

miR-499a-5p 通过靶向 APC 减轻氧化应激对心肌细胞的损伤

武国利¹, 马 竞²

(1. 保定市第一中心医院, 河北省保定市 071000; 2. 河北大学附属医院, 河北省保定市 071000)

[关键词] miR-499a-5p; APC; 心肌细胞损伤

[摘要] 目的 研究 miR-499a-5p 对过氧化氢(H_2O_2)诱导的心肌细胞 H9c2 增殖、凋亡的影响,并探讨其作用机制。方法 用细胞计数试剂盒(CCK-8)检测不同浓度 H_2O_2 (100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) 处理 6 h 的 H9c2 细胞的存活率,筛选 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理的 H9c2 细胞作为模型组。将模型组细胞分为 miR-NC 组、miR-499a-5p 组、si-NC 组、si-APC 组、miR-499a-5p+pcDNA 组、miR-499a-5p+pcDNA-APC 组,用流式细胞术、免疫印迹(Western blot)、酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组细胞的存活率、凋亡率、活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及增殖凋亡相关蛋白增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(P21)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关的 X 基因(Bax)的表达。结果 H_2O_2 (100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$) 呈浓度依赖性抑制 H9c2 细胞的存活,最适浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 。模型组细胞中 miR-499a-5p 表达显著降低,APC 表达显著升高;过表达 miR-499a-5p、抑制 APC 均可明显减轻 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞的增殖抑制、凋亡促进和氧化应激作用,并且 miR-499a-5p 还可靶向抑制 APC。过表达 APC 逆转了 miR-499a-5p 对 H_2O_2 诱导的心肌细胞损伤。结论 miR-499a-5p 可调控 H_2O_2 诱导的心肌细胞增殖、凋亡和氧化应激,其机制与靶向抑制 APC 有关,将可为氧化应激引起的心肌细胞损伤的治疗提供新靶点。

[中图分类号] R542.2

[文献标识码] A

miR-499a-5p attenuates oxidative stress damage to cardiomyocytes by targeting APC

WU Guoli¹, MA Jing²

(1. Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei 071000, China; 2. Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China)

[KEY WORDS] miR-499a-5p; APC; myocardial cell injury

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of miR-499a-5p on hydrogen peroxide(H_2O_2)-induced proliferation and apoptosis of cardiomyocytes H9c2, and to explore its mechanism. Methods Cell viability kit (CCK-8) was used to detect the survival rate of H9c2 cells treated with different concentrations of H_2O_2 (100, 200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$) for 6 h, and 400 $\mu\text{mol/L}$ treated H9c2 cells were selected as a model group. The model group cells were divided into miR-NC group, miR-499a-5p group, si-NC group, si-APC group, miR-499a-5p+pcDNA group, miR-499a-5p+pcDNA-APC group. Flow cytometry, western blotting(Western blot) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the survival rate, apoptosis rate, reactive oxygen species(ROS), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and proliferation-related protein expression proliferating cell nuclear antigen(PCNA), cyclins depend on kinase inhibitors(P21), B lymphoblastoma-2(Bcl-2), X gene associated with Bcl-2(Bax) of each group. Results H_2O_2 (100, 200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$) inhibited the survival of H9c2 cells in a concentration-dependent manner with an optimal concentration of 400 $\mu\text{mol/L}$. The expression of miR-499a-5p was significantly decreased and the expression of APC was significantly increased in the model group. Overexpression of miR-499a-5p and inhibition of APC significantly attenuated H_2O_2 -induced proliferation inhibition, apoptosis promotion and oxidation stress of H9c2 cells. miR-499a-5p can also target inhibition of APC. Overexpression of APC reversed the damage of H_2O_2 -induced cardiomyocytes by miR-499a-5p. Conclusions miR-499a-5p can regulate the proliferation, apoptosis and oxidative stress of cardiomyocytes induced by

[收稿日期] 2019-11-14

[修回日期] 2019-12-19

[基金项目] 保定市科技计划项目(1951ZF058)

[作者简介] 武国利,主治医师,研究方向为重症医学科,E-mail 为 f0yyef@163.com。通信作者马竞,硕士,主治医师,研究方向为心血管内科,E-mail 为 2002.abc@163.com。

H₂O₂. The mechanism is related to the targeted inhibition of APC, which will provide a new target for the treatment of myocardial cell injury induced by oxidative stress.

