

本文引用: 蒋芙蓉, 戴璐, 李梦一. miR-140-3p 通过靶向趋化因子受体 4 和抑制 JAK2/STAT3 通路减轻缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(9): 764-772. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.09.004.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2022)30-09-0764-09

miR-140-3p 通过靶向趋化因子受体 4 和抑制 JAK2/STAT3 通路减轻缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤

蒋芙蓉¹, 戴璐², 李梦一²

(1. 温州市中医院心血管内科, 浙江省温州市 325000; 2. 温州医科大学基础医学院, 浙江省温州市 325000)

[关键词] miR-140-3p; 缺氧复氧; 趋化因子受体 4; 炎症因子; JAK2/STAT3 通路; 心肌细胞损伤

[摘要] [目的] 探讨 miR-140-3p 对缺氧复氧(H/R)诱导的心肌细胞损伤的影响及其机制。[方法] 构建体外心肌细胞 H/R 模型, 使用 miR-140-3p mimics、趋化因子受体 4(CXCR4)过表达质粒转染 H9c2 细胞。噻唑蓝法检测细胞活性; 流式细胞术检测细胞凋亡; 反转录聚合酶链反应和 Western blot 检测细胞中 miR-140-3p、CXCR4、Janus 蛋白酪氨酸激酶 2(JAK2)/信号转导和转录激活因子 3(STAT3)通路的激活以及凋亡相关蛋白的表达。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-140-3p 与 CXCR4 的靶向关系。相应试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)的活性和炎症因子、活性氧(ROS)的水平。[结果] 体外 H/R 可抑制 miR-140-3p 的表达, 上调 CXCR4 表达和 JAK2/STAT3 通路的磷酸化, 诱导 H9c2 细胞凋亡而抑制 H9c2 细胞增殖, 促进炎症因子和 ROS 的释放并上调 LDH 的活性。miR-140-3p 可以通过靶向 CXCR4 3'UTR 抑制 CXCR4 表达, 从而抑制 JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活, 抑制炎症因子和 ROS 的释放, 下调 LDH 的活性, 促进 H9c2 细胞增殖而抑制其凋亡。[结论] miR-140-3p 可能通过靶向抑制 CXCR4 而抑制 JAK2/STAT3 通路, 从而减轻缺血再灌注诱导的心肌细胞损伤。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

miR-140-3p attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by targeting chemokine receptor 4 and inhibiting JAK2/STAT3 pathway

JIANG Fuling¹, DAI Lu², LI Mengyi²

(1. Department of Cardiology, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou, Zhejiang 325000, China;

2. Basic Medical School, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[KEY WORDS] miR-140-3p; hypoxia/reoxygenation; chemokine receptor 4; inflammatory factor; JAK2/STAT3 pathway; cardiomyocyte injury

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of miR-140-3p on hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced cardiomyocyte injury and its mechanism. **Methods** *In vitro* cardiomyocyte H/R model was constructed, and H9c2 cells were transfected with miR-140-3p mimics and chemokine receptor 4 (CXCR4) overexpression plasmids. Cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium method. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot were used to detect miR-140-3p, CXCR4, and the activation of Janus protein tyrosine kinase 2 (JAK2)/signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) pathway and the expressions of apoptosis-related proteins in cells. The targeting relationship between miR-140-3p and CXCR4 was verified by dual-luciferase reporter gene experiment. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) and the levels of inflammatory factors and reactive oxygen species (ROS) were detected with corresponding kits. **Results** *In vitro* H/R could inhibit the expression of miR-140-3p, up-regulate the expression of CXCR4 and the phosphorylation of JAK2/STAT3 pathway, induce the apoptosis of H9c2 cells and inhibit the proliferation of H9c2 cells, promote the release of inflammatory factors and ROS, and up-regulate the activity of LDH. miR-140-3p could inhibit the expression of CXCR4 by targeting CXCR4 3'UTR, thereby inhibiting the phosphorylation activation of JAK2/STAT3 pathway, inhibiting the release of inflammatory factors and ROS, down-regulating the activity of LDH, promoting the proliferation of H9c2 cells and inhibiting their apoptosis. **Conclusion**

[收稿日期] 2021-05-18

[修回日期] 2021-07-13

[作者简介] 蒋芙蓉, 硕士, 主治医师, 研究方向为中西医结合心血管内科, E-mail: jfl19890601@126.com。

miR-140-3p may inhibit the JAK2/STAT3 pathway through targeted inhibition of CXCR4, thereby attenuating ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte injury.

缺血性心脏病是一种常见的心血管疾病,预计到 2030 年将导致超过 2 360 万人死亡。临床上,心肌梗死是一种常见的缺血性心脏疾病,已成为患者死亡和致残的主要原因^[1]。对于包括急性心肌梗死在内的急性冠状动脉综合征,通过经皮冠状动脉介入治疗或溶栓治疗重新开放血液供应被认为是最有效的策略。然而,再灌注会造成额外的心肌细胞损伤,即缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[1-2]。目前,心肌细胞凋亡、氧化应激和炎症被广泛认为是心肌 I/R 损伤的主要机制^[2]。微小 RNA(micro RNA, miRNA, miR)是由核苷酸组成的非编码小 RNA,通过结合识别序列调节靶基因转录。miR-140 基因位于染色体 17p13.1 上。文献^[3-7]报道,miR-140-5p/CLDN₂ 参与脓毒症模型心肌细胞活化并抑制细胞凋亡、自噬和炎症;梓醇通过 Neat1/miR-140-5p/HDAC4 轴减弱心肌细胞凋亡;鞣花酸通过上调 miR-140-3p 促进急性心肌梗死后心室重构,但是其对于体外缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导心肌细胞损伤的作用尚未见报道。趋化因子受体 4(chemokine receptor 4, CXCR4)是一种 α 趋化因子受体,能激活内皮细胞,促进炎症细胞通过血管内皮进入炎症部位^[8]。在异丙肾上腺素诱导的心力衰竭模型中,心脏特异性 CXCR4 基因敲除的小鼠表现出慢性儿茶酚胺暴露导致的心功能障碍和心肌肥大^[9]。研究报道 Janus 蛋白酪氨酸激酶(Janus protein tyrosine kinase, JAK)/信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)(JAK/STAT)通路过度激活以及 CD63 合成不足可能与心肌细胞异常凋亡相关^[10]。此外, JAK2/STAT3 通路活性的变化与心力衰竭和心肌肥大有关,表明 JAK2/STAT3 通路是心血管疾病治疗的一个靶点^[11]。因此,推测 miR-140-3p 的下调和 CXCR4 的过度表达可能通过 JAK2/STAT3 通路参与心肌 I/R 损伤。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

