DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.05.019

基于 LncRNA malat-1/miR-133 通路调控 p-ERK1/2 探讨温阳振衰颗粒含药血清对阿霉素诱导 H9C2 心肌细胞损伤的影响

王楠[1],唐燕萍[2],蔡虎志[1],陈新宇[1],李少东[2],陈雪靓[2]
(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;2.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南 长沙 410208)

摘要:目的 基于长链非编码RNA(Long non-coding RNAs,LncRNA)肺腺癌转移相关转录子1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1,malat-1)/微小RNA-133(microRNA-133,miR-133)通路调控细胞外调节蛋白激酶1/2磷酸化(p-ERK1/2)探讨温阳振衰颗粒含药血清对阿霉素诱导H9C2心肌细胞损伤的影响。方法 使用2.67 μmol/L阿霉素(adriamycin,ADR)培养液共培养45 h以建立H9C2心肌细胞损伤模型并设置正常对照组、正常+W组(W:温阳振衰颗粒含药血清)、miR-133过表达组、miR-133过表达+W组、ADR组[ADR:阿霉素(adriamycin)]、ADR+W组、ADR+miR-133过表达组、ADR+miR-133过表达+W组共8组。细胞增殖活性采用MTT法检测,N端B型脑钠肽前体(N-terminal B-type brain natriuretic peptide precursor,NT-proBNP)的变化采用ELISA法检测,各组H9C2心肌细胞lncRNA malat-1、miR-133以及ERK1/2 mRNA的含量采用Real-time PCR法检测,ERK1/2及p-ERK1/2的蛋白表达采用Western blot检测。结果 ADR组、ADR+miR-133过表达组、ADR+W组、ADR+miR-133过表达+W组、正常对照组、miR-133过表达组、正常+W组、miR-133过表达+W组心肌细胞活性依次增加($P<0.05$);NT-proBNP含量依次降低($P<0.05$)。实验后各组心肌细胞ERK1/2 mRNA表达差异无统计学意义($P>0.05$),ADR组、ADR+miR-133过表达组、ADR+W组、ADR+miR-133过表达+W组、正常对照组、miR-133过表达组、正常+W组、miR-133过表达+W组miR-133表达依次增加($P<0.05$);lncRNA malat-1表达依次降低($P<0.05$)。实验后各组心肌细胞ERK1/2蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);ADR组、ADR+W组、ADR+miR-133过表达组、ADR+miR-133过表达+W组、正常对照组、miR-133过表达组、正常+W组、miR-133过表达+W组p-ERK1/2蛋白表达依次降低($P<0.05$)。结论 温阳振衰颗粒含药血清能够降低心肌细胞p-ERK1/2蛋白表达从而对慢性心力衰竭发挥疗效,其机制可能是通过对心肌细胞中的lncRNA malat-1/miR-133通路进行调控而实现的。

关键词:慢性心力衰竭;温阳振衰颗粒含药血清;H9C2心肌细胞;细胞外信号调节激酶1/2;微小RNA-133;肺腺癌转移相关转录子1
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)05-0089-06

Effect of Wenyang Zhenshuai Granule(温阳振衰颗粒) Medicated Serum on Adriamycin Induced H9C2 Myocardial Cell Injury Based on LncRNA malat-1/miR-133 Pathway Regulating p-ERK1/2

WANG Nan[1],TANG Yanping[2],CAI Huzhi[1],CHEN Xinyu[1],LI Shaodong[2],CHEN Xueliang[2]
(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine,Changsha 410007,Hunan,China;
2. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,Hunan University of Chinese Medicine,Changsha 410208,Hunan,China)

