

# miR-149-5p靶向FGF21对大鼠心肌细胞的缺氧/复氧损伤的促进作用

蒋先训, 张凯, 张鹰\*

南华大学衡阳医学院附属第二医院重症医学科, 湖南衡阳 421000

[中图分类号] R542.2 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2023.03.0275

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 蒋先训, 张凯, 张鹰. miR-149-5p靶向FGF21对大鼠心肌细胞的缺氧/复氧损伤的促进作用[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(3): 275-282.

[收稿日期] 2022-02-13 [录用日期] 2022-08-09 [上线日期] 2022-10-20

**[摘要]** **目的** 探究miR-149-5p与成纤维细胞生长因子21(FGF21)的靶向关系, 及其对大鼠心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤的影响。**方法** 将10只C56BL/6J雄性小鼠构建缺血再灌注(I/R)模型, qRT-PCR法检测I/R小鼠心脏组织中miR-149-5p表达水平的变化。将培养至生长对数期的H9c2大鼠心肌细胞分为对照组、H/R组、H/R+miR-149-5p inhibitor组、H/R+miR-149-5p NC组、H/R+miR-149-5p mimics组、H/R+miR-149-5p mimics+FGF21组, 并诱导H/R模型及转染处理。ELISA法检测H9c2细胞中乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)的活性; MTT法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; qRT-PCR检测细胞中miR-149-5p的表达水平; Western blotting检测Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、FGF21蛋白的表达水平; 双荧光素酶测定miR-149-5p与FGF21的靶向关系。**结果** 与假手术组比较, I/R小鼠心脏组织中miR-149-5p表达水平明显升高( $P<0.05$ )。与对照组比较, H/R组H9c2细胞凋亡率、LDH和CK活性及Bax、cleaved caspase-3蛋白表达水平均明显升高( $P<0.05$ ), 细胞活力及FGF21、Bcl-2蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ); 与H/R组和H/R+miR-149-5p NC组比较, H/R+miR-149-5p inhibitor组细胞凋亡率、LDH和CK活性及Bax、cleaved caspase-3蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ ), 细胞活力及FGF21、Bcl-2蛋白表达水平均明显升高( $P<0.05$ ); 与H/R组比较, H/R+miR-149-5p mimics组细胞凋亡率、LDH和CK活性及Bax、cleaved caspase-3蛋白表达水平均明显升高( $P<0.05$ ), 细胞活力及FGF21、Bcl-2蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ )。与H/R+miR-149-5p mimics组比较, H/R+miR-149-5p mimics+FGF21组细胞凋亡率及LDH和CK活性均明显降低( $P<0.05$ ), 细胞活力明显升高( $P<0.05$ )。双荧光素酶检测结果显示miR-149-5p与FGF21基因有靶向调控关系。**结论** miR-149-5p在I/R小鼠心肌组织中明显上调, 可负向调控FGF21水平, 导致H/R处理的大鼠心肌细胞活力下降、凋亡增加。

**[关键词]** miR-149-5p; 缺血再灌注; 成纤维细胞生长因子21; 细胞凋亡

## MiR-149-5p targeting FGF21 promotes hypoxia/reoxygenation injury of rat's cardiomyocytes

Jiang Xian-Xun, Zhang Kai, Zhang Ying\*

Department of Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China

\*Corresponding author, E-mail: zhangy20052005@126.com

This work was supported by the Scientific Research Program of Hunan Provincial Health Commission (202213014836)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the targeting relationship of miR-149-5p and fibroblast growth factor 21 (FGF21), and the effect of miR-149-5p on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury of rat's cardiomyocytes. **Methods** Ten male C56BL/6J mice were used to construct the cardiac ischemia-reperfusion (I/R) models, and qRT-PCR was performed to detect the changes of miR-149-5p levels in the heart tissues of I/R mice. H9c2 cells cultured to logarithmic phase were divided into control group, H/R group, H/R+miR-149-5p inhibitor group, H/R+miR-149-5p NC group, H/R+miR-149-5p mimics group and H/R+miR-149-5p

**[基金项目]** 湖南省卫生健康委科研项目(202213014836)

**[作者简介]** 蒋先训, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事心脏重症方面的基础研究

**[通信作者]** 张鹰, E-mail: zhangy20052005@126.com

mimics+FGF21 group, and induced H/R model and transfection treatment. The activities of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) in H9c2 cardiomyocytes were detected by ELISA; Cell viability was detected by MTT assay; apoptosis was detected by flow cytometry; the level of *miR-149-5p* was detected by qRT-PCR; the expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and FGF21 proteins were detected by Western blotting; the targeting relationship between *miR-149-5p* and FGF21 were determined by dual luciferase assay. **Results** Compared with the sham operation group, the level of *miR-149-5p* in the heart tissue of I/R mice was significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with those in control group, the apoptosis rate, LDH and CK activities and Bax, cleaved caspase-3 protein expression levels of H9c2 cells in H/R group were significantly increased ( $P<0.05$ ), cell viability and FGF21, Bcl-2 protein expression levels decreased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with those in H/R group and H/R+*miR-149-5p* NC group, the apoptosis rate, LDH and CK activities and Bax, cleaved caspase-3 protein expression levels of H9c2 cells in H/R+*miR-149-5p* inhibitor group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), cell viability and FGF21, Bcl-2 protein expression levels were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with those in H/R group, the apoptosis rate, LDH and CK activities and Bax, cleaved caspase-3 protein expression levels of H9c2 cells in H/R+*miR-149-5p* mimics group were significantly increased ( $P<0.05$ ), cell viability and FGF21, Bcl-2 protein expression levels decreased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with those in H/R+*miR-149-5p* mimics group, the apoptosis rate, and LDH and CK activities of H9c2 cells in *miR-149-5p* mimics+FGF21 group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), cell viability was significantly increased ( $P<0.05$ ). The result of dual luciferase assay indicated the targeted regulatory relationship between *miR-149-5p* and FGF21. **Conclusions** *miR-149-5p* is up-regulated significantly in the myocardial tissue of I/R mice, and negatively regulate the level of FGF21, leads to decreased cell viability and increased apoptosis of H/R-treated rat's cardiomyocytes.

