

miR-224-5p 调控 PI3K/Akt/FoxO1 轴抑制氧化应激减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤

梁国新^{1,2,3}, 唐红悦^{3,4}, 郭畅^{2,3}, 张明明³

¹南京医科大学附属南京明基医院检验科, 江苏 南京 210000; ²华北理工大学研究生学院, 河北 唐山 063000; ³河北省人民医院临床医学研究中心河北省代谢病重点实验室, 河北 石家庄 050051; ⁴河北北方学院研究生学院, 河北 张家口 075132

摘要:目的 探究 miRNA-224-5p 在缺氧/复氧(H/R)诱导心肌细胞损伤中的作用机制。方法 收集 160 例急性心肌梗死(AMI)患者 and 80 例健康体检者(HC)的血浆检测 miRNA-224-5p 及生化指标。H9c2 细胞分为对照组(Control)、H/R 组、H/R+miR-224-5pNC 组、H/R+miR-224-5p mimics 组。噻唑蓝(MTT)检测细胞活力;试剂盒检测丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶 2(SOD2)和乳酸脱氢酶(LDH);双荧光素酶报告基因实验验证 miR-224-5p 与 PTEN 的靶向关系;生物信息学方法对靶基因的潜在机制进行分析;qRT-PCR 检测 miRNA-224-5p mRNA 表达;Western blotting 检测 PTEN、Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3、SOD2、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Ak 及 p-FoxO1/FoxO1 蛋白水平;流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 与 HC 组相比,AMI 组的血糖、C 反应蛋白、CK、CK-MB 和 cTnI 水平均显著高于对照组($P<0.05$)。AMI 组和 H/R 组 miR-224-5p 的表达低于对照组($P<0.05$);心肌细胞活力呈缺氧/复氧时间依赖性减少;PTEN 是 miR-224-5p 的靶基因;PI3K/Akt 通路是最显著富集的通路;与 Control 组相比,H/R 组 SOD2 的活性降低,LDH 的活性和 MDA 的含量均上升,细胞凋亡率上升($P<0.05$),细胞中 p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1、SOD2 和 Bcl-2 蛋白表达水平均降低,PTEN、Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达均升高($P<0.05$);与 H/R 组比较,H/R+miR-224-5p mimics 组 SOD2 的活性显著上升,LDH、MDA 的水平和细胞凋亡率均显著降低($P<0.05$),细胞中 p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1、SOD2 和 Bcl-2 的表达均上调,PTEN、Bax 和 Cleaved caspase3 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。结论 miR-224-5p 过表达通过 PI3K/Akt/FoxO1 轴上调抗氧化基因 SOD2 的表达,缓解 H/R 诱导的 H9c2 细胞的氧化应激,减少细胞凋亡。

关键词: 缺氧/复氧;微小 RNA;氧化应激;凋亡

MiR-224-5p overexpression inhibits oxidative stress by regulating the PI3K/Akt/FoxO1 axis to attenuate hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury

LIANG Guoxin^{1,2,3}, TANG Hongyue^{3,4}, GUO Chang^{2,3}, ZHANG Mingming³

¹Department of Laboratory Medicine, Nanjing BenQ Medical Center, Affiliated BenQ Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China; ²Graduate School, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; ³Hebei Provincial Key Laboratory of Metabolic Diseases, Medical Research Center, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China; ⁴Graduate School of Hebei North College, Zhangjiakou 075132, China

Abstract: Objectives To investigate the regulatory role of miRNA-224-5p in hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced H9c2 cardiomyocyte injury. **Methods** Plasma samples were collected from 160 patients with acute myocardial infarction and 80 healthy controls(HC) to measure miRNA-224-5p levels and other biochemical parameters. In cultured H9c2 cells with H/R injury, the effects of transfection with miR-224-5p mimics or a negative control sequence on cell viability, malondialdehyde (MDA) content, and superoxide dismutase 2 (SOD2) and lactate dehydrogenase (LDH) activities were tested. Dual luciferase reporter gene assay was performed to verify the targeting relationship between miR-224-5p and PTEN. Bioinformatics methods were used to analyze the potential mechanisms of the target genes. The expression of miRNA-224-5p in the treated cells was detected with qRT-PCR, the protein expressions of PTEN, Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, SOD2, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Ak and p-FoxO1/FoxO1 were determined using Western blotting, and cell apoptosis was analysed with flow cytometry. **Results** The levels of blood glucose, C-reactive protein, CK, CK-MB and cTnI were significantly higher in the AMI group compared with the HC group ($P<0.05$). The expression level of miR-224-5p was significantly lowered in patients with STEMI and NSTEMI and in H9c2 cells with H/R injury. The viability of H9c2 cells decreased time-dependently following H/R injury. PTEN was a target gene of miR-224-5p, and the PI3K/Akt pathway was the most significantly enriched pathway. H9c2 cells with H/R injury showed significantly decreased SOD2 activity, increased LDH activity and MDA content, increased cell apoptosis, decreased protein expression levels of p-PI3K, p-Akt, p-FoxO1, SOD2, and Bcl-2, and increased expressions of PTEN, Bax, and cleaved caspase-3. These changes were obviously attenuated by transfection of the cells with miR-224-5p mimics prior to H/R exposure. **Conclusion** MiR-224-5p overexpression upregulates the expression of the antioxidant gene SOD2 through the PI3K/Akt/FoxO1 axis to relieve H/R-induced oxidative stress and reduce apoptosis of H9c2 cells.

Keywords: hypoxia/reoxygenation; microRNAs; oxidative stress; apoptosis

收稿日期:2024-01-03

基金项目:河北省政府资助临床医学人才培养项目(2020009);河北省自然科学基金资助项目(H2024307005)

作者简介:梁国新,硕士,住院医师,E-mail:lgx202309@163.com

通信作者:张明明,博士,教授,主任技师,E-mail:zhangmm197612@hebmdu.edu.cn

缺血性心脏病(ICM)是由冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)心肌缺血引起的心肌功能失常,冠心病事件发病率约为 35/万~835/万在全球,且呈现逐年上升的趋势^[1]。其发病机制包括缺血致心肌梗死、非梗死区域代偿肥大、内皮功能障碍、心肌细胞凋亡等^[2]。随着对冠

心病研究的日益深入,氧化应激在冠心病发生发展中的意义日益凸显。氧化应激(OS)是当体内氧自由基(OFR)产生过度或清除减少,造成体内活性氧类生成与抗氧化防御之间的平衡紊乱,其在ICM疾病过程中可损害细胞膜,致钙超载、细胞凋亡,产生炎性介质,损伤内皮细胞,损害血小板功能,影响miRNA的表达,继而导致ICM的发生和发展^[3]。而急性心肌梗死(AMI)是缺血性心脏病中导致人类死亡的主要疾病之一。