Abstract:*Objective* To explore the effect of Wenyang Zhenshuai Granule(温阳振衰颗粒) medicated serum on adriamycin induced H9C2 myocardial cell injury based on long non-coding RNAs(LncRNA) metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1(malat-1)/microRNA-133(miR-133) pathway regulating p-ERK1/2. *Methods* H9C2 myocardial cell injury model was established by coculture with 2.67 μmol/L adriamycin(ADR) for 45 h and set up a normal control group,a normal+W group(W:Wenyang Zhenshuai Granule medicated serum),an miR-133 overexpression group,an miR-133 overexpression+W group,an ADR group,an ADR+W group,an ADR+miR-133 overexpression group,and an ADR+miR-133 overexpression+W group. The cell proliferative activity was detected by MTT method,while the change of N-terminal B-type brain natriuretic peptide precursor(NT-proBNP) was detected by ELISA. The contents of lncRNA malat-1,miR-133 and ERK1/2 mRNA in H9C2 cardiomyocytes of each group were detected by RT-PCR. The protein expressions of ERK1/2 and p-ERK1/2 were detected by Western-blot. *Results* The myocardial cell activities in the ADR group,the ADR+miR-133 overex-

基金项目:国家自然科学基金项目(81704061);国家级大学生创新创业训练计划项目(202210541012);湖南省自然科学基金项目(2020JJ5423);湖南省卫生健康委科研计划项目(202203015711);湖南省中医药科研项目(B2023026);湖南省"国内一流培育学科"中西医结合开放基金项目(2020ZXYJH74);湖南省大学生创新创业训练计划项目(2022-2857)
作者简介:王楠(1993-),女,云南曲靖人,医师,博士,研究方向:中医药防治心脑血管疾病。
通讯作者:唐燕萍(1985-),女,湖南郴州人,副教授,硕士研究生导师,硕士,研究方向:中医药防治心脑血管疾病。E-mail:290881559@qq.com。

pression group, the ADR + W group, the ADR + miR - 133 overexpression + W group, the normal control group, the miR - 133 overexpression group, the normal + W group and the miR - 133 overexpression + W group were increased in sequence ($P < 0.05$). The content of NT - proBNP was decreased in sequence ($P < 0.05$). After the experiment, there was no significant difference in ERK1/2 mRNA expression in myocardial cells among different groups ($P > 0.05$). The expression of the miR - 133 in ADR group, the ADR + miR - 133 overexpression group, the ADR + W group, the ADR + miR - 133 overexpression + W group, the normal control group, the miR - 133 overexpression group, the normal + W group and the miR - 133 overexpression + W group increased in sequence ($P < 0.05$). The expression of LncRNA malat - 1 was decreased in sequence ($P < 0.05$). There was no significant difference in ERK1/2 protein expression in myocardial cells among different groups after the experiment ($P > 0.05$). The p - ERK1/2 protein expression levels in the ADR group, the ADR + W group, the ADR + miR - 133 overexpression group, the ADR + miR - 133 overexpression + W group, the normal control group, the miR - 133 overexpression group, the normal + W group and the miR - 133 overexpression + W group were decreased in sequence ($P < 0.05$). *Conclusion* Wenyang Zhenshuai Granule medicated serum can reduce the expression of p - ERK1/2 protein in myocardial cells and exert the curative effect on chronic heart failure, which may be achieved by regulating the lncRNA malat - 1/miR - 133 pathway in myocardial cells.

Keywords: chronic heart failure; Wenyang Zhenshuai Granule (温阳振衰颗粒) medicated serum; H9C2 cardiomyocytes; extracellular signal - regulated kinase 1/2; microRNA - 133; metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)已成为世界范围内严重的公共卫生问题[1],近年来的流行病学数据显示,我国心力衰竭的患病率为 0.9%[2],每年有 450 万患者患有心力衰竭,约 50 万新发心衰病例[3-4]。虽然手术治疗和药物干预可以显著降低患者死亡率,但该病的发病率仍在逐年增加。因此,阐明心衰的分子机制,探索防治心衰的新治疗策略至关重要。课题组前期通过动物实验研究发现[5],温阳振衰颗粒可以经长链非编码 RNA(Long non - coding RNAs, LncRNA)肺腺癌转移相关转录子 1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, malat - 1)/微小 RNA - 133(microRNA - 133, miR - 133)通路抑制细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)蛋白过度磷酸化从而治疗慢性心力衰竭,为了进一步验证该通路在慢性心力衰竭中的作用机制,我们进行了心肌细胞实验,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 H9C2 心肌细胞株由上海中乔新舟生物科技有限公司提供。