[Key words] *miR-149-5p*; ischemia-reperfusion; fibroblast growth factor 21; apoptosis

近年来, 缺血性心脏病的高发病率和高病死率使其成为全球性的健康问题之一<sup>[1]</sup>。心肌缺血后, 心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤会导致不良的心血管结局, 包括心肌收缩功能障碍、心脏电生理异常和心肌坏死, 甚至导致心肌细胞直接破坏<sup>[2-4]</sup>。因此, 深入研究心肌I/R损伤, 寻找更加有效的治疗策略具有重要意义。内源性microRNA(miRNA)被认为是多种心血管疾病发生和发展的关键调节因子, 并参与心肌I/R损伤的发展<sup>[5-7]</sup>。有研究显示*miR-149*多态性与缺血性卒中的发病机制有关, 缺血性卒中的发病机制也可能与I/R损伤的进展有关<sup>[8]</sup>。Ma等<sup>[9]</sup>研究显示, 心肌梗死小鼠体内的*miR-149-5p*水平显著上调。然而, *miR-149-5p*在心脏I/R损伤过程中的特殊作用和潜在机制仍不清楚。成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor 21, FGF21)是重要的代谢调节剂, 参与心脏发育并在心血管疾病中发挥有益作用<sup>[10]</sup>。生物信息学分析预测*miR-149-5p*在FGF21 3'-UTR中具有互补的结合位点<sup>[11]</sup>。本研究探讨了*miR-149-5p*靶向FGF21在H9c2大鼠心肌细胞缺氧/复氧(hypoxia reoxygenation, H/R)损伤过程中的作用及调控机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** C56BL/6J雄性小鼠20只, SPF级, 体重18~22 g, 购自南华大学[实验动物生产许可证号: SCXK(湘)2020-0003]; 在明暗周期12 h、气温25 ℃、湿度60%的条件下饲养。本动物实验方案经南华大学附属第二医院实验动物管理委员会批准;

所有程序均按照中国实验动物护理协会发布的《实验动物护理和使用》进行。

### 1.2 材料、试剂与仪器

**1.2.1 主要材料与试剂** H9c2大鼠心肌细胞购自中国科学院上海生命科学院细胞库。*miR-149-5p* mimics/inhibitor及其阴性对照均购自广州锐博生物技术有限公司。PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成。MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(G020-1-1)和Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(G003-1-2)购自南京建成生物工程研究所。Anti-FGF21抗体(ab171941)、Anti-Bcl-2抗体(ab182858)、Anti-Bax抗体(ab32503)和Anti-Cleaved Caspase-3抗体(ab32042)均购自美国Abcam公司。

**1.2.2 实验仪器** CO<sub>2</sub>细胞培养箱购自美国Thermo公司; 流式细胞仪购自日本东京Nikon公司; 全自动酶标仪、电泳仪、凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad公司。

### 1.3 动物实验

**1.3.1 小鼠I/R模型的建立** 采用随机数字表法将小鼠分为假手术组和I/R组, 每组10只。根据文献[12]的方法, I/R组结扎左冠状动脉前降支(LAD)建立I/R小鼠模型。首先将小鼠麻醉, 然后在LAD周围放置6-0丝线活结, 30 min后松开活结, 使心脏再灌注, 诱导心脏I/R。假手术组小鼠实施相同的外科手术, 但仅穿线而不打结。在I/R诱导24 h后收集心脏组织检测*miR-149-5p*表达水平的变化。

**1.3.2 qRT-PCR检测I/R小鼠心脏组织中*miR-149-5p*的表达水平** 用Trizol法提取部分心脏组织的总

RNA, 使用Nanodrop检测RNA浓度及纯度, 然后使用反转录试剂盒合成cDNA, 进行qRT-PCR检测。使用Premier 5.0软件设计qRT-PCR引物(表1)。qRT-PCR反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 循环40次; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。以U6为内参基因。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列
miR-149-5p	正义: 5'-TCTGGCTCCGTGTCTTCACT-3'
	反义: 5'-TCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC-3'
U6	正义: 5'-TGGAACGCTTACGAATTTGCG-3'
	反义: 5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-3'

## 1.4 细胞实验

**1.4.1 细胞培养及心肌细胞H/R模型的建立** H9c2大鼠心肌细胞采用DMEM培养基(含10% FBS), 置于37 °C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。采用氧和葡萄糖缺失然后再灌注, 诱导H9c2细胞以体外模拟心肌I/R损伤<sup>[13]</sup>: 将H9c2细胞以3 × 10<sup>5</sup>个/孔的密度接种到35 mm培养板中, 并在DMEM完全培养基中培养24 h; 然后更换为不含血清和葡萄糖的DMEM培养基, 并放置于无氧培养箱(95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)的无氧室中, 于37 °C条件下继续培养10 h; 之后在含有10%FBS和4.5 mg/ml葡萄糖的培养基中有氧培养2 h, 将细胞转移至37 °C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养24 h。以始终在37 °C、5%CO<sub>2</sub>普通培养箱中使用DMEM正常培养基培养的H9c2细胞为对照组。