心肌缺血/再灌注损伤(IRI)是心脏手术、心脏移植、心肌梗死和心脏骤停中常见且严重的病理生理现象。IRI的细胞和分子机制非常复杂,包括炎症、内皮功能障碍、钙浓度和pH值的变化,以及线粒体功能障碍和氧化应激^[4]。心肌IRI最常发生在急性心肌梗死(AMI)再灌注治疗期间。再灌注治疗可以清除阻塞的冠状动脉并恢复心肌的血流,但可能会导致活性氧(ROS)的产生急剧增加,这会压倒内源性抗氧化系统。过量的ROS不仅会引发氧化应激还会导致心肌细胞凋亡进而加重心肌细胞损伤,这两者都在AMI的发病机制中发挥重要作用^[5,6]。因此,提高机体的抗氧化能力从而消除过多的ROS可能是改善心肌梗死等缺血性心脏病的有效途径。

微小RNA(miRNA)是一种长度约为18~23个核苷酸的内源性非编码微小RNA,负向调节基因表达并调节特定基因的翻译和稳定性。近年来,在I/R损伤的心肌组织中发现了各种miRNA的显著变化,表明miRNA可能是治疗心肌I/R损伤的潜在治疗靶点^[7]。LncRNA AK087124/miR-224-5p/PTEN轴通过细胞凋亡和AKT信号通路调节动脉粥样硬化的内皮细胞损伤^[8]。miR-224-5p靶向TXNIP增强了HP-EV在缓解心肌梗死和再灌注治疗前心肌细胞缺氧状况方面的抗凋亡作用^[9]。miR-224-5p/CPEB3使EGFR/PI3K/AKT信号失活来抑制食管鳞状细胞癌的发展^[10]。PI3K/Akt信号通路的活化在心肌梗死以及心肌缺血再灌注损伤((MI/RI)的心脏保护中起着至关重要的作用,被认为是一条经典的对心脏有利的通路^[11]。而又头转录因子1(FoxO1)是PI3K/Akt信号轴的下游靶点^[12]。FoxO1参与包括氧化应激抵抗、代谢调节、细胞增殖和凋亡在内的多种生物学过程^[13]。作为调节氧化还原动态平衡的关键转录因子,FoxO1促进位于不同亚细胞室的抗氧化蛋白的表达,如线粒体中的锰超氧化物歧化酶(SOD2)^[14]。miR-224-5p与凋亡、炎症和心脑血管病的缺血再灌注损伤等生理病理过程密切相关^[15]。然而,miR-224-5p是否通过调节FoxO1蛋白表达维持心肌细胞内活性氧的水平从而减轻心肌细胞损伤尚未确定。

已证实体外H/R处理的H9c2心肌细胞模型可以复制在体心肌I/R损伤模型^[16,17]。因此在本研究中,我们利用H9c2心肌细胞建立了体外培养的H/R细胞模型,

探讨miR-224-5p通过PI3K/Akt/FoxO1信号轴抑制氧化应激减轻缺氧/复氧对H9c2心肌细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 选择2021年12月~2023年2月在河北人民医院心血管内科收治的80例ST段抬高心肌梗死(STEMI)患者,非ST段抬高心肌梗死(NSTEMI)患者80例。STEMI和NSTEMI患者的诊断基于ACC/AHA/ESC/WHF实践指南^[18]。胸痛超过12h、接受溶栓治疗和患有严重心力衰竭的AMI患者不包括在本研究中。还招募了同期80名年龄和性别匹配,没有证据表明有心血管或脑血管疾病的健康受试者作为健康对照组(HC)。从MI患者和健康体检者收集5mL空腹静脉血立即离心以获得纯血浆,随后储存在-80℃用于进一步分析。河北省人民医院伦理委员会批准了本研究(伦理审查编号:202104),所有参与者均已知情同意。

1.1.1 材料和试剂 H9c2心肌细胞株(HCM)购于中国科学院上海细胞库;DMEM细胞培养基、Lipofectamine 3000、TRizol试剂、miRNA逆转录试剂盒(Invitrogen);胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司);青链霉素双抗溶液、丙二醛(MDA)含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒和乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);miR-224-5p模拟物(miR-224-5p mimics)、模拟物阴性对照(miR-NC)、miR-224-5p抑制物(anti-miR-224-5p)、抑制物阴性对照(anti-miR-NC)以及双荧光素酶报告载体(汉恒生物科技(武汉)有限公司);逆转录酶、2×SYBR Green master miX(广州瑞博生物科技有限公司);膜联蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)(汉恒生物科技(武汉)有限公司);兔抗PTEN抗体、兔抗PI3K抗体、兔抗Akt抗体购于(购于Cell Signaling Technology公司);超氧化物歧化酶2抗体(SOD)、磷酸化叉头蛋白家族1抗体(p-FOXO1A (phospho S256))(上海联迈生物工程有限公司);裂解型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3兔单克隆抗体、兔B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)多克隆抗体、兔Bcl相关X蛋白(BaX)单克隆抗体、β-肌动蛋白抗体(β-actin)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(上海碧云天生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 患者入院后的空腹静脉血,离心力调至2180×g,10min分离血清及血浆,贝克曼自动生化分析仪对CK、CK-MB、CRP及血糖进行检测;全自动电化学发光分析仪测定血清中cTnI的浓度。

1.2.2 H9c2心肌细胞的培养 H9c2细胞置于37℃、5%CO₂的培养箱在含有完全培养基(RPMI 1640+10%

胎牛血清+1%青-链霉素溶液)的培养瓶中培养,每3 d换液1次,当细胞达到85%~90%融合时传代或冻存。参照^[19]构建H/R模型:首先在低葡萄糖DMEM培养基中(1 mg/mL),低氧条件(95% N₂和5% CO₂, 37 °C)置于三气培养箱中孵育12 h。随后,细胞在含10%胎牛血清的DMEM中、在95%空气和5%CO₂中37°C孵育不同的时间,不同的时间取决于复氧需要的时间。

1.2.3 细胞转染与分组 取对数期的细胞 2×10^5 接种于含有1%FBS的高糖DMEM培养基(4.5 mg/mL)的24孔板中并孵育24 h。转染miR-NC、miR-224-5p mimics按照Lipofectamine™3000试剂制造商的方案进行转染,48 h后收集细胞进行H/R处理,分别记为H/R+miR-NC组(空载体)与H/R+miR-224-5p组(模拟物序列)。在DMEM中正常培养的细胞作为对照组(Control);细胞H/R处理作为H/R模型组。

1.2.4 生物信息学 从GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)下载GSE230165高通量数据集。使用R软件EdgeR包分析差异表达的miRNA, $P < 0.05$ 设为显著差异的阈值。TargetScan7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/)数据库预测miR-224-5p的靶基因,并对靶基因进行KEGG通路分析。

