

RhoA/ROCK 通路在缺氧复氧诱导的人心肌 AC16 细胞损伤中的作用机制

朱振侠, 杨晓霞, 冯斐斐

(郑州煤炭工业(集团)有限责任公司大平煤矿医院内科, 河南省郑州市 450000)

[关键词] 心肌细胞; RhoA/ROCK 通路; 炎症反应; 细胞凋亡; 氧化应激; NF- κ B 通路

[摘要] **目的** 探讨 Ras 同源基因家族成员 A (RhoA)/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 (ROCK) 通路在缺氧复氧 (H/R) 诱导的人心肌 AC16 细胞损伤中的作用及其机制。**方法** 将体外培养的 AC16 细胞分为对照组 (正常培养)、H/R 组 (构建 H/R 模型)、H/R+NC-siRNA 组 (转染 NC-siRNA 后构建 H/R 模型) 和 H/R+RhoA-siRNA 组 (转染 RhoA-siRNA 后构建 H/R 模型), 采用 MTT 法检测 AC16 细胞存活率, 流式细胞术检测 AC16 细胞凋亡率, 比色法检测 AC16 细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和 Caspase-3 活性, ELISA 检测 AC16 细胞上清液中白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平, 试剂盒检测 AC16 细胞超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 水平, 实时荧光定量 PCR 检测 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、核因子 κ B (NF- κ B) p65 及 I κ B 激酶 (IKK) 的 mRNA 表达水平, Western blot 检测 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65、磷酸化 NF- κ B (p-NF- κ B) p65 及 IKK 的蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, H/R 组细胞存活率、SOD 水平显著降低, 细胞凋亡率、LDH 活性、Caspase-3 活性、MDA 水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平以及细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、IKK mRNA 与蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); H/R+NC-siRNA 组和 H/R 组之间上述各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 H/R+NC-siRNA 组比较, H/R+RhoA-siRNA 组细胞存活率、SOD 水平显著升高, 细胞凋亡率、LDH 活性、Caspase-3 活性、MDA 水平和细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平以及细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、IKK mRNA 与蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 靶向抑制 RhoA/ROCK 通路可通过降低炎症反应、氧化应激和细胞凋亡减轻 H/R 诱导的人心肌细胞损伤。

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Mechanism of RhoA/ROCK pathway in hypoxia/reoxygenation induced injury of human cardiac AC16 cells

ZHU Zhenxia, YANG Xiaoxia, FENG Feifei

(Department of Internal Medicine, Daping Coal Mine Hospital of Zhengzhou Coal Industry (Group) Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 450000, China)

[KEY WORDS] cardiomyocytes; RhoA/ROCK pathway; inflammatory response; apoptosis; oxidative stress; NF- κ B pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role and mechanism of Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK) pathway in hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced injury in human cardiac AC16 cells. **Methods** AC16 cells cultured in vitro were divided into control group (normal culture), H/R group (construction of H/R model), H/R+NC-siRNA group (H/R model was constructed after transfection of NC-siRNA) and H/R+RhoA-siRNA group (H/R model was established after transfection of RhoA-siRNA), MTT assay was used to detect the survival rate of AC16 cells, the apoptosis rate of AC16 cells was detected by flow cytometry, the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and Caspase-3 in AC16 cells were detected by colorimetry, the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the supernatant of AC16 cells were detected by ELISA, the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in AC16 cells were detected by kit, the mRNA ex-

[收稿日期] 2020-11-02

[修回日期] 2021-12-27

[基金项目] 河南省科技攻关项目 (182102310166)

[作者简介] 朱振侠, 主治医师, 研究方向为心血管内科, E-mail 为 zx8702dj@163.com。

pression levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 and IKK kinase (IKK) in AC16 cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, the protein expression levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, NF- κ B p65, phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B) p65 and IKK in AC16 cells were detected by Western blot. **Results** Compared with those in the control group, the cell survival rate and SOD level in H/R group were significantly lower, apoptosis rate, LDH activity, Caspase-3 activity, MDA level, IL-6, IL-1 β and TNF- α levels in cell supernatant, RhoA, ROCK1, ROCK2, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, IKK mRNA and protein expression levels were significantly higher ($P < 0.05$). There was no significant difference in the above indexes between H/R+NC-siRNA group and H/R group ($P > 0.05$). Compared with those in H/R+NC-siRNA group, the cell survival rate and SOD level in H/R+RhoA-siRNA group were significantly higher, apoptosis rate, LDH activity, Caspase-3 activity, MDA level, IL-6, IL-1 β and TNF- α levels in cell supernatant, RhoA, ROCK1, ROCK2, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, IKK mRNA and protein expression levels were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Targeted inhibition of RhoA/ROCK pathway can reduce H/R-induced cardiomyocyte injury by reducing inflammatory response, oxidative stress and apoptosis.