**1.4.2 双荧光素酶活性测定** 采用TargetScan软件分析并预测miR-149-5p在FGF21 3'-URT的结合位点。将含有miR-149-5p结合位点的野生型(WT)和突变型(MUT)FGF21 3'-URT基因序列插入荧光素酶报告基因的载体上, 构建相应的质粒载体, 然后将WT-FGF21、MUT-FGF21分别与miR-149-5p mimics、miR-149-5p NC共转染。48 h后收集细胞, 使用双荧光素酶检测试剂盒检测荧光强度。

**1.4.3 细胞转染及分组** 取培养至对数生长期的H9c2细胞, 将其分为对照组、H/R组、H/R+miR-149-5p NC组、H/R+miR-149-5p inhibitor组、H/R+miR-149-5p mimics组和H/R+miR-149-5p mimics+FGF21组。参照转染试剂盒说明书, 向H9c2细胞转染50 nmol的miR-149-5p mimics/inhibitor或阴性对照。H/R+miR-149-5p mimics+FGF21组细胞在转染50 nmol/L的miR-149-5p mimics后, 再加入1 μg/ml的FGF21<sup>[14]</sup>。转染6 h后, 更换成含10% FBS的DMEM继续培养。24 h后, 进行H/R模型处理,

收集H9c2细胞用于进一步分析。

**1.4.4 MTT法检测细胞活力** 将H9c2细胞以1 × 10<sup>4</sup>个/孔密度接种在96孔板中, 经1.4.3中方法转染和H/R处理后, 加入10 μl MTT溶液, 然后在37 °C条件下继续培养4 h。使用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度值, 作为细胞活力指标。

**1.4.5 ELISA法检测乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)的活性** 使用1.4.3中的方法将H9c2细胞进行转染及H/R处理后, 使用特异性酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒, 根据试剂盒说明书操作, 收集细胞上清液检测LDH和CK的活性。通过酶标仪在450 nm处测定吸光度值。

**1.4.6 流式细胞术检测H9c2细胞凋亡情况** 使用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒检测H9c2细胞凋亡情况。将H9c2细胞使用1.4.3中的方法进行转染及H/R处理, 然后在PBS中洗涤、收集细胞并离心。使用Annexin V-FITC结合缓冲液(195 μl)、Annexin V-FITC(5 μl)和碘化丙啶(PI)染色液(10 μl)在室温下染色20 min。通过流式细胞仪检测H9c2细胞凋亡情况。H9c2细胞凋亡率(%)=阳性染色的凋亡H9c2细胞数/H9c2细胞总数 × 100%。

**1.4.7 Western blotting测定Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3和FGF21表达水平** 根据1.4.3中方法处理H9c2细胞, 并使用RIPA裂解缓冲液将其裂解, 提取总蛋白并使用BCA法检测蛋白含量。SDS-PAGE电泳分离蛋白, 并转移到PVDF膜上。使用5%脱脂奶粉封闭1 h, 加入一抗(Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3、FGF21, 稀释倍数为1:1000), 在4 °C下孵育过夜。然后与以辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育1 h。使用ECL曝光显色, 并使用Image J软件进行蛋白定量。以β-actin为内参蛋白。

**1.5 统计学处理** 采用SPSS 22.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 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。

## 2 结 果

**2.1 I/R小鼠心脏组织中miR-149-5p的表达水平** qRT-PCR检测结果显示, 与假手术组比较, I/R组小鼠心脏组织中miR-149-5p表达水平明显升高(P<0.05, 图1)。

**2.2 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞活力的影响** MTT法检测结果显示, 与对照组比较, H/R组H9c2细胞活力显著降低(P<0.05)。与H/R组和H/R+miR-149-5p NC组相比, H/R+miR-149-5p inhibitor组H9c2细胞活力明显升高(P<0.05), H/R+miR-149-5p mimics组H9c2细胞活力明显降低(P<0.05, 图2)。

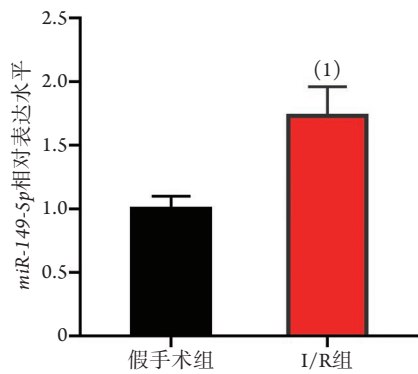


图1 I/R处理对小鼠心脏组织中miR-149-5p表达水平的影响

Fig.1 Effect of ischemia-reperfusion on level of miR-149-5p in cardiac tissue of mouse

I/R. 缺血再灌注; 与假手术组比较, (1) $P < 0.05$

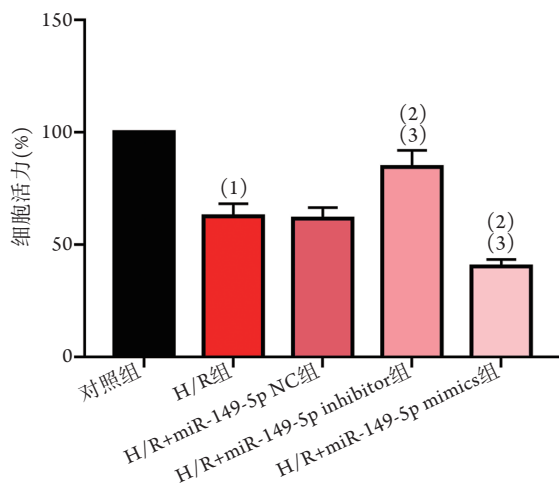


图2 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞活力的影响

Fig.2 Effect of miR-149-5p on cell viability of H9c2 rat's cardiomyocytes

H/R. 缺氧/复氧; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ ; 与H/R组比较, (2) $P < 0.05$ ; 与H/R+miR-149-5p NC组比较, (3) $P < 0.05$