1.2.5 RNA分离和实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR) 使用TRIzol试剂从H9c2细胞或者200 μL血浆中提取总RNA,然后使用第一链cDNA合成试剂盒进行逆转录。对于miRNA检测,在存在茎环的情况下对1 μg总RNA进行反转录。miRNA和U6的引物由广州锐博生物技术有限公司提供。最后,根据制造商的说明,使用miRNA qRT-PCR检测试剂盒(Sparkjade)对总miRNA进行定量,U6作为内源性对照。引物序列如下:miR-224-5p, forward: 5'-ACAAGTCACTAGTGGTTCC-3'; reverse: 5'-CAGTGATGTTGCGGTCTG-3'; U6, forward: 5'-CAGCACATTCGGCAGCACA-3'; reverse: 5'-TGGTGTCG TTGGAGTCG-3。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miRNA的表达量。

1.2.6 噻唑蓝(MTT)检测细胞活力 用完全培养基制成细胞悬液,将细胞浓度调整至以 5×10^4 /mL,吸取100 μL稀释后的细胞悬液,加入96孔板,每组设置5个复孔,并设置对照孔。培养24 h后加入20 μL MTT(5 mg/mL)孵育4 h。然后,通过离心机去除培养基,并通过加入150 μL DMSO裂解细胞以溶解甲臞。通过酶标仪测量490 nm处的吸光度(A)来量化细胞活力,并计算细胞存活率[实验组A值/对照组A值 $\times 100\%$]。

1.2.7 检测氧化应激相关指标 根据试剂制造商的方案,按照试剂盒说明书,分别收集H9c2细胞培养液上清和细胞。LDH活性的检测使用LDH检测试剂盒检测各组细胞的培养液上清。将各组H9c2细胞使用细胞裂解

液在冰上裂解后,收集上清液,检测SOD2的活性和MDA的含量。

1.2.8 双荧光素酶活性测定 构建野生型(Wt)Wt-PTEN-3'-UTR和突变体(Mut)Mut-PTEN-3'-UTR荧光素酶报告基因载体,根据Lipofectamine™3000转染试剂盒说明步骤将Wt-PTEN-3'-UTR或Mut-PTEN-3'-UTR与miRNA阴性对照寡核苷酸(miRNA NC)或miR-224-5p模拟物(miR-224-5p mimic)分别共转染至H9c2细胞。根据转染程序,转染48 h后使用试剂盒和多模式酶标仪测量双荧光素酶报告基因活性。

1.2.9 Western blotting 收集各组H9c2细胞,用细胞裂解缓冲液裂解,并在4 °C下以12 000 g离心15 min。用RIPA裂解缓冲液提取蛋白质,用8%~12%的分辨率凝胶进行SDS-PAGE分离。将分解后的蛋白质电印迹到膜上。在用5%脱脂牛奶封闭后。TBST溶液洗膜3次,然后分别加入稀释后的一抗:Caspase-3(1:1000)、Bax(1:1000)、Bcl-2(1:1000)、PTEN(1:1000)、Akt(1:1000)、PI3K(1:1000)、p-Akt(1:2000)、p-PI3K(1:1000)、SOD2(1:1000)、FoxO1(1:1000)、p-FoxO1(1:1000)、β-actin(1:500)4 °C孵育过夜。用TBST洗涤3次后,加入HRP标记的二抗IgG(1:2000)于室温孵育1 h。使用增强化学发光显影,在Bio-Rad化学发光成像系统下曝光,用ImageJ软件进行定量。

1.2.10 流式细胞术实验 数生长期的H9c2心肌细胞,消化、稀释、转染、分组等操作后,用PBS溶液进行洗涤,离心5 min后,用1 \times Binding Buffer缓冲液稀释成 1×10^6 /mL的细胞悬液,取100 μL细胞悬液,按照试剂盒说明书加入5 μL的Annexin V-APC和5 μL的7-AAD染色液,轻柔涡旋混匀后,室温避光孵育20 min.,混匀后上机检测,实验重复3次。

1.3 统计学分析

SPSS 24.0、GraphPadPrism8.02和R语言软件进行统计分析及可视化,计量资料用均数 \pm 标准差表示。Shapiro-Wilk法用于检验正态性,Levene法用于评估方差齐性。各组间差异比较采用单因素方差分析两两比较用LSD法,两组比较采用独立样本t检验;计数资料采用Fisher精确检验或 χ^2 检验。此外,受试者工作特征曲线(ROC)下面积(AUC)被用来评估miRNA作为AMI的诊断标志物的准确性。 $P < 0.05$ (双侧)时,差异被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的临床参数

80例STEMI患者和80例NSTEMI患者,与健康对照组(HC)在年龄和性别完全匹配,基本信息和实验室检测结果如表1所示。STEMI和NSTEMI患者的血糖、

C反应蛋白、CK、CK-MB和cTnI水平均显著高于对照组($P<0.05$)。

2.2 miR-224-5p在AMI疾病中的表达水平

高通量数据分析显示miR-224-5p显著下调(图1A)。AMI患者与HC组血浆miR-224-5p表达水平结果显示STEMI($n=80$)和NSTEMI($n=80$)组血浆miR-224-5p的水平均低于HC组,差异有统计学意义($P<0.05$)。但是STEMI与NSTEMI患者血浆中miR-224-5p的水平差异无统计学意义($P>0.05$,图1B);miRNA-224-5p在AMI患者和健康受试者之间表现出很强的分离能力,STEMI的曲线下面积(AUC)为0.952(图1C);NSTEMI患者和健康被试者的AUC为0.973($P<0.001$,图1D)。

2.3 缺氧/复氧降低心肌细胞活力

缺氧引起心肌细胞活力的时间依赖性下降,缺氧暴露后12h开始显著下降($P<0.05$,图2A);随着复氧时间的增加,在12h复氧后,心肌细胞活力也显著降低($P<0.05$,2B);Western blotting结果显示,与对照组相比,低氧暴露12h后,心肌细胞凋亡活性显著增加,表现为Bcl-2/Bax比值降低,Cleaved caspase3表达升高;随后复氧时间的延长心肌细胞Bcl-2/Bax蛋白比值逐渐降低、Cleaved caspase3的表达上升,缺氧/复氧降低了细胞存活率($P<0.05$,图2C~E);在H/R处理的H9c2细胞中,miR-224-5p的表达水平明显降低($P<0.05$,图2F)。

2.4 miR-224-5p靶向调控PTEN的表达

基于在线数据库筛选miR-224-5p的靶基因(图3A)。TargetScan数据库的分析显示,miR-224-5p与PTEN之间存在结合位点(图3B)。双荧光素酶报告基因实验显示,在H/R处理的H9c2细胞中,我们发现miR-224-5p mimic显著抑制野生型PTEN 3'-UTR报告基因的荧光素酶活性,差异有统计学意义($P<0.05$),但不影响具有突变miR-224-5p结合位点的PTEN 3'-UTR报告基因的荧光素酶活性($P>0.05$)。此外,当miR-NC或Vector与Wt或Mut共转染时,组间荧光素酶活性没有变化无统计学意义($P>0.05$,图3C)。京都基因和基因组百科全书(KEGG)对预测的靶基因进行的信号通路分析表明PI3K/Akt是最显著富集的通路(图3D)。