1.2 实验动物 清洁级(specific pathogen free, SPF)级 6 周龄健康 SD 雄性大鼠,体质量(180 ± 10) g,购于上海莱斯克实验动物有限责任公司,质量合格证:1107271911002467。本实验方案和操作程序经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号:LL2020061001。

1.3 药物 温阳振衰颗粒(主要药物组成为制附子、红参、干姜、甘草等),批号:201709,规格:8 g/包,由湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供;阿霉素(adriamycin, ADR),批号:201702,批准文号:国药准字 H14023143,规格:每瓶 10 mg,由山西普德药业股份有限公司生产。

1.4 主要仪器及试剂 细胞外调节蛋白激酶 ERK1/2 抗体及细胞外调节蛋白激酶 ERK1/2 磷酸化抗体,均由美国 CST 有限公司提供;DMEM 培养基由美国 Sigma 有限公司提供(D5796);二甲基亚砜(DMSO)由美国 VETEC 有限公司提供(V900090);N 端 B 型脑钠肽前体(N - terminal B - type brain natriuretic peptide precursor, NT - proBNP)试剂盒由武汉华美生物工程有限公司提供(F13038789);RIPA 裂解液由中国 abiowell 有限公司提供(AWB0136);mRNA(CW2569)、miRNA(CW2141)逆转录试剂盒、UltraSYBR Mixture(CW2601)、DM2000 Plus DNA Marker(CW0632)均由中国北京康为世纪有限公司提供。

倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器,DSZ2000X 型);低速离心机(知信仪器,DSZ2000X 型);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,H1650R 型);全自动酶标洗板机(深圳市汇松科技发展有限公司,PW - 812 型);电泳仪(深圳市汇松科技发展有限公司,PW - 812 型);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI, QuantStudio1 型)。

1.5 H9C2 心肌细胞株的传代培养、转染 H9C2 细胞培养于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) + 1% 双抗的 DMEM 培养基中,37 ℃,5% CO_2,饱和湿度培养箱中培养。直至细胞生长范围覆盖培养基 70% ~ 80% 时,向其中加入 1 mL 0.05% 胰蛋白酶消化细胞后使用无菌枪头吹贴壁细胞使其从培养基脱落,制备单细胞悬液,取少许剩余的细胞悬液稀释后进行计数,根据细胞计数调整细胞浓度至合适的比例,种板后继续培养备用。

选取两个离心管,每管加 95 μL 无血清 DMEM 培养基,然后往离心管中分别加入 5 μL 的 Lip2000 和 3 μg 的 miR - 133 过表达质粒后轻轻混匀静置,然后将细胞加入到 800 μL 对应基础培养基和混合液中培养备用。

1.6 含药血清的制备[6] 用蒸馏水将温阳振衰颗粒按 1.44 g/(kg · d)剂量标准配成 6 mL 溶液对大鼠进行灌胃处理,灌胃 2 次/d,每次 3 mL,连续给药 7 d 后剥离其腹主动脉采血 8 ~ 10 mL。以 3000 r/min 离心 15 min,取上清在 56 ℃下灭活处理 30 min,抽滤除菌后进行分装,置 - 20 ℃冰箱保存备用,使用时配置为 10% 浓度进行实验。

1.7 心肌细胞损伤的诱导 向心肌细胞培养液中加入浓度配制为 2.67 μmol/L 阿霉素培养液共培养 45 h 以建立心肌细胞损伤模型。

1.8 实验分组 实验分为 8 组:正常对照组:90% DMEM + 10% FBS;正常 + W 组(W:温阳振衰颗粒含药血清):90% DMEM + 10% 温阳振衰颗粒含药血清;miR - 133 过表达组:miR - 133 mimic 和 Lipofectamine2000 的混合液 + 90% DMEM + 10% FBS;miR - 133 过表达 + W 组:miR - 133 mimic 和 Lipofectamine2000 的混合液 + 90% DMEM + 10% FBS + 10% 温阳振衰颗粒含药血清;ADR 组[ADR:阿霉素(adriamycin)]:90% DMEM + 2.67 μmol/L ADR;ADR + W 组:90% DMEM + 2.67 μmol/L ADR + 10% 温阳振衰颗粒含药血清;ADR +

