

miR-7 在心肌细胞缺氧复氧模型中的表达及对心肌细胞凋亡的影响

费萍燕¹, 彭生², 费民忠¹, 陆海彬¹, 袁建英¹

1. 上海市松江区中心医院, 上海 201600; 2. 上海市第七人民医院

摘要: **目的** 探讨 miR-7 在心肌细胞缺氧复氧模型中的表达及对心肌细胞凋亡的影响。**方法** 构建心肌细胞缺氧复氧模型, RT-PCR 检测心肌细胞中 miR-7 的表达水平。心肌细胞转染 miR-7 模拟物和抑制物, RT-PCR 检测转染效果。流式细胞术检测 miR-7 模拟物和抑制物对缺氧复氧心肌细胞凋亡的影响, 试剂盒检测细胞中乳酸盐脱氢酶(LDH)水平, Western blot 检测细胞中活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(cleaved caspase-3)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)蛋白水平。**结果** 缺氧复氧心肌细胞模型中 miR-7 的表达水平明显高于正常培养的心肌细胞($P<0.01$)。miR-7 模拟物能够提高心肌细胞中 miR-7 的表达水平, 而 miR-7 抑制物能够抑制心肌细胞中 miR-7 的表达。miR-7 模拟物能够降低缺氧复氧心肌细胞的凋亡率和细胞中 cleaved caspase-3 表达, 抑制心肌细胞分泌 LDH, 促进细胞中 p-Akt 的表达。miR-7 抑制物能够促进缺氧复氧心肌细胞凋亡和细胞中 cleaved caspase-3 表达, 促进心肌细胞分泌 LDH, 抑制细胞中 p-Akt 的表达。**结论** miR-7 在心肌细胞缺氧复氧模型中表达升高。miR-7 能够降低缺氧复氧心肌细胞凋亡, 干扰 miR-7 表达能够促进缺氧复氧心肌细胞凋亡, 作用机制可能与 Akt 信号通路有关。

关键词: 心肌细胞; 缺氧复氧; 凋亡; miR-7

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)02-0195-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.02.019

Expression of miR-7 in myocardial hypoxia reoxygenation model and its effect on apoptosis of cardiomyocytes

FEI Ping-yan*, PENG Sheng, FEI Min-zhong, LU Hai-bin, YUAN Jian-ying

*The Central Hospital of Songjiang District, Shanghai 201600, China

Abstract: **Objective** To explore the expression of miR-7 in myocardial hypoxia reoxygenation model and its effect on the apoptosis of myocardial cells. **Methods** Myocardial hypoxia reoxygenation model was established, and the expression level of miR-7 in myocardial cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Myocardial cells were transfected with miR-7 mimics and inhibitors, and then RT-PCR was used to detect the transfection effect. Flow cytometry was employed to detect the effects of miR-7 mimics and inhibitors on myocardial apoptosis induced by hypoxia reoxygenation. Lactate dehydrogenase (LDH) kit was used to detect the LDH level, and the protein expression levels of cleaved caspase-3 and p-Akt in cells were detected by Western blot. **Results** The expression level of miR-7 in hypoxia reoxygenation myocardial cells was significantly higher than that of normal cultured cardiomyocytes ($P<0.01$). miR-7 mimics could enhance the expression level of miR-7 in myocardial cells, while miR-7 inhibitors could inhibit the expression of miR-7 in myocardial cells. miR-7 mimics could reduce the apoptosis rate of hypoxia reoxygenation myocardial cells and the expression of cleaved caspase-3 in the cells, inhibit the secretion of LDH in cardiac myocytes and promote the expression of p-Akt in the cells. miR-7 inhibitors could promote the apoptosis rate of hypoxia reoxygenation myocardial cells, increase the expression of cleaved caspase-3 in the cells, promote the secretion of LDH in cardiac myocytes and inhibit the expression of p-Akt in the cells. **Conclusions** The expression of miR-7 in myocardial hypoxia reoxygenation model is elevated. miR-7 can reduce the apoptosis of hypoxia reoxygenation myocardial cells, interference of miR-7 expression can promote the apoptosis of hypoxia reoxygenation myocardial cells, and the mechanism may be related to Akt signaling pathway.

