

miR-376b-3p 通过靶向 FGF21 加重缺氧复氧心肌细胞的损伤

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-376b-3p; 成纤维细胞生长因子 21; 缺氧复氧; 心肌细胞

[摘要] **目的** 探讨 miR-376b-3p 对缺氧复氧(H/R)心肌细胞增殖、凋亡的影响及机制。**方法** 培养心肌细胞 H9c2, 缺氧复氧法体外模拟 H/R 细胞损伤, 建立心肌细胞损伤模型。用流式细胞术、免疫印迹(Western blot)、酶联免疫吸附(ELISA)检测正常对照组、H/R 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-376b-3p 组、anti-miR-376b-3p+si-NC 组、anti-miR-376b-3p+si-成纤维细胞生长因子 21(FGF21)组细胞凋亡率、凋亡相关蛋白 B 淋巴瘤 2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 17(IL-17)情况。双荧光素酶报告基因实验检测细胞的荧光活性。**结果** 成功建立缺氧复氧损伤的细胞模型; 模型组细胞中 miR-376b-3p 表达显著升高, FGF21 表达显著降低, 并且抑制 miR-376b-3p 可以减轻损伤细胞的凋亡和 TNF- α 、IL-6、IL-17 的含量, 以及上调 Bcl-2, 下调 Bax。此外, miR-376b-3p 还可靶向 FGF21 mRNA。抑制 FGF21 后, 抑制 miR-376b-3p 对缺氧复氧损伤的 H9c2 细胞的保护作用被减弱。**结论** miR-376b-3p 可促进缺氧复氧心肌细胞的凋亡和炎症反应, 其机制与靶向 FGF21 mRNA 相关。

[中图分类号] R542.2

[文献标识码] A

Mechanism of miR-376b-3p promoting the injury of hypoxia reoxygenation myocardial cells by targeting FGF21

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-376b-3p; FGF21; hypoxia reoxygenation; cardiomyocytes

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of miR-376b-3p on proliferation and apoptosis of hypoxia reoxygenation (H/R) cardiomyocytes. **Methods** Cultured cardiomyocyte H9c2, hypoxia-reoxygenation method was used to simulate hypoxia reoxygenation injury in vitro, and a model of myocardial cell injury was established. Flow cytometry, Western blot, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the apoptosis rate, apoptosis-related B lymphoblastoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2 related X gene (Bax) protein expression and inflammatory factors secreted tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-17 (IL-17) in normal control group, H/R group, anti-miR-NC group, anti-miR-376b-3p group, anti-miR-376b-3p + si-NC group, anti-miR-376b-3p + si-fibroblast growth factor 21 (FGF21) group. The dual luciferase reporter gene assay was used to detect the fluorescence activity. **Results** A cell model of hypoxia reoxygenation injury was successfully established. miR-376b-3p mRNA expression was significantly increased, FGF21 mRNA and protein expression were significantly decreased in the model group. The cell apoptosis and inflammatory factor levels of TNF- α , IL-6, IL-17 were all inhibited, as well as up-regulation of Bcl-2 protein expression, down-regulation of Bax protein expression in inhibiting miR-376b-3p group. In addition, miR-376b-3p can also target FGF21 mRNA. After inhibiting FGF21, the protective effect of inhibiting miR-376b-3p on H9c2 cells damaged by hypoxia reoxygenation was weakened. **Conclusion** miR-376b-3p can promote the apoptosis and inflammatory response of hypoxia reoxygenation myocardial cells, and its mechanism may be related to targeting FGF21 mRNA.

[收稿日期] 2019-11-11

[修回日期] 2019-12-19

[基金项目] 河北省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。

心肌缺血缺氧再灌注是指在短时间内中断心肌供血和供氧,并在一定时间内恢复供血和供氧,使原始缺血性心肌损伤比供血和供氧前更为严重^[1-2]。心肌缺血缺氧再灌注损伤可诱导心肌细胞凋亡并增加心肌梗死面积,这也是急性心肌梗死患者再灌注后死亡率高的原因^[3-4]。由于对心肌缺血缺氧再灌注损伤的机制尚未十分清楚,导致其在临床治疗中也存在局限。因此,对心肌缺氧复氧(hypoxia reoxygenation, H/R)损伤的细胞和分子机制的研究能够有助于临床上更好地治疗此类疾病。微小RNA(microRNA, miRNA)参与人类多种疾病的发展过程,其中包括心肌缺氧复氧损伤^[5]。miR-376b-3p在肾细胞癌、胃癌中均具有调控癌细胞恶化的作用^[6-7]。miR-376b-3p是原发性肾细胞癌和耐药肾细胞癌中显著下调的miRNA之一^[6],还可作为长链非编码RNA TTN反义RNA 1(long non-coding RNA TTN antisense RNA 1, LncRNA TTN-AS1)的竞争性内源RNA参与胃癌细胞的增殖、凋亡和迁移侵袭调控^[7],但是其在缺氧复氧心肌损伤中的作用及机制尚未十分清楚。成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor 21, FGF21)在H/R引起的心脏损伤中具有抗凋亡和促增殖的保护作用^[8],但是其与miR-376b-3p在H/R心肌损伤中作用的相关性尚未可知。本研究旨在探究miR-376b-3p在H/R心肌损伤中的作用及机制,以期为H/R心肌损伤的治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