miR－133 过表达组：miR－133 mimic 和 Lipofectamine2000 的混合液＋90% DMEM＋10% FBS＋2.67 μmol/L ADR；ADR＋miR－133 过表达＋W 组：miR－133 mimic 和 Lipofectamine2000 的混合液＋90% DMEM＋10% FBS＋2.67μmol/LADR＋10% 温阳振衰颗粒含药血清。

1.9 MTT 检测各组 H9C2 细胞增殖活性 取以上分组细胞，用胰酶消化液消化细胞后进行计数，在 96 孔板内每孔注入 5×10^3 个细胞，体积为 100 μL/孔，各组均设 5 个复孔，待细胞培养贴壁后按照上述分组方法进行相应时间操作后，在每孔中倒入 5 mg/mL MTT 10 μL/孔后放置在 37 ℃，5% CO_2 的培养箱中孵育，4 h 后经离心后去掉上清，再将 150 μL 二甲基亚砜注入到每孔中并混合均匀，在 490 nm 处使用 Bio－Tek 酶标仪测量吸光度（OD）值。

1.10 ELISA 检测各组 H9C2 细胞 NT－proBNP 含量 用 ELISA 法检测 NT－proBNP 含量，按照 ELISA 试剂盒标准测取。

1.11 Real－time PCR 检测各组 H9C2 细胞 lncRNA malat－1、miR－133、ERK1/2mRNA 的表达 采用 Real－time PCR 法检测，依据试剂盒说明书，用 Trizol 法提取心肌组织总 RNA。用紫外分光光度计测定浓度，在 260 nm 与 280 nm 处测其吸光度值，并计算其浓度和纯度。RNA 浓度（ng/μL）＝A260×稀释倍数×40，浓度在 100 ～200 ng/uL，RNA 纯度＝OD260/OD280，比值为 1.8～2.0。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带，于凝胶成像系统下观察。按 HiFiScript cDNA Synthesis 试剂盒说明书合成 cDNA，以 cDNA 为模板按 UltraSYBR Mixture 合成试剂盒说明书进行扩增。从 NCBI 基因库中获取 lncRNA malat－1、miR－133 和 ERK1/2 的基因序列，运用 Primer5 软件设计引物，由上海生工生物技术有限公司合成，依照 PCR 反应试剂盒说明书完成分析。lncRNA malat－1 上游引物：5′－AACAGGGAGGAGTGGGTG－3′，下游引物：5′－TCCCTGAAGGTGTCGTGCC－3′，长度 125 bp；miR－133 上游引物：5′－ACACTCCAGCTGGGAGCTGGTAAAAUGGAA－3′，下游引物：5′－TGGTGTCGTGGAGTCG－3′，长度 232 bp；内参 5 s 上游引物：5′－GCCTACAGCCATACCACCCGGAA－3′，下游引物：5′－CCTACAGCACCCGGTATCCCA－3′，长度 116 bp；ERK1 上游引物：5′－GCTGCTGTGTCTTTATCTATCCC－3′，下游引物：5′－CTCCACCCCTCTGTAGCAC－3′，长度 103 bp；ERK2 上游引物：5′－TCATTCGCTGCAAGATGGAC－3′，下游引物：5′－TAAATCCCCAGGCAGTGAGCAT－3′，长度 155 bp；内参 GAPDH 上游引物：上游引物：5′－ACAGCAACAGGGTGGTGGAC－3′，下游引物：5′－TTTGAGGGTGCAGCGAACTT－3′，长度 252 bp。根据所得 Ct 值，以 GAPDH 为内参，用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算目的基因含量，计算公式为：△Ct＝目的基因 Ct－内参基因 Ct；－ΔΔCt＝（对照组）ΔCt－各样品 ΔCt。

