

本文引用: 秦建宁, 韩洋, 谭瑶, 等. miR-223-3p 在高糖诱导的 H9c2 细胞损伤中的靶基因预测及相关通路分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(11): 947-954. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.11.004.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-11-0947-08

• 实验研究 •

miR-223-3p 在高糖诱导的 H9c2 细胞损伤中的靶基因预测及相关通路分析

秦建宁, 韩洋, 谭瑶, 虞乐天, 屈顺林

南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病
国际科技创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 通过生物信息学途径探究 miR-223-3p 在高糖环境下对 H9c2 细胞的影响, 并结合转录组测序结果, 分析其在糖尿病心肌病发病机制中的作用, 旨在分子层面上发掘新的治疗靶点, 探究 miR-223-3p 的具体作用机制。**[方法]** 在高糖培养的 H9c2 细胞中分别转染 miR-223-3p 的抑制物及对照物, RT-qPCR 检测两组细胞中 miR-223-3p 的表达差异; 通过高通量测序对差异 mRNA 进行检测; 用 TopGO 软件进行 GO 功能富集分析; DESeq2 软件(v1.16.1)筛选差异表达基因, 对检测结果的差异基因与 miR-223-3p 靶基因数据库共分析, 预测 miR-223-3p 靶基因, 并用 RT-qPCR 检测验证其表达变化。**[结果]** 高糖处理的 H9c2 细胞活性明显降低, 转录组测序结果提示对照组和 miR-223-3p 抑制剂组间的基因表达存在较为明显的差异。GO 功能富集分析显示, 预测靶基因集显著富集于 G 蛋白偶联受体活性、甘油基乙酰单加氧酶活性、细胞阴离子稳态和氯离子稳态等方面。KEGG 通路富集分析显示, 这些基因主要涉及 TNF 信号通路和 IL-17 信号通路。此外, 它们还与 1 型糖尿病、细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用等相关疾病和生理过程有关。靶基因预测提示 miR-223-3p 可能与 Cxcl10、Creb3l3、Mmp3 和 Bcl3 等的表达变化有关。**[结论]** 在高糖诱导的 H9c2 细胞损伤中 miR-223-3p 及其下游靶基因的预测可能为糖尿病心肌病的治疗提供新的靶点, 对于揭示糖尿病心肌病的发病机制以及开发新的治疗策略具有重要意义。**[关键词]** 糖尿病心肌病; miR-223-3p; H9c2 细胞; 高通量测序; GO 功能富集分析; KEGG 通路富集分析

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

Target gene prediction and related pathway analysis of miR-223-3p in high glucose induced H9c2 cell injury

QIN Jianning, HAN Yang, TAN Yao, YU Letian, QU Shunlin

Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** The effect of miR-223-3p on H9c2 cells in high glucose environments was investigated through bioinformatics and its role in the mechanism of development of diabetic cardiomyopathy was analyzed in conjunction with transcriptomic sequencing results. The objective was to identify novel therapeutic targets at the molecular level and explore the specific mechanisms of action of miR-223-3p. **Methods** In high glucose-cultivated H9c2 cells, miR-223-3p inhibition and control were transfected, respectively. RT-qPCR was used to detect the differences in miR-223-3p expression between the two cell groups. Differential mRNA was identified through high-throughput sequencing. GO functional analysis was conducted using TopGO software. DESeq2 software (v1.16.1) filtered differentially expressed genes and analyzed them using a miR-223-3p target gene database. This process predicted the target genes of

[收稿日期] 2024-02-27

[修回日期] 2024-06-16

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2023JJ30526); 湖南省卫健委重点项目(202102063633)

[作者简介] 秦建宁, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化及其发病机制, E-mail: n13728488089@126.com。韩洋, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail: hanyang421mt@163.com。秦建宁和韩洋为共同第一作者。通信作者屈顺林, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化及其发病机制, E-mail: qushunlin78@126.com。

miR-223-3p and validated the changes in their expression through RT-qPCR. **Results** The activity of H9c2 cells treated with high glucose decreased significantly. Significant differences in gene expression between the control group and the inhibitor group had been indicated by transcriptomic sequencing results. GO function enrichment analysis showed that the predicted target gene set was significantly enriched in G protein-coupled receptor activity, glycerol ether monooxygenase activity, cellular anion homeostasis, and chloride ion homeostasis, among others. KEGG pathway enrichment analysis further showed that these genes were mainly involved in the TNF signaling pathway and the IL-17 signaling pathway. In addition, they were related to type 1 diabetes, cytochrome P450 metabolism of exogenous drugs, and other diseases and physiological processes. Target gene prediction suggested that miR-223-3p may be associated with the expression changes of Cxcl10, Creb3l3, Mmp3, and Bcl3, among others. **Conclusion** The prediction of miR-223-3p and its downstream target genes in high glucose induced H9c2 cell injury may provide new targets for the treatment of diabetic cardiomyopathy, which is of great significance for revealing the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy and developing new treatment strategies.