Key words: myocardial cell; hypoxia reoxygenation; apoptosis; miR-7

急性心肌梗死是一种常见的疾病, 而将缺血的心

肌细胞恢复血液流通是治疗该病的重要方法, 但在这一过程中容易造成心肌缺血再灌注损伤。心肌缺血再灌注损伤的发生与心肌细胞凋亡、能量代谢障碍等有关^[1]。miRNA 广泛存在于心肌组织中, 参与调控心脏

基金项目: 上海市浦东新区计划项目 (No: PWRd2016-19)

作者简介: 费萍燕 (1979-), 上海人, 本科学历, 研究方向: 心血管内科。

发育、心室重构等过程,在心肌细胞凋亡、心肌肥厚、心律失常等病理性过程中也发挥调控作用。miR-20、miR-320、miR-24 等 miRNA 均参与心肌缺血再灌注损伤过程^[2-4]。miR-7 具有抑制肿瘤发生的作用,在缺血再灌注损伤中发挥保护作用,能够抑制心肌细胞的凋亡^[5]。对于 miR-7 对体外缺氧复氧心肌细胞凋亡的研究尚不明确。本研究旨在探讨 miR-7 在缺氧复氧的心肌细胞凋亡中的作用,以期治疗心肌梗死提供新思路,为研究心肌梗死发病机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞 心肌细胞 H9C2 购自中国科学院细胞库。

1.2 主要仪器及试剂 CO₂ 培养箱、流式细胞仪均购自于美国 Thermo; Lipofectamine 2000 购自于美国 Invitrogen; BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自于上海碧云天生物技术研究所; miR-7 模拟序列(miR-7 mimics)、miR-7 抑制序列(miR-7 inhibitors)、对照序列(scramble control miRNA)购自于上海吉玛制药技术有限公司; 乳酸盐脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购自于南京建成生物工程有限公司; 胰蛋白酶、DMEM 培养基均购自于美国 Sigma; 紫外分光光度计购自于美国 Orion; 活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, cleaved caspase-3)多克隆抗体、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)多克隆抗体、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)多克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体均购自于武汉金开瑞生物工程有限公司。

1.3 细胞培养 取出保存在液氮中的心肌细胞 H9C2, 在 37 ℃ 融化后, 加入 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液, 1 000 rpm 离心 10 min, 用 3 ml 的细胞培养液悬浮细胞后, 接种到细胞培养瓶中, 放在 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。观察细胞长满瓶底时, 弃去细胞培养液, 加入磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)洗涤两次后, 加入 3 ml 的 0.25% 的胰蛋白酶在 37 ℃ 消化 2 min, 观察细胞呈圆形并且单个存在时, 加入细胞培养液终止培养, 离心后, 用 5 ml 的细胞培养液悬浮细胞, 接种到 2 个细胞培养瓶中继续培养。

1.4 缺氧复氧模型构建 心肌细胞缺氧复氧模型的构建参照参考文献^[6], 把不含有胎牛血清且不含有糖的 DMEM 培养基作为缺氧培养液。取缺氧培养液用含有 95% 氮气和 5% CO₂ 的混合气体平衡, 2 h 后即饱和缺氧培养液。取培养至对数生长期的心肌细胞, 弃去细胞培养液后, 加入饱和缺氧培养液, 放在 37 ℃