1.12 蛋白质免疫印迹法（Western blot）检测各组 H9C2 细胞 ERK1/2、p－ERK1/2 蛋白的表达 采用 Western Blot 法进行检测，将培养好的细胞标本用预冷的 PBS 洗涤 1～2 次，加 50 μL 浓度为 1 mmol/L 的 RIPA＋PMSF 裂解液至培养皿中并置于冰上裂解约 10～20 min，将裂解物置于 4 ℃环以 2000 r/min 转速离心 12 min 后取上清液放入标记的 EP 管（1.5 mL）中并置于－80 ℃保存。配制一定量比例为 1∶50 的 BCA 工作液，完全溶解蛋白质，通过酶标仪测定波长 562 nm 处的蛋白含量，取平均数。制备 SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳，将蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至 PVDF 膜，以兔抗小鼠 P－ERK1/2（稀释比 1∶2000，分子量：42，44 KDa）、ERK（稀释比 1∶1000）抗体作为一抗，山羊抗鼠（稀释比 1∶5000）、山羊抗兔（稀释比 1∶6000）抗体作为二抗，进入暗室曝光显影。分析 ERK1/2，p－ERK1/2 蛋白的相对表达水平（灰度值比值）。

1.13 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件分析实验数据及结果，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，比较检验多样本均数间使用单因素方差分析（One－way ANOVA），先使用 Levene 检验验证方差齐性，当方差齐时则使用 LSD 法及 Dunnett 法进行多重比较，当方差不齐时，采用 Tamhane'T2 法。

2 结果

2.1 H9C2 细胞增殖活性 实验后各组 H9C2 细胞增殖活性情况见表 1、插页ⅩⅩⅦ图 1。表 1 显示，正常对照组、miR－133 过表达组、正常＋W 组、miR－133 过表达＋W 组细胞活性依次增加（$P<0.05$）；ADR 组、ADR＋W 组、ADR＋miR－133 过表达组、ADR＋miR－133 过表达＋W 组与前 4 组比较，细胞活性降低（$P<0.05$）；ADR＋W 组、ADR＋miR－133 过表达组、ADR＋miR－133 过表达＋W 组细胞活性比 ADR 组高（$P<0.05$），其中 ADR＋miR－133 过表达＋W 组细胞活性最高（$P<0.05$），ADR＋W 组次之（$P<0.05$）。

表 1 实验后各组 H9C2 细胞增殖活性（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	OD 值
正常对照组	5	2.74±0.02
正常＋W 组	5	3.77±0.03①
miR－133 过表达组	5	3.25±0.05①②
miR－133 过表达＋W 组	5	4.83±0.04①②③
ADR 组	5	1.04±0.03①②③④
ADR＋W 组	5	1.89±0.04①②③④⑤
ADR＋miR－133 过表达组	5	1.44±0.02①②③④⑤⑥
ADR＋miR－133 过表达＋W 组	5	2.34±0.01①②③④⑤⑥⑦

注：①与正常对照组比较，$P<0.05$；②与正常＋W 组比较，$P<0.05$；③与 miR－133 过表达组比较，$P<0.05$；④与 miR－133 过表达＋W 组比较，$P<0.05$；⑤与 ADR 组比较，$P<0.05$；⑥与 ADR＋W 组比较，$P<0.05$；⑦与 ADR＋miR－133 过表达组相比，$P<0.05$。

2.2 H9C2 细胞 NT－proBNP 含量 实验后各组 H9C2 细胞 NT－proBNP 含量情况见表 2。表 2 显示，正常对照组、miR－133 过表达组、正常＋W 组、miR－133 过表达＋W 组 NT－proBNP 含量依次降低（$P<0.05$）；ADR 组、ADR＋W 组、ADR＋miR－133 过表达组、ADR＋miR－133 过表达＋W 组与前 4 组比较，NT－proBNP 含量升高（$P<0.05$）；ADR＋W 组、

