

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.16.007

miR-21 在大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤中的作用机制研究*

王 俭¹ 樊 霞^{1Δ} 贾世英¹ 刘 静¹ 孟宪猛¹ 黄海东¹ 陈 悦²

(1 武警辽宁省总队医院检验与病理科 辽宁 沈阳 110034; 2 武警辽宁省总队医院内科 辽宁 沈阳 110034)

摘要 目的:探讨微小 RNA-21(miR-21)在大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤中的作用机制。**方法:**选取 50 只 SPF 级 Wistar 大鼠并随机分为 5 组(n=10),分别为对照组、模型组、模型+阴性对照组、模型+miR-21 组和模型+miR-21 抑制物组。通过结扎大鼠左冠前降支进行建模。建模成功后采用高频彩色超声诊断仪检查各组大鼠的心脏功能指标:心脏射血分数(EF)、左室收缩期峰值压力(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)和缩短分数(FS)。检测各组大鼠心肌梗死面积和心肌细胞凋亡率。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定各组心肌组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)的含量。采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测心肌组织中 miR-21 的表达水平。蛋白免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠心肌凋亡蛋白和 TLR4/NF- κ B 表达水平。**结果:**模型组大鼠出现心肌梗死,提示建模成功,建模后大鼠心肌组织中 miR-21 的表达水平显著下降,提示 miR-21 可能具有保护心肌细胞的作用。建模成功后,EF、LVSP 和 FS 下降,LVEDP 升高,心肌细胞凋亡率显著升高,TNF- α 和 IL-6 表达水平显著升高,IL-10 显著下降,Bcl-2/Bax 表达下降,Caspase-3 表达升高,大鼠心肌细胞 TLR4 和 NF- κ B 蛋白磷酸化表达水平升高,而模型+miR-21 组上述指标均得到改善。**结论:**大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤导致 miR-21 表达降低,而过表达 miR-21 能有效抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,降低大鼠心肌凋亡水平和炎症因子的释放,从而发挥保护心肌细胞的作用。

关键词:miR-21; 大鼠; 心肌细胞; 缺血再灌注损伤; 作用机制

中图分类号:R-33;R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)16-3030-06

Study on the Mechanism of miR-21 in Rat Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*

WANG Jian¹, FAN Xia^{1Δ}, JIA Shi-ying¹, LIU Jing¹, MENG Xian-meng¹, HUANG Hai-dong¹, CHEN Yue²

(1 Department of Laboratory and Pathology, Liaoning Armed Police Corps Hospital, Shenyang, Liaoning, 110034, China;

2 Department of Internal Medicine, Liaoning Armed Police Corps Hospital, Shenyang, Liaoning, 110034, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of microRNA-21 (miR-21) in rat myocardial ischemia-reperfusion injury.

Methods: Fifty SPF Wistar rats were selected and randomly divided into 5 groups (n=10), including control group, model group, model + negative control group, model + miR-21 group and model + miR-21 inhibitor group. The model was established by ligation of the left anterior descending coronary artery in rats. After the successful modeling, high-frequency color ultrasound for small animals was used to examine the cardiac function indexes of rats in each group: cardiac ejection fraction (EF), left ventricular peak systolic pressure (LVSP), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) and shortening fraction (FS). Myocardial infarction size and apoptosis rate of myocardial cells were measured. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in myocardial tissues were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression level of miR-21 in myocardial tissue. The expression levels of apoptosis protein and TLR4/NF- κ B were detected by western blot. **Results:** Myocardial infarction occurred in rats in the model group, indicating that the modeling was successful. After modeling, the expression level of miR-21 in rat myocardial tissue decreased significantly, suggesting that miR-21 may protect myocardial cells. After successful modeling, EF, LVSP and FS decreased, LVEDP increased, apoptosis rate of myocardial cells significantly increased, TNF- α and IL-6 expression significantly increased, IL-10 significantly decreased, Bcl-2/Bax expression decreased, caspase-3 expression increased. The expression levels of TLR4 and NF- κ B protein phosphorylation increased in rat cardiomyocytes, while the above indicators were improved in model + miR-21 group. **Conclusion:** Ischemia reperfusion injury of rat cardiomyocytes leads to decreased expression of miR-21, Overexpression of miR-21 can effectively inhibit the TLR4/NF- κ B signaling pathway, reduce the level of myocardial apoptosis and the release of inflammatory factors, and thus play a protective role in myocardial cells.

