

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research阿巴西普基于 Notch1/HIF-1 α 通路介导
miR-16-5p 对急性心肌梗死大鼠心功能的研究Research of abasiximab-mediated *miR-16-5p* in rats with acute myocardial infarction based on the Notch1/HIF-1 α signaling pathway李银萍¹, 徐清斌¹, 张世昌¹,
马萌雪¹, 赵文丽²(1. 宁夏医科大学总医院 心脑血管病医院
心内科, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏医科大学
总医院 心内科, 宁夏 银川 750001)LI Yin-ping¹, XU Qing-bin¹,
ZHANG Shi-chang¹,
MA Meng-xue¹,
ZHAO Wen-li²(1. Department of Cardiology,
Cardiovascular and Cerebrovascular
Disease Hospital, Ningxia Medical
University General Hospital, Yinchuan
750004, Ningxia Province, China;
2. Department of Cardiology, General
Hospital of Ningxia Medical University,
Yinchuan 750001, Ningxia Province,
China)作者简介: 李银萍(1983-), 女, 主治医师, 主
要从事心血管疾病相关的临床工作
和研究通信作者: 赵文丽, 副主任医师
MP: 17395073626

E-mail: zhaowenli20120318@163.com

摘要:目的 基于神经源性基因 Notch 同源蛋白 1 (Notch1)/缺氧诱导因子 1 亚基 α (HIF-1 α) 信号通路, 研究阿巴西普 (ABT) 介导微小核糖核酸-16-5p (*miR-16-5p*) 对急性心肌梗死 (AMI) 大鼠的作用及其机制。方法 用左冠状动脉前支结扎法建立 AMI 大鼠模型。将 50 只大鼠随机分为假手术组 (开胸后不进行结扎)、模型组、实验组 (ABT 5 mg · kg⁻¹)、*miR-16-5p* 阴性实验组 (尾静脉注射腺病毒包被的 NC-mimic) 和 *miR-16-5p* 阳性实验组 (尾静脉注射腺病毒包被的 *miR-16-5p* mimic), 每组 10 只。用超声法检测各组大鼠的心功能指标; 用荧光原位杂交法检测大鼠心肌组织中 *miR-16-5p* 相对表达水平; 用酶联免疫吸附试验法检测各组大鼠血清乳酸脱氢酶、肌酸激酶含量、心肌组织中炎症因子及氧化应激因子水平; 用免疫荧光法检测各组大鼠心肌组织中 Notch1 和 HIF-1 α 蛋白表达。结果 假手术组、模型组、实验组的左室射血分数 (EF) 分别为 (64.72 ± 6.15)%、(42.70 ± 5.26)% 和 (59.51 ± 6.61)%; *miR-16-5p* 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.11、2.53 ± 0.33 和 1.37 ± 0.19; 假手术组、模型组、实验组、*miR-16-5p* 阴性实验组、*miR-16-5p* 阳性实验组乳酸脱氢酶 (LDH) 分别为 (154.64 ± 27.48)、(347.14 ± 48.67)、(173.42 ± 28.45)、(179.75 ± 29.83) 和 (336.47 ± 41.35) IU · L⁻¹; 肌酸激酶 (CPK) 分别为 (161.37 ± 29.14)、(425.43 ± 52.34)、(201.67 ± 31.23)、(197.74 ± 30.48) 和 (413.46 ± 49.78) IU · L⁻¹; 心肌组织白介素-1 β (IL-1 β) 分别为 (35.48 ± 6.93)、(129.64 ± 19.51)、(52.52 ± 8.48)、(51.62 ± 7.32) 和 (118.42 ± 19.51) pg · mg⁻¹ prot; 心肌组织超氧化物歧化酶分别为 (83.45 ± 13.42)、(34.54 ± 5.61)、(76.63 ± 15.63)、(75.87 ± 14.23) 和 (41.75 ± 5.92) U · mg⁻¹ prot; Notch1 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.16、1.86 ± 0.22、1.36 ± 0.19、1.29 ± 0.25 和 1.71 ± 0.28; HIF-1 α 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.13、2.41 ± 0.37、1.64 ± 0.24、1.57 ± 0.29 和 2.10 ± 0.38; 假手术组与模型组相比、模型组与实验组相比、*miR-16-5p* 阴性实验组与 *miR-16-5p* 阳性实验组相比, 以上指标在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 ABT 可能通过介导 *miR-16-5p* 表达调控 Notch1/HIF-1 α 信号通路来保护 AMI 大鼠心功能, 改善其心肌组织病理损伤和纤维化, 减轻氧化应激反应与炎症反应。