H9c2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司; DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培养基、胎牛血清、SuperScript IV 反转录酶、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、脂质体 3000 转染试剂、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、Bad 一抗、Bcl-2

一抗、p-STAT3 一抗、p-JAK2 一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗购自赛默飞世尔科技有限公司; CXCR4 一抗、JAK2 一抗、STAT3 一抗、Bax 一抗购自 Abcam 生物技术有限公司; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-10 和 IL-6 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉赛培生物科技有限公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、天冬氨酸氨基转移酶、肌酸激酶和肌酸激酶同工酶 ELISA 试剂盒购自上海昂科生物技术有限公司。

1.2 细胞培养和造模

在含 10% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的高糖 DMEM 培养基中培养 H9c2 细胞,所有细胞置于 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱中,每 2 天更换培养基,每隔 3~4 天传代细胞。

参照文献^[12]方法建立体外 H/R 模型:在 1% O₂、95% N₂ 和 5% CO₂ 的环境中用无糖 DMEM 培养基孵育 H9c2 细胞 4 h 以模拟缺氧损伤,随后,将细胞置于常氧环境(95% 空气、5% CO₂)中 37 °C 孵育 8 h,以达到复氧条件。

1.3 细胞分组和转染

将 1×10^5 个 H9c2 细胞接种于 12 孔板,80% 汇合后用脂质体 3000 转染试剂将 miR-140-3p 模拟物(miR-140-3p mimics)和 CXCR4 过表达质粒(CXCR4 over-expression; CXCR4 OE)转染细胞,miR-140-3p 模拟物和 CXCR4 过表达质粒由上海吉玛制药技术有限公司合成。

对照组细胞不做处理,体外 H/R 模型 H9c2 细胞分为 4 组:(1)H/R 组:转染无意义对照模拟物(non-meaning control mimics, NC mimics);(2)mimics 组:转染 2 μ mol/L miR-140-3p mimics;(3)mimics+CXCR4 组:转染 2 μ mol/L miR-140-3p mimics+2 μ mol/L CXCR4 OE;(4)CXCR4 OE 组:转染 2 μ mol/L CXCR4 OE;处理 24 h 后将细胞用于 MTT 实验、流式细胞术、反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和 Western blot 分析。

1.4 MTT 实验

制备 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,在 96 孔板中孵育细胞(2×10^4 个/孔),每孔加入 20 μ L MTT 溶液,37 °C 孵育 4 h,加入约 150 μ L 二甲基亚砷,用分光光度计测定 OD_{490 nm} 值。

1.5 流式细胞术

制备 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,用预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤 2 次,加入 10 μ L 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素和 5 μ L 碘化丙啶,并在无光照的条件下于室温孵育 15 min,用流式细胞仪在 490 nm 的激发波长下检测细胞凋亡。

1.6 生物化学指标检测

收集各组细胞培养上清液,3 500 r/min 离心 5 min,收集上清液,ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 、IL-10、IL-6、LDH、天冬氨酸氨基转移酶、肌酸激酶和肌酸激酶同工酶含量。

将 20 μ L 2',7'-二氯荧光素 (2',7'-dichlorofluorescein, DCF) 加入每孔细胞中,37 $^{\circ}$ C 孵育,反应 30 min 后,用荧光分光光度计测量在 485 nm 激发波长和 530 nm 发射波长下的高荧光 DCF,计算活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量。

1.7 RT-PCR

用 TRIzol 法制备 H9c2 细胞的总 RNA,然后合成 cDNA,随后使用 SYBR PreMix Ex TaqTM II 试剂盒测定靶基因的转录本水平,U6 作为 CXCR4 和 miR-140-3p 的内参。特异性引物序列由上海吉玛制药技术有限公司设计和合成(表 1),然后在 ABI PRISM 7000 系统中运行 RT-PCR 反应。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方程分析各基因的表达。

表 1. RT-PCR 所用引物

Table 1. Primers for RT-PCR

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
miR-140-3p	GACTGTGGTTAC-CGTCATGGC	ACTTGGTTTTTCATA-ACAGCGGA
CXCR4	AGTGTGGTGAGT-GCCAA	GCACCATCATTC-CAGGAC
U6	CATGTACGTTGC-TATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACG-CACGAT

1.8 Western blot

收集生长至 70% 汇合的细胞,使用 PRIP 裂解液裂解后离心获取蛋白质,采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。根据定量结果进行蛋白上样,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到聚偏氟乙烯膜上,然后和一抗 β -肌动蛋白(1:200)、CXCR4(1:500)、JAK2(1:300)、STAT3(1:300)、Bax(1:200)、Bad(1:500)、Bcl-2(1:300)、p-STAT3(1:300)、p-JAK2(1:300) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,PBS 洗涤后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:200),室温作用 2 h。用凝胶电泳成像仪和 Quantity One