2.5 各实验组SOD2、LDH及MDA水平比较

与Control组比较,H/R组上清中SOD2的水平降低,MDA和LDH水平增加($P<0.05$);与H/R+miR-NC组比较,H/R+miR-224-5p组SOD2的水平上调,MDA和LDH的水平显著下降($P<0.05$);H/R+miR-NC组与H/R组各指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$,图4)。

2.6 miR-224-5p通过PI3K/Akt/FoxO1信号传导参与H/R诱导的心肌细胞损伤

与Control组相比,H/R组细胞中PTEN、Cleaved caspase-3和bax蛋白表达水平明显上调($P<0.05$),

表1 研究对象的临床参数

Tab.1 Clinical parameters of the participants

Clinical parameters	STEMI ($n=80$)	NSTEMI ($n=80$)	HC ($n=80$)	P_1	P_2	P_3
Age (year)	60.5±11.46	58.58±12.19	59.24±12.85	0.514	0.739	0.306
Gender (male/female)	44/36	41/39	43/37	0.950	0.874	0.635
Hypertension	75% (60)	72% (58)	0	≠	≠	0.720
Tobacco	70% (56)	65% (52)	50% (40)	0.001	0.055	0.971
Diabetes mellitus	40% (32)	30% (24)	0	≠	≠	0.185
Hypercholesterolemia	80% (64)	75% (60)	0	≠	≠	0.449
Body mass index (kg/m ²)	25.2±4.2	24.5±3.4	22.4±1.8	0.795	0.839	0.973
Previous MI	10% (8)	6% (4)	0	≠	≠	0.378
Previous PTCA	6	4	0	≠	≠	0.744
Previous CABG	5% (4)	2% (2)	0	≠	≠	0.701
C-reactive protein (mg/L)	18.17±5.52	18.51±4.86	2.13±1.36	<0.05	<0.005	0.680
Glucose (mmol/L)	5.75±1.85	5.68±1.82	4.81±0.48	<0.05	<0.05	0.810
CK(U/L)	483.9±57.27	474.9±50.49	127.29±26.33	<0.05	<0.05	0.293
CK-MB(U/L)	76.43±23.85	73.71±20.68	9.82±4.88	<0.05	<0.05	0.472
cTnI (mg/mL)	163.66±21.50	160.73±23.88	26.40±13.77	<0.05	<0.05	0.403

CABG: Coronary artery bypass grafting; PTCA: Percutaneous transluminal coronary angioplasty; LDH: Lactate Dehydrogenase; CK-MB: Creatine Kinase, MB Form;cTnI: Cardiac troponin I; P_1 :HC vs STEMI; P_2 :HC vs NSTEMI; P_3 :STEMI vs NSTEMI.

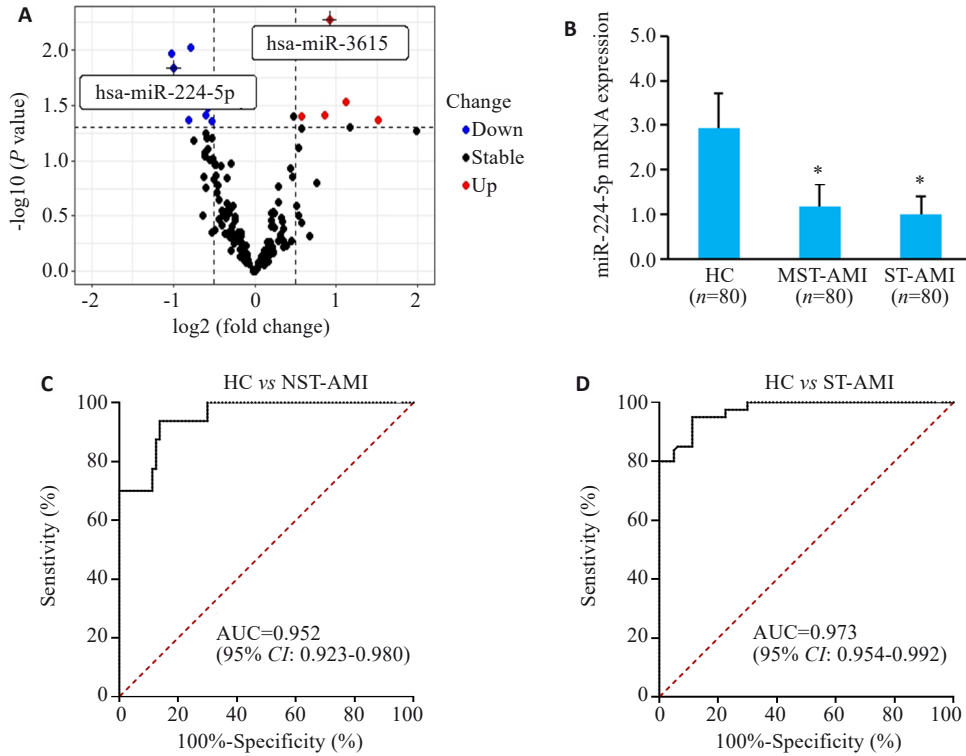


图1 miR-224-5p的表达水平及临床诊断价值

Fig.1 Expression level of miR-224-5p and its clinical diagnostic value. **A:** High-throughput data analysis. **B:** miR-224-5p expression levels. * $P < 0.05$ vs HC group; **C:** AUC of HC vs STEMI; **D:** AUC of HC vs NSTEMI.