表 2 实验后各组 H9C2 细胞 NT－proBNP 含量的表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	NT－proBNP/（pg/mL）
正常对照组	5	22.32±0.41
正常＋W 组	5	14.12±0.23①
miR－133 过表达组	5	18.27±0.32①②
miR－133 过表达＋W 组	5	10.28±0.42①②③
ADR 组	5	38.74±0.50①②③④
ADR＋W 组	5	29.87±0.53①②③④⑤
ADR＋miR－133 过表达组	5	34.56±0.42①②③④⑤⑥
ADR＋miR－133 过表达＋W 组	5	25.67±0.23①②③④⑤⑥⑦

注：①与正常对照组比较，$P<0.05$；②与正常＋W 组比较，$P<0.05$；③与 miR－133 过表达组比较，$P<0.05$；④与 miR－133 过表达＋W 组比较，$P<0.05$；⑤与 ADR 组比较，$P<0.05$；⑥与 ADR＋W 组比较，$P<0.05$；⑦与 ADR＋miR－133 过表达组相比，$P<0.05$。

表 3 实验后各组 H9C2 细胞 lncRNA malat－1、miR－133、ERK1/2mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	lncRNA malat－1	miR－133	ERK1/2mRNA
正常对照组	5	1.51±0.05	1.86±0.03	1.01±0.05
正常＋W 组	5	0.82±0.02①	2.68±0.02①	1.02±0.03
miR－133 过表达组	5	1.17±003①②	2.29±0.01①②	1.00±0.07
miR－133 过表达＋W 组	5	0.43±0.02①②③	3.06±0.03①②③	1.02±0.03
ADR 组	5	3.95±0.03①②③④	0.33±0.03①②③④	0.98±0.06
ADR＋W 组	5	2.65±0.03①②③④⑤	1.05±0.02①②③④⑤	1.00±0.03
ADR＋miR－133 过表达组	5	3.20±0.02①②③④⑤⑥	0.66± ±.01①②③④⑤⑥	0.96±0.04
ADR＋miR－133 过表达＋W 组	5	2.14±0.03①②③④⑤⑥⑦	1.44±0.02①②③④⑤⑥⑦	0.99±0.05

注：①与正常对照组相比，$P<0.05$；②与正常＋W 组比较，$P<0.05$；③与 miR－133 过表达组比较，$P<0.05$；④与 miR－133 过表达＋W 组比较，$P<0.05$；⑤与 ADR 组比较，$P<0.05$；⑥与 ADR＋W 组比较，$P<0.05$；⑦与 ADR＋miR－133 过表达组比较，$P<0.05$。

ADR＋miR－133 过表达组、ADR＋miR－133 过表达＋W 组 NT－proBNP 含量比 ADR 组低（$P<0.05$），其中 ADR＋miR－133 过表达＋W 组 NT－proBNP 含量最低（$P<0.05$），ADR＋W 组次之（$P<0.05$）。

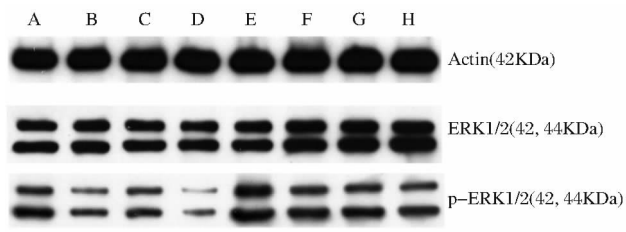
2.3 H9C2 细胞 lncRNA malat－1、miR－133、ERK1/2mRNA 的表达情况 实验后各组 H9C2 细胞 lncRNA malat－1、miR－133、ERK1/2mRNA 的表达情况见表 3。表 3 显示，各组 ERK1/2mRNA 表达无明显差异（$P>0.05$），正常＋W 组、miR－133 过表达＋W 组 miR－133 表达较正常组、miR－133 过表达组增高（$P<0.05$），lncRNA malat－1 表达较正常组、miR－133 过表达组降低（$P<0.05$），其中 miR－133 过表达＋W 组 miR－133 表达最高（$P<0.05$），lncRNA malat－1 表达最低，然后依次是正常＋W 组、miR－133 过表达组和正常组。ADR 组 lncRNA malat－1 表达增高（$P<0.05$），miR－133 表达最低（$P<0.05$），ADR＋miR－133 过表达＋W 组 lncRNA malat－1 较 ADR 组、ADR＋W 组、ADR＋miR－133 过表达组表达最低（$P<0.05$），miR－133 表达最高（$P<0.05$），ADR＋W 组次之（$P<0.05$）。