**2.3 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞中LDH和CK活性的影响** ELISA检测结果显示, 与对照组比较, H/R组H9c2细胞中LDH和CK活性明显升高( $P < 0.05$ ); 与H/R组和H/R+miR-149-5p NC组比较, H/R+miR-149-5p inhibitor组H9c2细胞中LDH和CK活性明显降低( $P < 0.05$ ), H/R+miR-149-5p mimics组H9c2细胞中LDH和CK活性明显升高( $P < 0.05$ , 图3)。

**2.4 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞凋亡的影响**

流式细胞术检测结果显示, 与对照组比较, H/R组H9c2细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05$ )。与H/R组和H/R+miR-149-5p NC组比较, H/R+miR-149-5p inhibitor组H9c2细胞凋亡率明显降低( $P < 0.05$ ), H/R+miR-149-5p mimics组H9c2细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05$ , 图4)。

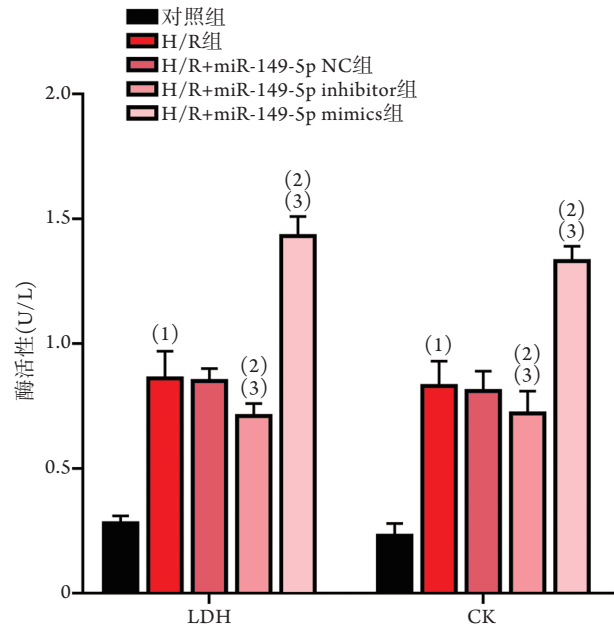


图3 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞中LDH和CK活性的影响

Fig.3 Effect of miR-149-5p on activity of LDH and CK in H9c2 rat's cardiomyocytes

H/R. 缺氧/复氧; LDH. 乳酸脱氢酶; CK. 肌酸激酶; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ ; 与H/R组比较, (2) $P < 0.05$ ; 与H/R+miR-149-5p NC组比较, (3) $P < 0.05$

**2.5 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞凋亡相关蛋白表达的影响** Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, H/R组H9c2细胞Bax、cleaved caspase-3蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ), Bcl-2蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。与H/R组和H/R+miR-149-5p NC组比较, H/R+miR-149-5p inhibitor组H9c2细胞Bax、cleaved caspase-3蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), Bcl-2蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ), H/R+miR-149-5p mimics组H9c2细胞Bax、cleaved caspase-3蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ), Bcl-2蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ , 图5)。

**2.6 miR-149-5p与FGF21结合位点的预测及验证** 生物信息学预测结果显示, FGF21的3' UTR序列上存在miR-149-5p的连续结合位点。双荧光素酶检测结果显示, 与miR-149-5p NC+FGF21 WT组比较, miR-149-5p mimics+FGF21 WT组荧光素酶活性明显降低( $P < 0.05$ ), miR-149-5p mimics+FGF21 MUT组和miR-149-5p NC+FGF21 MUT组荧光素酶活性无明显变化( $P > 0.05$ , 图6)。

**2.7 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞FGF21蛋白表达水平的影响** Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, H/R组H9c2细胞FGF21蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ); 与H/R组和H/R+miR-149-5p NC组比较, H/R+miR-149-5p inhibitor组H9c2细胞