心肌缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤是急性心肌梗死等缺血性心脏病患者冠状动脉搭桥术中常见的并发症^[1-2], 而如何有效改善 I/R 损伤是临床治疗的关键。目前, 关于心肌 I/R 损伤发生的机制尚不完全清楚, 但与心肌细胞凋亡、炎症反应和氧化应激等的发生有关^[3-5]。Ras 同源基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA) 是一种小分子三磷酸鸟苷结合蛋白, Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 (Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK) 是其下游效应分子, RhoA/ROCK 通路不仅可影响细胞凋亡还在细胞炎症反应和氧化应激等过程中发挥着重要作用, 与糖尿病性心脏病、肝癌和急性肠道炎等多种疾病的发生密切相关^[6-8]。有研究指出, RhoA/ROCK 通路异常活化可通过影响心肌自噬和凋亡参与心肌 I/R 损伤发生^[9], 但 RhoA/ROCK 通路在心肌 I/R 损伤中的作用机制并不完全清楚。缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 心肌细胞损伤是体外模拟心肌 I/R 损伤的常用研究模型, 其在细胞水平上的研究多集中在大鼠 H9c2 心肌细胞上, 本研究以人心肌 AC16 细胞为研究对象, 通过靶向 RhoA 表达抑制 RhoA/ROCK 通路活化观察 RhoA/ROCK 通路在 H/R 诱导的 AC16 细胞损伤中的作用并探讨其可能的作用机制, 以期开发以 RhoA/ROCK 通路为靶点的药物提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人心肌细胞株 AC16 (货号: MZ-1415) 购于宁波明舟生物科技有限公司; 青-链霉素混合液、DMEM 培养基、高糖 DMEM 培养基、转染试剂 Lipofectamine 2000、Caspase-3 活性测定试剂盒、肿瘤坏死因子 α (tumor

necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量检测试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒 (货号: P1400、90113、90013、L7800、BC3830、SEKH-0013、SEKH-0047、SEKH-0002、BC0170、BC0025、T2210) 购于北京索莱宝生物科技有限公司; 胎牛血清、MTT、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性检测试剂盒、膜联蛋白 V (Annexin V) 凋亡检测试剂盒 (货号: E600001、A600799、D799207、E606336) 购于上海生物工程股份有限公司, RhoA、ROCK1、ROCK2、磷酸化核因子 κ B (phosphorylated nuclear factor- κ B, p-NF- κ B) p65、核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65、IkB 激酶 (IKK kinase, IKK) 和 β -actin 抗体 (货号: ab54835、ab45171、ab66320、ab222494、ab207297、ab97406、ab8227) 购于中国 Abcam 公司; 阴性对照 NC-siRNA 和 RhoA-siRNA (货号: B01001、A01015) 购于上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 细胞培养与分组处理

使用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素双抗的高糖 DMEM 培养基在 5% CO₂、95% 空气、37 °C 的正常培养箱内常规培养。①H/R 模型构建^[10]: 以 5% N₂、95% CO₂ 混合气体预饱和过的无糖无血清培养基替换原培养基后, 转入 5% N₂、95% CO₂ 的环境下缺氧处理 12 h, 再以含血清的高糖 DMEM 培养基在正常培养箱内孵育 6 h。②分组与转染: 对照组 (正常培养)、H/R 组 (构建 H/R 模型)、H/R + NC-siRNA 组 (转染 NC-siRNA 后构建 H/R 模型) 和 H/R + RhoA-siRNA 组 (转染 RhoA-siRNA 后构建 H/R 模型), 每组设 3 个平行, 将对数生长期的 AC16 细胞按照每孔 5×10^5 个接种至 6 孔细胞板上, 常规培

养达 60% ~ 70% 融合度时,参照 Lipofectamine 2000 说明书将 RhoA-siRNA 和 NC-siRNA 转染至 AC16 细胞中,转染 5 h 换液,继续培养 48 h。