氧化应激引起的心肌细胞凋亡是很多心脏病的重要作用机制,这也是心血管疾病治疗的研究热点^[1-2]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 在人类疾病中的重要作用已经得到大量研究的认可,尤其是心血管疾病^[3-4]。miR-499a-5p 在心肌细胞损伤中的功能尚未完全清楚。活化蛋白 C (activated protein C, APC) 是一种重要的生理抗凝剂,其由蛋白 C 介导的细胞途径发挥直接的细胞调控,如抗炎活性、抗凋亡活性和内皮保护障碍^[5-6]。据报道,APC 在缺血/再灌注心肌损伤中具有有益作用,对心肌细胞凋亡和炎症具有抑制作用^[7-8]。但是,其与 miR-499a-5p 在心肌氧化应激损伤中的作用关系尚未清楚。本研究旨在探索 miR-499a-5p 在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤中的作用及其与 APC 之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠心肌细胞 H9c2 购自深圳市百思维生物科技有限公司;杜氏细胞培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 购自 Hyclone 公司; pGL3-Basic 载体购自上海康朗生物科技有限公司;脂质体 Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒购自北京明阳科华生物科技有限公司;实时荧光定量反转录聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;丙二醛 (melondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自上海碧云天研究所;细胞计数试剂盒 (cell counting kit, CCK-8) 购自日本同仁化学研究所;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素-碘化丙锭 (annexinV-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI) 凋亡检测试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司。

1.2 细胞培养及心肌细胞 H9c2 损伤模型的建立

H9c2 细胞培养时使用 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清) 进行常规培养、传代。将正常培养的 H9c2 细胞标记为对照组。将 H9c2 细胞用过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) (100、200、400、800 μmol/L)

处理 4 h, 检测细胞的存活率, 筛选 400 μmol/L 的浓度建立氧化应激损伤模型, 标记为模型组。将 miR-NC、miR-499a-5p、anti-miR-NC、anti-miR-499a-5p、miR-499a-5p+pcDNA、miR-499a-5p+pcDNA-APC 按照 1:3 的量加入脂质体试剂, 混匀转染至模型组 H9c2 细胞, 转染 5 h 后, 更换新鲜培养基继续培养 48 h, 用 qRT-PCR 法确认转染是否成功, 分别标记为 miR-NC 组、miR-499a-5p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-499a-5p 组、miR-499a-5p+pcDNA 组、miR-499a-5p+pcDNA-APC 组, 用于后续试验。

1.3 CCK-8 法检测细胞的存活率

收集细胞, 取 5×10^8 个/L 细胞 200 μL, 加入 96 孔板, 每孔再加入 CCK-8 反应液 20 μL, 在 490 nm 波长下检测细胞的吸光值 (A_{490})。存活率 (%) = $A_{490\text{实验组}} / A_{490\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.4 qRT-PCR 检测细胞中 miR-499a-5p、APC 的表达

收集细胞, 用 Trizol 法提取细胞中总 RNA, 再用反转录试剂盒将其合成 cDNA。最后用 qRT-PCR 试剂盒操作, 检测细胞中 miR-499a-5p、APC 的表达。以 U6、GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 检测细胞中 miR-499a-5p、APC 的相对表达量。20 μL 反转录反应混合物在 42 °C 孵育 15 min, 加热到 95 °C 反应 2 min。qRT-PCR 条件在 95 °C 10 s, 然后 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 45 个循环。引物信息 miR-499a-5p 上游引物 5'-AAC AUC ACA GCA AGU CUG UGC U-3', 下游引物 miR-499a-5p 5'-UUA AGA CUU GCA GUG AUG UUU-3'; U6 上游引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 下游引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'; APC 上游引物 5'-GGA CTA CAG GCC ATT GCA GAA-3', 下游引物 5'-GGC TAC ATC TCC AAA AGT CAA-3'; GAPDH 上游引物 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', 下游引物 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。