Key words: miR-21; Rat; Myocardial cell; Ischemia reperfusion injury; Mechanism

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)16-3030-06

* 基金项目:辽宁省自然科学基金项目(2017-ZD-0323)

作者简介:王俭(1976-),男,硕士,主治医师,从事检验、肿瘤病理方向的研究,E-mail: wangjian20082541@163.com

Δ 通讯作者:樊霞(1984-),女,本科,副主任技师,从事临床检验方向的研究,E-mail: 114087225@qq.com

(收稿日期:2022-03-23 接受日期:2022-04-18)

前言

近年来,心血管疾病如冠心病、心肌梗死等的发病率逐渐升高,发生机制涉及多层次、多因素,目前尚不明确,虽然介入治疗及药物治疗能改善治疗效果,但心肌缺血及缺血再灌注会引起心肌代谢功能紊乱,特别是心肌细胞再灌注时会导致心肌细胞损伤更严重甚至死亡,严重影响患者的预后^[1]。研究显示^[2,4], miRNA 在心肌缺血再灌注损伤中发挥重要作用,参与心肌细胞的凋亡过程和炎症反应等。Zhao 等^[3]研究显示 miR-182 可通过调控修饰巨噬细胞的极化状态来减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤。Ding 等^[4]研究显示抑制 MicroRNA-29a 通过靶向 SIRT1、抑制氧化应激和 NLRP3 介导的凋亡通路保护心肌缺血再灌注损伤。微小 RNA-21(miR-21)已被报道在包括心肌细胞在内的多种类型的心血管细胞中高表达,并在心肌缺血再灌注损伤保护中发挥作用^[5,6]。Xu 等^[7]研究显示葛根素诱导内源性 miR-21 表达的增加缓解了心肌缺血再灌注损伤,其潜在机制可能涉及凋亡和氧化应激的抑制。Wang 等^[8] 研究显示吗啡通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤。M2 巨噬源性外泌体携带 microRNA-148a 通过抑制 TXNIP 和 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路减轻心肌缺血 / 再灌注损伤^[9,10]。瑞芬太尼则可通过 miR-206-3p/TLR4/NF- κ B 信号轴保护心脏免受心肌缺血 / 再灌注损伤^[11]。因此,笔者推测 miR-21 保护大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的作用机制可能与 TLR4/NF- κ B 信号通路相关。基于此,本研究探讨 miR-21 在大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤中是否通过 TLR4/NF- κ B 信号通路发挥作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选取 50 只 SPF 级 Wistar 大鼠,购自首都医科大学实验动物科学部[SCXK(京)2021-0019],年龄 8-12 周,雌雄不限,体重 220-280 g,平均(256.8 $\pm$ 9.2)g。饲养条件:环境温度为(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,光 / 黑周期为 12 h,动物饲养室清洁,食物和饮用水充足,光照适度,通风良好。在上述条件下进行适应性喂养 7 d。本实验开始前,大鼠禁食 12 h。本研究获得了中国动物伦理委员会及我院伦理委员会批准同意。

1.2 动物分组及建模

将大鼠随机分为 5 组(n=10),分别为对照组、模型组、模型 + 阴性对照组、模型 + miR-21 组和模型 + miR-21 抑制物组。建模:将大鼠用 10%的水合氯醛麻醉,固定于手术台,对大鼠进行气管内插管并连接呼吸机,潮气量为 3 mL,剃毛、消毒后在第 3/4 肋间行纵切口,撕开心包暴露心脏。结扎大鼠左冠前降支,密切观察大鼠心肌颜色,在心肌由红变为白色且心电图显示 ST 段持续性升高时开始计时,30 min 后,解除左冠前降支结扎,心肌颜色由白色逐渐转变为红色且 ST 段下降时提示再灌注成功。采用 Lip2000 帮助转染空载体质粒、miR-21 和 miR-21 抑制物质粒,均购于上海吉玛制药技术有限公司。对照组大鼠仅进行心脏暴露后缝合,不结扎左冠前降支。模型组大鼠则通过结扎左冠前降支进行建模。模型 + 阴性对照组在建模前 12 h 静脉注射空载体质粒作为阴性对照。模型 + miR-21 组在建模前

12 h 静脉注射 miR-21。模型 + miR-21 抑制物组在建模前 12 h 静脉注射 miR-21 抑制物。建模成功后 24 h 进行检查。

1.3 观察指标

1.3.1 心脏功能 在建模成功 24 h 后麻醉大鼠,采用 Visual Sonics Vevo 2100 小动物专用高频彩色超声诊断仪检查大鼠的心脏射血分数(EF)、左心室收缩期峰值压力(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)和缩短分数(FS),以此来评估每组大鼠的心脏功能。

1.3.2 心肌梗死面积 在测量心脏功能后将大鼠麻醉,再次结扎左冠状动脉。用 4 mL 的 4%伊文思蓝(上海迈瑞尔化学技术有限公司)从心尖注射入心脏。非缺血区染蓝色,缺血区未染蓝色。然后,将心脏切开,用冰生理盐水冲洗。切除多余组织分离左心室,分离蓝区和非蓝区,称重非蓝区。非蓝色区域的组织置于 1% 噻唑蓝(MTT,上海研谨生物科技有限公司)中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min。梗死区深红色,非梗死区苍白色。分离梗死区并称重。心肌梗死面积大小(%)=(梗死区心肌重量 / 缺血区心肌重量) $\times$ 100%。采集组织后,将部分组织制备石蜡切片进行 TUNEL 染色(上海研谨生物科技有限公司),部分组织用液氮冷冻保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中长期保存,用于后续分子生物学研究。