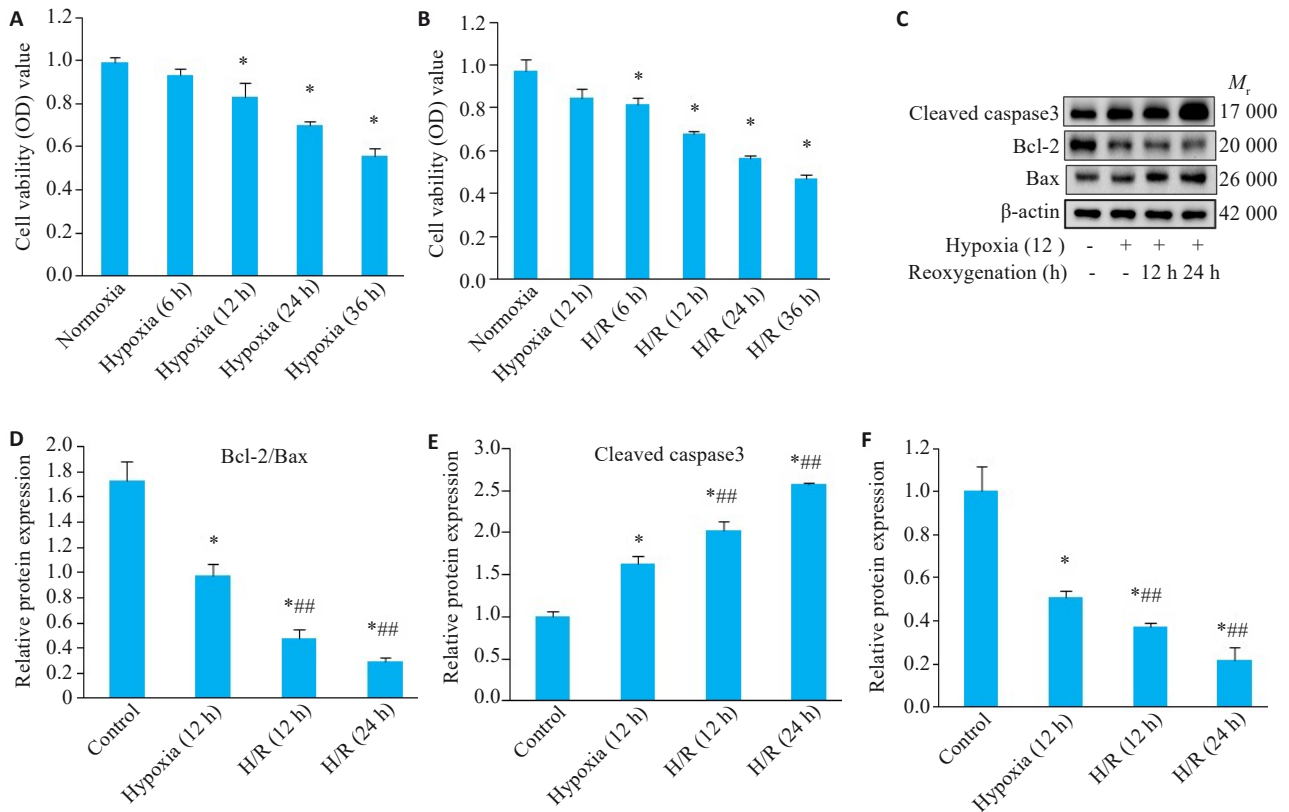


图2 缺氧/复氧降低心肌细胞活力并促进凋亡

Fig.2 Hypoxia/reoxygenation decreases viability and promotes apoptosis of cultured cardiomyocytes. **A, B:** MTT colorimetric assay to determine cell viability ($Mean \pm SD$, $n=6$). **C:** Western blotting for detecting protein expressions of cleaved caspase3, Bcl-2, and Bax. **D-F:** Relative expressions of Bcl2/Bax proteins, cleaved caspase3 and miR-224-5p in H9c2 cells in each group ($Mean \pm SD$, $n=3$). compared with Control group, * $P < 0.05$; ## $P < 0.05$ vs Hypoxia (12 h) group.

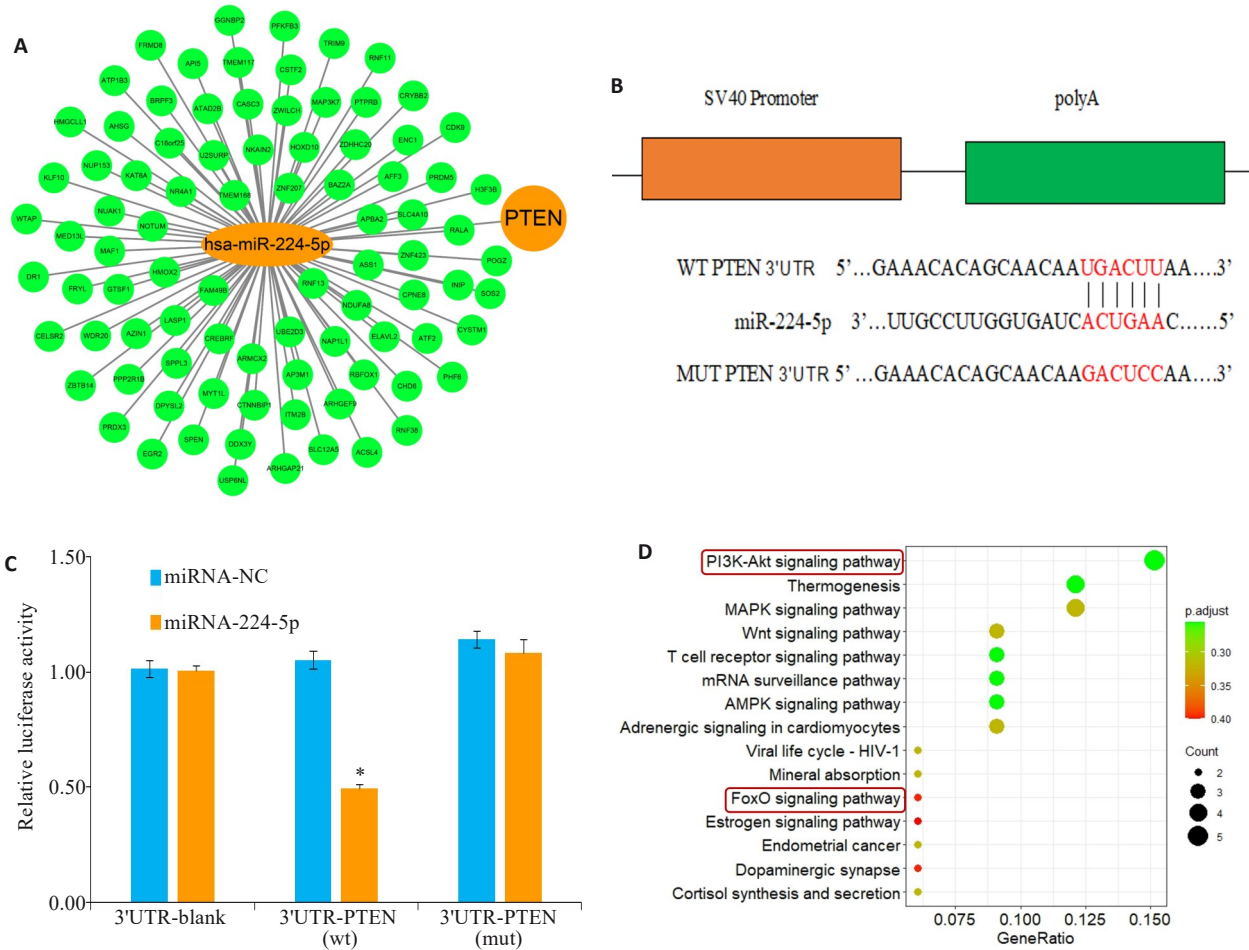


图3 miR-224-5p 靶基因和KEGG富集分析

Fig3 Target gene of miR-224-5p and KEGG enrichment analysis. A: MiR-224-5p gene regulatory network. B: Binding sequences of PTEN mRNA 3'-UTR and miR-224-5p. C: PTEN-Wt or PTEN- Mut reporter Vector cotransfected into H9C2 cells with vehicle (control), miR-224-5p mimic, or negative control (miRNA-NC). Luciferase activity was normalized to the activity in the control group. Data are presented as Mean±SD (n=3). D: KEGG pathway enrichment analysis. *P<0.05 vs miR-NC group.