H9c2细胞购自中国科学院细胞库;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙锭(Annexin-V fluorescein isothiocyanate/Propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)检测试剂盒、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)检测试剂盒,白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)检测试剂盒均购自上海碧云天研究所;反转录试剂盒购自Fermentas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)检测试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司。miR-NC、miR-376b-3p、anti-miR和siFGF21均由上海吉玛公司设计合成,相关引物的合成也由该公司完成。

1.2 缺氧复氧模型的建立

将H9c2细胞用含有10%胎牛血清的杜氏细胞培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)在37℃、5%CO₂培养箱中常规培养传代。

按照孙弼等^[9]方法对H9c2细胞进行缺氧24h复氧1h模拟缺血再灌注心肌细胞损伤,建立缺氧复氧模型(H/R组)。将正常培养的H9c2细胞标记为正常对照组。用5倍DNA或质粒量的脂质体将miR-NC组(转染miR-NC)、miR-376b-3p组(转染miR-376b-3p mimics)、anti-miR-NC组(转染anti-miR-NC)、anti-miR-376b-3p组(转染anti-miR-376b-3p)、anti-miR-376b-3p+si-NC组(共转染anti-miR-376b-3p和si-NC)、anti-miR-376b-3p+si-FGF21组(共转染anti-miR-376b-3p和si-FGF21)转染至H9c2细胞,转染8h后,补充新鲜培养基继续培养48h,用qRT-PCR法确认转染的效率是否达到要求,将转染成功的各组细胞进行缺氧复氧处理,最后将各组细胞用于后续的流式细胞术、酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫印迹(Western blot)和qRT-PCR实验。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡

收集所要检测的细胞,离心,用培养基调整至10⁸个/L,取2mL离心。将沉淀细胞用结合缓冲液500 μ L进行悬浮,然后按照Annexin V-FITC双染细胞凋亡检测试剂盒要求操作加入Annexin V-FITC、PI进行避光反应10min,结束后立即上流式细胞仪进行凋亡的检测分析。凋亡率(%)=早期凋亡率(%) + 晚期凋亡率(%)。

1.4 ELISA检测TNF- α 、IL-6、IL-17的含量

收集所要检测的细胞,离心取上清液,用于TNF- α 、IL-6、IL-17含量的检测。具体操作步骤和结果判定均按照TNF- α 检测试剂盒、IL-6检测试剂盒、IL-17 ELISA检测试剂盒的说明书要求进行操作。

1.5 Western blot检测Bcl-2、Bax、FGF21的蛋白表达

收集所要检测的细胞,用蛋白裂解液在冰上对细胞进行充分的裂解,提取总蛋白。用考马斯亮蓝染色对蛋白进行定量,最后用沸水浴法对蛋白进行变性。变性后,将上清液用来进行蛋白电泳的上样。电泳结束后,将蛋白用转膜仪转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,转膜过程中整个仪器及环境必须保持在4℃环境中。转膜结束后,用脱脂奶粉进行封闭处理,再进行一抗(1:

500~1:1 500)4 ℃ 孵育过夜处理。取出膜,再浸入二抗溶液(1:1 000 倍稀释)中在室温条件下孵育 2 h。结束后用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)发光试剂盒进行显影、曝光处理,图片用 Quantity One 软件分析条带灰度,以目的条带灰度值与磷酸甘油醛脱氢酶(phosphoglyceraldehyde dehydrogenase, GAPDH)灰度值的比值表示目的蛋白的表达。