关键词: 阿巴西普; 急性心肌梗死; 微小核糖核酸-16-5p; 神经源性基因 Notch 同源蛋白 1; 缺氧诱导因子 1 亚基 α

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.02.009

中图分类号: R541 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)02-0204-07

Abstract: Objective To investigate the effects of abatacept (ABT)-mediated micro ribonucleic acid-16-5p (*miR-16-5p*) in rats with acute myocardial infarction (AMI) based on the neurogenic locus

notch homolog protein 1 (Notch1)/hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) signaling pathway. **Methods** AMI rat model was established using the left anterior descending coronary artery ligation method. A total of 50 rats were randomly divided into the sham-operation group (thoracotomy without ligation), model group, experimental group (5 mg·kg⁻¹ ABT), Ad-scramble group (tail vein injection of adenovirus-coated NC-mimic) and Ad-miR-16-5p group (tail vein injection of adenovirus-coated miR-16-5p mimic), with 10 rats in each group. Cardiac function indicators in each group were detected by echocardiography. Fluorescence *in situ* hybridization was used to detect miR-16-5p relative expression levels in rat myocardial tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum lactate dehydrogenase and creatine phosphohykinase levels, as well as inflammatory factor and oxidative stress factor levels in myocardial tissue. Immunofluorescence was used to detect Notch1 and HIF-1 α protein expression in rat myocardial tissue. **Results** The left ventricular ejection fractions (EF) in the sham-operation group, model group and experimental group were (64.72 ± 6.15)%, (42.70 ± 5.26)% and (59.51 ± 6.61)%, respectively; the relative fluorescence intensities of miR-16-5p were 1.00 ± 0.11, 2.53 ± 0.33 and 1.37 ± 0.19, respectively; the lactate dehydrogenase (LDH) levels in the sham-operation group, model group, experimental group, Ad-scramble group and Ad-miR-16-5p group were (154.64 ± 27.48), (347.14 ± 48.67), (173.42 ± 28.45), (179.75 ± 29.83) and (336.47 ± 41.35) IU·L⁻¹, respectively; the creatine phosphohykinase (CPK) levels were (161.37 ± 29.14), (425.43 ± 52.34), (201.67 ± 31.23), (197.74 ± 30.48) and (413.46 ± 49.78) IU·L⁻¹, respectively; the interleukin-1 β (IL-1 β) levels in myocardial tissue were (35.48 ± 6.93), (129.64 ± 19.51), (52.52 ± 8.48), (51.62 ± 7.32) and (118.42 ± 19.51) pg·mg⁻¹ prot, respectively; the superoxide dismutase levels in myocardial tissue were (83.45 ± 13.42), (34.54 ± 5.61), (76.63 ± 15.63), (75.87 ± 14.23) and (41.75 ± 5.92) U·mg⁻¹ prot, respectively; the relative fluorescence intensities of Notch1 were 1.00 ± 0.16, 1.86 ± 0.22, 1.36 ± 0.19, 1.29 ± 0.25 and 1.71 ± 0.28, respectively; the relative fluorescence intensities of HIF-1 α were 1.00 ± 0.13, 2.41 ± 0.37, 1.64 ± 0.24, 1.57 ± 0.29 and 2.10 ± 0.38, respectively; the above indicators showed statistically significant differences between the sham-operation group and the model group, between the model group and the experimental group, and between the Ad-scramble group and the Ad-miR-16-5p group ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** ABT may protect cardiac function in AMI rats, improve myocardial tissue pathological damage and fibrosis, and reduce oxidative stress and inflammatory responses by mediating miR-16-5p expression to regulate the Notch1/HIF-1 α signaling pathway.

Key words: abatacept; acute myocardial infarction; micro ribonucleic acid-16-5p; neurogenic locus notch homolog protein1; hypoxia inducible factor1 α

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)属于临床常见的一种心血管疾病,患者常出现胸痛、呼吸困难、缺氧、恶心等症状,严重者可以出现死亡^[1-2]。临床治疗 AMI 以介入手术及药物治疗为主,虽能缓解症状,但整体疗效有限^[3]。阿巴西普(abatacept, ABT)属于重组细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 与免疫球蛋白 G1 的 Fc 部分的融合蛋白,可以降低类风湿关节炎患者发生心血管疾病的风险^[4]。微小核糖核酸-16-5p(micro ribonucleic acid-16-5p, miR-16-5p)在缺血性扩张型心肌病中表达上调,具有保护心脏免受内质网和氧化应激诱导损伤的潜力^[5]。神经源性基因 Notch 同源蛋白 1(neurogenic locus notch homolog protein1, Notch1)通路参与心血管疾病进程。缺氧诱导因子 1 亚基 α (hypoxia inducible

factor1 α , HIF-1 α)具有心肌保护功能。但目前,关于 ABT、miR-16-5p 与 Notch1/HIF-1 α 通路的相互作用及其机制仍需进一步研究。因此,本研究旨在基于 Notch1/HIF-1 α 信号通路,探讨 ABT 介导 miR-16-5p 表达对 AMI 大鼠的影响,以期为 AMI 的临床治疗提供实验支持。