1.3.3 细胞凋亡 每组心肌组织石蜡切片脱蜡,新鲜制备 3% 过氧化氢溶液处理 10 min, PBS 冲洗 3 次,严格按照 TUNEL 试剂盒的说明进行 TUNEL 染色。TUNEL 阳性细胞为黄绿色荧光细胞(凋亡细胞)。染色后切片加抗荧光猝灭液封片,观察并计算缺血区凋亡心肌细胞数量。采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞分析法检测细胞凋亡,严格按照试剂盒(上海欣奥盛生物科技有限公司)说明书进行操作。左下象限为活细胞[Annexin V(-)PI(-)];左上象限为非活细胞,即坏死细胞[Annexin V(-)PI(+)];右上象限为晚调细胞[(Annexin V(+))PI(+)];右下象限为早调细胞[(Annexin V(+))PI(-)]。本实验中凋亡细胞记右上和右下两象限细胞。

1.3.4 炎症指标 严格按照肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-10(IL-10)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉博斯特生物科技有限公司)说明书,测定各组心肌组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的含量。

1.3.5 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测心肌组织中 miR-21 的表达水平 将心肌组织在液氮保存下研磨裂解,用 Trizol 法提取组织总 RNA。用逆转录试剂盒(上海研生实业有限公司)对 RNA 样品进行逆转录测定以合成 cDNA,逆转录反应条件:37 $^{\circ}$ C 下反应 15 min;逆转录酶失活反应条件:85 $^{\circ}$ C 下反应 15 s。用 SYBR Prellix Ex TaqTM 实时 PCR 试剂盒(北京智杰方远科技有限公司)进行 RT-PCR 实验。在 95 $^{\circ}$ C 下激活 DNA 聚合酶 5 min 进行 PCR。反应条件:95 $^{\circ}$ C 下反应 10 s,60 $^{\circ}$ C 下反应 30 s,延伸 75 $^{\circ}$ C 下反应 10 min,最后维持在 4 $^{\circ}$ C,总共进行 40 个循环。miR-21 正向引物:5'-AGGCCCTCTGAACCC-TAAG-3',miR-21 反向引物:5'-CCAGAGGCATACAGGGA-CAAC-3'。GAPDH 正向引物:5'-CTGAACGGGAAGCT-CACTGG-3',miR-21 反向引物:5'-TCCGATGCCTGCTTCAC-TAC-3'。使用 2^{- Δ Δ CT} 法分析 mRNA 表达。

1.3.6 蛋白免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠心肌凋亡蛋白和 TLR4/NF- κ B 表达水平 取心肌组织,加入体积比

为 1:1、1%蛋白酶抑制剂和 1%磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液(北京索莱宝科技有限公司),匀浆至肉眼未见组织碎片。然后在 12000 rpm、4℃下离心 10min,抽取上清即总蛋白,用 BCA 蛋白检测试剂盒(上海晶抗生物工程有限公司)定量分析。然后制备相同浓度的蛋白负载缓冲液,然后进行负载、电泳和膜转移。新鲜配制 5%无脂牛奶封闭 2 h。随后加入一抗(Bcl-2、Bax、Caspase-3、TLR4、NF-κB 和 GAPDH 抗体)在 4℃过夜孵育。复温后,用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(上海银海圣生物科技有限公司)孵育 1 h,并加入增强化学发光(ECL)溶液。最后采用荧光显像技术获取图像。

1.4 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示及 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏功能情况

模型组 EF、LVSP 和 FS 均显著低于对照组,LVEDP 高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);模型+阴性对照组与模型组测得心脏功能指标(EF、LVSP、LVEDP 和 FS)大致相仿,差异无统计学意义($P > 0.05$);模型+miR-21 组 EF、LVSP 和 FS 均显著高于模型组,LVEDP 低于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);模型+miR-21 抑制物组 EF、LVSP 和 FS 均低于模型+miR-21 组,LVEDP 高于模型+miR-21 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明,建模成功后,EF、LVSP 和 FS 下降,LVEDP 升高,而 miR-21 具有改善心脏功能指标的作用。见表 1。

表 1 各组大鼠心脏功能比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of cardiac function of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	EF (%)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	FS (%)
Control group	87.63± 4.02	132.06± 8.19	6.52± 0.76	56.31± 2.13
Model group	53.91± 3.10*	73.61± 5.84*	13.20± 2.45*	30.68± 2.34*
Model + negative control group	52.08± 3.24*	75.09± 5.39*	12.87± 2.51*	31.06± 2.28*
Model + miR-21 group	72.01± 3.67* ^{&@}	94.11± 6.52* ^{&@}	8.76± 1.24* ^{&@}	47.44± 2.51* ^{&@}
Model + miR-21 inhibitor group	63.55± 4.06* ^{&@%}	80.94± 6.07* ^{&@%}	10.33± 1.42* ^{&@%}	37.95± 2.06* ^{&@%}
F	160.407	140.287	24.088	237.817
P	0.001	0.001	0.001	0.001

Note: compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, [&] $P < 0.05$; Compared with model + negative control group,

[@] $P < 0.05$; Compared with model + miR-21 group, [%] $P < 0.05$.