1.5 Western blot 检测细胞中 APC、PCNA、P21、Bcl-2、Bax 的蛋白表达

收集细胞, 用蛋白裂解液充分将细胞裂解, 提取细胞中的总蛋白。将蛋白用 BCA 法进行定量, 然后进行沸水浴变性处理, 取上清液进行蛋白电泳的上样。电泳结束后, 再用转膜仪将胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上, 转膜结束后将膜用 5% 的脱脂奶粉

进行封闭处理,然后将膜转移至倍比稀释的一抗(1:1 500~1:500)溶液中,4℃孵育过夜处理。次日,将膜取出,清洗后,浸入倍比稀释的相应的二抗(1:1 000)溶液中,37℃孵育 2 h。用超敏电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒对其进行显影曝光,用 Quantity One 4.62 软件分析图像条带灰度,以目的条带灰度值与内参磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的灰度值之比表示蛋白的表达。电泳时,分离胶浓度 6% (30% 丙烯酰胺 4 mL, pH8.8 Tris-HCl 5 mL, 10% SDS 200 μ L, 10% AP 200 μ L, ddH₂O 10.6 mL, TEMED 20 μ L), 浓缩胶浓度 4% (30% 丙烯酰胺 0.667 mL, pH6.8 Tris-HCl 0.63 mL, 10% SDS 50 μ L, 10% AP 50 μ L, ddH₂O 3.6 mL, TEMED 7 μ L)。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

收集细胞,按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒的说明书要求操作,用结合缓冲液悬浮细胞后,加入 Annexin V-FITC 和 PI 进行避光孵育,结束后,尽快进行细胞的凋亡检测分析。凋亡率(%)=早期凋亡率(%) + 晚期凋亡率(%)。

1.7 ELISA 检测细胞中 ROS、SOD、MDA 的含量

按照活性氧(ROS)检测试剂盒的说明书要求,将待测细胞弃去培养基加入染色工作液(1:1 000 稀释的 DCFH-DA),37℃孵育 40 min, PBS 冲洗后置于荧光酶标仪中,设置激发波长 500 nm,发射波长 525 nm 检测细胞的荧光活性。细胞的荧光强度与细胞内活性氧的水平成正比。每个样本做 3 个复孔,实验重复 3 次,取平均值。将待测细胞上清液用超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒操作,在 450 nm 波长下检测吸光度,结果计算按照说明书要求计算。根据标准品的浓度与吸光度绘制标准曲线直线回归方程,将样品的吸光度带入公式,计算出样品的浓度。最终浓度再乘以样品的稀释倍数。丙二醛(MDA)检测试剂盒说明书要求操作后,在酶标仪上先后设置 600 nm 波长、532 nm 波长,测得相应的吸光值(A),结果计算 MDA 含量 = $6.45 \times (A_{532} - A_{600})$ 。

1.8 生物信息学分析

通过生物信息学在线预测网站 Starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn>) 预测能够与 APC 靶向结合的 miRNA,将从中筛选出的 miR-499a-5p 采用 miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 进行 miR-499a-5p 的保守性和稳定性确认。

1.9 双荧光素酶报告基因检测实验

将 APC 3'UTR-WT(含 APC 3'UTR 片段)和 APC 3'UTR-MUT(含 APC 3'UTR 片段突变体)克隆至 pGL3-Basic 载体的荧光素酶后的区域,建立荧光素酶报告质粒。再将 pGL3-APC 3'UTR-WT、pGL3-APC 3'UTR-MUT 用脂质体分别与 miR-NC、miR-499a-5p、anti-miR-NC、anti-miR-499a-5p 共转染至 H9c2 细胞。按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒操作手册的要求操作,进行细胞的裂解和荧光活性的检测。结果以海肾荧光素酶的荧光强度与萤火虫荧光素酶荧光强度的比值为细胞的荧光活性。