材料与方法

1 材料

动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,鼠龄 7 周,体重为 200~250 g,由甘肃中医药大学提供。动物生产许可证号:SCXK(甘)2021-0001,动物使用许可证号:SYXK(甘)2021-0004。本实验经宁夏医科大

学总医院动物伦理委员会批准,伦理批号:科审S2024(062)。

药品与试剂 ABT,规格:每支5 mg,纯度:≥99.0%,批号:97222、异氟烷,规格:每瓶500 mg,纯度:≥98.0%,批号:85307,均由美国 MedChemExpress 公司生产;兔抗大鼠 Notch1,英国 Biorbyt 公司生产;兔抗大鼠 HIF-1 α 、Alexa Fluor[®]488 荧光标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G、Alexa Fluor[®]594 荧光标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G,均由英国 Abcam 公司生产;MolPure[®] TRleasy[™] 总 RNA 提取试剂盒,翌圣生物科技(上海)股份有限公司生产;白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、肌酸激酶(creatine phosphohykinase, CPK)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,均由上海烜雅生物科技有限公司生产;cDNA 第一链合成试剂盒,优利科(上海)生命科学有限公司生产;苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)试剂盒,江苏南京森贝伽生物科技有限公司生产;马松染色试剂盒,上海沪震实业有限公司生产;探针、引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成;miR-16-5p 模拟物(miR-16-5p mimic)及阴性对照(NC-mimic),均由上海吉玛制药有限公司提供。

仪器 HELX S2000 彩色多普勒超声仪,德国 Siemens 公司产品;Mini8 Plus 实时荧光定量 PCR 仪,北京卡尤迪生物科技股份有限公司产品;TI-DH611624 荧光倒置显微镜,日本 Nikon 公司产品;VECG-2303B 心电图机,广东省广州市三锐电子科技有限公司产品。

2 实验方法

2.1 模型建立^[6]

用左冠状动脉前支结扎法建立 AMI 大鼠模型,取 SD 大鼠通过吸入方式给予异氟烷实施麻醉,将其仰卧固定于操作板上,随后进行气管插管操作,连接小动物呼吸机辅助呼吸,接着对胸部进行脱毛、消毒后切开暴露心脏,在明确左冠状动脉前降支位置后予以结扎处理,观察到大鼠左心室前壁变苍白且心电图显示 ST 段抬高,则提示 AMI 大鼠模型成功建立,再缝合伤口消毒。

2.2 动物分组与处理方法

将 50 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、实验组、miR-16-5p 阴性实验组和 miR-16-5p 阳性实验组,每组 10 只。假手术组在开胸后不进行结扎;实验组对造模后的大鼠皮下注射 5 mg·kg⁻¹ ABT,连

续 21 d,每天 1 次;miR-16-5p 阴性实验组在造模前 48 h,尾静脉注射腺病毒包被的 NC-mimic,后续操作与实验组相同;miR-16-5p 阳性实验组在造模前 48 h,尾静脉注射腺病毒包被的 miR-16-5p mimic,后续操作与实验组相同;假手术组、模型组灌胃等体积生理盐水。

2.3 超声法检测心功能指标

麻醉大鼠后取仰卧位,用彩色多普勒超声仪超声检测各组大鼠左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVDS)、左室射血分数(ejection fractions, EF)和左室舒张末期内径(left ventricular end diastolic dimension, LVDD)。

2.4 实时荧光定量-聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)法检测 miR-16-5p、Notch1 和 HIF-1 α 表达^[7]

提取各组大鼠心肌组织中的总 RNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,并扩增,以核小 RNA-U6 (small nuclear RNA-U6, U6)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内部对照,用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算 miR-16-5p、Notch1 和 HIF-1 α 相对表达水平。引物序列如下,miR-16-5p:正向 5'-TGGGGTAGCAGCAGCGTAAA-3',反向 5'-CTCAACTGGTGTCTGAGAGTC-3';Notch1:正向 5'-CGTGAACGTCCGATCCCC-3',反向 5'-TGGGAGCATCTCAAGCCTCT-3';HIF-1 α :正向 5'-GTAGTGCTGATCCCTGCACTGAATC-3',反向 5'-CTGGGACTGTTAGGCTCAGGTG-3';U6:正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向 5'-CTCAACTGTGTCTGCTGGA-3';GAPDH:正向 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3',反向 5'-AAAGGTGGAGGAGTGGGTGT-3'。

2.5 荧光原位杂交法检测大鼠心肌组织中 miR-16-5p 表达^[8]

取各组大鼠心肌组织,固定后切片脱蜡至水,加入蛋白酶 K,在 37℃ 孵育 20 min,洗涤,加入预杂交液,在 37℃ 孵育 8 min,再加入含 miR-16-5p 探针的杂交液,在 37℃ 封闭过夜。洗去杂交液,用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶进行核染,封片,用荧光显微镜观察。miR-16-5p 探针序列:5'-DIG-UAUUUAUUUCACUACGCCAA-DIG-3'。