1.3 MTT 法检测细胞存活率

将对数生长期的 AC16 细胞以每孔 2.5×10^4 个接种至 96 孔板上并常规培养贴壁后,按照 1.2 中的分组处理细胞,并将不含细胞的培养基作为空白调零组;待处理结束后,每孔加入 5 g/L MTT 反应液 20 μ L 孵育 4 h;吸去培养液后,每孔加入二甲基亚砷 150 μ L 摇床孵育 10 min;采用酶标仪在波长为 490 nm 处检测吸光度 (absorbance, A) 值,并计算各组 AC16 细胞存活率。其中,存活率 (%) = (实验组 A 值 - 调零组 A 值) / (对照组 A 值 - 调零组 A 值) $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集处理结束后的 H/R 组、H/R+NC-siRNA 组、H/R+RhoA-siRNA 组和对照组 AC16 细胞,加入结合缓冲液调整细胞浓度;取 1 mL 细胞液 (含 5×10^5 个细胞),先后加入异硫氰酸荧光素标记的 Annexin V、碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液各 5 μ L,充分混匀后,置于避光环境下室温孵育 15 min,于 60 min 内上流式细胞仪检测各组 AC16 细胞凋亡率。

1.5 比色法检测 LDH 和 Caspase-3 活性

参照 1.2 中的方法处理 H/R 组、H/R+NC-siRNA 组、H/R+RhoA-siRNA 组和对照组 AC16 细胞,收集各组细胞,参照 Caspase-3 活性测定试剂盒说明书处理各组 AC16 细胞,用酶标仪测定波长 405 nm 下的吸光度值来反映细胞 Caspase-3 活性,该实验重复 3 次;参照 LDH 活性检测试剂盒说明书,吸取细胞培养上清液,用全自动生化分析仪检测细胞 LDH 活性。

1.6 ELISA 检测 AC16 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平

参照 1.2 中的方法处理 H/R 组、H/R+NC-siRNA 组、H/R+RhoA-siRNA 组和对照组 AC16 细胞,收集各组细胞上清液,严格按照 ELISA 试剂盒说明书用酶标仪测定波长 492 nm 下的 OD 值,绘制标准曲线,通过计算得出细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平。

1.7 试剂盒检测 AC16 细胞 MDA 和 SOD 水平

将 H/R 组、H/R+NC-siRNA 组、H/R+RhoA-siRNA 组和对照组 AC16 细胞按照 1.2 中的方法进行处理后,收集各组细胞,分别参照 MDA 和 SOD 检测试剂盒说明书用酶标仪分别在波长 532 nm 和 550 nm 下检测 AC16 细胞 MDA 和 SOD 水平。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65 和 IKK 的 mRNA 表达

按照 1.2 中的方法处理各组 AC16 细胞,收集细胞,采用 Trizol 法提取总 RNA 后,将 RNA 反转录成为单链 cDNA;将 cDNA 作为模板,参照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行扩增,扩增参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 6 min,94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,56 ~ 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。扩增引物序列:RhoA 上游 5'-TCTGTCCCAACGTGCCCATCAT-3',下游 5'-CTGCCTTCTTCAGGTTTCACCG-3';ROCK1 上游 5'-GAAACAGTGTTCATGCTAGACG-3',下游 5'-GC-CGCTTATTTGATTCTGCTCC-3';ROCK2 上游 5'-TGCGGTCACTCAAGCCTT-3',下游 5'-CGTA-CAGGCAATGAAAGCCATCC-3';NF- κ B p65 上游 5'-GCACTTACGGATTCTGGTGG-3',下游 5'-CTCAAA CGCTGGTGTAGGC-3';IKK 上游 5'-ACAGCGAG-CAAACCGAGTTTGG-3',下游 5'-CCTCTGTAAGTC-CACAATGTCGG-3'; β -actin 上游 5'-CTCCATCCTG-GCCTCGCTGT-3',下游 5'-GCTGTCACCTTCACCGT-TCC-3'。以 β -actin 作为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65 和 IKK 的 mRNA 表达水平。