[**KEY WORDS**] diabetic cardiomyopathy; miR-223-3p; H9c2 cell; high throughput sequencing; GO function enrichment analysis; KEGG pathway enrichment analysis

糖尿病是一种代谢性疾病,其主要特征是慢性高血糖、胰岛素分泌和功能下降、碳水化合物代谢功能障碍,糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是其主要的并发症之一,即使在没有冠状动脉病变和高血压等的情况下,糖尿病患者也出现左心室肥厚、收缩期和舒张期功能障碍,甚至晚期心力衰竭和死亡^[1-2]。研究发现,直接靶向心肌细胞死亡来治疗 DCM 可能比干扰其上游信号通路更可行^[3]。miRNA 是一类在进化上非常保守的基因,通过与靶基因的 3'UTR 或 5'UTR 相互作用调节转录,提示可能有重要的生物学功能^[4]。据报道,miRNA 通过转录和转录后调控参与多种心血管疾病的发病机制,在 DCM 中也具有重要的作用^[5]。高血糖会影响糖尿病心脏中一些 miRNA 的表达,这些差异表达的 miRNA 可调节糖尿病患者心肌细胞凋亡、心肌纤维化、心肌肥大、氧化应激和线粒体功能障碍^[6-8]。大量研究表明,DCM 期间心肌细胞损伤的发生是由特定 miRNA 的失调促进的,如 miR-451 的过表达以及 miR-30、miR-373、miR-133a 和 miR-150 的下调。miR-150-5p 被发现可以减轻高糖(high glucose, HG)诱导的人心肌细胞损伤^[9], miR-223-3p 也可作为心血管疾病的一个潜在治疗靶点,通过调控 SPI1(编码 PU.1)促进心肌细胞焦亡^[10]。然而,关于 miR-223-3p 在 DCM 中的作用和机制尚未被充分阐明。因此,本研究旨在探究 miR-223-3p 的抑制物和对照物转染高糖培养的 H9c2 细胞后,通过高通量测序和生物信息学分析预测 miR-223-3p 潜在的靶基因及其在生物信号通路中的作用,以期预测 DCM 的发生和发展提供潜在的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 H9c2 细胞培养及转染

将 H9c2 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,待细胞密度达到 80% ~ 90% 时,使用胰蛋白酶进行消化处理。将消化后的 H9c2 细胞接种于 6 孔板进行后续实验,两组细胞在处理前用无血清培养基孵育过夜,然后在含 1% FBS 的最低必需培养基中加入葡萄糖粉,使其终浓度为 30 mmol/L,对照组给予等量甘露醇以提高渗透压,培养 24 h。将 H9c2 细胞以 60% ~ 75% 的密度与 miR-223-3p 抑制剂按照制造商的方案进行瞬时转染,以 miR-223-3p 抑制剂阴性对照作为对照。转染后 H9c2 细胞继续在 6 孔板中培养,24 h 进行后续实验。

1.2 CCK-8 实验检测细胞损伤

在 96 孔板中每孔接种 100 μ L 细胞悬液,每组设置 3 ~ 5 个复孔,在孔板的最外圈加入 PBS 溶液,以避免蒸发,置于培养箱中培养 12 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,将孔板重新置于培养箱内培养 2 h,取出在 450 nm 处测量吸光度值,并计算细胞活力。

1.3 RT-qPCR 检测 miR-223-3p 的表达

根据试剂盒说明书要求,使用 1 mL RNA 分离试剂(Vazyme#RC201,中国南京)从培养的 H9c2 细胞中提取 miRNA,使用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒(Vazyme#MR101,中国南京)按照制造商的说明进行 cDNA 合成。采用 miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme#MQ101,中国南京)定量 miR-223-3p 的相对表达水平。使用 7500 FAST Real-time PCR 系统(Applied Biosystems)进行 40 个循环,

以 U6 作为内部对照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 miR-223-3p 的相对表达量。引物序列:miR-223-3p 正义链为 5'-GCCGAGTGTCACTTTGTCAAA-3',反义链为 5'-TGGAGCCTGGGACGTG-3', RT: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGCGTGTCTGCCAGTTGTTGAGC-3'; U6 正义链为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反义链为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.4 文库构建与质检

主要步骤包括:(1)使用 Oligo(dT) 磁珠富集 mRNA;(2)将 mRNA 打断成 200 bp 的片段;(3)在 M-MuLV 反转录酶体系中合成 cDNA 的第一条链;(4)用 Rnase H 降解 RNA 链,并在 DNA polymerase I 体系下合成 cDNA 的第二条链;(5)用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA,然后进行末端补平和接头加入;(6)用 USER 酶消化二链 cDNA,得到单链 cDNA 文库;(7)通过 PCR 扩增约 15 个循环,得到最终的 cDNA 文库。由于 Illumina 测序数据中低质量序列通常集中在序列末端,使用 Skewer 工具去除这些特定的接头序列和低质量片段后,通过 FastQC 软件对处理后的数据进行质量控制评估,并计算 Q20(质量分数 ≥ 20 的碱基占高质量片段碱基总数的比例)和 Q30(质量分数 ≥ 30 的碱基占高质量片段碱基总数的比例),以确保数据质量达到后续分析的要求。