的培养箱中缺氧孵育 10 h。更换为完全细胞培养液, 培养 2 h 后, 为缺氧复氧心肌细胞模型。

1.5 RT-PCR 检测细胞中 miR-7 表达水平 取缺氧复氧心肌细胞模型和正常培养的心肌细胞, 根据 RNA 提取试剂盒提取细胞中的 RNA, 用紫外分光光度计检测提取的 RNA 在 A260/A280 的比值(1.8~2.0 为最佳比值), 检测提取的 RNA 浓度和纯度。RT-PCR 检测 miR-7 的表达水平, 内参基因为 GAPDH, 以 Ct 法计算 miR-7 表达水平。反应条件为: 95 ℃, 5 min; 50 ℃ 2 min; 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s; 60 ℃ 1 min, 共计 40 个循环。

1.6 细胞分组及转染 心肌细胞分为正常组、模型组、mimics 组、inhibitors 组、NC 组, 其中模型组心肌细胞缺氧 10 h 和复氧 2 h 处理; mimics 组、inhibitors 组、NC 组心肌细胞分别用 Lip2000 转染试剂转染 miR-7 mimics、miR-7 inhibitors、对照序列 control 后立即缺氧 10 h 和复氧 2 h 处理; 正常组心肌细胞在正常情况下培养。心肌细胞转染 miR-7 mimics、miR-7 inhibitors、对照序列 control 后 48 h, RT-PCR 检测细胞中 miR-7。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 正常组、模型组、mimics 组、inhibitors 组、NC 组分别经过 1.6 方法中处理后, 每组细胞收集 10⁶ 个细胞, 用冰预冷的 PBS 重悬细胞 2 次后, 1 000 rpm 离心 10 min, 在细胞中加入 100 μl 的结合缓冲液, 混合后, 加入 5 μl 的膜联蛋白 V-FITC(Annexin V-FITC)混匀后, 再加入碘化丙啶(Propidium Iodide, PI) 5 μl, 在避光条件下室温反应 15 min, 加 400 μl 的结合缓冲液, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.8 LDH 水平检测 正常组、模型组、mimics 组、inhibitors 组、NC 组分别经过 1.6 方法中处理后, 收集各组细胞培养液, 用酶标仪检测 LDH 表达水平, 以正常组为参照, 分析各组 LDH 表达水平。

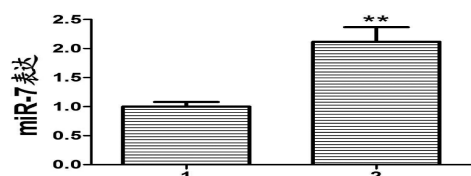
1.9 cleaved caspase-3、Akt、p-Akt 蛋白水平检测 正常组、模型组、mimics 组、inhibitors 组、NC 组分别经过 1.6 方法中处理后, 在细胞中加入裂解液, 放在冰上裂解反应 20 min, 将细胞刮下后, 14 000 rpm, 4 ℃ 离心 15 min, 吸取蛋白上清液, 用 BCA 法对提取蛋白进行定量检测。在蛋白样品中加入等体积的 2×Loading buffer 混合煮沸 5 min, 按照每孔加入 50 μl 的蛋白样品电泳, 蛋白凝胶用 5% 浓缩胶, 10% 分离胶, 90 V 电压观察溴酚蓝进入分离胶底端时终止电泳, 在 120 V 电压条件下将蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 90 min, 1:1 000 稀释的一抗在 4 ℃ 孵育过夜, 1:2 000 倍稀释的二抗在室温下孵育 90 min。滴加显色

液,用 Photoshop CS3 分析目的蛋白表达水平。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计学软件分析实验数据,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本均数比较采用 t 检验。多组比较,先采用单因素方差分析,发现差异再采用 LSD- t 检验进行两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

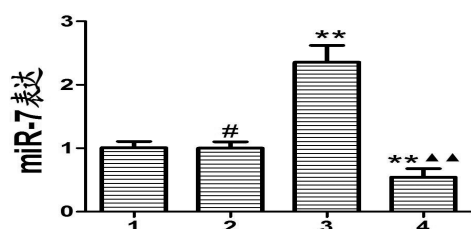
2.1 miR-7 在缺氧复氧心肌细胞中的表达 见图 1。心肌细胞缺氧复氧后 miR-7 表达水平升高,与正常培养的心肌细胞相比差异有统计学意义($P<0.01$)。