1.9 Western blot 检测 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65 和 IKK 的蛋白表达

按照 1.2 中的方法处理各组 AC16 细胞,收集细胞,加入细胞裂解液抽提总蛋白;考马斯亮蓝法检测蛋白浓度后,将蛋白样品与等体积上样缓冲液混匀并置于沸水中变性 5 min;按照每孔 60 μ g 上样量行 SDS-PAGE;电泳分离结束后,半干法转膜;脱脂奶粉封闭 1.5 h 后,加入 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、IKK 和 β -actin 抗体于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜;次日,加入二抗室温孵育 2 h 后,滴加发光剂暗室内显影;将 β -actin 作为内参照,采用 Image J 软件分析各组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65 和 IKK 的蛋白表达水平。

1.10 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验重复 3 次。

2 结果

2.1 AC16 细胞存活率和 LDH 活性

与对照组比较,H/R 组 AC16 细胞存活率显著

降低,而 LDH 活性显著升高 ($P<0.05$);与 H/R 组比较,H/R+NC-siRNA 组 AC16 细胞存活率和 LDH 活性差异均无统计学意义 ($P>0.05$);与 H/R+NC-

siRNA 组比较,H/R+RhoA-siRNA 组 AC16 细胞存活率显著升高,而 LDH 活性显著降低 ($P<0.05$;图 1)。

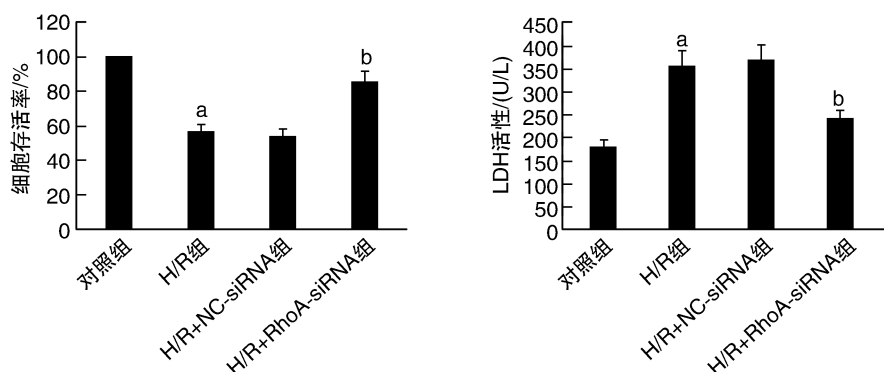


图 1. 各组细胞存活率和 LDH 活性

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 H/R+NC-siRNA 组比较。

Figure 1. Cell survival rate and LDH activity in each group

2.2 AC16 细胞凋亡率和 Caspase-3 活性

与对照组比较,H/R 组 AC16 细胞凋亡率和 Caspase-3 活性均显著升高 ($P<0.05$);与 H/R 组比较,H/R+NC-siRNA 组 AC16 细胞凋亡率和 Caspase-

3 活性差异均无统计学意义 ($P>0.05$);而 H/R+RhoA-siRNA 组 AC16 细胞凋亡率和 Caspase-3 活性均显著低于 H/R+NC-siRNA 组 ($P<0.05$;图 2 和表 1)。