1.6 qRT-PCR 检测 miR-376b-3p、FGF21 mRNA 表达

收集所要检测的细胞,将细胞用 Trizol 液提取总 RNA,采用分光光度法在 260 nm 处测定 RNA 水平,尽量快速使用反转录试剂盒和荧光定量试剂盒分别将 RNA 反转录为 cDNA,并配制反应体系,进行扩增,以 U6、GAPDH 为内参,实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。反应条件为:94 ℃ 变性 2 min;然后 94 ℃,30 min→58 ℃,30 s→72 ℃,30 s 进行循环扩增,共 45 个循环,最后延伸温度 72 ℃,2 min。引物信息(5'-3'):miR-376b-3p 上游引物 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA ACA TGG-3',下游引物 5'-GTT AAT CAT AGA GGA AAA TCC ATG TT-3';FGF21 上游引物 5'-CTG GGG GTC TAC CAA GCA TA-3',下游引物 5'-CAC CCA GGA TTT GAA TGA CC-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';GAPDH 上游引物 5'-TCC CTC AAG ATT GCT AGC AA-3',下游引物 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'。

1.7 生物信息学分析

通过生物信息学在线靶基因预测网站 Starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn>) 预测与 FGF21 相结

合的潜在 miRNA。根据 miRNA 的稳定性和 miRNA 在 NCBI 心肌损伤中差异表达谱分析确认最佳 miRNA 为 miR-376b-3p。

1.8 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞中 miR-376b-3p 与 FGF21 的结合力

用 psiCHECK-2 载体将合成的目的基因序列(FGF21-WT)和突变序列(FGF21-MUT)克隆至载体,构建荧光素酶报告基因载体 psiCHECK-2-FGF21-WT、psiCHECK-2-FGF21-MUT,然后用热激法将其转染至感受态细胞,经过优势菌落筛选,扩大优势菌落培养,提取质粒 DNA。然后将 psiCHECK-2-FGF21-WT、psiCHECK-2-FGF21-MUT 用脂质体法分别与 miR-NC、miR-376b-3p、anti-miR-NC、anti-miR-376b-3p 共转染至 H9c2。最后按照双荧光素酶报告基因检测实验试剂盒操作说明书要求操作,以海參荧光值与萤光虫荧光值的比值表示 miR-376b-3p 与 FGF21 的结合力。

1.9 统计学处理

实验中所用到的所有数据采用 SPSS 22.1 进行分析,GraphPad Prism 6.0 进行相关图片绘制,计量均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用 ANOVA+SNK-*q* 检验,两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧复氧模型的建立

如图 1、表 1 和图 2 所示,与正常对照组比较,H/R 组细胞凋亡率显著升高,TNF- α 、IL-6、IL-17 的含量均显著升高,细胞中 Bcl-2 蛋白表达显著降低,Bax 蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$)。

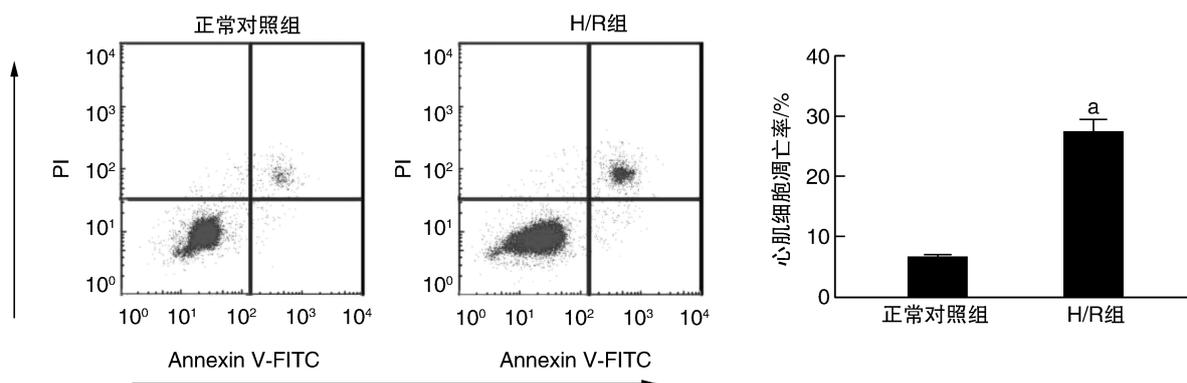


图 1. 正常对照组、H/R 组心肌细胞凋亡情况的比较 a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

Figure 1. Comparison of cardiomyocyte apoptosis in normal control group and H/R group

表 1. 正常对照组、H/R 组心肌细胞中 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量的比较 (n=9)

Table 1. Comparison of contents of TNF- α , IL-6 and IL-17 in cardiomyocytes of normal control group and H/R group (n=9)