1.5 上机测序

在上机测序阶段,使用 cBot 仪器进行桥式 PCR 扩增,生成 clusters。Illumina 测序平台采用 2×150 测序模式,边合成边测序。在测序过程中,通过使用带有荧光标记的核苷酸、DNA 聚合酶和接头引物来扩增目标 DNA 序列。随着每个荧光标记的 dNTP 的加入并释放荧光,测序仪检测到这些荧光信号,将其转换为测序峰,最终通过软件识别这些峰来获得具体的序列数据。

1.6 聚类 and 测序

对于样本组间差异表达基因的筛选,使用基因和样本的双向层级聚类,并用热图展示,聚类参数为 Distance metric: Pearson correlation; Linkage rule: Average Linkage。

1.7 差异表达基因分析

使用 DESeq2 软件(v1.16.1)对不同样本组之间进行差异表达基因的筛选。通过错误发现率(false discovery rate, FDR)法得到各基因 P 值校正后的 Q 值, FDR 值比 P 值更严格,数值越小越可靠,但没有约定的阈值,不像 P 值小于 0.05 和 0.01 时才认为差异显著和差异非常显著。

1.8 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

用 TopGO 软件对目的基因集进行 GO 功能分析,分别对上调差异基因和下调差异基因进行富集。具体方法:首先将全部基因作为背景列表,目的基因列表则是从背景列表中筛选出的候选列表;然后利用 Fisher 精确检验计算 GO 功能集在目的基因列表中的富集程度,得到 P 值后进行 FDR 校正。针对这些基因进行 KEGG 数据库中 Pathway 的功能注释和分类,并由疾病注释功能分析针对这些基因进行 DisGeNET 疾病数据库中疾病类型的功能注释和分类。Reactome 代谢通路分析则是针对这些基因进行 Reactome 数据库中代谢通路的注释和分类,这些分析方法与 GO 类似。

1.9 ELISA 检测

收集培养上清液,根据试剂盒说明书进行 ELISA 检测,检测上清液中白细胞介素(interleukin, IL) 6、 1β 和 18 的浓度。

1.10 RT-qPCR 验证相关基因表达

采用 RT-qPCR 检测转染 miR-223-3p 抑制物后高糖诱导的 H9c2 细胞中 Cxcl10、Creb3l3、Mmp3、Bcl3 以及炎症因子的相对表达量。具体步骤:(1)总 RNA 提取:操作根据 Trizol 试剂盒说明书流程提示,提取两组细胞的总 RNA;(2)反转录:按照提供的反转录配方操作,将提取的总 RNA 反转录为 cDNA,确保在反转录过程中分别处理两组细胞的 RNA 样品;(3)配制 qPCR 反应体系:按照提供的配方,制备包括 SYBR Green MasterMix、引物、ROX Reference Dye 和 cDNA 模板的反应体系,确保在配制反应液时将两组细胞的 cDNA 分别加入;(4)PCR 反应:将配制好的反应体系加载到荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 反应,按照提供的 PCR 程序设定,运行 PCR 反应;(5)数据分析:反应结束后,使用内参基因 GAPDH 的 C_t 值进行数据分析,计算 ΔC_t 值,并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来计算基因的相对表达量。根据差异表达的筛选标准($|\log_2 FC| \geq 1, P < 0.05$),评估所选基因在两组细胞中的差异表达情况。所用引物序列(引物由生工公司合成):GAPDH 正义链:5'-CCAGTGCTCTCCTCTGA-3',反义链:5'-GCTGTAGCCAAATCGTTG-3'; TNF- α 正义链:5'-AGCATGATCCGAGATGTGGAA-3',反义链:5'-TAGACAGAAGAGCGTGGTGGC-3'; IL-6 正义链:5'-GTTGCCTTCTTGGGACTGATG-3',反义链:5'-ATACTGGTCTGTTGTGGGTGGT-3'; IL- 1β 正义链:5'-GGGATGATGACGACCTGCTAG-3',反义链:5'-ACCACTTGTTGGCTTATGTTCTG-3'; CXCL10 正义链:5'-TCCTGTCCGCATGTTG

AGATCATTG-3', 反义链: 5'-ACCTTCTTTGGCTCAC
CGCTTTC-3'; Creb3l3 正义链: 5'-TGTGAAGGAATTG
CTGCTGTCTG-3', 反义链: 5'-GCAACTTCTTCTCATC
CTCTGTCTG-3'; Mmp3 正义链: 5'-CCTATTCCTGGT
TGCTGCTCATG-3', 反义链: 5'-TCTGTGGAGGACTTG
TAGACTGG-3'; Bcl3 正义链: 5'-GTGACAGCTGGTG
CCAGC-3', 反义链: 5'-GTTGCGCTGTCTAGCAGG
GC-3'。

1.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析和统计图表制作。所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 两组数据比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖诱导 H9c2 细胞损伤

用高糖处理 H9c2 细胞 24 h 后, 与普通培养基培养的细胞相比, 高糖条件下培养的细胞活力降低 ($P < 0.001$), 表明高糖能显著抑制细胞的生长活力, 诱导 H9c2 细胞损伤(图 1)。