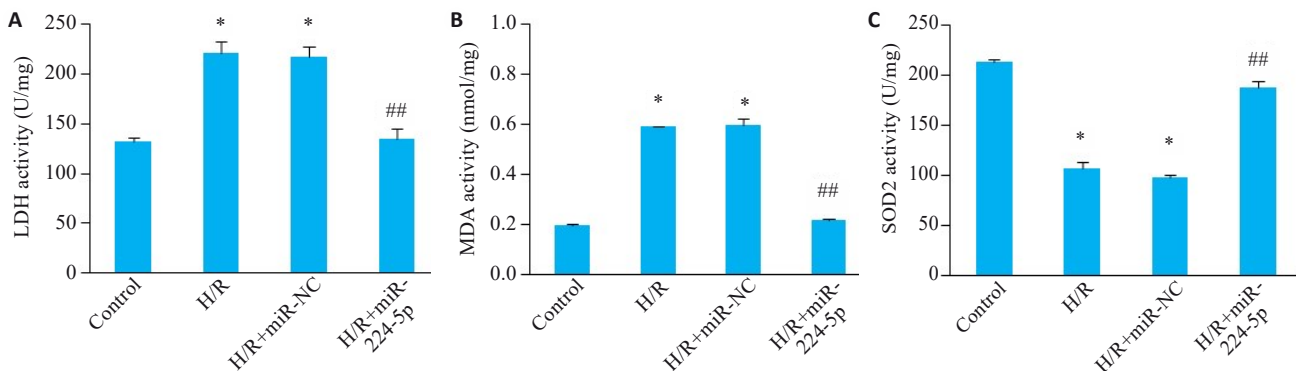


图4 各实验组LDH、MDA和SOD2的水平

Fig.4 Levels of LDH, MDA, and SOD2 in H9c2 cells in each group (Mean±SD, n=6). A: LDH activity. B: MDA content. C: SOD2 activity measurement. *P<0.05 vs Control group; **P<0.05 vs H/R+miR-NC group.

p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1、SOD2 和 Bcl-2 蛋白表达水平以及 Bcl-2/Bax 比值显著下调(P<0.05);与H/R+miR-NC 组比较, H/R+miR-224-5p mimic 组细胞中 PTEN、

Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平均显著降低 (P<0.05), p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1、SOD2 和 Bcl-2 蛋白表达水平及 Bcl-2/Bax 比值显著升高(P<0.05, 图5)。

流式细胞术结果显示,与Control组相比,H/R组的细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与H/R+miR-NC组相比,

H/R+miR-224-5p mimic组的细胞凋亡率降低($P<0.05$,图5E,F)。

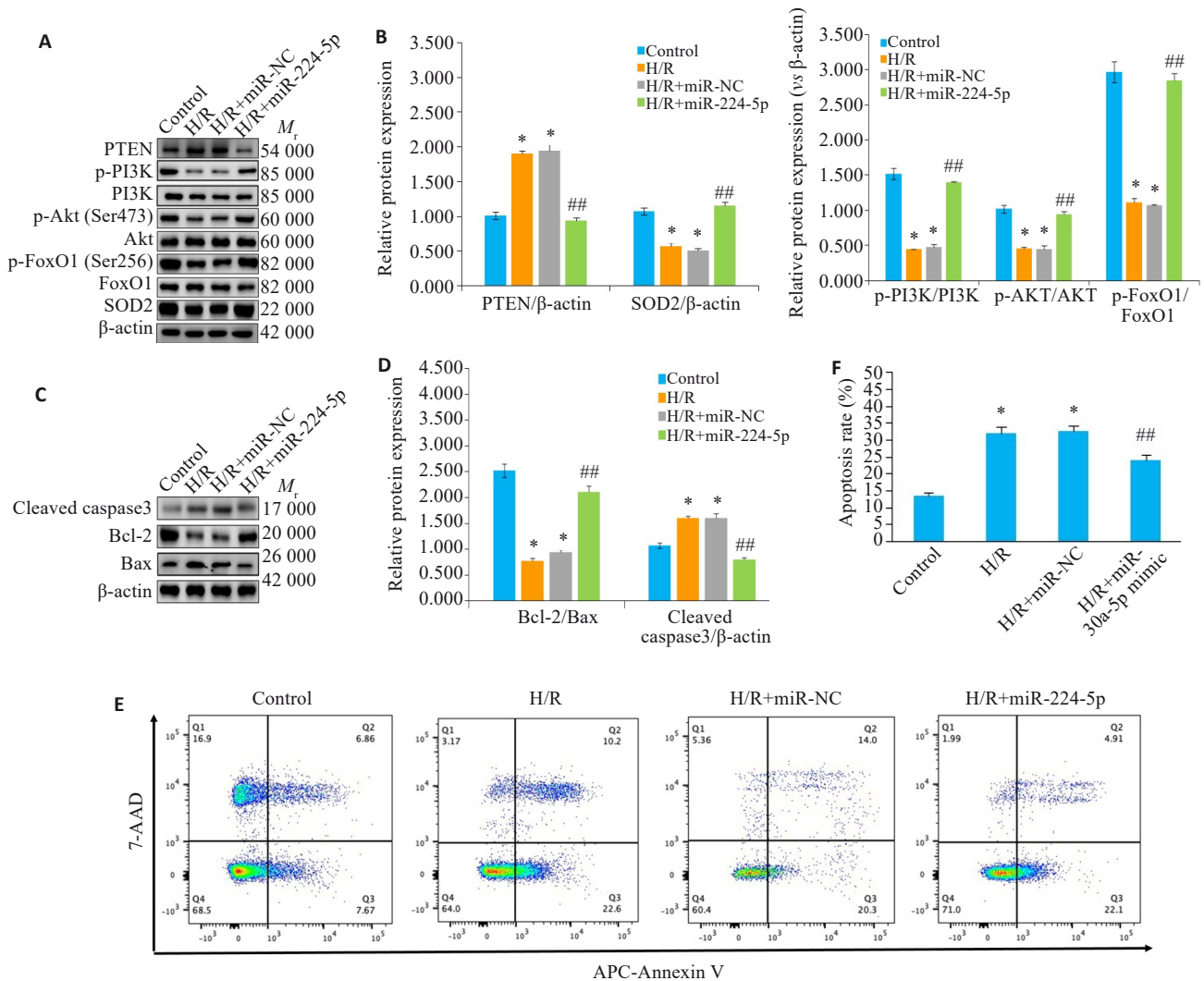


图5 miR-224-5p的过表达对缺氧/缺氧诱导的氧化应激和细胞凋亡蛋白的影响

Fig5 Effect of overexpression of miR-224-5p on hypoxia/hypoxia-induced oxidative stress and apoptotic proteins in H9c2 cells in each group ($Mean\pm SD, n=3$). A, B: Western blotting for detecting oxidative stress pathway protein expressions. C, D: Western blotting for detecting cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2 protein expressions. E, F: Flow cytometry for analyzing apoptosis rate in H9c2 cells in each group ($Mean\pm SD, n=3$); * $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ vs H/R+ miR-NC group, ## $P<0.05$.