2.6 ELISA 法检测各组大鼠血清中 LDH、CPK 含量及血清和心肌组织中炎症因子及氧化应激因子水平^[8]

于末次给药 1 h 后,对各组大鼠进行颈总动脉采

血,在4℃下以 $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,获取上清液。严格按照相应试剂盒说明书分别检测血清中LDH、CPK、IL-1 β 、IL-6、SOD和MDA水平。取心肌组织加入磷酸盐缓冲液后研磨成匀浆,在4℃下以 $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min收集上清液,严格按照相应试剂盒说明书检测心肌组织中IL-1 β 、IL-6、SOD和MDA水平。

2.7 免疫荧光法检测各组大鼠心肌组织中 Notch1 和 HIF-1 α 蛋白的表达水平^[7]

取各组大鼠心肌组织进行切片脱蜡至水,经抗原修复、封闭处理,加入按1:2 000比例稀释的Notch1和HIF-1 α 抗体,4℃过夜,洗涤,加入按1:2 000比例稀释的荧光二抗,37℃孵育1 h,用4',6-二脒基-2-苯基吲哚进行核染、封片,用荧光显微镜观察。

2.8 HE染色法和马松染色法观察心肌组织病理学变化及纤维化病变情况^[8]

取各组大鼠心肌组织加入4%甲醛固定24 h,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋、切片脱蜡后,分别进行HE和马松染色,中性树脂封片,用显微镜观察心肌组织病理学变化及纤维化病变情况。用Image J软件定量心肌组织马松染色切片图像中视野面积和胶原纤维占用面积,进而得出心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF), $\text{CVF} = \text{视野中胶原纤维面积} / \text{切片视野总面积} \times 100\%$ 。

3 统计学处理

用SPSS 26.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 ABT对AMI模型大鼠心肌组织病理损伤和纤维化的影响

假手术组:开胸后不进行结扎;模型组:左冠状动

脉前支结扎法建立AMI大鼠模型;实验组:对造模后的大鼠皮下注射 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ABT,连续21 d,每天1次;miR-16-5p阴性实验组:在造模前48 h,尾静脉注射腺病毒包被的NC-mimic,后续操作与实验组相同;miR-16-5p阳性实验组:在造模前48 h,尾静脉注射腺病毒包被的miR-16-5p mimic,后续操作与实验组相同。假手术组、模型组灌胃等体积生理盐水。

HE染色显示:假手术组大鼠心肌组织结构和形态正常,无病理损伤。与假手术组相比,模型组大鼠心肌组织病理损伤严重,心肌纤维断裂、扭曲且排列紊乱,部分心肌细胞存在变性、溶解或坏死现象,伴有大量炎症细胞浸润。与模型组相比,实验组大鼠心肌组织病理损伤和纤维化程度明显减轻,未见炎症浸润。

马松染色显示:假手术组心肌组织中蓝色胶原纤维较少,相比假手术组,模型组明显增多,与模型组相比,实验组明显减少,见图1。与假手术组相比,模型组心肌CVF显著升高,与模型组相比,实验组心肌CVF显著降低(均 $P < 0.001$),见表1。

2 ABT对AMI模型大鼠心功能的影响

相较于假手术组,模型组大鼠的LVDD和LVDS均显著升高,EF显著降低(均 $P < 0.001$);相较于模型组,实验组大鼠的LVDD和LVDS均显著降低,EF显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$),见表2。

表1 各组大鼠心肌胶原容积分数的比较(CVF)($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of myocardial collagen volume fraction (CVF) in rats of all groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	CVF(%)
Sham-operation	10	4.24 ± 0.78
Model	10	$31.45 \pm 5.92^{***}$
Experimental	10	$15.95 \pm 2.87^{\Delta\Delta\Delta}$

CVF: Collagen volume fraction; Compared to sham-operation group,

*** $P < 0.001$; Compared to model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

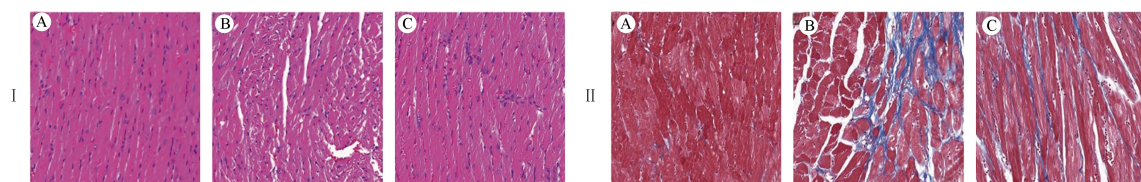


图1 阿巴西普(ABT)对急性心肌梗死(AMI)模型大鼠心肌组织病理损伤和纤维化的影响($\times 200$)

Figure 1 Effects of abatacept (ABT) on myocardial histopathological damage and fibrosis in an acute myocardial infarction (AMI) model in rats ($\times 200$)

Sham-operation group: Thoracotomy without ligation; Model group: AMI rat model established by left anterior descending coronary artery ligation; Experimental group: After modeling, subcutaneous injection of $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ABT; I: Hematoxylin-eosin (HE) staining detected the degree of myocardial tissue injury in rats from each group; II: Masson staining verified the degree of myocardial tissue fibrosis in rats from each group; A: Sham-operation group; B: Model group; C: Experimental group.