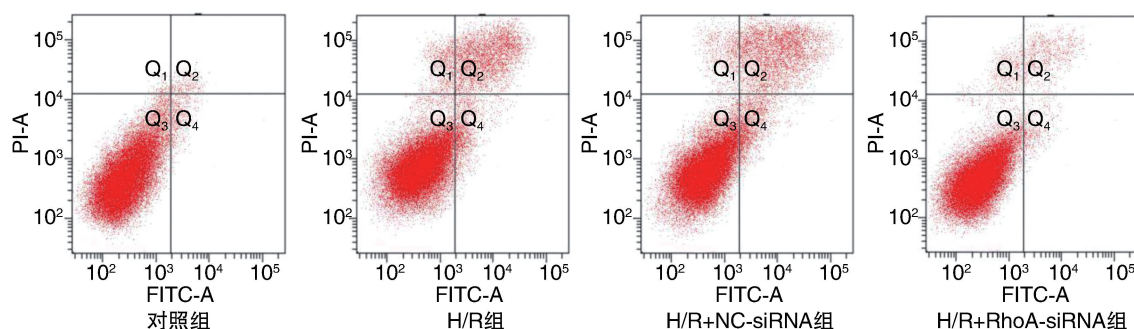


图 2. 流式细胞仪检测 AC16 细胞凋亡率

Figure 2. The apoptosis rate of AC16 cells was detected by flow cytometry

表 1. 各组细胞凋亡率和 Caspase-3 活性

Table 1. Apoptosis rate and Caspase-3 activity in each group

| 分组 | 凋亡率/% | Caspase-3 活性 |
|------------------|-------------------------|------------------------|
| 对照组 | 4.16±0.28 | 0.22±0.03 |
| H/R 组 | 17.57±3.33 ^a | 1.46±0.14 ^a |
| H/R+NC-siRNA 组 | 19.02±3.25 | 1.40±0.19 |
| H/R+RhoA-siRNA 组 | 8.85±1.12 ^b | 0.87±0.12 ^b |
| F | 78.865 | 168.38 |
| P | <0.001 | <0.001 |

注:a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 H/R+NC-siRNA 组比较。

2.3 AC16 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平

H/R 组 AC16 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著高于对照组 ($P<0.05$),H/R 组与 H/R+NC-siRNA 组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$),H/R+RhoA-siRNA 组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平较 H/R+NC-siRNA 组显著降低 ($P<0.05$;图 3)。

2.4 AC16 细胞 MDA 和 SOD 水平

与对照组比较,H/R 组 AC16 细胞 SOD 水平显著降低,而 MDA 水平显著升高 ($P<0.05$);H/R+NC-siRNA 组与 H/R 组 AC16 细胞 SOD 和 MDA 水

平差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与 H/R+NC-siRNA 组比较, H/R+RhoA-siRNA 组 AC16 细胞 SOD 水平显著升高, 而 MDA 水平显著降低 ($P<0.05$; 图 4)。

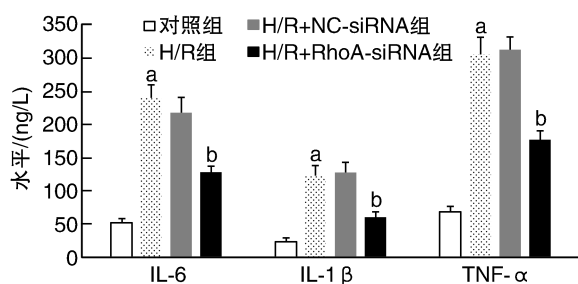


图 3. 各组细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R+NC-siRNA 组比较。

Figure 3. The levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in the cell supernatant of each group

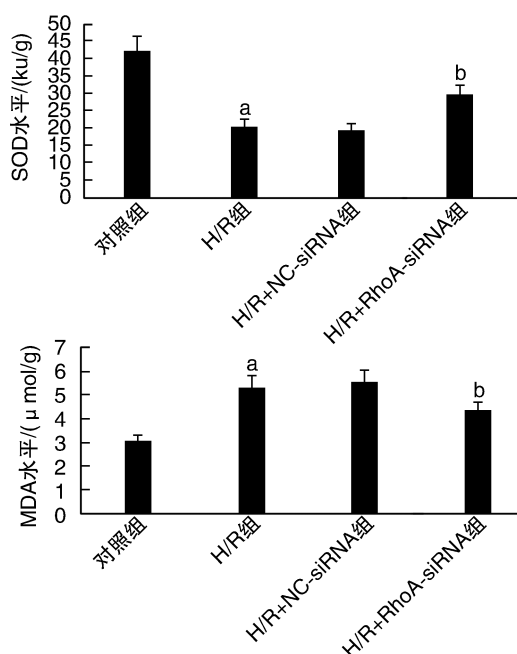


图 4. 各组 AC16 细胞 SOD 和 MDA 水平

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R+NC-siRNA 组比较。

Figure 4. SOD and MDA levels of AC16 cells in each group

2.5 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65 和 IKK 的 mRNA 表达

与对照组比较, H/R 组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65 和 IKK 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$); H/R+NC-siRNA 组与 H/R 组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65 和

IKK 的 mRNA 表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与 H/R+NC-siRNA 组比较, H/R+RhoA-siRNA 组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65 和 IKK 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$; 图 5)。