注:1:正常培养的心肌细胞;2:缺氧复氧模型心肌细胞; * $P<0.01$ vs 正常培养细胞。

图 1 心肌细胞缺氧复氧后 miR-7 的表达

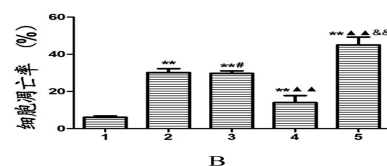
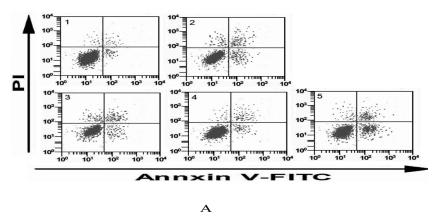
2.2 转染后细胞中 miR-7 表达 见图 2。心肌细胞转染 miR-7 mimics 后细胞中 miR-7 的表达水平明显高于未转染的心肌细胞。心肌细胞转染 miR-7 inhibitors 后细胞中 miR-7 表达水平明显低于未转染的细胞。miR-7 mimics 能促进心肌细胞中 miR-7 的表达,miR-7 inhibitors 能抑制心肌细胞中 miR-7 的表达。



注:1:未转染的心肌细胞;2:转染对照序列 control 后的心肌细胞;3:转染 miR-7 mimics 的心肌细胞;4:转染 miR-7 inhibitors 的心肌细胞; * $P<0.01$ vs 未转染的心肌细胞;▲▲ $P<0.01$ vs 转染 miR-7 mimics 的心肌细胞;# $P>0.05$ vs 未转染的心肌细胞。

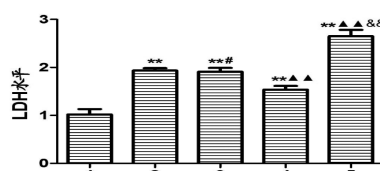
图 2 转染后细胞中 miR-7 表达

2.3 miR-7 对心肌细胞凋亡和 LDH 表达影响 模型组、mimics 组、inhibitors 组、NC 组细胞凋亡率明显高于正常组($P<0.01$)。mimics 组细胞凋亡率明显低于模型组,而 inhibitors 组凋亡率明显高于模型组。miR-7 能够抑制缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡,而下调 miR-7 后能够促进缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡,见图 3。miR-7 能够抑制缺氧复氧诱导的心肌细胞分泌 LDH,下调 miR-7 后能够促进缺氧复氧诱导的心肌细胞分泌 LDH,见图 4。



注:A:流式细胞仪结果图;B:细胞凋亡率;1:正常组;2:模型组;3:NC 组;4:mimics 组;5:inhibitors 组; * $P<0.01$ vs 正常组;# $P>0.05$ vs 模型组;▲▲ $P<0.01$ vs 模型组;&& $P<0.01$ vs mimics 组。

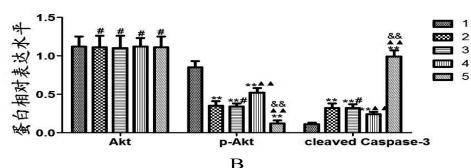
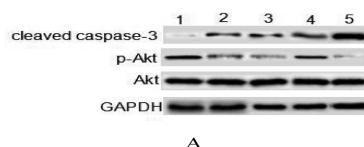
图 3 流式细胞术检测细胞凋亡



注:1:正常组;2:模型组;3:NC 组;4:mimics 组;5:inhibitors 组; * $P<0.01$ vs 正常组;# $P>0.05$ vs 模型组;▲▲ $P<0.01$ vs 模型组;&& $P<0.01$ vs mimics 组。