3 讨论

缺血/再灌注损伤是缺血性心脏病的主要病因,因此减轻心肌细胞损伤并因此保护心脏功能对于降低心血管疾病风险至关重要^[20]。研究表明 miRNAs 在心肌梗死中异常表达并在调节心肌损伤中发挥作用,但 miRNAs 在心肌梗死中的功能仍未完全了解。本研究探究了 miR-224-5p 在 AMI 患者中的诊断价值,与健康对照组相比,STEMI 和 NSTEMI 患者 miRNA-224-5p 血浆中浓度显著降低,miRNA-224-5p 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 在 HC 与 STEMI (AUC=0.973) 和 NSTEMI (AUC=0.952) 表现出很强的区分性,进一步在细胞上研

究对缺氧/复氧的影响。MTT 的结果显示缺氧/复氧处理降低了细胞活力,激活了细胞中的凋亡途径。细胞凋亡是缺血/再灌注损伤的严重后果,当凋亡途径被激活时,会发生各种变化,包括细胞收缩和脱落、核碎裂和凋亡体的形成^[21]。在凋亡相关蛋白中,Bcl-2 家族和裂解的 caspase-3 是调控细胞凋亡的关键因子,Bcl-2 可能促进细胞存活,而 Bax 可能通过凋亡促进细胞死亡。Bcl-2/Bax 比值是决定细胞损伤后是否发生细胞凋亡的关键因素^[22]。Western blotting 结果显示,与对照组相比,H/R 可显著下调 Bcl-2/Bax 的比值,上调 Cleaved caspase-3 蛋白的表达。此外越来越多的研究表明在缺氧/复氧诱

导的心肌细胞损伤过程中 miR-7a-5p、miR-1224 和 MicroRNA-590-3p 的浓度发生了严重的变化。经特异性抑制或模拟 miRNAs 处理的 H/R 诱导的 H9c2 细胞通过作用其靶基因(分别为 VDAC1、HIF-1 α 和 GPX4)显著调节各种细胞炎症途径,显著降低氧化应激、caspase-3 活性和细胞凋亡,并显著保护心肌细胞损伤提高细胞存活率^[23-25]。在此,我们发现 miR-224-5p 在缺氧/再灌注后 H9c2 细胞中也显著下调。然而,miR-224-5p 对 H/R 暴露的心肌细胞损伤中氧化应激和凋亡的报道较少。

本研究探讨了 H/R 诱导的 H9c2 细胞 miR-224-5p 水平显著降低的潜在分子机制。使用 TargetScan 在线数据库预测 miR-224-5p 可能的靶基因,发现 miR-224-5p 与 PTEN 的 3'非翻译区(3'-UTR)存在特异的结合位点。荧光素酶报告基因实验证实 PTEN 是 miR-224-5p 的靶基因。PTEN 作为一种脂质磷酸酶,负调控 PI3K 信号通路并将 PIP3 转化为 PIP2。当 PTEN 发生突变或失活时,PI3K 效应子特别是 Akt,在没有任何外源致癌刺激的情况下被激活。PI3K/Akt 信号通路参与多种生理过程,是许多疾病尤其是肿瘤发展的重要信号途径,能调控细胞存活、转移和新陈代谢,在凋亡和炎症因子募集中发挥作用^[26,27]。如 Akt 磷酸化 Bcl-2 家族成员 BAD,使其与 14-3-3 结合而阻止其与 Bcl-XL 结合起始凋亡^[28]。PTEN/PI3K/Akt-mTOR 信号通路是缺血性心脏病中 BMI1 诱导的心脏纤维化的原因^[29]。KEGG 富集分析显示 miR-224-5p 的预测靶基因与最显著富集的通路 PI3K/Akt 通路相关。研究表明,PI3K/Akt 通路在抵抗 ROS 方面发挥关键作用,并改善心肌细胞的存活^[30]。叉头盒转录因子 O1(FoxO1)是一种调节抗氧化反应的重要转录因子,已被认为是改善心脏氧化应激损伤的有趣靶点^[31]。FoxO1 又是 PI3K/Akt 信号通路的下游靶标。氧化应激是 ROS 生成和抗氧化防御系统之间失衡的结果,乳酸脱氢酶和丙二醛是细胞氧化应激的重要指标,而超氧化物歧化酶是保护性指标^[32]。本研究发现,与对照组相比,H9c2 细胞进行 H/R 处理后,细胞 LDH 和 MDA 水平升高,同时 SOD2 表达也减少,表明 H/R 后确实能够使细胞发生氧化应激,抗氧化系统受损。与 H/R 组比较,miR-224-5p mimic 转染 H/R 诱导的 H9c2 细胞后,LDH 的活性降低,MDA 含量减少而 SOD2 活力上升,结果表明,miR-224-5p 可显著抑制 H/R 暴露的心肌细胞的氧化应激,提示 miR-224-5p 可能通过阻断氧化应激而对 H/R 处理的心肌细胞产生抗凋亡作用。

为了研究 miR-224-5p 是否通过 PI3K/Akt/FoxO1 抑制氧化应激减少细胞凋亡。体外模拟 miR-224-5p 过表达,WB 结果显示,与 Control 组相比,H/R 组 H9c2 细胞中 PTEN、Cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平升高,p-Akt、p-FoxO1、SOD2 和 Bcl-2 蛋白表达水平以及

Bcl-2/Bax 比值降低。miR-224-5p 过表达后 p-PI3K、p-Akt、p-FoxO1、SOD2 和 Bcl-2 蛋白的表达水平以及 Bcl-2/Bax 比值均明显升高,PTEN、Cleaved caspase-3 和 bax 蛋白表达水平显著降低。此外,流式细胞术结果显示 miR-224-5p 转染减少了 H/R 引起的 H9c2 心肌细胞凋亡。表明 miR-224-5p 过表达可显著减轻氧化应激和抑制细胞凋亡,从而保护细胞免受 H/R 的影响。