软件进行图像分析,以 β -肌动蛋白作为对照以计算目的蛋白的相对表达量。

1.9 双荧光素酶报告基因实验

利用“https://cm.jefferson.edu/rna22/Precomputed/”生物信息学软件预测在 miR140-3p 和 CXCR4 3'端非翻译区存在的互补结合位点。扩增含有 miR-140-3p 结合位点的 CXCR4 3'非编码区序列,将其克隆到 pGL3-Basic 荧光素酶质粒中,构建 CXCR4 野生型(wild type, WT)重组质粒。用点突变试剂盒对 CXCR4-WT 的 miR-140-3p 结合位点进行突变,构建 CXCR4 突变型(mutant type, MT)重组质粒。将 2 μ mol/L 的 CXCR4-WT 或 CXCR4-MT 质粒与 2 μ mol/L 的 miR-140-3p mimics 或 NC mimics 共转染 H9c2 细胞 48 h 后,用双荧光素酶报告基因实验分析系统检测 CXCR4-WT 或 CXCR4-MT 报告质粒的荧光素酶活性。

1.10 统计分析

所有数据用 SPSS 20.0 软件进行处理,所有实验至少重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差分析后采用最小显著性差异 t 检验(LSD- t), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H/R 损伤后 miR-140-3p 低表达而 CXCR4 高表达

在建立体外 H/R 模型后通过 RT-PCR 检测 miR-140-3p 和 CXCR4 的表达,结果显示,相对于对照组细胞,H/R 组细胞中 miR-140-3p 转录水平明显降低,而 CXCR4 的表达显著增加,提示 miR-140-3p 和 CXCR4 可能参与 H/R 诱导的心肌细胞损伤(图 1)。

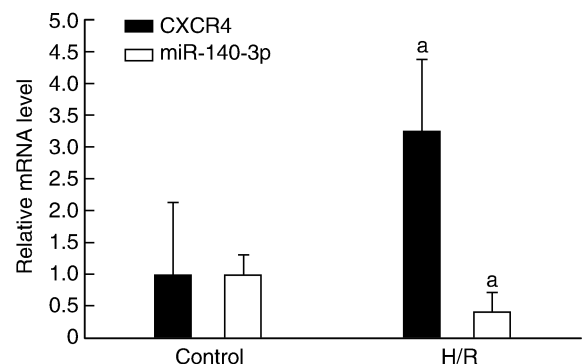


图 1. H/R 损伤后 miR-140-3p 和 CXCR4 的异常表达($n=9$)
a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。

Figure 1. Abnormal expression of miR-140-3p and CXCR4 after H/R injury ($n=9$)

2.2 miR-140-3p 过表达缓解 H/R 诱导的心肌细胞损伤

与对照组细胞相比,H/R 组细胞增殖被明显抑制而细胞凋亡显著增加。Western blot 结果显示,H/R 组细胞中凋亡相关蛋白 Bad、Bax、cleaved casepase-3 (CCS-3) 的表达水平明显增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著降低,JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活明显上调。使用 miR-140-3p mimics 转染后,miR-

140-3p 转录水平明显上升,H/R 诱导的心肌细胞凋亡被明显抑制,细胞增殖活性显著增加,凋亡相关蛋白表达下调而 Bcl-2 水平上升,JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活被明显抑制。而且 miR-140-3p mimics 转染可以抑制 H/R 诱导的 LDH 活性,抑制炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、TGF- β) 释放,下调 ROS 含量(图 2)。