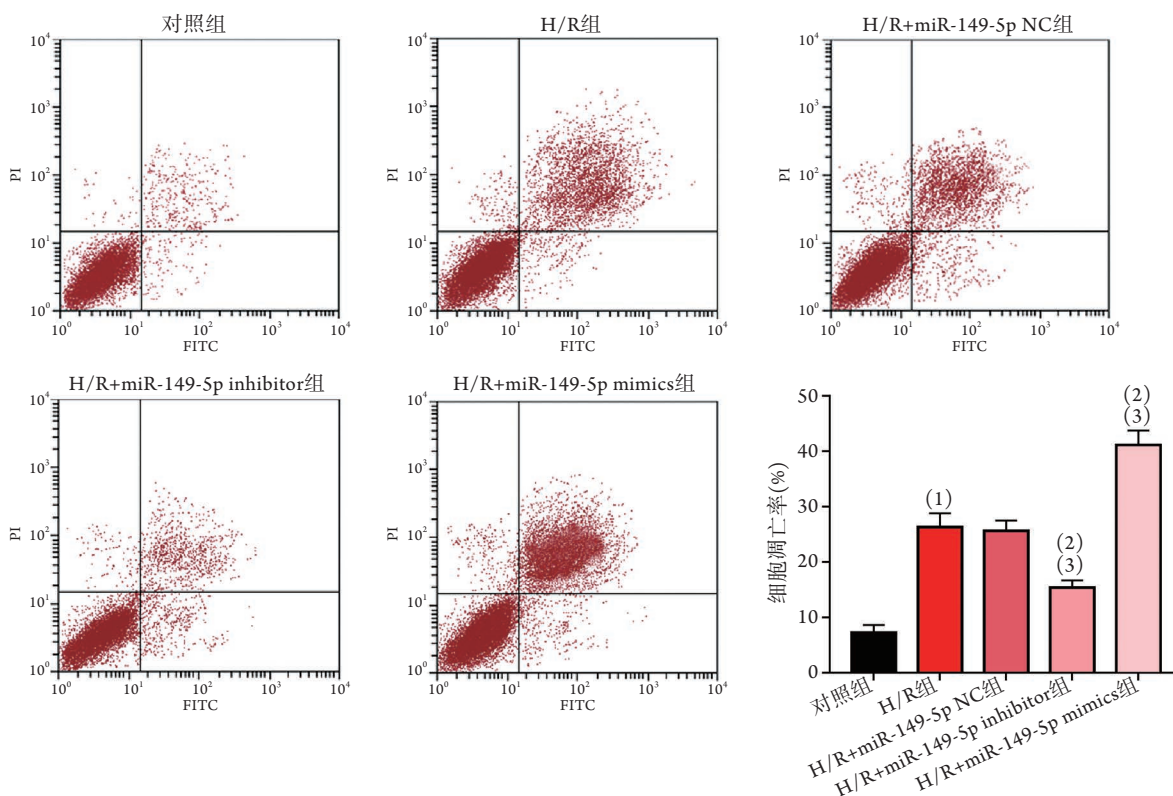


图4 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of miR-149-5p on apoptosis of H9c2 rat's cardiomyocytes

H/R. 缺氧/复氧; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ ; 与H/R组相比, (2) $P < 0.05$ ; 与H/R+miR-149-5p NC组比较, (3) $P < 0.05$

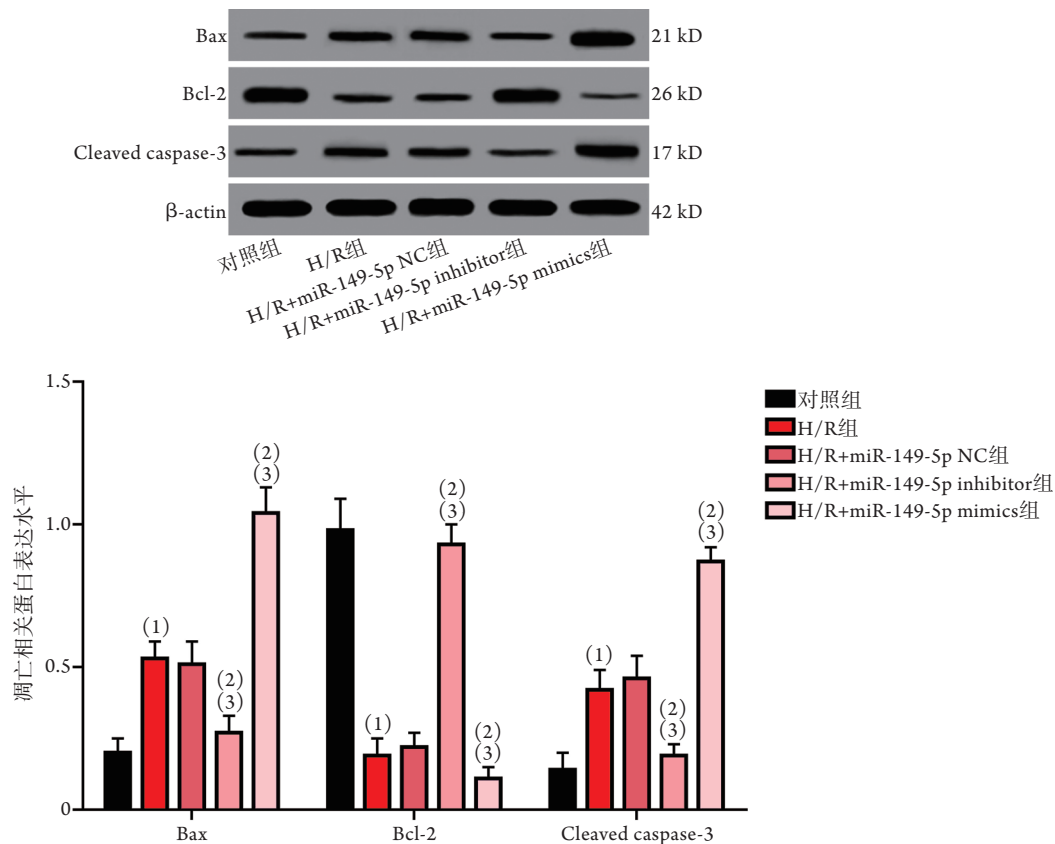


图5 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of miR-149-5p on expression of apoptosis-related proteins in H9c2 rat's cardiomyocytes(Western blotting)

H/R. 缺氧/复氧; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$ ; 与H/R组相比, (2) $P < 0.05$ ; 与H/R+miR-149-5p NC组比较, (3) $P < 0.05$

FGF21蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ ), H/R+miR-149-5p mimics组H9c2细胞FGF21蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ , 图7)。