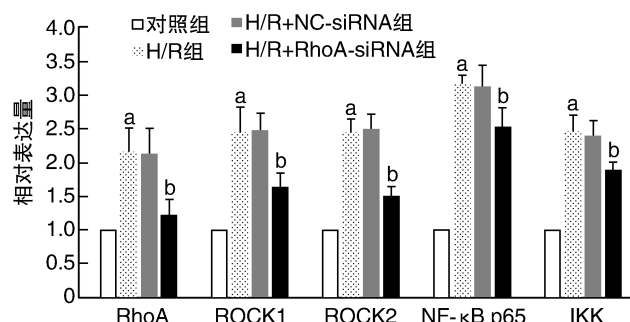


图 5. 各组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65 和 IKK 的 mRNA 表达水平

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R+NC-siRNA 组比较。

Figure 5. The mRNA expression levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, NF- κ B p65 and IKK in AC16 cells in each group

2.6 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 和 IKK 的蛋白表达

与对照组比较, H/R 组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-NF- κ B p65 和 IKK 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$); 与 H/R 组比较, H/R+NC-siRNA 组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-NF- κ B p65 和 IKK 的蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与 H/R+NC-siRNA 组比较, H/R+RhoA-siRNA 组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-NF- κ B p65 和 IKK 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); NF- κ B p65 在各组中均未见显著变化 ($P>0.05$; 图 6 和表 2)。

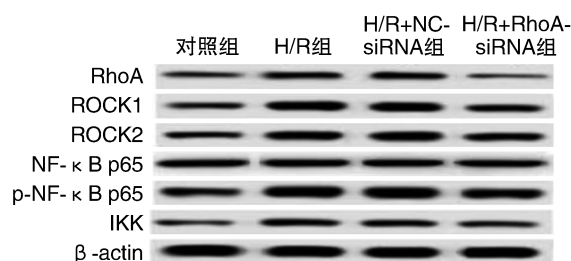


图 6. Western blot 检测 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-NF- κ B p65 和 IKK 的蛋白表达

Figure 6. The protein expression levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, p-NF- κ B p65 and IKK detected by Western blot

表 2. 各组 AC16 细胞中 RhoA、ROCK1、ROCK2、p-NF- κ B p65 和 IKK 的蛋白表达水平Table 2. The protein expression levels of RhoA, ROCK1, ROCK2, p-NF- κ B p65 and IKK in AC16 cells in each group

| 分组 | RhoA | ROCK1 | ROCK2 | p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 | IKK |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---|------------------------------|
| 对照组 | 0.30 \pm 0.03 | 0.38 \pm 0.03 | 0.41 \pm 0.03 | 0.55 \pm 0.04 | 0.26 \pm 0.02 |
| H/R 组 | 0.59 \pm 0.07 ^a | 0.76 \pm 0.07 ^a | 0.78 \pm 0.07 ^a | 1.21 \pm 0.13 ^a | 0.53 \pm 0.03 ^a |
| H/R+NC-siRNA 组 | 0.54 \pm 0.06 | 0.74 \pm 0.08 | 0.79 \pm 0.09 | 1.28 \pm 0.09 | 0.44 \pm 0.03 |
| H/R+RhoA-siRNA 组 | 0.29 \pm 0.01 ^b | 0.42 \pm 0.05 ^b | 0.55 \pm 0.06 ^b | 0.70 \pm 0.06 ^b | 0.26 \pm 0.03 ^b |
| <i>F</i> | 93.73 | 100.82 | 70.54 | 158.19 | 211.65 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注: a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R+NC-siRNA 组比较。

3 讨 论

心肌 I/R 损伤是指缺血心肌恢复血流量后受损心肌细胞释放大量活性氧、线粒体功能异常和细胞凋亡等的发生导致更严重的心肌损伤的病理过程^[10]。炎症反应和氧化应激在心肌 H/R 损伤过程中起着重要的作用。当缺血心肌再灌注即恢复血氧供应时, 心肌细胞不仅可合成过量的氧自由基促进氧化应激反应的发生, 还可激发心肌细胞产生和释放大量促炎因子, 进而导致心肌细胞大量坏死、凋亡和纤维化, 最终导致心力衰竭而危及生命^[11-13]。因此, 如何有效减轻 H/R 引起的炎症、氧化应激损伤和心肌细胞凋亡对治疗心肌 H/R 损伤具有重要意义。