分组	TNF- α	IL-6	IL-17
正常对照组	156.14 \pm 9.28	123.02 \pm 7.09	104.20 \pm 8.63
H/R 组	189.35 \pm 8.93 ^a	175.21 \pm 9.75 ^a	153.17 \pm 9.91 ^a
<i>t</i>	7.736	12.988	11.180
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

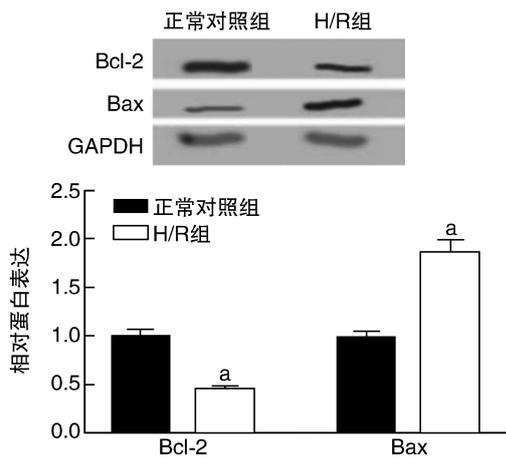


图 2. Bcl-2、Bax 蛋白在正常对照组、H/R 组心肌细胞中的表达 a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

Figure 2. Expression of Bcl-2 and Bax protein in cardiomyocytes of normal control group and H/R group

2.2 缺氧复氧 H9c2 细胞中 miR-376b-3p、FGF21 的差异表达

如表 2、图 3 所示,与正常对照组比较,H/R 组细胞中 miR-376b-3p 表达显著升高,FGF21 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。

表 2. miR-376b-3p、FGF21 mRNA 在正常对照组、H/R 组心肌细胞中的表达 (n=9)

Table 2. Expression of miR-376b-3p and FGF21 mRNA in normal control group and H/R group (n=9)

分组	miR-376b-3p	FGF21 mRNA
正常对照组	1.01 \pm 0.08	1.00 \pm 0.06
H/R 组	3.09 \pm 0.21 ^a	0.52 \pm 0.05 ^a
<i>t</i>	27.768	18.437
<i>P</i>	0.000	0.000

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

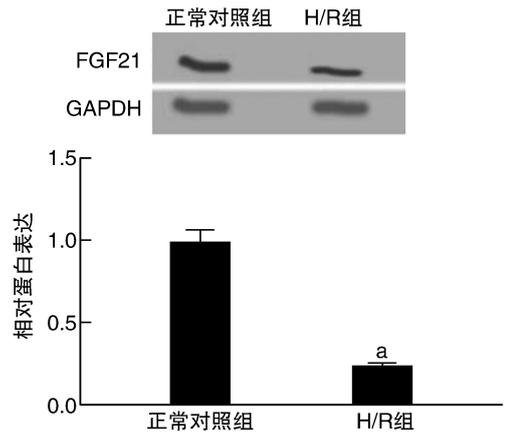


图 3. FGF21 蛋白在正常对照组、H/R 组心肌细胞中的表达 a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

Figure 3. Expression of FGF21 protein in cardiomyocytes of normal control group and H/R group

2.3 抑制 miR-376b-3p 对缺氧复氧 H9c2 细胞凋亡、炎症因子含量的影响

与 anti-miR-NC 组比较,anti-miR-376b-3p 组细胞凋亡率显著降低 (图 4), TNF- α 、IL-6、IL-17 的含量均显著降低 (表 3), 细胞中 Bcl-2 蛋白表达显著升高, Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$; 图 5)。