1.10 统计学处理

实验中的数据全部使用 Graph Pad Prism 7.0 软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析和组内 SNK-*q* 检验,两组比较独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 氧化应激心肌损伤细胞模型的建立

如表 1 所示,与对照组比较, H₂O₂ (100、200、400、800 μ mol/L) 处理的 H9c2 细胞存活率呈浓度依赖性下调。选取存活率约 50% 的 H₂O₂ 浓度用于后续试验,故用 400 μ mol/L H₂O₂ 用于心肌细胞损伤模型的建立。

表 1. 不同浓度 H₂O₂ 对 H9c2 存活率的影响($n=9$)

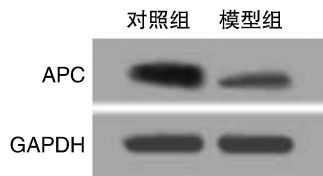
Table 1. Effect of different concentration of H₂O₂ on the survival rate of H9c2 ($n=9$)

分组	H ₂ O ₂ 浓度	存活率(%)
对照组	0 μ mol/L	100.00 \pm 6.14
H ₂ O ₂ 组	100 μ mol/L	80.34 \pm 4.89 ^a
	200 μ mol/L	71.37 \pm 5.75 ^a
	400 μ mol/L	53.67 \pm 4.98 ^a
	800 μ mol/L	45.71 \pm 3.12 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 miR-499a-5p、APC 在 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞中的表达

如图 1 和表 2 所示,与对照组比较,模型组细胞中 miR-499a-5p 表达显著升高,APC 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低($P < 0.05$)。

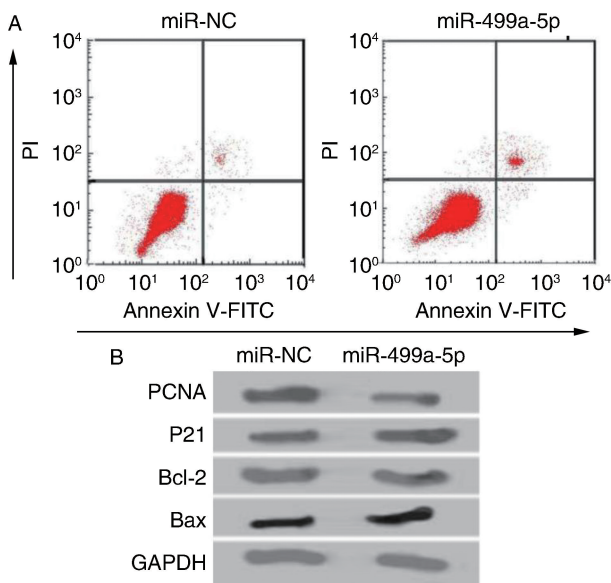
图 1. APC 在 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞中的蛋白表达Figure 1. Protein expression of APC in H_2O_2 -induced H9c2 cells表 2. miR-499a-5p、APC 在 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞中的表达 ($n=9$)Table 2. miR-499a-5p and APC expression in H_2O_2 -induced H9c2 cells ($n=9$)

分组	miR-499a-5p	APC mRNA	APC 蛋白
对照组	0.98±0.08	1.02±0.07	1.00±0.06
模型组	4.75±0.24 ^a	0.51±0.05 ^a	0.33±0.03 ^a

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较。

2.3 过表达 miR-499a-5p 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞存活、凋亡和氧化应激的影响

如图 2 和表 3 所示, 与 miR-NC 组比较, miR-499a-5p 组细胞中 miR-499a-5p 表达显著升高, 细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高, ROS、MDA 的含量均显著升高, SOD 含量显著降低, PCNA、Bcl-2 蛋白表达均显著降低, P21、Bax 蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$)。

