NOX4 in cardiovascular diseases[J]. Advances in Cardiovascular Diseases, 2019, 40(2): 212-215.
- [16] YU Weimin, LI Siqi, WU Haixia, et al. Endothelial Nox4 dysfunction aggravates atherosclerosis by inducing endoplasmic reticulum stress and soluble epoxide hydrolase[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2021, 164: 44-57.
- [17] XIAO Lili, GU Yulei, REN Gaofei, et al. MiRNA-146a mimic inhibits NOX4/P38 signalling to ameliorate mouse myocardial ischaemia reperfusion (I/R) injury[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 6366254.
- 收稿日期: 2024-03-07  
修回日期: 2024-05-14