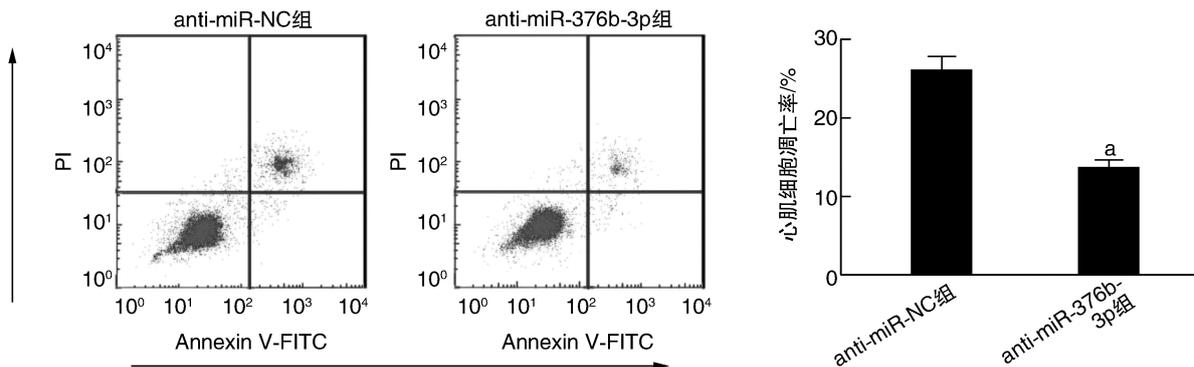


图 4. 抑制 miR-376b-3p 对 H/R 心肌细胞凋亡的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 anti-miR-NC 组比较。

Figure 4. Effect of miR-376b-3p inhibition on apoptosis of H/R cardiomyocytes

表 3. 抑制 miR-376b-3p 对 H/R 心肌细胞 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量的影响 ($n=9$)Table 3. Effect of miR-376b-3p inhibition on the contents of TNF- α , IL-6 and IL-17 in H/R cardiomyocytes ($n=9$)

分组	TNF- α	IL-6	IL-17
anti-miR-NC 组	179.88 \pm 8.55	172.98 \pm 9.21	147.33 \pm 8.17
anti-miR-376b-3p 组	160.03 \pm 9.87 ^a	151.08 \pm 8.68 ^a	127.94 \pm 9.98 ^a
<i>t</i>	4.560	5.191	4.510
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

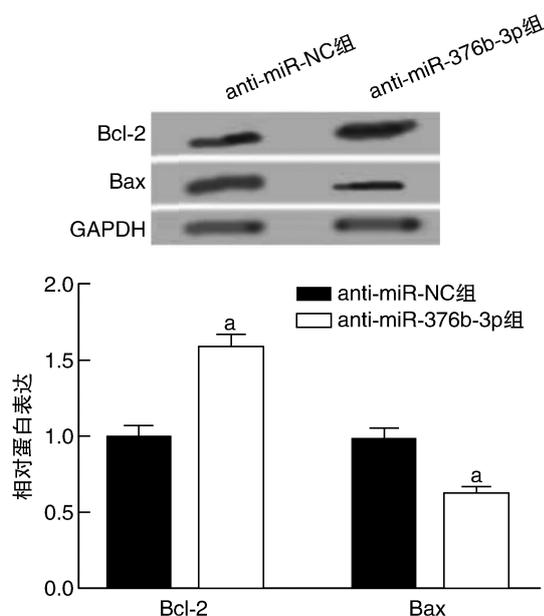
a 为 $P<0.05$, 与 anti-miR-NC 组比较。图 5. 抑制 miR-376b-3p 对 H/R 心肌细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 a 为 $P<0.05$, 与 anti-miR-NC 组比较。

Figure 5. Effect of miR-376b-3p inhibition on the expression of Bcl-2 and Bax in H/R cardiomyocytes

2.4 miR-376b-3p 靶向 FGF21 mRNA

生物信息学分析预测到 miR-376b-3p 与 FGF21 的 3' UTR 端存在连续的靶向结合位点 (图 6)。与 miR-NC 组比较, miR-376b-3p 组 FGF21-WT 心肌细胞的荧光活性显著降低 ($P<0.05$), FGF21-MUT 细胞的荧光活性变化不显著 (表 4), miR-376b-3p 组心肌细胞中 FGF21 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$; 图 7)。与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-376b-3p 组 FGF21-WT 心肌细胞的荧光活性显著升高 ($P<0.05$), FGF21-MUT 细胞的荧光活性变化不显著 (表 4), anti-miR-376b-3p 组心肌细胞 FGF21 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$; 图 7)。



图 6. miR-376b-3p 与 FGF21 互补的结合位点

Figure 6. Complementary binding sites of miR-376b-3p and FGF21

表 4. 双荧光素酶报告基因实验结果 ($n=9$)Table 4. Results of double luciferase reporter gene experiment ($n=9$)

分组	FGF21-WT	FGF21-MUT
miR-NC 组	1.00 \pm 0.05	1.01 \pm 0.07
miR-376b-3p 组	0.41 \pm 0.04 ^a	0.99 \pm 0.05
anti-miR-NC 组	0.99 \pm 0.09	0.98 \pm 0.08
anti-miR-376b-3p 组	1.89 \pm 0.09 ^b	0.97 \pm 0.09
<i>F</i>	661.640	0.479
<i>P</i>	0.000	0.699