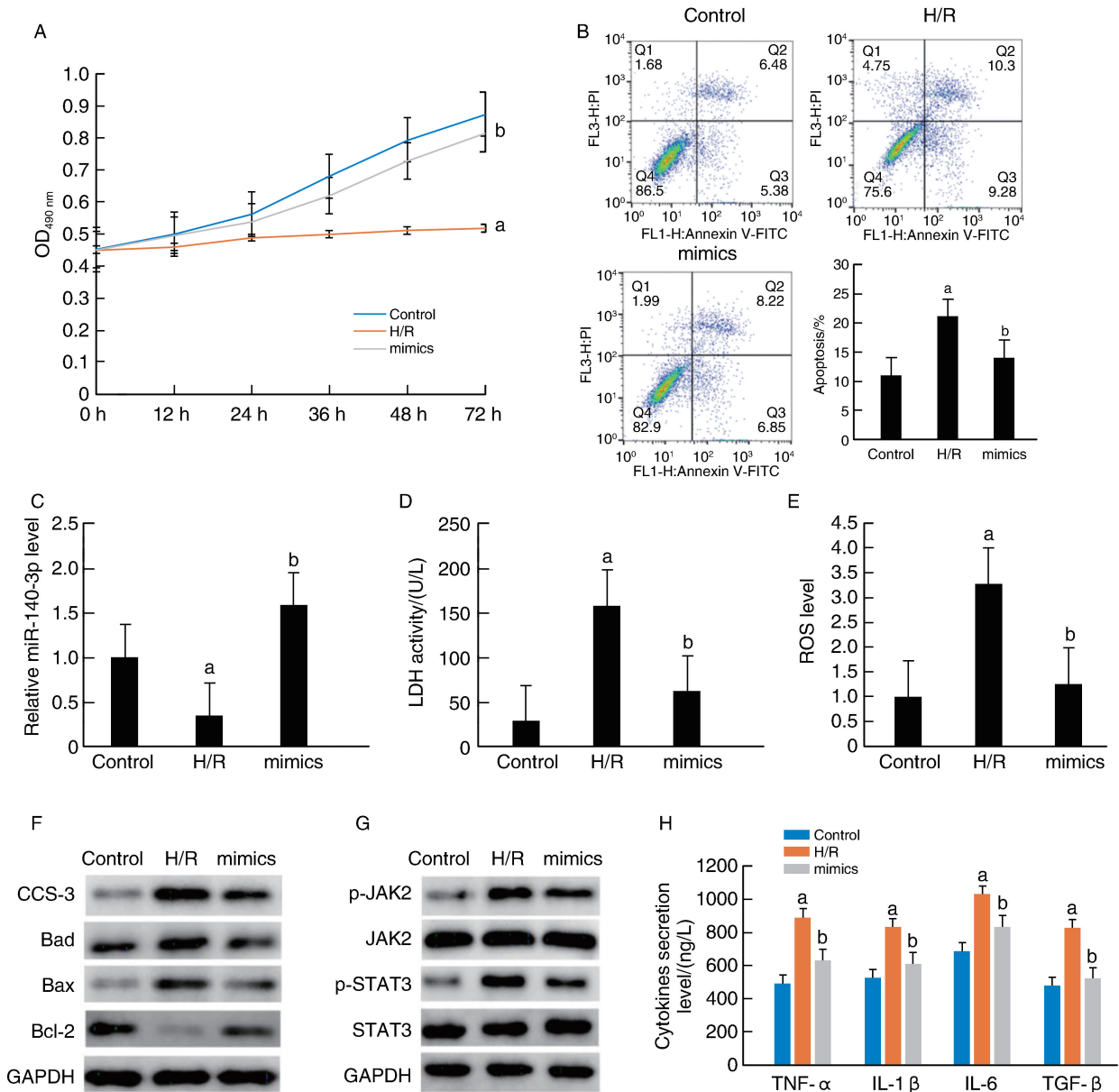


图 2. miR-140-3p 减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤 (n=9)

A 为 MTT 检测细胞增殖;B 为流式细胞术检测细胞凋亡;C 为 RT-PCR 检测 miR-140-3p 表达;D 为 LDH 试剂盒检测 LDH 活性;E 为 ROS 试剂盒检测 ROS 含量;F 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达;G 为 Western blot 检测 JAK2、STAT3 及其磷酸化;H 为 ELISA 检测炎症因子。

a 为 P<0.05,与对照组相比;b 为 P<0.05,与 H/R 组相比。

Figure 2. miR-140-3p attenuates cardiomyocyte injury induced by H/R (n=9)

2.3 CXCR4 过表达促进 H/R 诱导的心肌细胞损伤
与 H/R 组细胞相比,使用 CXCR4 OE 转染后 CXCR4 表达水平显著增加,心肌细胞凋亡明显上升而细胞增殖被显著抑制,凋亡相关蛋白表达明显增

加而 Bcl-2 水平显著下调,JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活被明显促进。CXCR4 OE 转染还可促进 H/R 诱导的炎症因子和 LDH 释放,并显著上调 ROS 含量(图 3)。