2.2 各组大鼠心肌梗死面积比较

对照组大鼠无心肌梗死;模型组心肌梗死面积显著升高,与对照组对比差异有统计学意义($P < 0.05$);模型+阴性对照组与模型组心肌梗死面积大致相仿,差异无统计学意义($P > 0.05$);模型+miR-21 组心肌梗死面积低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型+miR-21 抑制物组心肌梗死面积高于模型+miR-21 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明,模型组大鼠出现心肌梗死,提示建模成功,而 miR-21 具有降低心肌梗死面积的作用。见表 2。

2.3 各组大鼠心肌细胞凋亡数量

模型组心肌细胞凋亡率显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型+阴性对照组与模型组心肌细胞凋亡率大致相仿,差异无统计学意义($P > 0.05$);模型+miR-21 组心肌细胞凋亡率显著低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型+miR-21 抑制物组心肌细胞凋亡率高于模型+miR-21 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明,建模成功后,心肌细胞凋亡率显著升高,而 miR-21 具有改善心肌细胞凋亡率的作用。见表 3,图 1。

2.4 各组大鼠心肌组织炎症指标水平

模型组 TNF-α 和 IL-6 水平均显著高于对照组,IL-10 水平低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);模型+阴性对照组与模型组测得心肌组织炎症指标水平(TNF-α、IL-6 和 IL-10)大致相仿,差异无统计学意义($P > 0.05$);模型+miR-21

组 TNF-α 和 IL-6 水平均低于模型组,IL-10 水平高于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);模型+miR-21 抑制物组 TNF-α 和 IL-6 水平均高于模型+miR-21 组,IL-10 水平低于模型+miR-21 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明,建模成功后,TNF-α 和 IL-6 表达水平显著升高,IL-10 水平显著下降,提示心肌组织炎症指标表达水平增加,而 miR-21 具有改善心肌组织炎症指标的作用。见表 4。

表 2 各组大鼠心肌梗死面积比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of myocardial infarction area in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Myocardial infarction area (%)
Control group	0
Model group	43.62± 3.67*
Model + negative control group	44.01± 3.52*
Model + miR-21 group	20.57± 2.17* ^{&@}
Model + miR-21 inhibitor group	34.84± 3.19* ^{&@%}
F	424.736
P	0.001

Note: compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, [&] $P < 0.05$; Compared with model + negative control group, [@] $P < 0.05$; Compared with model + miR-21 group, [%] $P < 0.05$.

表 3 心肌细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of cardiomyocyte apoptosis rate($\bar{x} \pm s$)

Groups	Cardiomyocyte apoptosis rate(%)
Control group	1.08± 0.09
Model group	36.81± 3.42*
Model + negative control group	37.01± 3.39*
Model + miR-21 group	15.49± 2.28* ^{&@}
Model + miR-21 inhibitor group	24.17± 2.36* ^{&@%}
F	340.506
P	0.001

Note: compared with the control group, * $P<0.05$; Compared with the model group, [&] $P<0.05$; Compared with model + negative control group, [@] $P<0.05$; Compared with model + miR-21 group, [%] $P<0.05$.

2.5 各组大鼠 miR-21 在心肌组织中的表达水平

模型组和模型 + 阴性对照组 miR-21 表达水平显著低于对

照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 模型 + miR-21 组 miR-21 表达水平显著高于模型组和模型 + 阴性对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 模型 + miR-21 抑制物组 miR-21 表达水平低于模型 + miR-21 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。上述结果表明, 建模成功后, 大鼠心肌组织中 miR-21 的表达水平显著下降。见表 5。

2.6 各组大鼠心肌组织中凋亡蛋白表达水平

与对照组比较, 模型组、模型 + 阴性对照组、模型 + miR-21 组和模型 + miR-21 抑制物组 Bcl-2/Bax 均下降, 而 Caspase-3 升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型组和模型 + 阴性对照组比较, 模型 + miR-21 组 Bcl-2/Bax 升高, Caspase-3 降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型 + miR-21 组比较, 模型 + miR-21 抑制物组 Bcl-2/Bax 降低, Caspase-3 升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。上述结果表明, 建模成功后, Bcl-2/Bax 表达下降, Caspase-3 表达升高, 提示心肌细胞凋亡蛋白表达水平增加, 而 miR-21 具有降低心肌组织中凋亡蛋白表达的作用。见表 6、图 1。

表 4 各组大鼠心肌组织炎症指标水平($\bar{x} \pm s$)Table 4 Levels of inflammatory indexes in myocardial tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	TNF- α (nmol/L)	IL-6(pg/mL)	IL-10(pg/mL)
Control group	0.37± 0.05	172.58± 12.49	94.57± 6.28
Model group	2.94± 0.31*	312.07± 21.48*	47.12± 4.20*
Model + negative control group	3.01± 0.33*	310.28± 22.17*	46.38± 4.15*
Model + miR-21 group	1.75± 0.20* ^{&@}	224.63± 18.79* ^{&@}	71.08± 5.94* ^{&@}
Model + miR-21 inhibitor group	2.34± 0.25* ^{&@%}	271.08± 21.35* ^{&@%}	55.06± 4.37* ^{&@%}
F	189.721	92.802	160.597
P	0.001	0.001	0.001

Note: compared with the control group, * $P<0.05$; Compared with the model group, [&] $P<0.05$; Compared with model + negative control group, [@] $P<0.05$; Compared with model + miR-21 group, [%] $P<0.05$.