图 4 细胞中 LDH 水平

2.4 细胞中 cleaved caspase-3、Akt、p-Akt 表达 见图 5。mimics 组细胞中凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 表达下调,而 inhibitors 组细胞中 cleaved caspase-3 表达上调,与模型组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。mimics 组细胞中 Akt 信号通路关键蛋白 p-Akt 水平上升,而 inhibitors 组细胞中 p-Akt 表达下调,与模型组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。



注:A:Western blot 结果;B:以 GAPDH 为内参,目的蛋白相对表达水平;1:正常组;2:模型组;3:NC 组;4:mimics 组;5:inhibitors 组; * $P<0.01$ vs 正常组;# $P>0.05$ vs 模型组;▲▲ $P<0.01$ vs 模型组;&& $P<0.01$ vs mimics 组。

图 5 细胞中 cleaved caspase-3、Akt、p-Akt 表达

3 讨论

细胞凋亡是一种主动性的细胞死亡,受到多种基

因的严格调控,是机体维持内环境稳定的重要方式。在某些病理因素的作用下,机体内正常细胞过度凋亡,导致组织坏死,影响组织器官功能的发挥^[7]。在心脏缺血再灌注过程中,心肌细胞出现过度凋亡的现象。Gottlieb^[8]构建了兔心脏缺血再灌注模型,在该模型中发现大量的心肌细胞死亡,而在单纯缺血后的心肌组织中并没有发现有细胞凋亡发生,这表明,心肌细胞凋亡是心脏缺血再灌注损伤中的重要特征之一。Fliss^[9]运用原位末端标记法检测发现在大鼠心脏缺血再灌注损伤中细胞凋亡增多。Yang 等^[10]研究发现,缺氧复氧心肌细胞模型中细胞凋亡水平明显高于单纯缺氧的心肌细胞,并且细胞内的 LDH 升高。以上的研究结果均说明,心肌细胞凋亡与心脏缺血再灌注损伤有密切的联系。在本研究中,通过体外构建缺氧复氧心肌细胞模型,进一步证实了缺氧复氧能够诱导心肌细胞凋亡,并且能够促进心肌细胞分泌 LDH。

Caspase 蛋白家族是细胞凋亡的重要参与者,该蛋白家族成员被激活后能够导致细胞内的 DNA 降解,细胞核发生凝聚等多种形态变化,最后被吞噬细胞识别后消化^[11]。细胞凋亡与细胞死亡不同,不会发生细胞膜的破裂,细胞的内容物也不会发生泄漏,这些是细胞凋亡过程中的主要特征。细胞凋亡分为内源性和外源性两种途径,外源性途径又称为死亡受体途径,是死亡受体与配体结合后激活 Caspase 级联反应而诱导的细胞凋亡,而内源性途径主要是通过作用于线粒体的膜电位,改变线粒体的通透性,致使凋亡因子大量释放而激活 Caspase 级联反应^[12-14]。Caspase-3 在 Caspase 级联反应中发挥凋亡执行的作用,是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志。miRNA 与心脏缺血再灌注有关,Xu 等^[15]的研究表明,miRNA-1 在心脏缺血再灌注损伤区域表达升高,而 miR-133 表达降低。Tang 等^[16]的研究表明,miR-1 能够通过调控 Caspase 蛋白家族成员诱导心肌细胞凋亡的发生。李彬等^[17]在心脏缺血再灌注损伤模型中发现 miR-7 表达升高。本研究检测发现在缺氧复氧心肌细胞模型中 miR-7 表达升高,进一步通过细胞转染 miR-7 的模拟物和抑制物检测细胞凋亡,发现 miR-7 模拟物能够减少缺氧复氧后的心肌细胞凋亡,相反 miR-7 抑制物能够促进缺氧复氧后的心肌细胞凋亡。这提示,miR-7 能够减少心脏缺血再灌注损伤。

本研究还对其可能的分子机制进行了探讨。Akt 信号通路在心脏缺血再灌注损伤中具有重要作用。姜小雪等^[18]在小鼠心脏缺血再灌注损伤中发现,用 Akt 信号通路抑制剂 LY294002 处理小鼠心脏缺血再灌注