3 ABT 对 AMI 模型大鼠心肌组织中 *miR-16-5p* 表达水平的影响

相较于假手术组,模型组大鼠心肌组织中 *miR-16-5p* 相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$);相较于模型组,实验组大鼠心肌组织中 *miR-16-5p* 相对表达水平显著降低 ($P < 0.001$),见表3。

4 ABT 通过 *miR-16-5p* 对 AMI 模型大鼠血清中 LDH 和 CPK 含量的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清中的 LDH 和 CPK 含量均显著升高 (均 $P < 0.001$);与模型组相比,实验组大鼠上述指标均显著降低 (均 $P < 0.001$);与实验组相比,*miR-16-5p* 阴性实验组大鼠上述指标在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$);与 *miR-16-5p* 阴性实验组相比,*miR-16-5p* 阳性实验组大鼠上述指标均显著升高 (均 $P < 0.001$),见表4。

5 ABT 通过 *miR-16-5p* 对各组大鼠血清及心肌组织中炎症因子的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清及心肌组织中 IL-1 β 和 IL-6 水平均显著升高 (均 $P < 0.001$);与模型组相比,实验组大鼠上述指标均显著降低 (均 $P < 0.001$);与实验组相比,*miR-16-5p* 阴性实验组大鼠上述指标在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$);与 *miR-16-5p* 阴性实验组相比,*miR-16-5p* 阳性实验组大鼠上述指标均显著升高 (均 $P < 0.001$),见表5。

表3 各组大鼠心肌组织中 *miR-16-5p* 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the relative expression levels of *miR-16-5p* in the myocardial tissue of each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	<i>miR-16-5p</i>	Relative fluorescence intensity of <i>miR-16-5p</i>
Sham-operation	10	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.11
Model	10	2.04 $\pm$ 0.39 ***	2.53 $\pm$ 0.33 ***
Experimental	10	1.16 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta\Delta$	1.37 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta\Delta$

Compared to sham-operation group, *** $P < 0.001$; Compared to model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

表2 各组大鼠心功能指标左室舒张末期径(LVDD)、左室收缩末期径(LVDS)和左室射血分数(EF)的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of left ventricular end diastolic dimension (LVDD), left ventricular end-systolic diameter (LVDS) and left ventricular ejection fraction (EF) in rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	LVDD (mm)	LVDS (mm)	EF (%)
Sham-operation	10	18.37 $\pm$ 2.06	10.59 $\pm$ 1.89	64.72 $\pm$ 6.15
Model	10	26.31 $\pm$ 3.50 ***	17.72 $\pm$ 2.12 ***	42.70 $\pm$ 5.26 ***
Experimental	10	21.01 $\pm$ 2.82 $\Delta\Delta$	12.88 $\pm$ 1.83 $\Delta\Delta\Delta$	59.51 $\pm$ 6.61 $\Delta\Delta\Delta$

Compared to sham-operation group, *** $P < 0.001$; Compared to model group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

6 ABT 通过 *miR-16-5p* 对各组大鼠血清及心肌组织中氧化应激因子的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清及心肌组织中 SOD 水平均显著降低,MDA 水平均显著升高 (均 $P < 0.001$);与模型组相比,实验组大鼠血清及心肌组织中 SOD 水平均显著升高,MDA 水平均显著降低 (均 $P < 0.001$);与实验组相比,*miR-16-5p* 阴性实验组大鼠上述指标在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$);与 *miR-16-5p* 阴性实验组相比,*miR-16-5p* 阳性实验组大鼠血清及心肌组织中 SOD 水平均显著降低,MDA 水平均显著升高 (均 $P < 0.001$),见表6。

7 ABT 通过 *miR-16-5p* 对各组大鼠心肌组织 Notch1/HIF-1 α 相关蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠心肌组织中 Notch1 和 HIF-1 α mRNA 及蛋白相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$);与模型组相比,实验组大鼠上述指标均显著降低 (均 $P < 0.001$);与实验组相比,*miR-16-5p* 阴性实验组大鼠上述指标在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$);与 *miR-16-5p* 阴性实验组相比,*miR-16-5p* 阳性实验组大鼠上述指标均显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$),见表7。