表 5 各组大鼠 miR-21 在心肌组织中的表达水平($\bar{x} \pm s$)Table 5 Expression level of miR-21 in myocardial tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	miR-21
Control group	2.79± 0.66
Model group	1.15± 0.24*
Model + negative control group	1.14± 0.25*
Model + miR-21 group	2.26± 0.71* ^{&@}
Model + miR-21 inhibitor group	1.43± 0.44* ^{&@%}
F	21.702
P	0.001

Note: compared with the control group, * $P<0.05$; Compared with the model group, [&] $P<0.05$; Compared with model + negative control group, [@] $P<0.05$; Compared with model + miR-21 group, [%] $P<0.05$.

2.7 各组大鼠心肌细胞 TLR4/NF- κ B 表达水平

与对照组比较, 模型组、模型 + 阴性对照组、模型 + miR-21 组和模型 + miR-21 抑制物组 p-TLR4/TLR4 和 p-NF- κ B/NF- κ B

均升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型组和模型 + 阴性对照组比较, 模型 + miR-21 组 p-TLR4/TLR4 和 p-NF- κ B/NF- κ B 均降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型 + miR-21 组比较, 模型 + miR-21 抑制物组 p-TLR4/TLR4 和 p-NF- κ B/NF- κ B 均升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。上述结果表明, 建模成功后, 大鼠心肌细胞 TLR4 和 NF- κ B 蛋白磷酸化表达水平升高, 而 miR-21 具有抑制 TLR4/NF- κ B 蛋白表达水平的作用。见表 7、图 2。

3 讨论

急性心肌梗死是临床较常见的心血管疾病, 介入和溶栓治疗等再灌注疗法是临床常见的治疗手段, 且具有一定疗效, 但其再灌注损伤可能会严重威胁患者的预后^[12-14]。心肌细胞缺血再灌注损伤会进一步加重心肌超微结构、功能和代谢的损害, 导致不可逆的病理过程, 从而导致患者低血压、心律失常、休克甚至猝死^[15,16]。因此预防 / 减轻再灌注损伤对降低心肌细胞凋亡、维持心功能、改善患者预后具有重要意义。

miRNA 与细胞发育、增殖、分化、凋亡、侵袭等生物学行为密切相关, 具有特异性、稳定性和保守性等特点。miR-21 是

表 6 各组大鼠心肌组织中凋亡蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Expression level of apoptotic protein in myocardial tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Bcl-2/Bax	Caspase-3
Control group	1.00± 0.01	1.00± 0.01
Model group	0.57± 0.14*	3.29± 0.47*
Model + negative control group	0.56± 0.15*	3.30± 0.47*
Model + miR-21 group	0.85± 0.20* ^{&@}	2.36± 0.32* ^{&@}
Model + miR-21 inhibitor group	0.69± 0.17* ^{&@%}	2.78± 0.26* ^{&@%}
F	16.125	73.572
P	0.001	0.001

Note: compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, [&] $P < 0.05$; Compared with model + negative control group, [@] $P < 0.05$; Compared with model + miR-21 group, [%] $P < 0.05$.

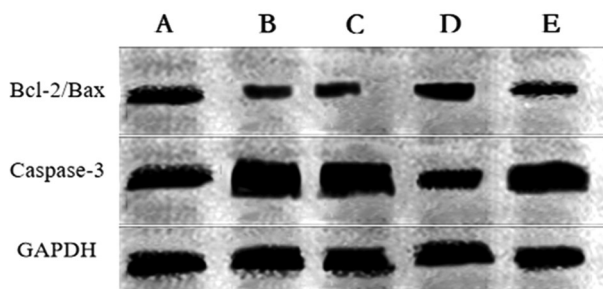


图 1 各组大鼠心肌组织中凋亡蛋白表达水平

Fig.1 Expression level of apoptotic protein in myocardial tissue of rats in each group

Note: A: Control group, B: Model group, C: Model + negative control group, D: Model + miR-21 group, E: Model + miR-21 inhibitor group.