2.2 转染后 miR-223-3p 的表达

将 miR-223-3p 的抑制物 and 对照物分别转染高糖诱导的 H9c2 细胞, 与对照组相比, 抑制剂组 miR-223-3p 的表达水平降低 ($P < 0.01$; 图 2)。

2.3 测序数据的质量控制

利用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台的双端测序方式对 miR-223-3p 对照组与 miR-223-3p 抑制剂组各 3 个重复样本进行了高通量测序分析。结果显示, 每个样本获得的原始序列数平均为 48 742 198; miR-223-3p 对照组中去除低质量片段后序列数平均为 49 522 130, miR-223-3p 抑制剂组中去除低质量片段后序列数平均为 47 962 267。经过测序和数

据处理后, 两组样本的去除低质量片段后序列数和去除低质量片段后序列碱基数比例都超过了 99%。此外, 两组样本的 Q20 碱基百分比均超过了 98%, Q30 碱基百分比也都超过了 94%。综合分析以上结果, 高糖诱导的 H9c2 细胞的 miR-223-3p 对照组和 miR-223-3p 抑制剂组的测序数据质量较好, 测序结果可用于后续研究(表 1)。

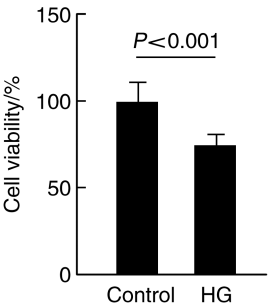


图 1. 高糖对 H9c2 细胞活力的影响
Figure 1. The effect of HG on the cell viability of H9c2 cells

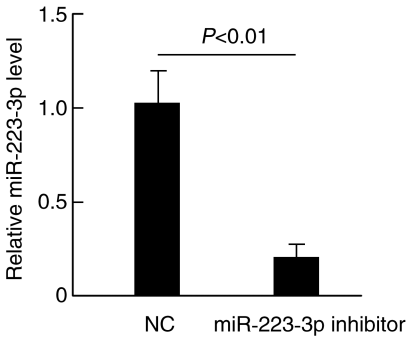


图 2. miR-223-3p 的抑制物 and 对照物转染高糖诱导的 H9c2 细胞 miR-223-3p 的表达水平
Figure 2. Expression levels of miR-223-3p in HG induced H9c2 cells transfected with miR-223-3p inhibitor and control

表 1. 测序数据质量统计结果
Table 1. Statistical results of sequencing data quality

样本	原始序列数	原始碱基数	去除低质量 片段后序列数	去除低质量 片段后序列 碱基数	去除低质量 片段后序列 平均长度	去除低质量 片段后 序列数 所占比例	去除低质量 片段后序列 碱基数 所占比例	Q20	Q30
miR-223-3p NC-1	44 104 452	6 659 772 252	43 874 784	6 603 614 363	150.5	99.48%	99.16%	98.15%	94.45%
miR-223-3p NC-2	54 811 172	8 276 486 972	54 596 016	8 215 109 756	150.5	99.61%	99.26%	98.35%	95.00%
miR-223-3p NC-3	49 650 766	7 497 265 666	49 453 340	7 440 648 756	150.5	99.60%	99.24%	98.35%	95.05%
miR-223-3p inhibitor-1	42 968 502	6 488 243 802	42 810 494	6 443 841 484	150.5	99.63%	99.32%	98.40%	95.15%
miR-223-3p inhibitor-2	46 861 264	7 076 050 864	46 665 822	7 020 777 035	150.4	99.58%	99.22%	98.25%	94.75%
miR-223-3p inhibitor-3	54 057 034	8 162 612 134	53 838 968	8 101 235 374	150.5	99.6%	99.25%	98.3%	95.05%

2.4 差异基因的筛选和聚类热图

高糖处理的 H9c2 细胞中,miR-223-3p 抑制剂组共有 19 276 个基因的表达发生了变化,其中 9 677 个基因表达上调,9 599 个基因表达下调。为了筛选出显著差异表达的基因,使用 DESeq2 软件分析,并设定了 $|\log_2FC| \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 的阈值,以

此标准发现,相较于对照组,miR-223-3p 抑制剂组的差异基因共有 198 个,其中 111 个基因上调,87 个基因下调(图 3A)。对两组的差异基因进行聚类分析后发现,两组之间的差异基因表现出显著的分化特征(图 3B),说明抑制 miR-223-3p 后可导致高糖诱导的 H9c2 细胞中许多基因表达水平发生改变。