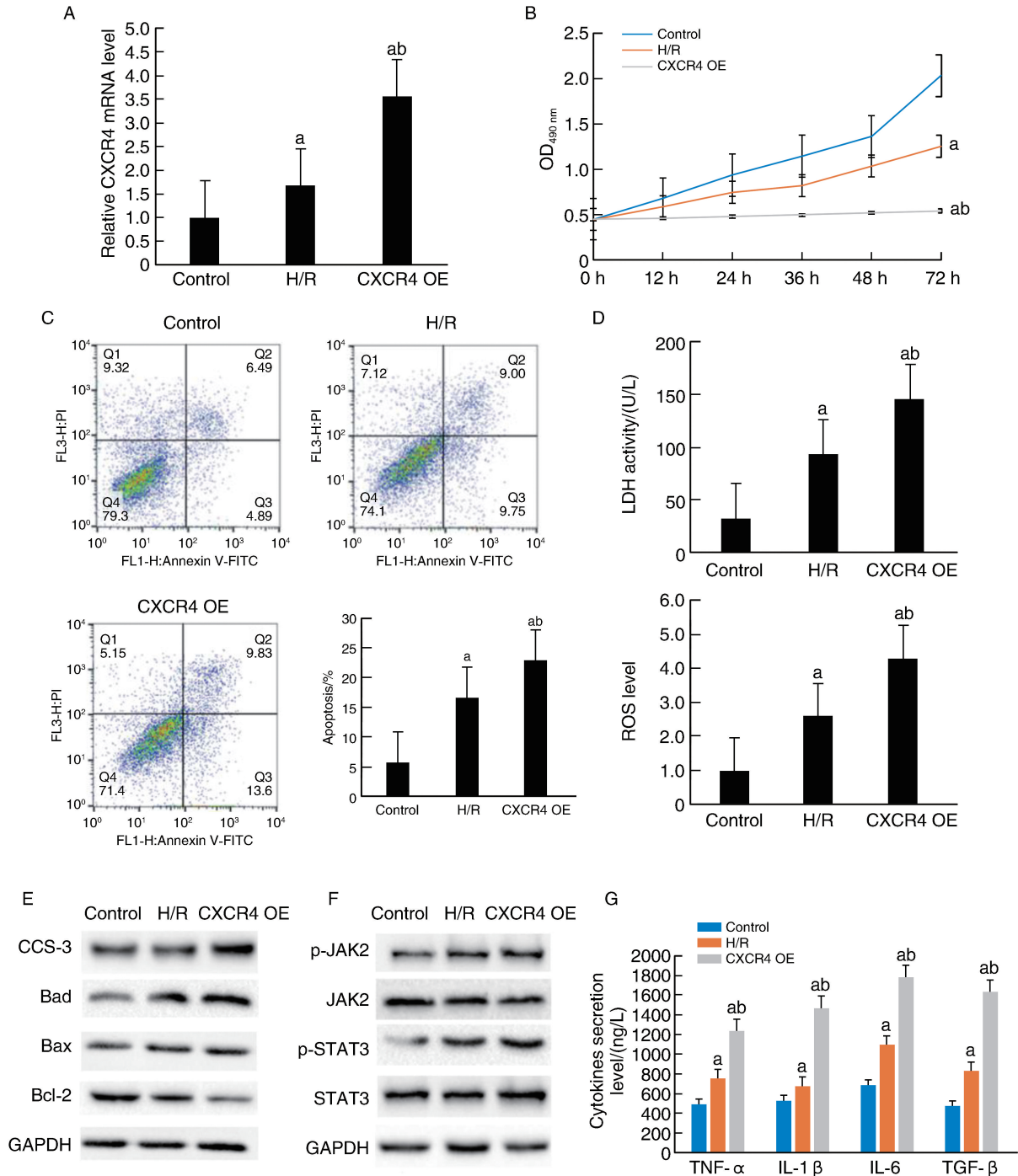


图 3. CXCR4 促进 H/R 诱导的心肌细胞损伤 (n=9)

A 为 PCR 检测 CXCR4 OE 转染效率;B 为 MTT 检测细胞增殖;C 为流式细胞术检测细胞凋亡;D 为 LDH 试剂盒检测 LDH 活性,ROS 试剂盒检测 ROS 含量;E 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达;F 为 Western blot 检测 JAK2、STAT3 及其磷酸化;G 为 ELISA 检测炎症因子。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R 组相比。

Figure 3. CXCR4 promotes cardiomyocyte injury induced by H/R (n=9)

2.4 miR-140-3p 靶向抑制 CXCR4 的表达

CXCR4 3'UTR 存在 miR-140-3p 的靶向结合位点,在 CXCR4-WT 心肌细胞中,相较于 NC mimics 转染,miR-140-3p mimics 转染可显著抑制荧光素酶活性;而在 CXCR4-MT 心肌细胞中,两组转染细胞的荧光素酶活性无显著变化。Western blot 结果显示,miR-140-3p mimics 转染可显著抑制 CXCR4 的蛋白表达,证实 miR-140-3p 通过与 CXCR4 3'UTR 的靶向结合而抑制 CXCR4 表达(图 4)。

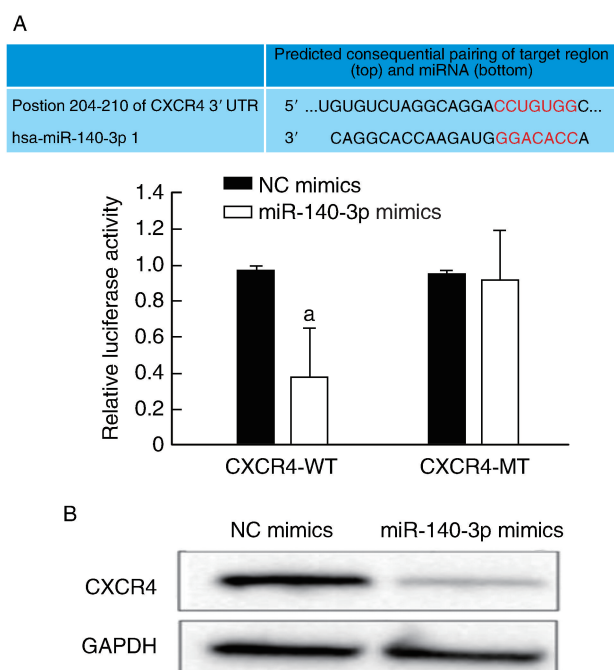


图 4. miR-140-3p 对 CXCR4 表达的靶向抑制($n=3$)

A 为双荧光素酶报告基因实验验证 miR-140-3p 和 CXCR4 结合; B 为 Western blot 检测 miR-140-3p mimics 转染后 CXCR4 的表达。
a 为 $P<0.05$,与 NC mimics 组相比。

Figure 4. Targeted inhibition of CXCR4 expression by miR-140-3p ($n=3$)

2.5 miR-140-3p 通过 CXCR4 调节心肌细胞活性

与 miR-140-3p mimics 组细胞相比,CXCR4 OE 转染可逆转 miR-140-3p mimics 发挥的心肌保护作用,促进 H/R 诱导的心肌细胞凋亡而抑制心肌细胞增殖;Western blot 结果显示,CXCR4 OE 可逆转 miR-140-3p mimics 诱导的 JAK2/STAT3 通路失活,上调凋亡蛋白表达而下调 Bcl-2 水平。相较于 miR-140-3p mimics 组细胞,CXCR4 OE 转染后炎症因子和 LDH 释放明显增加,ROS 含量显著上调。提示 miR-140-3p 通过 CXCR4 调节心肌细胞活性,且与 JAK2/STAT3 通路的失活相关(图 5)。

3 讨论

缺血性心脏病是全球致死致残的主要原因之一,其特征是心脏某一区域突然失去血液循环,从而导致相应的功能丧失^[13]。心肌组织损伤的主要原因不是缺血本身,而是对攻击细胞的自由基的过度清除,导致 I/R 损伤^[14]。因此,更好地理解心脏 I/R 后氧化应激损伤病理过程潜在的细胞和分子机制可能为缺血性心脏病提供新的治疗方法。目前,治疗心肌 I/R 损伤有多种干预措施,包括 miRNA 干扰。本研究的结果显示,心肌细胞在 H/R 条件下 miR-140-3p 的表达降低,同时 CXCR4 的表达增加,进一步的机制分析显示,过表达 miR-140-3p 通过直接靶向 CXCR4 抑制 JAK2/STAT3 通路,从而减轻 H/R 引起的心肌细胞损伤和炎症以及氧化应激。