RhoA 是一种 RhoGTP 亚家族蛋白, 不仅可通过影响细胞迁移在细胞骨架调节中发挥着重要作用, 还可通过激活下游 ROCK 激酶影响细胞凋亡、炎症和氧化应激等参与多种疾病的发生发展^[14]。例如: 在关于阿尔茨海默病的研究中, RhoA 在反应性小胶质细胞中的表达水平升高, β -淀粉样肽可诱导小胶质细胞毒性和炎症反应, 而 RhoA/ROCK 通路抑制剂法舒地尔和 Y27632 作用后可显著改善 β -淀粉样肽的作用^[15]; 在关于脑 I/R 损伤的研究中发现, 桑白皮可抑制脑 I/R 损伤大鼠中 RhoA/ROCK 信号通路的活化, 而 RhoA 过表达可明显逆转桑白皮对糖氧剥夺再灌注诱导的神经 PC12 细胞炎症反应、氧化应激和脑细胞凋亡的抑制作用^[16]。有研究指出, 在心肌 I/R 损伤大鼠模型中心肌组织 RhoA 活性和 ROCK1、ROCK2 蛋白表达水平异常升高^[17-18]; 而 ROCK 抑制剂 Y27632 预处理可通过诱导自噬的发生抑制细胞凋亡从而减轻大鼠 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤^[9]。然而, RhoA/ROCK 通路在心肌 I/R 损伤中的作用及其机制并不完全清楚。

本研究在构建的人心肌 AC16 细胞 H/R 损伤模型中发现, AC16 细胞活力降低, 而细胞凋亡率、细胞损伤指标 LDH 活性和促凋亡因子 Caspase-3 活性明显升高; 同时, 促炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平升高, 氧化应激指标 SOD 水平降低而 MDA 水平升高; 另外, RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 和蛋白表达水平均升高。这表明, H/R 可诱导 AC16 细胞损伤引起凋亡、炎症和氧化应激的发生, 并促进 RhoA/ROCK 通路活化。本研究通过靶向抑制 RhoA 表达阻滞 RhoA/ROCK 通路激活后发现, H/R 诱导的 AC16 细胞损伤明显减轻, 细胞活力和 SOD 水平明显升高, 而细胞凋亡率、LDH 活性、Caspase-3 活性和 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、MDA 水平明显降低。结果表明, 靶向抑制 RhoA/ROCK 通路活化可减轻心肌细胞凋亡、炎症反应和氧化应激, 改善 H/R 诱导的 AC16 细胞损伤。提示, 抑制 RhoA 表达可能是治疗心肌 I/R 损伤的重要靶点。

NF- κ B 是细胞内重要的转录调节因子, IKK 是其上游激酶, 正常情况下, IKK 与 NF- κ B 以聚合物形式存在于胞质, NF- κ B 处于非激活状态; 当受到外界刺激时, IKK 降解释放 NF- κ B, 而活化的 NF- κ B 进入细胞核激活下游相关靶基因, 在细胞增殖、凋亡和炎症反应等过程中发挥着重要作用^[19]。研究显示, 在心肌 I/R 损伤过程中 NF- κ B 通路异常活化, 且在心肌细胞凋亡、炎症反应和氧化应激等过程中发挥着重要的促进作用^[20-21]。有研究指出, 阻断 RhoA/ROCK 可通过 TAK1/NOD2 介导的 NF- κ B 途径抑制氧化应激和细胞凋亡, 从而抑制寻常性天疱疮的发病^[22]; 靶向干扰 RhoA 表达阻断 RhoA/ROCK 通路活化可通过抑制 NF- κ B 途径减轻 LPS 诱导的肺上皮 A549 细胞炎症损伤^[23]。本研究进一步检测发现, 在构建的 AC16 细胞 H/R 损伤模型中 NF- κ B p65、IKK mRNA 和 p-NF- κ B p65、IKK 蛋白表达水平

均明显升高,而靶向干扰 RhoA 表达阻断 RhoA/ROCK 通路活化后发现,AC16 细胞中 NF- κ B p65、IKK mRNA 和 p-NF- κ B p65、IKK 蛋白表达水平均明显降低。结果表明,阻断 RhoA/ROCK 通路活化可抑制 H/R 诱导的 AC16 细胞中 NF- κ B 通路激活。

总之,本研究证实了靶向抑制 RhoA/ROCK 通路可通过降低炎症反应、氧化应激和细胞凋亡减轻 H/R 诱导的 AC16 细胞损伤,然而,RhoA/ROCK 通路参与心肌细胞损伤的作用机制是否与 NF- κ B 通路有关仍需进一步深入探讨。

[参考文献]