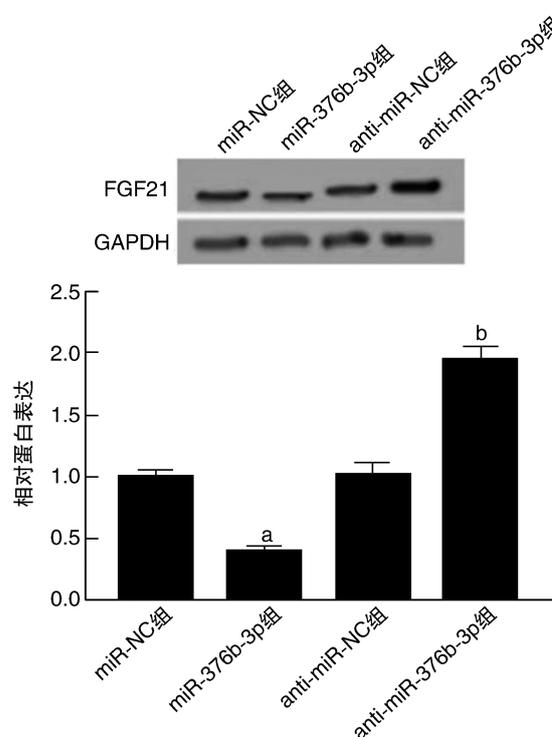
a 为 $P<0.05$, 与 miR-NC 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 anti-miR-NC 组比较。

图 7. miR-376b-3p 负向调控心肌细胞 FGF21 蛋白表达

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

Figure 7. miR-376b-3p negatively regulates FGF21 protein expression in cardiomyocytes

2.5 敲减 FGF21 逆转抑制 miR-376b-3p 对 H/R 心肌细胞凋亡、炎症因子分泌的影响

与 anti-miR-376b-3p + si-NC 组比较, anti-miR-

376b-3p+si-FGF21 组心肌细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$; 图 8), TNF- α 、IL-6、IL-17 的含量均显著升高

($P < 0.05$; 表 5), 细胞中 Bcl-2 蛋白表达显著降低, Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$; 图 9)。

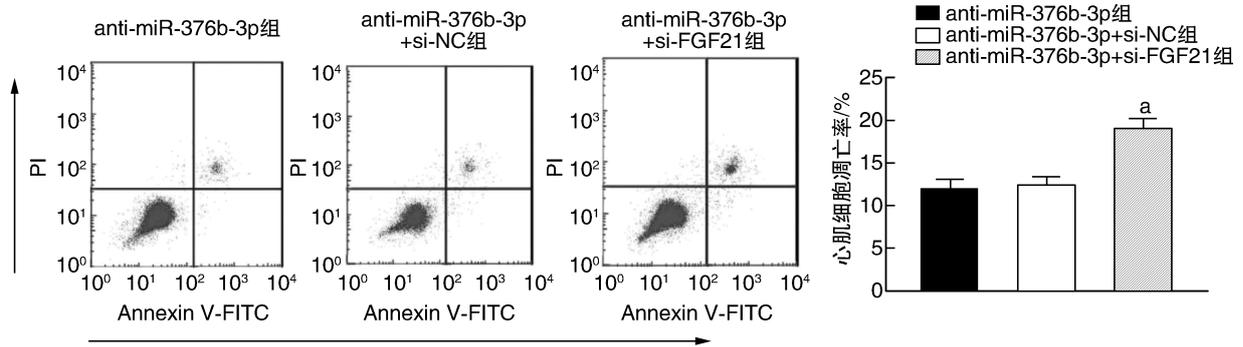


图 8. 敲减 FGF21 逆转抑制 miR-376b-3p 对 H/R 心肌细胞凋亡的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 anti-miR-376b-3p+si-NC 组比较。
Figure 8. Knockdown of FGF21 reverses the regulation of miR-376b-3p on apoptosis of H/R cardiomyocytes

表 5. 心肌细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-17 含量的比较 ($n=9$)

Table 5. Comparison of contents of inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-17 in cardiomyocytes ($n=9$) $\mu\text{g/g}$