图 2. 过表达 miR-499a-5p 的 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞凋亡图 and 增殖、凋亡相关蛋白的表达 A 为过表达 miR-499a-5p 的 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞的凋亡图; B 为增殖、凋亡相关蛋白的表达。Figure 2. Apoptosis of H9c2 cells induced by H_2O_2 overexpression of miR-499a-5p and expression of proliferation and apoptosis-related proteins表 3. 过表达 miR-499a-5p 对 H_2O_2 诱导 H9c2 细胞存活、凋亡和氧化应激的影响 ($n=9$)Table 3. Effect of overexpression of miR-499a-5p in H_2O_2 induced survival, apoptosis and oxidative stress of H9c2 cells ($n=9$)

指标	miR-NC 组	miR-499a-5p 组
miR-499a-5p	1.02±0.08	2.41±0.15 ^a
存活率 (%)	99.87±5.45	67.41±4.03 ^a
凋亡率 (%)	15.64±1.08	19.34±1.37 ^a
ROS (平均荧光值)	17.67±1.04	19.46±1.42 ^a
SOD (kU/g)	29.31±2.11	23.84±2.09 ^a
MDA ($\mu\text{mol/g}$)	3.11±0.34	3.97±0.32 ^a
PCNA	0.97±0.08	0.42±0.04 ^a
P21	0.99±0.09	1.64±0.12 ^a
Bcl-2	1.00±0.07	0.56±0.05 ^a
Bax	1.02±0.09	1.79±0.11 ^a

a 为 $P<0.05$, 与 miR-NC 组比较。

2.4 miR-499a-5p 靶向 APC

通过 Starbase 预测到 miR-499a-5p 与 APC 之间存在靶向结合位点 (图 3A)。与 miR-NC 组比较, miR-499a-5p 组 APC-WT 细胞荧光活性显著降低, miR-499a-5p 组细胞中 APC 蛋白表达显著降低; 与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-499a-5p 组 APC-WT 细胞荧光活性显著升高, 细胞中 APC 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$, 图 3B 和表 4)。



图 3. miR-499a-5p 靶向 APC A 为 miR-499a-5p 与 APC 的 3'UTR 的结合位点; B 为 miR-499a-5p 调控 APC 蛋白表达。

Figure 3. miR-499a-5p targeting to APC

表 4. miR-499a-5p 靶向 APC ($n=9$)Table 4. miR-499a-5p targeting to APC ($n=9$)

分组	荧光活性		APC 蛋白
	APC-WT	APC-MUT	
miR-NC 组	1.01±0.07	1.00±0.06	1.00±0.08
miR-499a-5p 组	0.37±0.03 ^a	0.97±0.07	0.45±0.04 ^a
anti-miR-NC 组	0.97±0.09	0.98±0.08	1.01±0.09
anti-miR-499a-5p 组	1.74±0.14 ^b	0.95±0.06	1.54±0.10 ^b

a 为 $P<0.05$, 与 miR-NC 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 anti-miR-NC 组比较。

2.5 过表达 APC 部分逆转 miR-499a-5p 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞的影响

如图 4 和表 5 所示,与 miR-499a-5p+pcDNA 组比较,miR-499a-5p+pcDNA-APC 组细胞中 miR-499a-

5p 表达显著降低,细胞存活率显著升高,细胞凋亡率显著降低,ROS、MDA 的含量均显著降低,SOD 含量显著升高,PCNA、Bcl-2 蛋白表达均显著升高,P21、Bax 蛋白表达均显著降低($P<0.05$)。