表4 各组大鼠血清中乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CPK)含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphohykinase (CPK) levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	LDH (IU $\cdot$ L ⁻¹)	CPK (IU $\cdot$ L ⁻¹)
Sham-operation	10	154.64 $\pm$ 27.48	161.37 $\pm$ 29.14
Model	10	347.14 $\pm$ 48.67 ***	425.43 $\pm$ 52.34 ***
Experimental	10	173.42 $\pm$ 28.45 $\Delta\Delta\Delta$	201.67 $\pm$ 31.23 $\Delta\Delta\Delta$
Ad-scramble	10	179.75 $\pm$ 29.83	197.74 $\pm$ 30.48
Ad-miR-16-5p	10	336.47 $\pm$ 41.35 $\Delta\Delta\Delta$	413.46 $\pm$ 49.78 $\Delta\Delta\Delta$

Ad-scramble group: Tail vein injection of adenovirus-coated NC-mimic 48 h before modeling; Ad-miR-16-5p group: Tail vein injection of adenovirus-coated miR-16-5p mimic 48 h before modeling; Compared to sham-operation group, *** $P < 0.001$; Compared to model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared to Ad-scramble group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

表5 各组大鼠血清及心肌组织中白介素-1 β (IL-1 β) 和 IL-6 水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 5 Comparison of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 levels in serum and myocardial tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Serum		Myocardium	
		IL-1 β (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	IL-6 (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	IL-1 β (pg $\cdot$ mg $^{-1}$ prot)	IL-6 (pg $\cdot$ mg $^{-1}$ prot)
Sham-operation	10	101.34 $\pm$ 17.84	69.58 $\pm$ 12.04	35.48 $\pm$ 6.93	39.82 $\pm$ 7.41
Model	10	269.56 $\pm$ 36.85 ***	210.31 $\pm$ 31.54 ***	129.64 $\pm$ 19.51 ***	147.48 $\pm$ 24.51 ***
Experimental	10	118.59 $\pm$ 16.36 $\Delta\Delta\Delta$	104.17 $\pm$ 12.56 $\Delta\Delta\Delta$	52.52 $\pm$ 8.48 $\Delta\Delta\Delta$	56.34 $\pm$ 6.86 $\Delta\Delta\Delta$
Ad-scramble	10	116.38 $\pm$ 15.71	101.46 $\pm$ 13.79	51.62 $\pm$ 7.32	57.65 $\pm$ 7.34
Ad-miR-16-5p	10	256.50 $\pm$ 32.84 $\Delta\Delta\Delta$	203.14 $\pm$ 35.49 $\Delta\Delta\Delta$	118.42 $\pm$ 19.51 $\Delta\Delta\Delta$	131.45 $\pm$ 21.62 $\Delta\Delta\Delta$

Compared to sham-operation group, *** P < 0.001; Compared to model group, $\Delta\Delta\Delta P$ < 0.001; Compared to Ad-scramble group, $\Delta\Delta\Delta P$ < 0.001.

表6 各组大鼠血清及心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 6 Comparison of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in serum and myocardial tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Serum		Myocardium	
		SOD (U $\cdot$ mL $^{-1}$)	MDA (nmol $\cdot$ mL $^{-1}$)	SOD (U $\cdot$ mg $^{-1}$ prot)	MDA (nmol $\cdot$ mg $^{-1}$ prot)
Sham-operation	10	112.29 $\pm$ 18.67	13.29 $\pm$ 2.17	83.45 $\pm$ 13.42	4.26 $\pm$ 0.91
Model	10	53.47 $\pm$ 9.54 ***	39.81 $\pm$ 6.07 ***	34.54 $\pm$ 5.61 ***	21.42 $\pm$ 3.94 ***
Experimental	10	95.14 $\pm$ 14.74 $\Delta\Delta\Delta$	18.12 $\pm$ 2.58 $\Delta\Delta\Delta$	76.63 $\pm$ 15.63 $\Delta\Delta\Delta$	9.54 $\pm$ 1.34 $\Delta\Delta\Delta$
Ad-scramble	10	94.85 $\pm$ 15.69	19.57 $\pm$ 2.74	75.87 $\pm$ 14.23	9.31 $\pm$ 1.89
Ad-miR-16-5p	10	61.64 $\pm$ 8.86 $\Delta\Delta\Delta$	28.48 $\pm$ 6.13 $\Delta\Delta\Delta$	41.75 $\pm$ 5.92 $\Delta\Delta\Delta$	16.42 $\pm$ 3.27 $\Delta\Delta\Delta$

Compared to sham-operation group, *** P < 0.001; Compared to model group, $\Delta\Delta\Delta P$ < 0.001; Compared to Ad-scramble group, $\Delta\Delta\Delta P$ < 0.001.