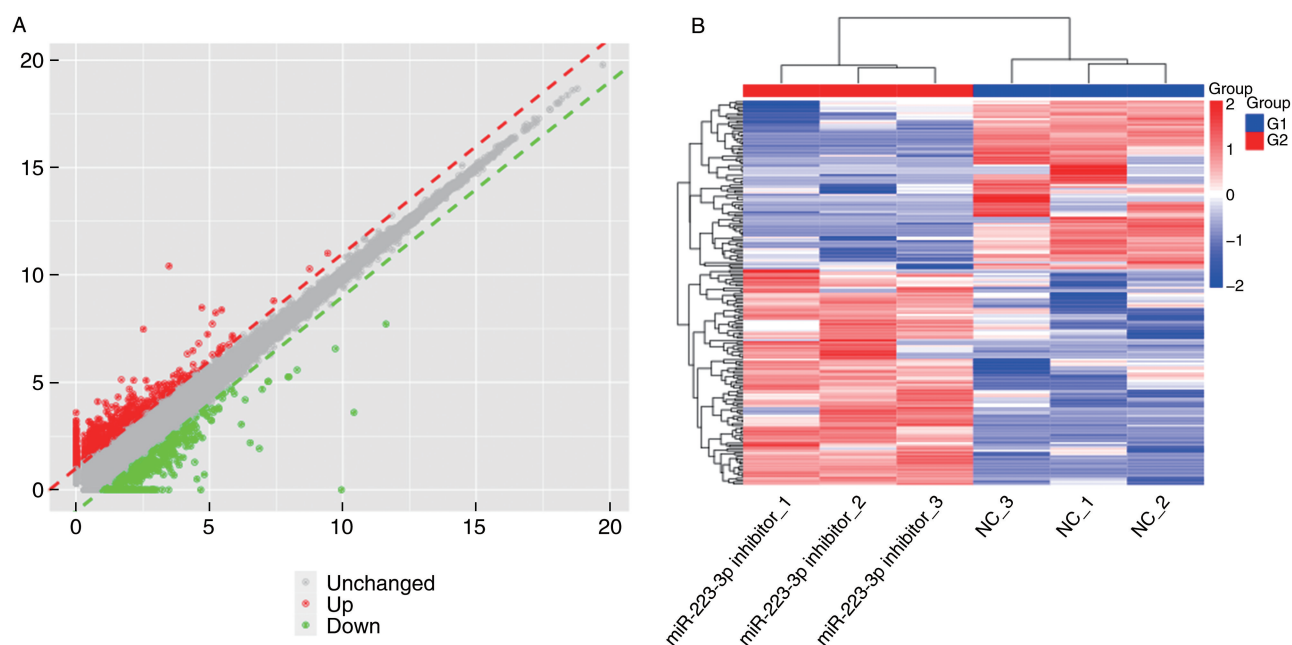


图 3. 差异基因表达分布情况

A: 差异基因散点图,横坐标代表基因在对照组的表达量,纵坐标代表基因在 miR-223-3p 抑制剂组的表达量;红色标记的点代表与对照组相比表达显著上升的基因,绿色标记的点代表表达显著下降的基因,灰色点表示表达变化不显著的基因,显著差异基因的筛选条件为 $P < 0.05$ 。B: 差异基因聚类热图,白色代表显著差异基因的表达量均值,越红代表表达量越高,越蓝代表表达量越低,每一行代表一个基因,每一列代表一个样本,筛选条件同散点图。

Figure 3. Distribution of differential gene expression

2.5 差异表达基因的 GO 功能富集分析情况

与对照组相比,miR-223-3p 抑制剂组的差异表达基因在细胞组成 (cell composition, CC) 上主要富集在 Bcl3-Bcl10 复合物、Bcl3/NF- κ B2 复合物和肌浆网等组份上,在分子功能 (molecular function, MF) 上主要富集在 G 蛋白偶联受体活性、甘油基乙醚单加氧酶活性等方面,在生物过程 (biological process, BP) 方面主要参与细胞阴离子稳态和氯离子稳态等过程(图 4)。

2.6 KEGG 通路富集分析情况

对 miR-223-3p 抑制剂组和对照组中的差异基因进行 KEGG 通路富集分析,以揭示这些基因在何种细胞信号传导途径中起主要作用。以 $P < 0.05$ 作为通路显著性标准,结果显示,差异表达基因在 KEGG 通路中主要涉及 TNF 信号通路、IL-17 信号通

路、1 型糖尿病、细胞色素 P450 对药物的代谢作用等生物过程(图 5)。其中,注释在 TNF 信号通路的相关差异性候选基因有 4 个,分别是 Cxcl10、Creb3l3、Mmp3 和 Bcl3;注释在 IL-17 信号通路的候选基因有 3 个,分别是 Cxcl10、Mmp3 和 Mmp13 (表 2)。

2.7 miR-223-3p 促进 H9c2 细胞炎症因子产生

与对照组相比,miR-223-3p 抑制剂组细胞分泌的炎症因子 IL-6 降低了 32.68%、IL-1 β 降低了 23.22% 以及 IL-18 降低了 55.74% ($P < 0.05$;图 6)。RT-qPCR 结果显示,miR-223-3p 抑制剂组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 水平较对照组分别降低了 72.83% ($P < 0.001$)、41.79% ($P < 0.05$)、41.15% ($P < 0.01$;图 7)。