- [1] 龚瑶,金智丽,涂佩,等. Malat1 通过激活 p38 MAPK/p53 信号通路调控缺氧复氧 AC16 心肌细胞凋亡[J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(5): 715-719.
- [2] 周云洁,张会超,孙治霞. miR-873 对缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡的影响及其机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(8): 857-863.
- [3] PEI Y H, CHEN J, WU X, et al. LncRNA PEAMIR inhibits apoptosis and inflammatory response in PM2.5 exposure aggravated myocardial ischemia/reperfusion injury as a competing endogenous RNA of miR-29b-3p[J]. Nanotoxicology, 2020, 14(5): 638-653.
- [4] WU J, YANG Y, XUN N, et al. Osthole attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting apoptosis and inflammation[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(4): 1109-1116.
- [5] FU W W, XU H L, YU X F, et al. 20(S)-Ginsenoside Rg2 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing oxidative stress and inflammation: role of SIRT1[J]. RSC Advances, 2018, 8(42): 23947-23962.
- [6] 谢发江,冯健,李家富. RhoA/ROCK 信号通路在糖尿病心脏病发病机制中的研究进展[J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(9): 846-850.
- [7] ZHANG L, ZHOU H, WEI G. miR-506 regulates cell proliferation and apoptosis by affecting RhoA/ROCK signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(4): 1163-1173.
- [8] WANG Y, SHOU Z, FAN H, et al. Protective effects of oxymatrine against DSS-induced acute intestinal inflammation in mice via blocking the RhoA/ROCK signaling pathway[J]. Biosci Rep, 2019, 39(7): BSR20182297.
- [9] 于影,闵凤,叶红伟,等. Y27632 通过抑制自噬减轻 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(11): 1511-1515.
- [10] 李刚,余朝萍,龚厚文,等. 芒果苷减轻缺氧复氧所致人心肌细胞损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(4): 657-662.
- [11] 季宇彬,马晓玉,陈荣昌,等. 灯盏乙素对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(5): 648-653.
- [12] 侯莉,于颖,丁力. 西红花苷通过 C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 途径对缺血缺氧损伤心肌的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(6): 481-488.
- [13] 黄县立,饶玲璋,熊慧,等. 神经调节蛋白 1 通过 ERK1-2 通路减轻心肌细胞缺氧复氧损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(11): 950-955.
- [14] 刘建兵,刘敏丽. RhoA/ROCK 信号通路相关疾病的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(6): 78-82.
- [15] ZHANG X, YE P, WANG D, et al. Involvement of RhoA/ROCK signaling in A β -induced chemotaxis, cytotoxicity and inflammatory response of microglial BV2 cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2019, 39(5): 637-650.
- [16] ZHAO Y, XU J. Sanggenon C ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and oxidative stress through regulating RhoA-ROCK signaling[J]. Inflammation, 2020, 43(4): 1476-1487.
- [17] XIE Y, GE C L, ZHANG Z Y, et al. Oxycodone inhibits myocardial cell apoptosis after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via RhoA/ROCK1 signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(11): 6371-6379.
- [18] LUO S Y, CHEN S, QIN Y D, et al. Urotensin-II receptor antagonist SB-710411 protects rat heart against ischemia-reperfusion injury via RhoA/ROCK pathway[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146094.
- [19] 王自闯,陈小永,张娟. 蛋白酶体抑制剂依沙佐米对胰腺癌细胞凋亡及 NF- κ B 通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(8): 1416-1422.
- [20] LI J, WANG D, YI L, et al. Daphnetin alleviates myocardial ischemia injury in rats through mediating oxidative stress and inhibiting JNK/NF- κ B pathway[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2020, 36(6): 513-519.
- [21] 冯周恒,王海英. miRNA 调控 NF- κ B 在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(22): 3694-3697.
- [22] LIANG J, ZENG X, HALIFU Y, et al. Blocking RhoA/ROCK inhibits the pathogenesis of pemphigus vulgaris by suppressing oxidative stress and apoptosis through TAK1/NOD2-mediated NF- κ B pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 436(1-2): 151-158.
- [23] LIU Q, YANG H, XU S, et al. Downregulation of p300 alleviates LPS-induced inflammatory injuries through regulation of RhoA/ROCK/NF- κ B pathways in A549 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97(12): 369-374.

(此文编辑 文玉珊)