研究^[15]发现,miR-140-3p 在心肌肥厚时表达升高。另一项研究^[16]表明,miR-140 在心肌肥厚时表达增强,并导致心力衰竭。据报道^[17],与正常健康小鼠相比,局灶性脑 I/R 诱导的神经元凋亡过程中 CXCR4 的表达增加。在本研究中,H/R 损伤后通过 RT-PCR 检测 CXCR4 与 miR-140-3p 的表达,结果显示,H/R 损伤后 miR-140-3p 的表达水平明显降低而 CXCR4 的表达水平显著增加,并伴随着 JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活。先前的研究^[18-19]指出 miR-140 可以避免棕榈酸酯刺激诱导的心肌细胞凋亡,miR-140 的敲低会导致心肌肥大和心力衰竭。在本研究中,miR-140-3p mimics 转染后 H/R 诱导的心肌细胞损伤被明显抑制,细胞活力明显增加而细胞凋亡被显著抑制。以往研究^[20]指出,CXCR4 过表达可以通过降低线粒体功能和上调凋亡标志物,增加佛波酯诱导的心肌肥大。此外,卡托普利通过抑制 JAK2/STAT3 通路减轻主动脉缩窄术诱导的心力衰竭^[21-22]。在本研究中,使用 CXCR4 过表达质粒转染后,H/R 诱导的心肌细胞损伤被明显促进,细胞活力被明显抑制而细胞凋亡显著增加。CXCR4 参与细胞损伤,在包括 I/R 在内的各种病理条件下,其是产生炎症反应的关键介质。研究证实 CXCR4 通过与多个受体相互作用来调节心肌细胞凋亡和炎症反应,在心肌 I/R 损伤的发展过程中起着关键作用^[23]。在本研究中,使用 CXCR4 过表达质粒转染后,炎症因子的释放明显增加而 LDH 活性被明显促进。局灶性心肌 I/R 过程中产生的 ROS 可直接对细胞 DNA、脂质、蛋白质等大分子造成损伤,而 JAK2/STAT3 通路被认为广泛参与氧化应激