miRNA 家族的重要组成部分之一,具有抗凋亡作用,尤其在心脏组织中的抗凋亡作用尤为显著,在缓解心肌梗死、心肌缺血再灌注等多种心血管疾病中发挥重要作用^[17,18]。心肌缺血再灌注可诱发心肌细胞凋亡,而心肌细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤机制中的重要环节,同时心肌细胞凋亡的多少也是决定心肌缺血再灌注损伤严重程度的重要标志,因此有效抑制细胞凋亡是减轻心肌缺血再灌注损伤的重要途径^[19,20]。Bcl-2/Bax 比值下降时心肌细胞会发生凋亡,Caspase-3 则是心肌细胞凋亡过程的主要执行者^[21,22]。本研究结果显示,建模后大鼠心功能指标降低,心肌梗死面积增大,心肌细胞凋亡率显著升高,Bcl-2/Bax 表达下降,Caspase-3 表达升高,提示建模后大鼠心肌细胞凋亡明显,过表达 miR-21 后,心功能指标升高,心肌梗死面积减小,心

表 7 各组大鼠心肌细胞 TLR4/NF-κB 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 7 TLR4 / NF-κB of rat cardiomyocytes in each group expression level($\bar{x} \pm s$)

Groups	p-TLR4/TLR4	p-NF-κB/NF-κB
Control group	1.00± 0.01	1.00± 0.01
Model group	1.97± 0.34*	3.14± 0.62*
Model + negative control group	1.98± 0.34*	3.13± 0.62*
Model + miR-21 group	1.45± 0.28* ^{&@}	2.20± 0.45* ^{&@}
Model + miR-21 inhibitor group	1.76± 0.30* ^{&@%}	2.68± 0.51* ^{&@%}
F	21.400	32.458
P	0.001	0.001

Note: compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the model group, [&] $P < 0.05$; Compared with model + negative control group, [@] $P < 0.05$; Compared with model + miR-21 group, [%] $P < 0.05$.

肌细胞凋亡率下降,Bcl-2/Bax 表达升高,Caspase-3 表达下降,提示细胞凋亡得到改善。表明 miR-21 能抑制心肌细胞凋亡。心肌缺血会引起炎症反应,补体的激活、中性粒细胞的浸润和活性氧的产生破坏了内皮细胞结构的完整性,进而产生有毒物质,加重了心肌损伤^[23,24]。周丽等^[25]研究显示在小鼠结扎冠脉降支建模后,心肌细胞中 TNF-α 和 IL-6 表达水平显著升高,提示心肌缺血再灌注损伤后引起了炎症反应的发生,而抑制 miR-92a 后减少了炎症因子的释放,从而发挥保护心肌细胞的作用。表明有效抑制炎症反应也是减轻心肌缺血再灌注损伤的

重要途径。本研究结果显示,建模成功后,TNF-α 和 IL-6 表示水平显著升高,IL-10 显著下降,提示建模后大鼠心肌细胞炎症因子表达增加,抗炎因子表达降低,炎症反应明显;而过表达 miR-21 后,TNF-α 和 IL-6 表示水平降低,IL-10 表达升高,提示炎症反应得到缓解。表明 miR-21 能抑制心肌细胞促炎因子的表达。本研究建模成功后,大鼠心肌组织中 miR-21 的表达水平显著下降,提示 miR-21 可能具有保护心肌细胞的作用,主要通过抑制心肌细胞凋亡和心肌细胞促炎因子表达而发挥作用。我们进一步研究其可能作用的信号通路,结果显示,建模成功

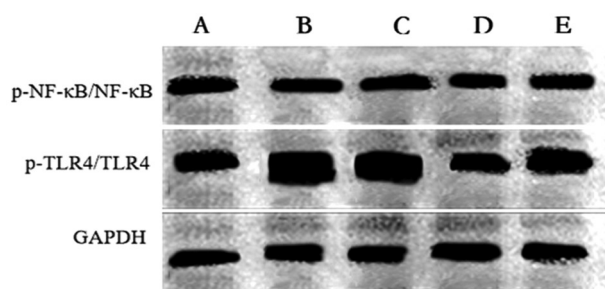


图2 各组大鼠心肌细胞 TLR4/NF-κB 蛋白表达水平

Fig.2 TLR4 / NF-κB protein expression level of rat cardiomyocytes in each group

Note: A: Control group, B: Model group, C: Model + negative control group, D: Model + miR-21 group, E: Model + miR-21 inhibitor group.

后,大鼠心肌细胞 TLR4 和 NF-κB 蛋白磷酸化表达水平升高,而过表达 miR-21 能抑制 TLR4/NF-κB 蛋白表达水平。TLR4 在心肌细胞和微血管内皮细胞中高表达,能够通过 MyD88 依赖途径促进干扰素-β 的表达并激活 NF-κB^[26]。在心肌细胞缺血、缺氧等条件下,磷酸化的 TLR4 增加,TLR4 被激活,进一步提高 NF-κB 磷酸化水平,激活 TLR4/NF-κB 通路,从而增加炎症因子含量和细胞凋亡率^[27]。miR-21 在心脏组织中表达最高,是心脏中一种高度特异性的 miRNA,可以参与靶基因 mRNA 的降解,有效地抑制或促进靶蛋白的翻译^[28]。TLR4 是 miR-21 的靶基因,miR-21 作用于 TLR4 介导多种生理和病理过程中的凋亡^[29]。Zou 等^[30]研究显示 miR-21 通过 TLR4/NF-κB 信号通路调节减轻肢体缺血再灌注引起的肺损伤。因此,笔者分析认为,本研究建模成功后,大鼠心肌组织中 miR-21 的表达水平显著下降,最终表现为大鼠心肌细胞 TLR4 和 NF-κB 蛋白磷酸化表达水平升高,激活 TLR4/NF-κB 信号通路,加重炎症因子的释放,从而损伤心肌细胞,进一步加深心肌细胞凋亡水平。