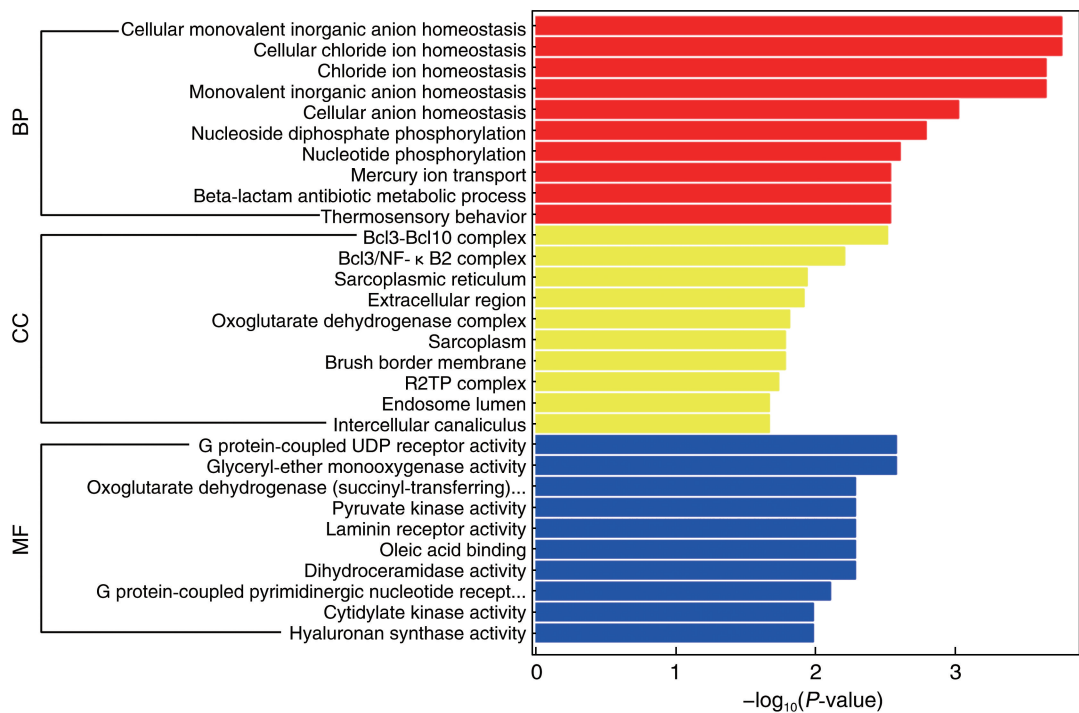


图 4. 差异表达基因的 GO 功能富集分析

Figure 4. GO functional enrichment analysis of differentially expressed genes

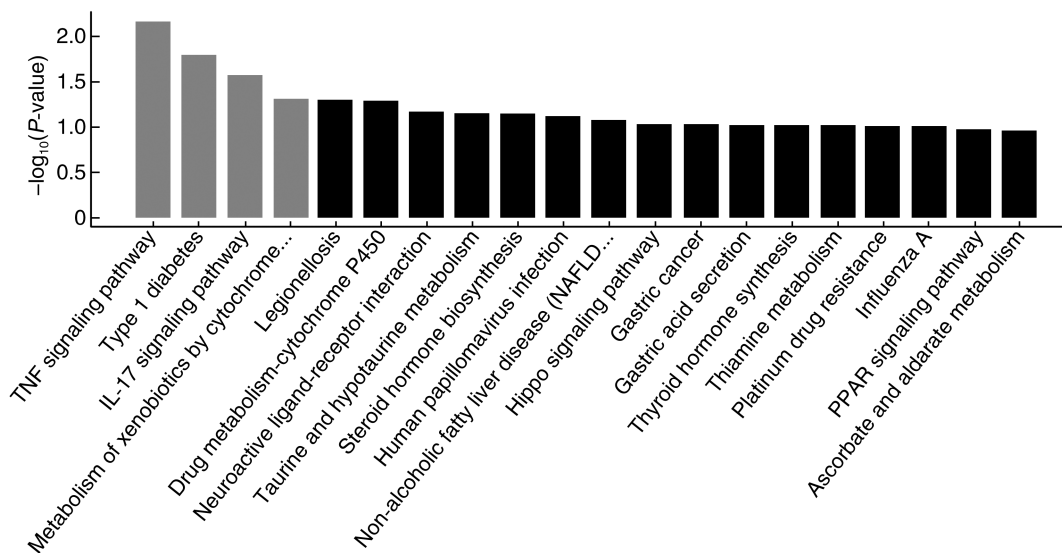


图 5. 显著富集 KEGG 柱状图

Figure 5. Significantly enriched KEGG column chart

表 2. KEGG 通路富集分析结果

Table 2. Enrichment analysis results of KEGG pathway

通路名称	基因总数	候选基因数	候选基因	P	富集因子值
TNF 信号通路	106	4	Cxcl10、Creb3l3、Mmp3、Bcl3	0.0069	0.0377
IL-17 信号通路	90	3	Cxcl10、Mmp3、Mmp13	0.0267	0.0333
细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用	40	2	Akr7a3、Ugt2b10	0.0482	0.0408
1 型糖尿病	27	2	Bhlha15、Pklr	0.0159	0.0741