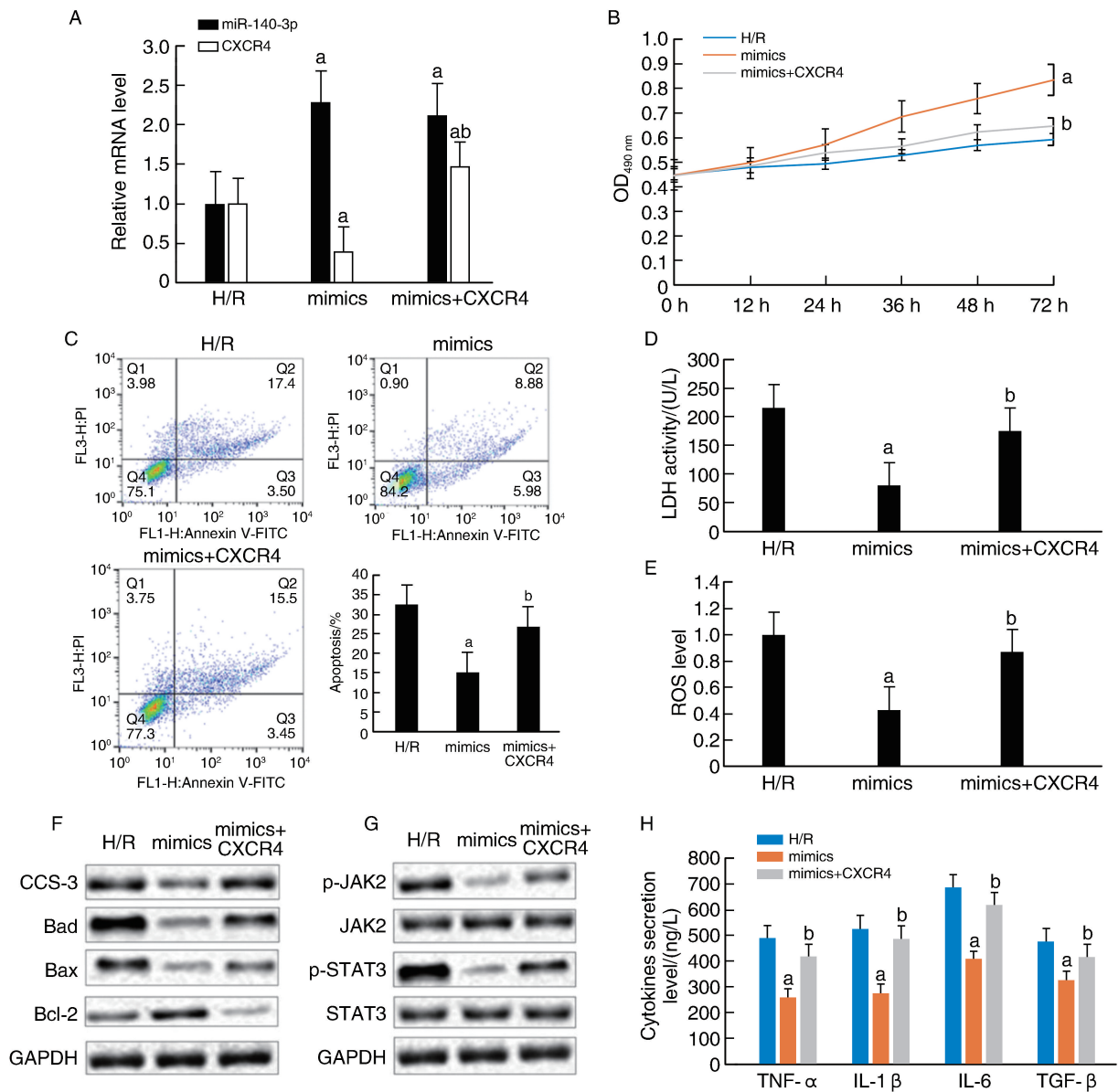


图 5. miR-140-3p 通过 CXCR4 调节心肌细胞的活性($n=9$)

A 为 PCR 检测 CXCR4 和 miR-140-3p 表达;B 为 MTT 检测细胞增殖;C 为流式细胞术检测细胞凋亡;D 为 LDH 试剂盒检测 LDH 活性;

E 为 ROS 试剂盒检测 ROS 含量;F 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达;G 为 Western blot 检测 JAK2、STAT3 及其磷酸化;

H 为 ELISA 检测炎症因子。a 为 $P<0.05$,与 H/R 组相比;b 为 $P<0.05$,与 mimics 组相比。

Figure 5. miR-140-3p regulates cardiomyocyte activity through CXCR4 ($n=9$)

和炎症因子的释放过程^[24]。在氧化应激条件下,抑制 JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活可以刺激 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 的激活,然后与编码抗氧化蛋白(如血红素加氧酶)的相关基因的启动子区域结合,最终通过一系列协同机制清除 ROS,在维持细胞氧化还原状态和防止氧化损伤中发挥重要作用^[25]。在本研究中,H/R 损伤后 JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活被明显促进,炎症因子的释放和 ROS 水平明显增加,而使用 miR-140-3p mimics 可以抑制 JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活,下调炎症因子的释放和

ROS 水平,CXCR4 过表达质粒转染则引起相反的生物学作用。此外,在本研究中,CXCR4 被预测为 miR-140-3p 的潜在靶点。通过双荧光素酶报告基因实验验证 CXCR4 和 miR-140-3p 的靶向结合,进一步的实验显示,CXCR4 过表达质粒的共转染可以明显逆转 miR-140-3p mimics 诱导的心肌细胞增殖,并促进心肌细胞凋亡,促进炎症因子的释放和 JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活。

总而言之,本研究的结果显示,在体外 H/R 模型中,miR-140-3p 低表达而 CXCR4 高表达,miR-

140-3p 可以通过靶向抑制 CXCR4 而抑制 JAK2/STAT3 通路的磷酸化激活,从而抑制炎症和氧化应激,保护心肌细胞免受 H/R 损伤。但是本研究也存在一定的局限性,例如未能进行体内研究,信号通路的靶向关系未作深层次阐明,而这也是后期研究的方向。

[参考文献]

- [1] 梁伟杰,何洁仪,黄惠敏,等. 硫化氢通过抑制 ROS-TLR4 通路对抗高糖诱导的 H9c2 心肌细胞损伤和炎症反应[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(12): 1207-1213.
LIANG W J, HE J Y, HUANG H M, et al. Hydrogen sulfide protects against high glucose-induced H9c2 cardiomyocyte injury and inflammatory response by inhibiting ROS-TLR4 pathway[J]. Chin J Arterioscler, 2016, 24(12): 1207-1213.
- [2] 王慷慨,肖献忠. 心肌再生: 心肌细胞增殖与体细胞转分化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(10): 973-977.
WANG K K, XIAO X Z. Cardiac regeneration: cardiomyocyte proliferation and direct transdifferentiation from somatic cells[J]. Chin J Arterioscler, 2017, 25(10): 973-977.
- [3] LIU W, WANG D W, LIU L D, et al. miR-140 inhibits osteosarcoma progression by impairing USP22-mediated LSD1 stabilization and promoting p21 expression[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 24: 436-448.
- [4] HU X P, HAN D, WANG Y Y, et al. Phospho-Smad3L promotes progression of hepatocellular carcinoma through decreasing miR-140-5p level and stimulating epithelial-mesenchymal transition [J]. Dig Liver Dis, 2021, 53(10): 1343-1351.
- [5] GHAFOURI-FARD S, BAHROUDI Z, SHOOREI H, et al. MicroRNA-140: a miRNA with diverse roles in human diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 135: 111256.
- [6] ZOU G L, ZHONG W L, WU F, et al. Catalpol attenuates cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Neat1/miR-140-5p/HDAC4 axis [J]. Biochimie, 2019, 165: 90-99.
- [7] WANG D N, WANG H Y, LIU C, et al. Hyperglycemia inhibition of endothelial miR-140-3p mediates angiogenic dysfunction in diabetes mellitus[J]. J Diabetes Complications, 2019, 33(5): 374-382.
- [8] 王丽萍,郭晓明,高贤伟,等. CXCR4-FAK 信号通路在低氧预处理骨髓间充质干细胞向大鼠脊髓缺血再灌注损伤组织迁移和粘附中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(6): 752-757.
WANG L P, GUO X M, GAO X W, et al. The role of CXCR4-FAK signaling pathway in the migration and adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells to rat spinal cord ischemia-reperfusion injury tissue after hypoxia preconditioning[J]. Chin J Anesthesiol, 2013, 33(6): 752-757.
- [9] 陶录岭. 基于调节 SDF-1 α /CXCR4 轴的脑脉通对脑缺血/再灌注老龄大鼠脑微血管生成机制研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2014: 325-329.
TAO L L. Study on the mechanism of Naomaitong on cerebral microangiogenesis in aged rats with cerebral ischemia/reperfusion based on the regulation of SDF-1 α /CXCR4 axis [D]. Zhengzhou: Henan College of Traditional Chinese Medicine, 2014: 325-329.
- [10] WANG Z, WANG Z, WANG T Z, et al. Inhibition of miR-34a-5p protected myocardial ischemia reperfusion injury-induced apoptosis and reactive oxygen species accumulation through regulation of Notch receptor 1 signaling [J]. Rev Cardiovasc Med, 2019, 20(3): 187-197.
- [11] SU Q, LIU Y, LYU X W, et al. Inhibition of lncRNA TUG1 upregulates miR-142-3p to ameliorate myocardial injury during ischemia and reperfusion via targeting HMGB1- and Rac1-induced autophagy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 133: 12-25.
- [12] WANG S, YAO T, DENG F, et al. LncRNA MALAT1 promotes oxygen-glucose deprivation and reoxygenation induced cardiomyocytes injury through sponging miR-20b to enhance beclin1-mediated autophagy [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2019, 33(6): 675-686.
- [13] 孙涛,李雅,郭志华,等. 血速升颗粒对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织的保护作用及机制研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(24): 2581-2585.
SUN T, LI Y, GUO Z H, et al. Study on the protective effect and mechanism of Xueshusheng granules on myocardial tissue in rats with myocardial ischemia and reperfusion[J]. J Clin Exp Med, 2020, 19(24): 2581-2585.
- [14] 蔡少艾,赵甘剑,黄尹,等. 血管紧张素(1-7)抑制异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(5): 438-444.
CAI S A, ZHAO G J, HUANG Y, et al. Angiotensin(1-7) inhibits isoproterenol induced apoptosis in H9c2 cells [J]. Chin J Arterioscler, 2018, 26(5): 438-444.
- [15] 胡跃强,陈海峰,甘业贤,等. 缺氧预处理 MSCs 移植对脑缺血再灌注损伤大鼠 SDF-1/CXCR4 表达的影响及清热化痰方的干预作用[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(6): 779-784.
HU Y Q, CHEN H F, GAN Y X, et al. Effects of anoxic preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on expression of SDF-1/CXCR4 in cerebral ischemia/reperfusion injury rats and intervention of Qingre Huayu prescription[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2016, 27(6): 779-784.