分组	TNF- α	IL-6	IL-17
anti-miR-376b-3p 组	156.99 \pm 8.67	150.97 \pm 10.47	132.54 \pm 7.89
anti-miR-376b-3p+si-NC 组	157.37 \pm 7.95	148.67 \pm 8.44	130.24 \pm 9.05
anti-miR-376b-3p+si-FGF21 组	171.33 \pm 8.61 ^a	168.41 \pm 8.78 ^a	143.16 \pm 7.98 ^a
<i>F</i>	8.484	12.196	6.171
<i>P</i>	0.002	0.000	0.007

a 为 $P < 0.05$, 与 anti-miR-376b-3p+si-NC 组比较。

3 讨论

本研究成功建立了缺氧复氧损伤心肌细胞模型,并通过 qRT-PCR、Western blot 检测了其 miR-376b-3p 的表达,发现 miR-376b-3p 表达明显升高,并且抑制 miR-376b-3p 能够抑制损伤心肌细胞的凋亡和致炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-17 的分泌,说明 miR-376b-3p 在缺氧复氧心肌细胞的损伤过程中发挥促进作用,再次验证了 miR-376b-3p 的促进缺氧复氧心肌损伤的功能。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,证实了 miR-376b-3p 靶向 FGF21 mRNA,这可能与 miR-376b-3p 在心肌细胞损伤中的功能具有一定的相关性。本研究还检测了缺氧复氧心肌细胞中 FGF21 的表达,发现 FGF21 的表达明显降低。敲减 FGF21 后,抑制 miR-

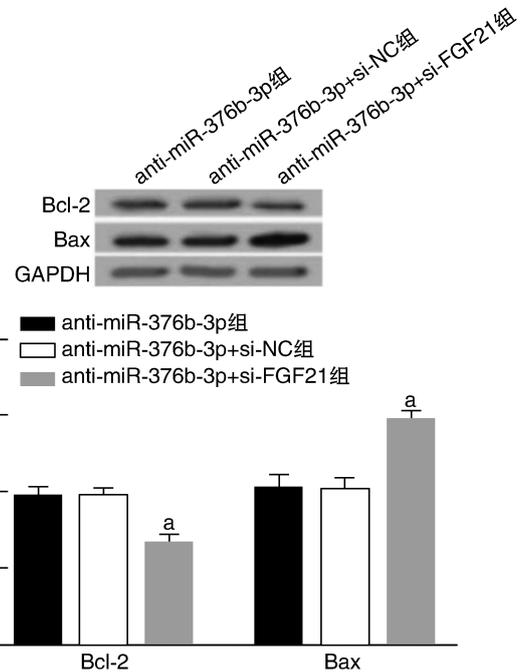


图 9. 敲减 FGF21 逆转抑制 miR-376b-3p 对 H/R 心肌细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 anti-miR-376b-3p+si-NC 组比较。

Figure 9. Downregulation of Bcl-2 and Bax protein expression in H/R cardiomyocytes by downregulation of miR-376b-3p by FGF21 knockdown

376b-3p 对缺氧复氧心肌细胞的凋亡和致炎因子分泌的抑制作用被部分逆转,这个结果在一定程度上也说明了 FGF21 是 miR-376b-3p 在缺氧复氧心肌细胞损伤中发挥作用的功能性靶标。

miR-376b-3p 在脑缺血和心肌肥厚病的发展过

程中均具有一定的影响^[10-11]。Pan 等^[12]研究发现,毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3 能够保护大鼠心肌缺血性保护,并且在缺血性心脏组织中 miR-376b-3p 显著上调,在体外促进过氧化氢诱导的 H9c2 细胞损伤,如细胞存活率降低、细胞内游离的 Ca²⁺ 和细胞内活性氧含量升高,产生种种作用的机制与 miR-376b-3p 直接靶向调控脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 相关,提示 miR-376b-3p 通过靶向 BDNF 促进心肌缺血的损伤。这为研究 miR-376b-3p 在心肌缺氧复氧损伤中的功能机制奠定了基础,于是本研究提出 miR-376b-3p 促进缺氧复氧损伤心肌细胞的凋亡和炎症因子的分泌假说。在心肌细胞保护过程中致炎因子的分泌所造成的炎症损伤占有重要地位,因此本研究检测了炎症因子指标 TNF- α 、IL-6、IL-17 在缺氧复氧心肌细胞上清液中的含量,以说明心肌细胞中的炎症变化情况。