表7 各组大鼠心肌组织中神经源性基因 Notch 同源蛋白 1 (Notch1) 和缺氧诱导因子 1 亚基 α (HIF-1 α) mRNA 和相对荧光强度水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 7 Comparison of mRNA and relative fluorescence intensity levels of neurogenic locus notch homolog protein1 (Notch1) and hypoxia inducible factor1 α (HIF-1 α) in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	mRNA levels		Relative fluorescence intensity levels	
		Notch1 mRNA	HIF-1 α mRNA	Notch1	HIF-1 α
Sham-operation	10	1.00 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.13
Model	10	2.35 $\pm$ 0.41 ***	2.17 $\pm$ 0.36 ***	1.86 $\pm$ 0.22 ***	2.41 $\pm$ 0.37 ***
Experimental	10	1.23 $\pm$ 0.24 $\Delta\Delta\Delta$	1.15 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta\Delta$	1.36 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta\Delta$	1.64 $\pm$ 0.24 $\Delta\Delta\Delta$
Ad-Scramble	10	1.18 $\pm$ 0.21	1.13 $\pm$ 0.22	1.29 $\pm$ 0.25	1.57 $\pm$ 0.29
Ad-miR-16-5p	10	2.08 $\pm$ 0.36 $\Delta\Delta\Delta$	1.93 $\pm$ 0.32 $\Delta\Delta\Delta$	1.71 $\pm$ 0.28 $\Delta\Delta$	2.10 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$

Compared to sham-operation group, *** P < 0.001; Compared to model group, $\Delta\Delta\Delta P$ < 0.001; Compared to Ad-scramble group, $\Delta\Delta P$ < 0.01, $\Delta\Delta\Delta P$ < 0.001.

讨 论

AMI 的发病率、死亡率均较高,其主要特征为心肌急性或持续性的缺血缺氧导致的心肌坏死,这种病变会致使心功能降低,显著增加心力衰竭的发生风险^[9]。目前,介入、药物治疗在 AMI 临床管理中已有一定成效,但部分患者治疗后仍会发生不良心血管事件,导致再入院率及住院期死亡风险上升。因此,寻找有效减轻心肌损伤的药物对改善预后至关重要。ABT 具有显著的抗炎功效,其疗效已在类风湿关节炎中得到证实,能够降低此类患者发生心肌梗死以及冠

状动脉血运重建的风险^[10]。本研究提示,ABT 能够改善 AMI 大鼠的心肌组织病理损伤和纤维化,可能是一种有效的 AMI 治疗药物。miRNA 是一种内源性非编码的小分子 RNA,长度大约为 22 个核苷酸,为 AMI 评估及预后预测的重要标志物^[11]。miR-16-5p 在心肌细胞凋亡的促进、心脏炎症反应的加剧,以及心脏纤维化进程的推动中都发挥着关键作用。谢小芳等^[12]研究发现,大黄素能够通过阻断 miR-16-5p/信号转导子和转录激活子 3 信号通路,进而降低炎症因子表达,减轻心肌梗死大鼠的心肌组织损伤及心肌细胞凋亡。WANG 等^[13]研究发现,AMI 患者中 miR-16-5p 表达上调,敲低 miR-16-5p 能够有效抑制心肌成纤维

细胞的活化、增殖以及迁移过程,进而缓解心肌纤维化。在本研究中,*miR-16-5p*在AMI大鼠心肌组织中表达升高,ABT处理后可以下调*miR-16-5p*表达,与上述研究结果类似。*Notch1*信号通路参与调控心肌缺血过程^[14],能够激活*HIF-1 α* ,而*HIF-1 α* 是一种细胞核转录因子,在心肌缺血缺氧时表达上调,有助于减轻炎症反应以及血管内皮损伤^[15]。本研究发现,ABT处理后大鼠心肌组织*Notch1*/*HIF-1 α* mRNA和蛋白相对表达水平均显著降低,同时,经ABT/*miR-16-5p*过表达处理后以上结果均可逆转,推测ABT可能是通过介导*miR-16-5p*表达调控*Notch1*/*HIF-1 α* 信号通路在AMI中发挥治疗作用。

AMI发生后,心肌组织处于缺血缺氧状态甚至出现坏死,可以触发急性炎症反应,导致IL-1 β 、IL-6等多种炎症细胞因子大量释放并聚集于心肌梗死区,进一步加重炎症反应,扩大心肌梗死面积、加重心肌损伤,引起心肌损伤标志物水平异常;大量生成活性氧,机体抗氧化能力下降,导致出现内皮功能障碍和动脉粥样硬化^[16]。熊纭辉等^[17]研究发现,雷公藤内酯醇能够激活核因子E2相关因子2/抗氧化反应元件介导的抗氧化、抗炎反应途径,有效改善AMI大鼠的心肌坏死状况,抑制心肌纤维化的发展进程,最终实现对心功能的改善,具体表现为大鼠心肌组织IL-6、IL-1 β 蛋白表达水平、活性氧荧光强度等均显著降低,SOD2等表达水平均明显升高。本研究发现,经过ABT处理后的AMI大鼠LVDD、LVDS、LDH、CPK、IL-1 β 、IL-6和MDA水平均显著降低,EF和SOD水平均显著升高,提示ABT同样能保护AMI大鼠的心功能,改善心肌损伤标志物水平,减轻氧化应激与炎症反应,可能是通过介导*miR-16-5p*表达调控*Notch1*/*HIF-1 α* 信号通路来实现的。