- [16] GUO Q C, ZHANG N, LIU S, et al. By targeting TRAF6, miR-140-3p inhibits TGF- β 1-induced human osteosarcoma epithelial-to-mesenchymal transition, migration, and invasion[J]. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(11): 2123-2133.
- [17] JIANG W, LI T, WANG J J, et al. miR-140-3p suppresses cell growth and induces apoptosis in colorectal cancer by targeting PD-L1[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 10275-10285.
- [18] WU S M, WANG H R, PAN Y P, et al. miR-140-3p enhances cisplatin sensitivity and attenuates stem cell-like properties through repressing Wnt/ β -catenin signaling in lung adenocarcinoma cells[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1664-1674.
- [19] CHEN X Q, JIANG J, ZHAO Y X, et al. Circular RNA circNTRK2 facilitates the progression of esophageal squamous cell carcinoma through up-regulating NRIP1 expression via miR-140-3p[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 133.
- [20] 王彩霞, 李彦辉, 刘玉兰, 等. 注射用苦碟子对大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. *河北医科大学学报*, 2006, 12(1): 40-42.
WANG C X, LI Y H, LIU Y L, et al. Protective effect of Kudiezi for injection on acute myocardial ischemia in rats [J]. *J Hebei Med Univer*, 2006, 12(1): 40-42.
- [21] 门运政, 童旭辉, 胡森, 等. JAK2/STAT3 信号通路在右美托咪定抗小鼠脑缺血/再灌注损伤中的作用[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2020, 49(6): 662-699.
MEN Y Z, TONG X H, HU M, et al. The role of JAK2/STAT3 signaling pathway in dexmedetomidine against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *Acta Med Univ Med Tongji*, 2020, 49(6): 662-699.
- [22] LI Y, CHENG T, WAN C L, et al. CircRNA_0084043 contributes to the progression of diabetic retinopathy via sponging miR-140-3p and inducing TGFA gene expression in retinal pigment epithelial cells [J]. *Gene*, 2020, 747: 144653.
- [23] HE Y M, YANG Y, LIAO Y M, et al. miR-140-3p inhibits cutaneous melanoma progression by disrupting AKT/p70S6K and JNK pathways through ABHD2[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 17: 83-93.
- [24] 秦燕, 杨光. 基于 CXCR4-FAK 信号通路观察鞘内注射右美托咪定改善大鼠脊髓缺血再灌注损伤后神经运动功能[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 77-85.
QIN Y, YANG G. Intrathecal injection of dexmedetomidine improves neuromotor function in rats with spinal cord ischemia-reperfusion injury based on the CXCR4-FAK signaling pathway[J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 77-85.
- [25] 司晓芸, 徐申, 毕晓红, 等. 间充质干细胞修复大鼠缺血再灌注肾损伤中 SDF-1/CXCR4 轴的调控机制研究[J]. *华南国防医学杂志*, 2018, 32(7): 435-439.
SI X Y, XU S, BI X H, et al. Study on regulation mechanism of SDF-1/CXCR4 axis in mesenchymal stem cells for repairing ischemia reperfusion injured kidney in rats [J]. *Mil Med J S Chin*, 2018, 32(7): 435-439.

(此文编辑 曾学清)