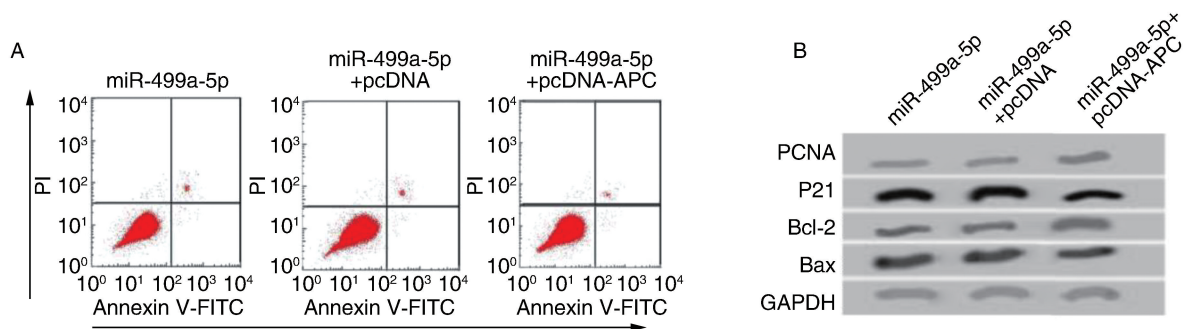


图 4. H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞凋亡图和增殖、凋亡相关蛋白的表达

A 为 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞的凋亡图;B 为增殖、凋亡相关蛋白的表达。

Figure 4. Apoptosis of H9c2 cells induced by H₂O₂ and expression of proliferation and apoptosis-related proteins

表 5. 过表达 APC 部分逆转 miR-499a-5p 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞的影响($n=9$)

Table 5. Overexpression of APC partially reversed the effect of miR-499a-5p on H₂O₂-induced H9c2 cells($n=9$)

指标	miR-499a-5p 组	miR-499a-5p+pcDNA 组	miR-499a-5p+pcDNA-APC 组
miR-499a-5p	1.00±0.07	0.98±0.09	0.31±0.03 ^a
存活率(%)	98.82±5.89	99.73±6.72	119.37±10.13 ^a
凋亡率(%)	18.67±1.14	19.03±1.62	13.86±1.27 ^a
ROS(平均荧光值)	18.94±1.05	18.79±1.36	15.33±1.22 ^a
SOD(kU/g)	21.52±2.01	21.34±1.47	29.74±1.10 ^a
MDA(μmol/g)	4.11±0.28	3.89±0.31	2.61±0.18 ^a
PCNA	0.98±0.05	0.99±0.07	0.67±0.06 ^a
P21	0.99±0.07	1.02±0.06	0.67±0.06 ^a
Bcl-2	0.98±0.05	0.97±0.09	1.87±0.13 ^a
Bax	1.01±0.07	1.00±0.09	0.43±0.04 ^a

a 为 $P<0.05$,与 miR-499a-5p+pcDNA 组比较。

3 讨论

miR-449a 在不稳定型心绞痛、急性冠状动脉综合征、急性心肌梗死患者的血样中含量增加^[9-10]。Zhao 等^[11]报道,miR-499a-5p 在缺氧/复氧模型心肌细胞中表达水平显著降低,过表达 miR-499a-5p 后细胞的凋亡率和乳酸盐脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)活性均下调,其作用机制与靶向分化簇 38(differentiation of 38 clusters,CD38)具有相关

性,揭示 miR-499a-5p 可通过靶向 CD38 减轻缺氧/复氧引起的心肌细胞损伤。Zhang 等^[12]报道,四甲基吡嗪(tetramethylpyrazine,TMP)可以部分缓解缺氧引起的 H9c2 细胞中 miR-449a 上调,并且 miR-449a 过表达减弱了 TMP 对缺氧处理 H9c2 细胞的治疗作用,另外沉默信息调节因子 1(information regulator 1,Sirt1)是 miR-449a 的靶基因,提示 TMP 通过下调 miR-499a,上调 Sirt1,然后激活 PI3K/AKT 途径部分缓解了缺氧引起的心肌细胞 H9c2 活力降低和凋亡。这提示 miR-499a 在缺氧诱导的 H9c2 细胞中表达异常上调。本研究检测了 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤中 miR-499a-5p 的表达,发现 miR-499a-5p 表达水平明显升高,并且过表达 miR-499a-5p 明显加重了 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞的增殖抑制、凋亡促进和氧化应激作用,说明 miR-499a-5p 参与 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤作用,这与 Zhang 等^[12]下调 miR-499a-5p 对缺氧心肌细胞损伤的保护作用相呼应,与 Zhao 等^[11]的关于 miR-499a-5p 保护心肌细胞缺血/再灌注损伤作用相悖。进一步通过生物信息学预测、双荧光素酶报告基因检测实验,发现 miR-499a-5p 能够靶向负调控 APC,这可能与 miR-499a-5p 在心肌细胞损伤中的功能具有相关性。