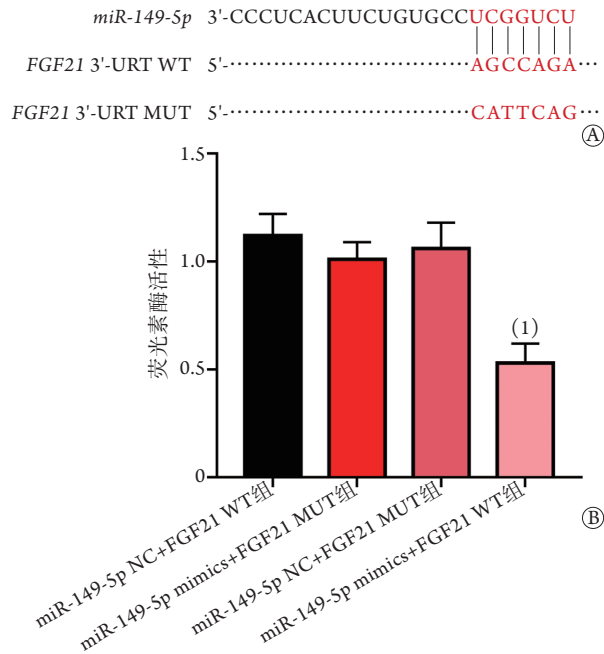


图6 miR-149-5p与FGF21 3' UTR的预测结合位点及双荧光素酶检测结果

**Fig.6** Prediction of binding sites on FGF21 3' UTR with miR-149-5p and the results of dual-luciferase reporter assay

WT. 野生型; MUT. 突变型; UTR. 非翻译区; A. 生物信息学预测的结合位点; B. 荧光素酶检测结果; 与miR-149-5p NC+FGF21 WT组比较, (1) $P<0.05$

**2.8** miR-149-5p通过FGF21对H9c2大鼠心肌细胞活力、凋亡的影响 与H/R+miR-149-5p mimics组比较, H/R+miR-149-5p mimics+FGF21组H9c2细胞活力明显升高( $59.38\% \pm 6.05\%$  vs.  $40.29\% \pm 3.12\%$ ,  $P<0.05$ ), 细胞凋亡率明显降低( $28.41\% \pm 1.29\%$  vs.  $41.09\% \pm 2.63\%$ ,  $P<0.05$ )。

**2.9** miR-149-5p通过FGF21对LDH和CK活性的影响 与H/R+miR-149-5p mimics组相比, H/R+miR-149-5p mimics+FGF21组H9c2细胞中LDH和CK活性明显降低( $P<0.05$ , 图8)。

### 3 讨论

缺血性心脏病的预防和治疗近年来取得了显著进步, 但仍保持较高的发病率和病死率。心肌I/R损伤是指心肌在缺血后恢复正常血流状态时, 缺血性心肌损伤加剧; 其主要表现包括心律不齐、心肌收缩功能障碍和不可逆的心肌再灌注损伤<sup>[15]</sup>。近年来, 随着溶栓治疗、经皮冠状动脉介入治疗、心血管系统手术和体外循环的广泛应用, 心肌I/R损伤的发生显著增多<sup>[16]</sup>。因此, 改善I/R损伤具有重要

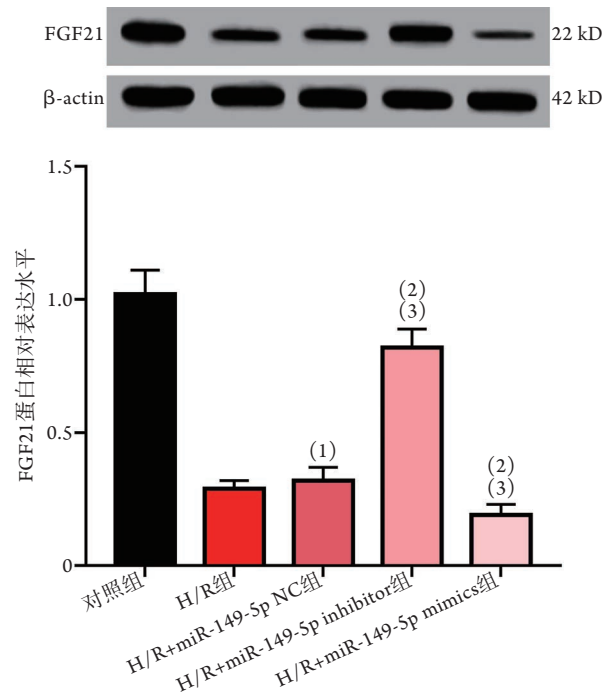


图7 miR-149-5p对H9c2大鼠心肌细胞FGF21蛋白表达的影响

**Fig.7** Effect of miR-149-5p on expression of FGF21 in H9c2 rat's cardiomyocytes (Western blotting)

H/R. 缺氧/复氧; 与对照组比较, (1) $P<0.05$ ; 与H/R组比较, (2) $P<0.05$ ; 与H/R+miR-149-5p NC组比较, (3) $P<0.05$

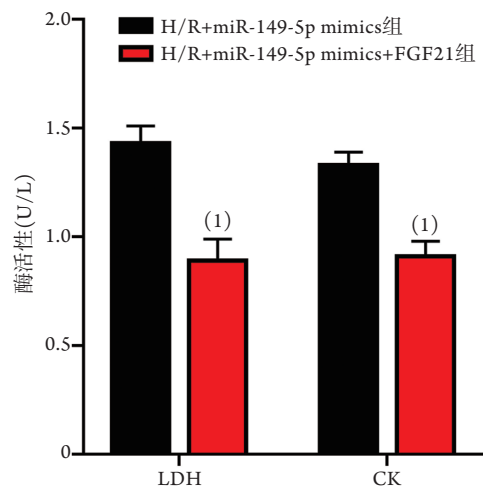


图8 miR-149-5p通过FGF21对H9c2大鼠心肌细胞中LDH和CK活性的影响

**Fig.8** Effect of miR-149-5p on activity of LDH and CK in H9c2 rat's cardiomyocytes through FGF21

H/R. 缺氧/复氧; LDH. 乳酸脱氢酶; CK. 肌酸激酶; 与H/R+miR-149-5p mimics组比较, (1) $P<0.05$

的临床意义。本研究建立了I/R小鼠体内模型和体外大鼠心肌细胞H/R模型, 观察了miR-149-5p在体外大鼠心肌细胞H/R模型中的作用, 以及miR-149-5p对FGF21的靶向调节作用。