模型,心肌细胞凋亡增多,梗死面积增大,p-Akt 表达水平下降。本研究检测发现 miR-7 过表达后缺氧复氧心肌细胞中 p-Akt 磷酸化水平升高,而干扰 miR-7 后的缺氧复氧心肌细胞中 p-Akt 磷酸化水平降低。这提示,miR-7 对缺氧复氧心肌细胞的作用与 Akt 信号通路有关。

综上所述,miR-7 在缺氧复氧心肌细胞中表达升高,促进 miR-7 表达能够抑制缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡,作用机制与 Akt 信号通路有关。这说明,miR-7 可能对心脏缺血再灌注损伤具有保护作用,这为后续进一步研究心脏缺血再灌注发病机制奠定了基础,为治疗心脏缺血再灌注损伤提供了新思路。

参考文献

- [1] Han Y, Guo J, Zheng Y, et al. Bivalirudin vs heparin with or without tirofiban during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction; the BRIGHT randomized clinical trial[J]. JAMA, 2015, 313(13):1336-1346.
- [2] Duygu B, de Windt LJ, da Costa Martins PA. Targeting microRNAs in heart failure[J]. Trends Cardiovasc Med, 2016, 26(2):99-110.
- [3] Lu Q, Gong Z, Zhou N, et al. MiR-24 expression in myocardial ischemia reperfusion induced by acute myocardial infarction after percutaneous coronary intervention treatment[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(2):1659-1666.
- [4] Boon RA, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction[J]. Nat Rev Cardiol, 2015, 12(3):135-142.
- [5] Wu HJ, Zhang CY, Zhang S, et al. Microarray expression profile of circular RNAs in heart tissue of mice with myocardial infarction-induced heart failure[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(1):205-216.
- [6] Malik A, Bromage DI, He Z, et al. Exogenous SDF-1 α protects human myocardium from hypoxia-reoxygenation injury via CXCR4[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2015, 29(6):589-592.
- [7] 孙洋, 刘爽, 徐静, 等. 一种新型肽对 Lewis 肿瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(17):4806-4808.
- [8] Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes[J]. J Clin Invest, 1994, 94(4):1621-1628.
- [9] Fliss H, Gattlinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. Circ Res, 1996, 79(5):949-956.
- [10] Yang Z, Zingarelli B, Szabó C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Circulation, 2000, 101(9):1019-1026.
- [11] Weng D, Marty-Roix R, Ganesan S, et al. Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(20):7391-7396.
- [12] White K, Dempsey Y, Caruso P, et al. Endothelial apoptosis in pulmonary hypertension is controlled by a microRNA/programmed cell death 4/caspase-3 axis[J]. Hypertension, 2014, 64(1):185-194.
- [13] Liu T, Yamaguchi Y, Shirasaki Y, et al. Single-cell imaging of caspase-1 dynamics reveals an all-or-none inflammasome signaling response[J]. Cell Rep, 2014, 8(4):974-982.
- [14] Ni HM, McGill MR, Chao X, et al. Caspase inhibition prevents tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and promotes necrotic cell death in mouse hepatocytes *in vivo* and *in vitro*[J]. Am J Pathol, 2016, 186(10):2623-2636.
- [15] Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes[J]. J Cell Sci, 2007, 120(17):3045-3052.
- [16] Tang Y, Zheng J, Sun Y, et al. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2[J]. Int Heart J, 2009, 50(3):377-387.
- [17] 李彬. MicroRNA-7a/b 在缺血/再灌注诱导的心肌细胞损伤中的作用及机制研究[D]. 济南:山东大学, 2014.
- [18] 姜小雪, 刘关羽, 雷寒, 等. PI3K/Akt 通路介导 TRPV1 抑制离体小鼠心脏缺血再灌注后的细胞凋亡[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(9):1187-1192.