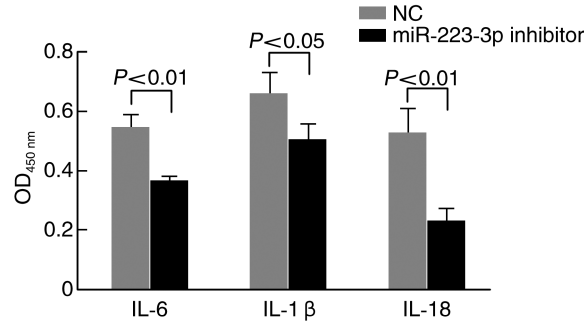


图 6. ELISA 检测两组细胞上清液中炎症因子浓度
Figure 6. ELISA detects the concentration of inflammatory factors in saliva in two groups of cells

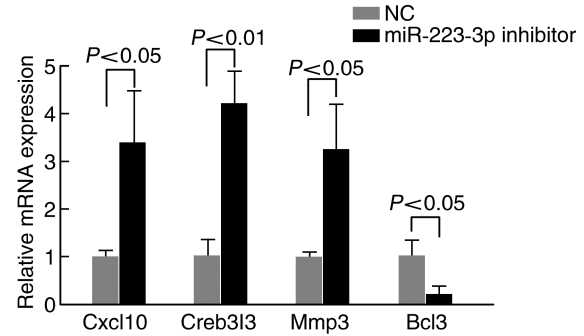


图 8. TNF 相关通路的差异基因 mRNA 相对表达水平
Figure 8. Relative expression levels of mRNA in TNF-related pathway differential genes

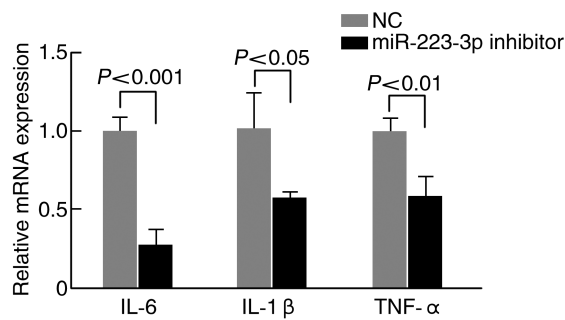


图 7. RT-qPCR 检测两组细胞中炎症因子 mRNA 表达
Figure 7. RT-qPCR detects the mRNA expression of inflammatory factors in two groups of cells

2.8 显著差异基因的验证

通过整合分析抑制 miR-223-3p 之后关键基因的表达情况及测序数据,筛选出 4 个在 TNF 信号通路调控中发挥作用的显著差异基因,即 Cxcl10、Creb3l3、Mmp3 和 Bcl3 基因(表 3)。RT-qPCR 结果显示,与对照组相比,miR-223-3p 抑制剂组 Cxcl10、Creb3l3 和 Mmp3 的 mRNA 表达水平分别升高了 2.38 倍($P<0.05$)、3.10 倍($P<0.01$)和 2.25 倍($P<0.05$),而 Bcl3 的 mRNA 表达水平则降低了 78.51%($P<0.05$;图 8)。实验结果与测序数据相符,说明抑制 miR-223-3p 的表达会影响这些 TNF 信号通路相关的靶基因的表达水平。

表 3. TNF 信号通路相关候选差异基因

Table 3. TNF signal pathway-related candidate differential genes

基因	log ₂ FC	P	FDR
Cxcl10	1.629	0.0012	0.111
Creb3l3	1.895	0.04523	0.638
Mmp3	1.431	0.0002	0.039
Bcl3	-2.189	0.0151	0.421

3 讨论

目前的研究表明,糖尿病可以通过引起心肌细胞的损伤诱发相关心肌病,如细胞的氧化还原损伤、线粒体功能障碍、细胞凋亡和纤维化,损害心肌收缩力和降低心功能^[11]。但其发病机制尚不明确,因此进一步明确 DCM 的发病机制,对 DCM 进行早期诊断和干预其发病的进程具有重要的临床意义。

目前,miRNA 已被证明是多种生物过程的调节因子,在 DCM 中也起着重要作用,比如与 TGF- β 信号通路相互作用调节 DCM 的进程^[12-13]。先前的研究表明,高血糖调节糖尿病心脏中一些 miRNA 的表达,这些差异表达的 miRNA 可调节糖尿病患者心肌凋亡、心肌纤维化、心肌肥大和线粒体功能障碍^[14]。而细胞内 miR-223-3p 的增加会损害心肌细胞的糖脂代谢,并在高糖处理的心肌细胞中 miR-223-3p 的表达显著增加,其可能通过靶向 SPI1 促进心肌细胞焦亡和炎症因子的释放^[10]。

为了继续探究 miR-223-3p 与 DCM 发病的可能关系,本研究构建了“miR-223-3p-mRNA 靶点”网络并进行了通路富集分析,其主要涉及的通路是 TNF 信号通路和 IL-17 信号通路,此外还与 1 型糖尿病、细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用等有关。TNF 是一种促炎性细胞因子,通过与 TNFR1 和 TNFR2 两种不同受体相互作用,这些受体在细胞和组织层面的表达不同,激活不同的信号传导路径,导致包括细胞死亡、增殖和迁移在内的多种细胞生物过程^[15],在心肌缺血再灌注损伤、心肌肥厚、DCM 和心力衰竭的发病和进展中起着至关重要的作用。过往研究表明 TNF- α 在 H9c2 细胞中可以通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制自噬,导致细胞凋亡增加^[16]。本研究检测了 TNF- α 和炎症因子 IL-6、IL-1 β 、IL-18 等的表达,结果显示,抑制 miR-223-3p 后,