miRNA是一组小的非编码单链RNA分子, 具有

18~25个核苷酸,通过限制mRNA的翻译和(或)通过与非翻译区(3'-UTR)互补碱基配对来促进mRNA降解,从而充当基因表达的负调节剂<sup>[17]</sup>。大量研究显示,内源性miRNA在转录和转录后水平对靶基因有较强的调控作用,且与多种疾病过程相关<sup>[18-19]</sup>。在心脏中,心脏I/R损伤期间一些miRNA表达失调,可将其视为这些心脏疾病潜在的关键调节剂或生物标志物<sup>[20]</sup>。例如,在心肌梗死的心脏组织中观察到miR-1以及miR-21和miR-133的表达失调。尽管miR-1在心脏I/R损伤中的作用仍不确定,但不可否认的是,miR-1与心肌I/R进程密切相关,且可能调节心脏损伤后的适应机制<sup>[21]</sup>。据报道,miR-149-5p可能成为缺血性卒中后血脑屏障破坏的潜在治疗靶点<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,I/R小鼠心脏组织中miR-149-5p表达水平明显上调,提示miR-149-5p可能在心脏I/R损伤中发挥重要作用。H9c2大鼠心肌细胞经miR-149-5p inhibitor处理后,细胞活力得到明显恢复,细胞凋亡明显减少。另外,CK和LDH水平是评价心肌细胞损伤和细胞膜完整性的敏感指标<sup>[23]</sup>,这两种酶可在H/R诱导的细胞膜损伤时渗出细胞。因此,在miR-149-5p下调后,细胞上清液中CK和LDH释放减少,提示调控miRNA在小鼠体内和体外均可能发挥心脏保护作用。上述结果可能为心肌I/R损伤相关基因治疗提供新的线索。

尽管介导心肌I/R损伤的分子机制尚不清楚,但细胞凋亡的激活在病理学中起着重要作用<sup>[24]</sup>。凋亡是程序性细胞死亡的过程,在心肌I/R损伤的情况下,心肌细胞凋亡会导致心肌细胞容量降低和随后的心脏舒张与收缩功能障碍<sup>[25]</sup>。另外,急性心肌梗死后症状性心力衰竭的发病率与心肌细胞凋亡增加呈正相关<sup>[26]</sup>。因此,研究减轻H/R诱导心肌细胞凋亡的方法在对抗心肌I/R损伤方面具有一定的临床意义。本研究结果显示,H/R损伤的H9c2大鼠心肌细胞中,miR-149-5p表达水平上调且细胞凋亡率升高,提示miR-149-5p上调可能与H9c2细胞凋亡增强有关。Caspase-3是细胞凋亡过程中重要的蛋白酶。Bcl-2家族的Bcl-2和Bax是目前已知的重要的细胞凋亡调控因子,可作用于下游的caspase-3。Bcl-2和Bax在细胞凋亡转导过程中相互关联并相互制约<sup>[27]</sup>。本研究结果显示,miR-149-5p过表达可加剧H/R诱导的细胞凋亡,使Bax和cleaved caspase-3蛋白表达水平升高,Bcl-2蛋白表达水平降低;相反,抑制miR-149-5p可抑制H/R诱导的细胞凋亡,且Bax和cleaved caspase-3蛋白表达水平降低,Bcl-2蛋白表达水平升高。上述结果提示,miR-149-5p可在H/R刺激的心肌细胞中发挥促凋亡作用。

FGF21是一种内分泌因子,主要在脂肪和肝组

织中表达,也在其他组织如心肌中表达<sup>[11]</sup>。有研究显示,FGF21可显著减轻I/R后大鼠心肌梗死,减少H/R诱导的H9c2大鼠心肌细胞凋亡<sup>[28]</sup>。Zhang等<sup>[29]</sup>报道,FGF21可通过激活ERK1/2-p38 MAPK-AMPK途径来预防脂质或糖尿病引起的心肌细胞凋亡。在本研究中,采用miR-149-5p抑制剂处理H/R损伤的H9c2细胞后,FGF21蛋白表达水平升高,细胞凋亡率降低,提示FGF21可抑制H9c2细胞凋亡。生物信息学预测和双荧光素酶鉴定结果显示,FGF21可能是miR-149-5p的靶向位点。另外,H/R损伤的H9c2细胞经miR-149-5p mimics和FGF21共同处理后,各项指标均比miR-149-5p mimics单独处理有所改善。因此我们推测,miR-149-5p可通过调节FGF21影响H/R损伤后的心肌细胞凋亡。

总之,本研究结果显示,miR-149-5p可直接靶向FGF21,负向调控其表达,促进H/R处理的H9c2大鼠心肌细胞活力下降、凋亡增加;而抑制miR-149-5p表达可上调FGF21水平,促进H9c2细胞活力恢复、凋亡减少。上述研究结果可为I/R损伤提供潜在的治疗靶点,但本研究主要围绕细胞水平开展,且尚未对miR-149-5p在I/R小鼠中的具体调控机制进行验证;miR-149-5p对心脏I/R损伤的作用机制有待进一步深入研究。