APC 通过抑制单核细胞产生的细胞因子而在抗炎过程中发挥重要作用,据报道在多种病理情况下 APC 均可减轻组织或器官的损伤,包括缺氧诱导的神经元和脑内皮细胞、心肌细胞凋亡^[13]。Ding 等^[14]在研究中发现,APC 给药的大鼠心脏中,与缺

血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 大鼠比较, 梗塞面积明显减小, APC 降低了促凋亡基因 Bax 和细胞色素 C 的表达, 表明 APC 通过上调与抗凋亡途径有关的蛋白质和基因的表达而产生心脏保护作用。Wang 等^[15] 在研究中发现, APC 对腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) 的激活改善了 I/R 小鼠心脏的缺血后心脏功能障碍, 并且 APC 能通过减弱 I/R 诱导的 c-Jun 氨基端激酶 (C-jun amino-terminal kinase, JNK) 和核转录因子 κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 信号传导通路抑制体内肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的产生, 表明 APC 通过调节 AMPK、NF- κ B 和 JNK 信号通路在心脏 I/R 损伤中发挥保护作用。本研究发现 APC 在 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞中表达明显降低, 并且过表达 APC 能够减轻 miR-499a-5p 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞损伤的加重作用。不足的是, 这个实验结果并未在动物体内进行验证, 这也是本课题下一步的研究计划。

综上所述, miR-499a-5p 参与 H_2O_2 诱导的心肌细胞损伤过程, 其机制与靶向抑制 APC 表达相关, 为氧化应激损伤心肌的靶向治疗提供理论参考。

[参考文献]

- [1] García N, Zazueta C, Aguilera AL. Oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017(4): 1-2.
- [2] Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, et al. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights [J]. *Kardiol Pol*, 2018, 76(4): 713-722.
- [3] Schulte C, Karakas M, Zeller T. microRNAs in cardiovascular disease-clinical application [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(5): 687-704.
- [4] Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar KK. MicroRNA in cardiovascular biology and disease[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(5): 865-874.
- [5] Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C, protease activated receptor1, and neuroprotection[J]. *Blood*, 2018, 132(2): 159-169.
- [6] Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: biased for translation [J]. *Blood*, 2015, 125(19): 2898-2907.
- [7] Barefield DY, McNamara JW, Lynch TL, et al. Ablation of the calpain-targeted site in cardiac myosin binding protein-C is cardioprotective during ischemia-reperfusion injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 129(4): 236-246.
- [8] Liu F, Zhang H, Zhang Z, et al. miR-208a aggravates H_2O_2 -induced cardiomyocyte injury by targeting APC[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 864(11): 172668.
- [9] Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(7): 1183-1185.
- [10] Shalaby SM, Elsa S, Shoukry A, et al. Serum miRNA-499 and miRNA-210: A potential role in early diagnosis of acute coronary syndrome [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(8): 673-682.
- [11] Zhao L, Wang B, Zhang W, et al. Effect of miR-499a-5p on damage of cardiomyocyte induced by hypoxia-reoxygenation via downregulating CD38 protein [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 26(8): 1-3.
- [12] Zhang X, Dong H, Liu Y, et al. Tetramethylpyrazine partially relieves hypoxia-caused damage of cardiomyocytes H9c2 by downregulation of miR-449a[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 15(2): 1-10.
- [13] 张 玥. Cdh1-APC 在缺血缺氧性神经元凋亡中的作用及机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014: 1-67.
- [14] Ding JW, Tong XH, Yang J, et al. Activated protein C protects myocardium via activation of anti-apoptotic pathways of survival in ischemia-reperfusion rat heart[J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(11): 1609-1615.
- [15] Wang J, Yang L, Rezaie AR, et al. Activated protein C protects against myocardial ischemic/reperfusion injury through AMP-activated protein kinase signaling [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(7): 1308-1317.

(此文编辑 朱雯霞)