H9c2 细胞中 TNF- α 和炎症因子的表达降低,推测 miR-223-3p 可能与一些靶点结合,通过 TNF 信号通路促进 H9c2 细胞炎症反应。进一步分析 TNF 信号通路相关靶点筛选出 miR-223-3p 与 DCM 相关核心靶点 4 个,分别是 Cxcl10、Creb3l3、Mmp3 和 Bcl3,这些靶点可能在 miR-223-3p 早期诊断或干预 DCM 中发挥关键作用。其中 IFN-g 诱导的 Th1 趋化因子 Cxcl10 在许多自身免疫性疾病的发病机制中发挥重要作用,而膜结合转录因子 Creb3l3 在体内对饥饿有广泛的代谢作用,在几种类型的糖尿病肥胖小鼠中也观察到通过肝脏激活 Creb3l3 来改善糖尿病^[17]。

根据测序数据和先前研究的结果,推测 miR-223-3p 可能通过调控 Cxcl10、Creb3l3、Bcl3 和 Mmp3 等关键基因促进 DCM 的发生发展过程。因此,本研究团队下一步将继续深入探讨 miR-223-3p 是否通过调控这些靶基因来促进心肌细胞的炎症损伤及其机制,确定其在 DCM 发生发展中的作用,期望能为 DCM 的早期诊断和治疗探寻新的靶点和方向。

[参考文献]

- [1] ZHAO X, LIU S, WANG X, et al. Diabetic cardiomyopathy: clinical phenotype and practice [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1032268.
- [2] HSU J C, HUANG K C, LIN T T, et al. Epicardial adipose tissue is associated with geometry alteration and diastolic dysfunction in prediabetic cardiomyopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2024. DOI: 10.1210/clinem/dgae400.
- [3] CHEN Y, HUA Y, LI X, et al. Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 42.
- [4] HWANG H, CHANG H R, BAEK D. Determinants of functional microRNA targeting [J]. *Mol Cells*, 2023, 46(1): 21-32.
- [5] BREAK M K B, SYED R U, HUSSEIN W, et al. Noncoding RNAs as therapeutic targets in autophagy-related diabetic cardiomyopathy [J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 256: 155225.
- [6] MEDZIKOVIC L, ARYAN L, RUFFENACH G, et al. Myocardial fibrosis and calcification are attenuated by microRNA-129-5p targeting Asporin and Sox9 in cardiac fibroblasts [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(9): e168655.
- [7] LI G, SHAO Y, GUO H C, et al. MicroRNA-27b-3p down-regulates FGF1 and aggravates pathological cardiac remodelling [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(9): 2139-2151.
- [8] SONG R, DASGUPTA C, MULDER C, et al. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism and protects heart function in myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2022, 145(15): 1140-1153.
- [9] 孟宪杰, 刘蕊, 曹丽慧, 等. 长链非编码 RNA MIAT 在 2 型糖尿病合并冠心病患者血清中的水平及对高糖诱导的心肌细胞损伤的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(6): 481-490. MENG X J, LIU R, CAO L H, et al. Serum levels of long non-coding RNA MIAT in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease and its effect on high glucose-induced cardiomyocyte injury [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(6): 481-490.
- [10] ZHAO S, TAN Y, QIN J, et al. MicroRNA-223-3p promotes pyroptosis of cardiomyocyte and release of inflammasome factors via downregulating the expression level of SPI1 (PU.1) [J]. *Toxicology*, 2022, 476: 153252.
- [11] DEWANJEE S, VALLAMKONDU J, KALRA R S, et al. Autophagy in the diabetic heart: a potential pharmacotherapeutic target in diabetic cardiomyopathy [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 68: 101338.
- [12] HUANG K, WEN S, HUANG J, et al. Integrated analysis of hub genes and miRNAs in dilated cardiomyopathy [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8925420.
- [13] QIN J, TAN Y, HAN Y, et al. Interplay between TGF- β signaling and microRNA in diabetic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2023. DOI: 10.1007/s10557-023-07532-2.
- [14] AHMED U, KHALIQ S, AHMAD H U, et al. Pathogenesis of diabetic cardiomyopathy and role of miRNA [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2021, 31(1): 79-92.
- [15] TIEGS G, HORST A K. TNF in the liver: targeting a central player in inflammation [J]. *Semin Immunopathol*, 2022, 44(4): 445-459.
- [16] KE X, HAO Y, LI B, et al. Vaspin prevents tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in cardiomyocytes by promoting autophagy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2018, 77(5): 257-267.
- [17] NAKAGAWA Y, SATOH A, YABE S, et al. Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(12): 4706-4719.

(此文编辑 文玉珊)