综上所述,大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤导致 miR-21 表达降低,而过表达 miR-21 能有效抑制 TLR4/NF-κB 信号通路,降低大鼠心肌凋亡水平和炎症因子的释放,从而发挥保护心肌细胞的作用。

参考文献(References)

- [1] Shin B, Cowan DB, Emani SM, et al. Mitochondrial Transplantation in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 982(22): 595-619
- [2] 陈福晖,刘达兴,容松. 心肌缺血再灌注损伤发生机制的研究进展 [J]. *安徽医药*, 2017, 21(12): 2145-2148
- [3] Zhao J, Li X, Hu J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1205-1216
- [4] Ding S, Liu D, Wang L, et al. Inhibiting MicroRNA-29a Protects Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting SIRT1 and Suppressing Oxidative Stress and NLRP3-Mediated Pyroptosis Pathway [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 372(1): 128-135
- [5] Gu GL, Xu XL, Sun XT, et al. Cardioprotective Effect of MicroRNA-21 in Murine Myocardial Infarction [J]. *Cardiovasc Ther*, 2015, 33(3): 109-117
- [6] Hinkel R, Ramanujam D, Kaczmarek V, et al. AntimiR-21 Prevents Myocardial Dysfunction in a Pig Model of Ischemia/Reperfusion Injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(15): 1788-1800

- [7] Xu HX, Pan W, Qian JF, et al. MicroRNA-21 contributes to the puerarin-induced cardioprotection via suppression of apoptosis and oxidative stress in a cell model of ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(1): 719-727
- [8] Wang Y, Wang L, Li JH, et al. Morphine alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8616-8624
- [9] Dai Y, Wang S, Chang S, et al. M2 macrophage-derived exosomes carry microRNA-148a to alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibiting TXNIP and the TLR4/NF-κB/NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 142(53): 65-79
- [10] Liu X, Zhan Z, Xu L, et al. MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKIIα [J]. *J Immunol*, 2010, 185(12): 7244-7251
- [11] Zhang D, Wang Q, Qiu X, et al. Remifentanyl protects heart from myocardial ischaemia/reperfusion (I/R) injury via miR-206-3p/TLR4/NF-κB signalling axis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 25(33): rgab151
- [12] Ding S, Liu D, Wang L, et al. Inhibiting MicroRNA-29a Protects Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting SIRT1 and Suppressing Oxidative Stress and NLRP3-Mediated Pyroptosis Pathway [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2020, 372(1): 128-135
- [13] Rout A, Tantry US, Novakovic M, et al. Targeted pharmacotherapy for ischemia reperfusion injury in acute myocardial infarction [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(15): 1851-1865
- [14] Heusch G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(12): 773-789
- [15] Qin LB, Li ZY, Li H, et al. Inhibitive effects of microRNA-34a on protecting against ischemia-reperfusion injury of vital organs in hemorrhagic shock pregnant mice [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(6): 1812-1818
- [16] Korshunova AY, Blagonravov ML, Neborak EV, et al. BCL2 regulated apoptotic process in myocardial ischemia reperfusion injury (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 23-36
- [17] 吴若霞,李正阳,任婷,等. 加味丹参饮结合 miR-21 对缺血再灌注损伤心肌细胞的影响研究 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(2): 277-281
- [18] Li M, Tang X, Liu X, et al. Targeted miR-21 loaded liposomes for acute myocardial infarction [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8 (45): 10384-10391
- [19] 温淑珍,王娜娜,徐晓明,等. 沉默 miR-208b-3p 对心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(19): 4332-4336
- [20] Wetzel MD, Wenke JC. Mechanisms by which hydrogen sulfide attenuates muscle function following ischemia-reperfusion injury: effects on Akt signaling, mitochondrial function, and apoptosis [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 33
- [21] Zhang Y, Yang X, Ge X, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109(11): 726-733
- [22] Sun C, Liu H, Guo J, et al. MicroRNA-98 negatively regulates myocardial infarction-induced apoptosis by down-regulating Fas and caspase-3 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7460

(下转第 3095 页)