FGF21 在人类的多种疾病中均能够发挥一定的调节作用,其中包括心脏的保护^[13]。Hu 等^[14]报道,在 H/R 诱导心肌细胞损伤后,FGF21 给药可抑制细胞凋亡并增加细胞增殖能力。qPCR 和蛋白质印迹数据显示 H/R 诱导的损伤后葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 的水平降低,而 FGF21 的给药可以逆转该变化;另外,使用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制血管生成素 2 (angiopoietin, Angpt2) 表达可通过上调 GLUT1 增强 FGF21 的心脏保护作用,揭示了使用 FGF21 可防止心肌细胞受 H/R 诱导的损伤,并且通过使用 FGF21 进一步抑制 Angpt2 可诱导 GLUT1 的表达,其可促进心肌细胞的能量代谢,因此导致更有效的的心脏保护作用,提示 FGF21 的给药和 Angpt2 的抑制可能是 I/R 引起的心脏损伤的一种新型治疗方法。最近,Hu 等^[15]研究报道,FGF21 可降低 I/R 损伤后的心肌梗死,改善 H/R 诱导的细胞凋亡,并抑制 H/R 诱导的血清中乳酸盐脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、TNF- α 和 IL-6 的表达,并下调 miR-145,上调 Angpt2 表达增加,抑制细胞的自噬,揭示了 FGF21 通过促进 miR-145 水平和自噬同时抑制 Angpt2 表达,从而保护心肌细胞免受 I/R 损伤,提示了一种针对心肌 I/R 损伤的新型治疗策略。这些研究证实了 FGF21 在缺氧复氧心肌细胞损伤中的保护作用。这与本研究的实验结果相一致。不足之处,这些结果尚待在动物体内进行验证。

综上所述,抑制 miR-376b-3p 可抑制缺氧复氧心肌细胞的凋亡和炎症反应,发挥保护心肌作用,

其机制与靶向 FGF21 mRNA 相关,为心肌的缺氧复氧损伤提供新的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Tong Q, Zhu PC, Zhuang Z, et al. Notoginsenoside R1 for organs ischemia/reperfusion injury: apreclinical systematic review [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 17(10): 1204-1204.
- [2] Thind GS, Agrawal PR, Hirsh B, et al. Mechanisms of myocardial ischemia-reperfusion injury and the cytoprotective role of minocycline: scope and limitations[J]. *Future Cardiol*, 2015, 11(1): 61-76.
- [3] Martin del CSE, Latchana N, Levine KM, et al. miR-21 enhances melanoma invasiveness via inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 expression: in vivo effects of miR-21 inhibitor[J]. *Plos One*, 2015, 10(1): e0115919.
- [4] Yang J, Zhang F, Shi H, et al. Neutrophil-derived advanced glycation end products-N ϵ -(carboxymethyl) lysine promotes RIP3-mediated myocardial necroptosis via RAGE and exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *FASEB J*, 2019, 30(10): 115.
- [5] Liu S, He Y, Shi J, et al. Downregulation of miRNA-30a enhanced autophagy in osthole-alleviated myocardium ischemia/reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 24(4): 1-10.
- [6] Kovacova J, Juracek J, Poprach A, et al. miR-376b-3p is associated with long-term response to sunitinib in metastatic renal cell carcinoma patients[J]. *Cancer Genom Proteom*, 2019, 16(5): 353-359.
- [7] Dong MM, Peng SJ, Yuan YN, et al. LncRNA TTN-AS1 contributes to gastric cancer progression by acting as a competing endogenous RNA of miR-376b-3p[J]. *Neoplasma*, 2019, 66(4): 564-575.
- [8] Pothoff MJ. FGF21 and metabolic disease in 2016: A new frontier in FGF21 biology[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(2): 74-76.
- [9] 孙弼, 宛蕾, 林晓坚, 等. 太子参多糖对缺血再灌注损伤模型大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用研究[J]. *中国药房*, 2018, 634(16): 20-24.
- [10] Sun YL, Li SH, Yang L, et al. miR-376b-3p attenuates mitochondrial fission and cardiac hypertrophy by targeting mitochondrial fission factor [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45(8): 779-787.
- [11] Li LJ, Huang Q, Zhang N, et al. miR-376b-5p regulates angiogenesis in cerebral ischemia[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 527-535.
- [12] Pan Z, Guo Y, Qi H, et al. M3 subtype of muscarinic acetylcholine receptor promotes cardioprotection via the suppression of miR-376b-5p[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32571.
- [13] Redondo AI, Mas SA, Sitges M, et al. Fgf21 is required for cardiac remodeling in pregnancy [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(13): 1574-1584.
- [14] Hu S, Cao S, Liu J. Role of angiopoietin-2 in the cardioprotective effect of fibroblast growth factor 21 on ischemia/reperfusion-induced injury in H9c2 cardiomyocytes[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 771-779.
- [15] Hu S, Cao S, Tong Z, et al. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11): 3677-3688.

(此文编辑 朱雯霞)