本研究提示:ABT能够改善心肌组织病理损伤和纤维化、减轻氧化应激与炎症反应,进而达到保护AMI大鼠心功能的作用,其机制可能与介导*miR-16-5p*表达调控*Notch1*/*HIF-1 α* 信号通路有关。但本研究主要聚焦于阐明ABT的保护效应,*miR-16-5p*与*Notch1*/*HIF-1 α* 之间是否存在直接靶向调控关系,尚未通过双荧光素酶报告基因等实验进行验证,这是本研究的局限性之一,也是未来机制探索的重要方向。

参考文献:

- [1] 张鑫,王文娟,张润,等. 中国成人BMI和腹型肥胖与急性心肌梗死发病关系的前瞻性研究[J]. 中华疾病控制杂志,2022,26(7):750—755,789.
- [2] 张旻,赵延延,田少芳,等. 中国急性心肌梗死患者发病前动脉粥样硬化性心血管疾病危险分层分析[J]. 中国循环杂志,2021,36(9):852—857.
- [3] 李真,尹玉洁,刘依,等. 中药单体治疗急性心肌梗死后心脏纤维化的实验研究进展[J]. 世界中医药,2021,16(11):1665—1670.
- [4] KARPOUZAS G A, ORMSETH S R, HERNANDEZ E, et al. Biologics may prevent cardiovascular events in rheumatoid arthritis by inhibiting coronary plaque formation and stabilizing high-risk lesions[J]. *Arthritis Rheumatol*,2020,72(9):1467—1475.
- [5] TORO R, PÉREZ-SERRA A, MANGAS A, et al. *miR-16-5p* suppression protects human cardiomyocytes against endoplasmic reticulum and oxidative stress-induced injury[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(3):1036.
- [6] 马英东,王梁,刘琳琳,等. 达格列净对急性心肌梗死后大鼠的心肌电活动影响的研究[J]. 中国心血管病研究,2021,19(2):147—151.
- [7] 陈海云,颜博,何超明,等. TREM2通过激活Th17细胞调节神经免疫炎症并保护局灶性脑缺血再灌注损伤[J]. 中国免疫学杂志,2023,39(9):1822—1828.
- [8] 毛美玲,卢健棋,潘朝铨,等. 强心汤保护心血管内皮治疗慢性心力衰竭的作用机制[J]. 北京中医药大学学报,2024,47(2):238—248.
- [9] 王天光,陈泽伦,赵朝阳,等. 虎杖苷抑制TGF- β /Smad/ERK信号通路挽救急性心肌梗死大鼠心肌纤维化[J]. 现代免疫学,2024,44(1):39—44,50.
- [10] 胡娣萍,黎艳红,刘毅. 生物制剂治疗类风湿关节炎对心血管风险影响的研究进展[J]. 医学研究杂志,2021,50(5):7—10,14.
- [11] ZHONG Z, WU H, ZHONG W, et al. Expression profiling and bioinformatics analysis of circulating microRNAs in patients with acute myocardial infarction[J]. *J Clin Lab Anal*,2020,34(3):e23099.
- [12] 谢小芳,赵展庆,符妹垂. 大黄素调控*miR-16-5p*/STAT3对心肌梗死大鼠模型保护作用机制研究[J]. 河北医药,2023,45(11):1605—1610.
- [13] WANG Y, LIU Y, FEI A, et al. CircMACF1 alleviates myocardial fibrosis after acute myocardial infarction by suppressing cardiac fibroblast activation via the *miR-16-5p*/SMAD7 axis[J]. *Medicine(Baltimore)*,2023,102(37):e35119.
- [14] 毛福英,李冰,杨震旻,等. Notch信号通路在心肌缺血损伤中的作用研究[J]. 生命的化学,2022,42(2):291—300.
- [15] 吴倩,杨娟,孙斌. 血清ET-1、NT-proBNP、HIF-1 α 水平与急性左心衰竭患者预后的相关性[J]. 川北医学院学报,2024,39(8):1064—1067.
- [16] 张化,王艳萍. 依托咪酯调节AMPK/NLRP3信号通路对急性心肌梗死大鼠心肌损伤的影响[J]. 广东药科大学学报,2024,40(2):104—111.
- [17] 熊纭辉,邓海华,王娟. 雷公藤内酯醇调控Nrf2/ARE通路对急性心肌梗死大鼠心肌纤维化的影响[J]. 新疆医科大学学报,2022,45(11):1274—1282.

(本文编辑:马凌云 收稿日期 2025-05-08)