- 医用影像学, 2020, 29(6): 1114-1116, 1135
- [14] Qiang Y, Wu Y, Cai T. Clinical Significance of Increasing Pressure Curve's Slope When Injecting Ultrasound Contrast Agent During Evaluation of Fallopian Tubal Patency [J]. J Ultrasound Med, 2021, 40 (11): 2329-2338
- [15] 葛丹, 涂美琳, 欧斐. 四维输卵管超声造影形态对不孕症患者输卵管通畅度的诊断价值 [J]. 中华医学超声杂志 (电子版), 2021, 18 (1): 68-73
- [16] Ma Y, Du L, Li F, et al. Use of atropine in four-dimensional hysterosalpingo-contrast sonography: Does it suppress pain during infertility examination? [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2018, 45 (12): 1334-1340
- [17] Gu P, Yang X, Zhao X, et al. The value of transvaginal 4-dimensional hysterosalpingo-contrast sonography in predicting the necessity of assisted reproductive technology for women with tubal factor infertility [J]. Quant Imaging Med Surg, 2021, 11(8): 3698-3714
- [18] Liang N, Wu QQ, Li JH, et al. Causes of misdiagnosis in assessing tubal patency by transvaginal real-time three-dimensional hysterosalpingo-contrast sonography [J]. Rev Assoc Med Bras (1992), 2019, 65(8): 1055-1060
- [19] Wang J, Li J, Yu L, et al. Application of 3D-HyCoSy in the diagnosis of oviduct obstruction[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(3): 966-970
- [20] Zhang N, Liu Y, He Y, et al. Transvaginal four-dimensional hysterosalpingo-contrast sonography: Pain perception and factors influencing pain severity[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2021, 47(1): 302-310
- [21] Pek E. The immunohistochemical and histologic effects of contrast medium on uterus, fallopian tubes and ovaries, given during hysterosalpingography: rat study[J]. Radiol Res Pract, 2020, 21(4): 243-254
- [22] Roelant E, Al-Tameemi H N, Al-Haris N R, et al. Effectiveness and radiation dose of computerized tomography virtual hysterosalpingography in the evaluation of female infertility: Systematic review and meta-analysis[J]. BMJ Open, 2021, 71(1): 114-118
- [23] Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and Management of Infertility: A Review[J]. JAMA, 2021, 326(1): 65-76
- [24] Shi J, Li S, Wu H, et al. The Influencing Factors of Venous Intravasation During Transvaginal Four-dimensional Hysterosalpingo-contrast Sonography With SonoVue [J]. Ultrasound Med Biol, 2019, 45 (9): 2273-2280
- [25] Exalto N, Emanuel MH. Clinical Aspects of HyFoSy as Tubal Patency Test in Subfertility Workup[J]. Biomed Res Int, 2019, 15(2): 4827376
- [26] Gao YB, Yan JH, Yang YD, et al. Diagnostic value of transvaginal four-dimensional hysterosalpingo-contrast sonography combined with recanalization in patients with tubal infertility [J]. Niger J Clin Pract, 2019, 22(1): 46-50
- [27] Cheng Q, Wang SS, Zhu XS, et al. Evaluation of Tubal Patency with Transvaginal Three-dimensional Hysterosalpingo-contrast Sonography[J]. Chin Med Sci J, 2015, 30(2): 70-75
- [28] Wang W, Zhou Q, Zhou X, et al. Influence Factors on Contrast Agent Venous Intravasation During Transvaginal 4-Dimensional Hysterosalpingo-Contrast Sonography [J]. J Ultrasound Med, 2018, 37 (10): 2379-2385
- [29] Liu Y, Zhang N, He Y, et al. Spontaneous conception outcome in infertile women after four-dimensional hysterosalpingo-contrast-sonography[J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2020, 20(1): 638
- [30] He Y, Wu H, Xiong R, et al. Intravasation Affects the Diagnostic Image Quality of Transvaginal 4-Dimensional Hysterosalpingo-Contrast Sonography With SonoVue [J]. J Ultrasound Med, 2019, 38 (8): 2169-2180

(上接第 3035 页)

- [23] Yao BJ, He XQ, Lin YH, et al. Cardioprotective effects of anisodamine against myocardial ischemia/reperfusion injury through the inhibition of oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 1253-1260
- [24] 张风云, 崔金金, 张慧, 等. NLRP3 炎性体与中性粒细胞在心肌缺血/再灌注损伤中的交流 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(15): 2957-2961
- [25] 周丽, 王诗奇, 邹武松. miR-92a 在心肌缺血再灌注损伤中作用及机制研究[J]. 中国急救医学, 2020, 40(3): 254-259
- [26] Gao JM, Meng XW, Zhang J, et al. Dexmedetomidine Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Suppressing TLR4-MyD88-NF- κ B Signaling[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017(48): 1674613
- [27] Zhang X, Du Q, Yang Y, et al. The protective effect of Luteolin on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91 (23): 1042-1052
- [28] Mensah AA, Cascione L, Gaudio E, et al. Bromodomain and extra-terminal domain inhibition modulates the expression of pathologically relevant microRNAs in diffuse large B-cell lymphoma [J]. Haematologica, 2018, 103(12): 2049-2058
- [29] Fang HC, Wu BQ, Hao YL, et al. KRT1 gene silencing ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via the activation of the Notch signaling pathway in mouse models [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 3634-3646
- [30] Zou HB, Sun XF. The mechanism of curcumin post-treatment relieving lung injuries by regulating miR-21/TLR4/NF- κ B signalling pathway[J]. J Int Med Res, 2020, 48(11): 300060520965809