综上所述,本研究发现 miR-224-5p 保护心肌细胞免受缺氧/复氧损伤与 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路密切相关。然而,本研究仅在体外细胞水平上研究了 miR-224-5p 在 H/R 中的机制。为了更准确地分析 miR-224-5p 调控 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路在 AMI 中的机制,并为未来的临床应用提供思路,需要在体内实验上进行进一步的验证性研究。

参考文献:

- [1] WHO CVD Risk Chart Working Group. World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions[J]. *Lancet Glob Health*, 2019, 7(10): e1332-e1345.
- [2] Valikeserlis I, Athanasiou AA, Stakos D. Cellular mechanisms and pathways in myocardial reperfusion injury[J]. *Coron Artery Dis*, 2021, 32(6): 567-77.
- [3] Liu Y, Li L, Wang Z, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury; Molecular mechanisms and prevention[J]. *Microvasc Res*, 2023, 149: 104565.
- [4] Zhang WL, Chen CY, Wang J, et al. Mitophagy in cardiomyocytes and in platelets: a major mechanism of cardioprotection against ischemia/reperfusion injury[J]. *Physiology*, 2018, 33(2): 86-98.
- [5] Wang L, Niu HP, Zhang J. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in myocardial ischemia/reperfusion injury through stimulating ROS production and the ERK1/2 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 938-44.
- [6] Jiang W, Zhang YX, Zhang W, et al. Hirsutine ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury through improving mitochondrial function via CaMKII pathway[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2023, 45(1): 2192444.
- [7] Zhao P, Zhang BL, Liu K, et al. Overexpression of miR-638 attenuated the effects of hypoxia/reoxygenation treatment on cell viability, cell apoptosis and autophagy by targeting ATG5 in the human cardiomyocytes[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(23): 8462-71.
- [8] Zhai CL, Sun YG, Qian G, et al. LncRNA AK087124/miR-224-5p/PTEN axis modulates endothelial cell injury in atherosclerosis through apoptosis and AKT signaling pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 705: 108916.
- [9] Mao CY, Zhang TT, Li DJ, et al. Extracellular vesicles from hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells alleviates myocardial injury by targeting thioredoxin-interacting protein-mediated hypoxia-inducible factor-1 α pathway[J]. *World J Stem Cells*, 2022, 14(2): 183-99.
- [10] Cheng JW, Ma HB, Yan M, et al. Circ_0007624 suppresses the

- development of esophageal squamous cell carcinoma *via* targeting miR-224-5p/CPEB3 to inactivate the EGFR/PI3K/AKT signaling [J]. *Cell Signal*, 2022, 99: 110448.
- [11] Zhou G, Wu H, Yang J, et al. Liraglutide attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the inhibition of necroptosis by activating GLP-1R/PI3K/akt pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2023, 23(3/4): 161-75.
- [12] Guo LT, Wang SQ, Su J, et al. Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 95.
- [13] Zeng H, Yang Y, Tou FF, et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomes improve oxidative stress and pyroptosis in doxorubicin-induced myocardial injury *in vitro* by regulating the transcription of GSDMD through the PI3K-AKT-Foxo1 pathway [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11(3): e810.
- [14] Tan Y, Bie YL, Chen L, et al. Lingbao Huxin pill alleviates apoptosis and inflammation at infarct border zone through SIRT1-mediated FOXO1 and NF- κ B pathways in rat model of acute myocardial infarction [J]. *Chin J Integr Med*, 2022, 28(4): 330-8.
- [15] Liu LL, Qiao S, Wang ML, et al. MiR224-5p inhibitor restrains neuronal apoptosis by targeting NR4A1 in the oxygen-glucose deprivation (OGD) model [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 613.
- [16] Hou ZX, Qin XH, Hu YY, et al. Longterm exercise-derived exosomal miR-342-5p: a novel exerkin for cardioprotection [J]. *Circ Res*, 2019, 124(9): 1386-400.
- [17] Gao Y, Yin H, Zhang YF, et al. Dexmedetomidine protects hippocampal neurons against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis through activation HIF-1 α /p53 signaling [J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116611.
- [18] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018) [J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(3): 237-69.
- [19] Lv XB, Niu QH, Zhang M, et al. Critical functions of microRNA-30a-5p-E2F3 in cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(2): 92-100.
- [20] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-67.
- [21] Monier B, Suzanne M. Orchestration of force generation and nuclear collapse in apoptotic cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10257.
- [22] Zhu L, Hao J, Cheng MJ, et al. Hyperglycemia-induced Bcl-2/Bax-mediated apoptosis of Schwann cells *via* mTORC1/S6K1 inhibition in diabetic peripheral neuropathy [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 367(2): 186-95.
- [23] Lu HL, Zhang JF, Xuan FF. MiR-7a-5p attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by targeting VDAC1 [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(2): 108-17.
- [24] Li GB, Jin JL, Liu SX, et al. Inhibition of miR-1224 suppresses hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes through targeting GPX4 [J]. *Exp Mol Pathol*, 2021, 121: 104645.
- [25] Gong NJ, Yang XH, Li XY, et al. MicroRNA-590-3p relieves hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes apoptosis and autophagy by targeting HIF-1 α [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1077.
- [26] 高晓阳, 赵晓璐, 张春艳, 等. 槲皮素诱导肝星状细胞凋亡: 基于调控 miR-146 影响 PI3K/Akt 信号通路 [J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(10): 1725-33.
- [27] 杨子, 赵天豪, 程阳, 等. 香叶木素通过调节小鼠的肠道免疫平衡减轻克罗恩病样结肠炎: 基于抑制 PI3K/AKT 通路 [J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(3): 474-82.
- [28] Xu YX, Jiang YP, Wang YZ, et al. LINC00473 rescues human bone marrow mesenchymal stem cells from apoptosis induced by dexamethasone through the PEBP1-mediated Akt/Bad/Bcl-2 signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 171-82.
- [29] Yang WB, Wu ZJ, Yang K, et al. BMI1 promotes cardiac fibrosis in ischemia-induced heart failure *via* the PTEN-PI3K/Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(1): H61-H69.
- [30] Sun L, Wang H, Xu D, et al. Lapatinib induces mitochondrial dysfunction to enhance oxidative stress and ferroptosis in doxorubicin-induced cardiomyocytes *via* inhibition of PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 48-60.
- [31] Peng B, Rao L, Yang JL, et al. Columbianadin attenuates doxorubicin-induced cardiac injury, oxidative stress, and apoptosis *via* Sirt1/FOXO1 signaling pathway [J]. *Acta Cir Bras*, 2023, 38: e382223.
- [32] Hu B, Tian T, Li XT, et al. Dexmedetomidine postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by activating the Nrf2/Sirt3/SOD2 signaling pathway in the rats [J]. *Redox Rep*, 2023, 28(1): 2158526.

(编辑: 吴锦雅)