#### 【参考文献】

- [1] Meng H, Wang QY, Li N, *et al.* Danqi tablet regulates energy metabolism in ischemic heart rat model through AMPK/SIRT1-PGC-1 $\alpha$  Pathway[J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(8): 597-603.
- [2] Peng M, Liu Y, Zhang XQ, *et al.* CTRP5-overexpression attenuated ischemia-reperfusion associated heart injuries and improved infarction induced heart failure[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11(1): 1-10.
- [3] Jiang L, Yin X, Chen YH, *et al.* Proteomic analysis reveals ginsenoside Rb1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ROS production from mitochondrial complex I[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1703-1720.
- [4] Han LM, Luo XH, Zhao HL. Research progress on mechanism of autophagy regulatory factor mTOR in myocardial ischemiareperfusion injury[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(11): 1161-1166. [韩利民, 罗小红, 赵海龙. 自噬调控因子mTOR对心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(11): 1161-1166.]
- [5] Lv XW, He ZF, Zhu PP, *et al.* miR-451-3p alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting MAP1LC3B-mediated autophagy[J]. *Inflamm Res*, 2021, 70(10-12): 1089-1100.
- [6] Ouyang C, Huang L, Ye X, *et al.* Overexpression of miR-1298 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting PP2A[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2022, 53(1): 136-148.
- [7] Li K, Zhou P, Li S, *et al.* MicroRNA-29b reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in rats *via* down-regulating PTEN and activating the Akt/eNOS signaling pathway[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2022, 53(1): 123-135.
- [8] Yan Z, Deng Y, Zou Y, *et al.* Analysis of regulatory effect of miR-

- 149-5p on Sphingosine-1-phosphate receptor 2 of pericytes and its neuroprotective molecular mechanism after acute cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 3348-3357.
- [9] Ma H, Chen P, Sang C, *et al.* Modulation of apoptosis-related microRNAs following myocardial infarction in fat-1 transgenic mice vs wild-type mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(11): 5698-5707.
- [10] Zhang Y, Liu D, Long XX, *et al.* The role of FGF21 in the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(24): 2931-2943.
- [11] Chen S, Chen D, Yang H, *et al.* Uric acid induced hepatocytes lipid accumulation through regulation of miR-149-5p/FGF21 axis[J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20(1): 1-9.
- [12] Reichert K, Colantuono B, McCormack I, *et al.* Murine left anterior descending(LAD) coronary artery ligation: an improved and simplified model for myocardial infarction[J]. *J Vis Exp*, 2017(122): 55353.
- [13] Zhang S, Zhang R, Wu F, *et al.* MicroRNA-208a regulates H9c2 cells simulated ischemia-reperfusion myocardial injury *via* targeting CHD9 through Notch/NF-kappa B signal pathways[J]. *Int Heart J*, 2018, 59(3): 580-588.
- [14] 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.
- [15] Xu S, Wu B, Zhong B, *et al.* Naringenin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2)/System xc-/glutathione peroxidase 4 (GPX4) axis to inhibit ferroptosis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 10924-10934.
- [16] Wu Y, Liu H, Wang X. Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2021, 264(1): 1-10.
- [17] Liu W, Miao Y, Zhang L, *et al.* MiR-211 protects cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting cell apoptosis[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 189-200.
- [18] Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 1-23.
- [19] Pan YQ, Sun YY, Li YX, *et al.* Construction and analysis of competitive endogenous RNA networks in acute myeloid leukemia based on high-throughput microarray[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2021, 47(3): 669-676. [潘玉卿, 孙运艳, 李轶勋, 等. 基于高通量芯片对急性髓系白血病竞争内源性RNA网络的构建和分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2021, 47(3): 669-676.]
- [20] Colpaert RMW, Calore M. Epigenetics and microRNAs in cardiovascular diseases[J]. *Genomics*, 2021, 113(2): 540-551.
- [21] Kura B, Kalocayova B, Devaux Y, *et al.* Potential clinical implications of miR-1 and miR-21 in heart disease and cardioprotection[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1-30.
- [22] Wan Y, Jin HJ, Zhu YY, *et al.* MicroRNA-149-5p regulates blood-brain barrier permeability after transient middle cerebral artery occlusion in rats by targeting S1PR2 of pericytes[J]. *FASEB J*, 2018, 32(6): 3133-3148.
- [23] Wu J, Cai W, Du R, *et al.* Sevoflurane alleviates myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting P2X7-NLRP3 mediated pyroptosis[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8(1): 1-17.
- [24] Wang ZK, Li JH, Li W, *et al.* Protective effect and mechanism of puerarin on myocardial ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Clin J Med Offic*, 2020, 48(5): 528-531, 535. [王子宽, 李菁华, 李炜, 等. 葛根素在大鼠心肌缺血再灌注损伤中保护作用及机制研究[J]. *临床军医杂志*, 2020, 48(5): 528-531, 535.]
- [25] Li QH, Ge ZW, Xiang Y, *et al.* Upregulation of microRNA-34a enhances myocardial ischemia-reperfusion injury *via* the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Free Radic Res*, 2022, 56(3-4): 229-244.
- [26] Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Bussani R, *et al.* Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(5): 753-760.
- [27] Zhang S, Du X, Zhang K, *et al.* Effects of sevoflurane on apoptosis of myocardial cells in IRI rats[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021(1): 1-6.
- [28] 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.
- [29] Zhang C, Huang Z, Gu J, *et al.* Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model *via* extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway[J]. *Diabetologia*, 2015, 58(8): 1937-1948.

(责任编辑: 蒋铭敏)