2.4 H9C2 细胞 ERK1/2、p－ERK1/2 蛋白的表达 实验后各组 H9C2 细胞 ERK1/2、p－ERK1/2 蛋白的表达情况见表 4、图 2。表 4 显示，各组 ERK1/2 差异无统计学意义（$P>0.05$）；正常对照组、miR－133 过表达组、正常＋W 组、miR－133 过表达＋W 组含 p－ERK1/2 蛋白表达依次降低（$P<0.05$）；ADR 组、ADR＋W 组、ADR＋miR－133 过表达组、ADR＋miR－133 过表达＋W 组与前 4 组比较，p－ERK1/2 蛋白表达升高（$P<0.05$）；ADR＋W 组、ADR＋miR－133 过表达组、ADR＋miR－133 过表达＋W 组 p－ERK1/2 蛋白表达比 ADR 组低（$P<0.05$），其中 ADR＋miR－133 过表达＋W 组 p－ERK1/2 蛋白表达最低（$P<0.05$），ADR＋W 组次之（$P<0.05$）。

表 4 实验后各组 H9C2 细胞 ERK1/2、p－ERK1/2 蛋白的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ERK1/2	p－ERK1/2
正常对照组	5	0.79±0.07	1.53±0.04
正常＋W 组	5	0.81±0.05	0.72±0.02①
miR－133 过表达组	5	0.77±0.04	1.14±0.03①②
miR－133 过表达＋W 组	5	0.74±0.05	0.31±0.03①②③
ADR 组	5	0.78±0.07	3.36±0.04①②③④
ADR＋W 组	5	0.80±0.04	2.45±0.03①②③④⑤
ADR＋miR－133 过表达组	5	0.77±0.08	2.83±.01①②③④⑤⑥
ADR＋miR－133 过表达＋W 组	5	0.80±0.05	1.95±0.03①②③④⑤⑥⑦

注：①与正常对照组比较，$P<0.05$；②与正常＋W 组比较，$P<0.05$；③与 miR－133 过表达组比较，$P<0.05$；④与 miR－133 过表达＋W 组比较，$P<0.05$；⑤与 ADR 组比较，$P<0.05$；⑥与 ADR＋W 组比较，$P<0.05$；⑦与 ADR＋miR－133 过表达组相比，$P<0.05$。



注：A. 正常对照组，B. 正常＋W 组，C. miR－133 过表达组，D. miR－133 过表达＋W 组，E. ADR 组，F. ADR＋W 组，G. ADR＋miR－133 过表达组，H. ADR＋miR－133 过表达＋W 组。

图 2 各组 H9C2 心肌细胞 ERK1/2、p－ERK1/2 蛋白表达(灰度分析)

3 讨论

ERK1/2 是丝裂原活化蛋白激酶（mitogen－activated protein kinase，MAPK）家族的重要一员，广泛表达于各种哺乳动物组织中，参与细胞外信号向细胞内蛋白的传递[7－8]。目前研究发现缺血再灌注（ischemia－reperfusion，I/R）、氧化应激、缺氧、β－肾上腺素能刺激、蒽环类药物暴露、脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）、内脂素、肿瘤坏死因子－α（tumor necrosis factor－α，TNF－α）、白细胞介素－6（interleukin－6，IL－6）、白细胞介素－1β（interleukin－1β，IL－1β）以及压力超负荷和拉伸，都是导致心脏 ERK1/2 信号激活的已知因素[9－11]，上述因素通过激活 ERK1/2 信号通路诱导心肌细胞肥大、心肌纤维化和心肌细胞凋亡，从而导致心力衰竭发生。

LncRNAs 可以调节细胞活性，包括细胞增殖、凋亡、分化和代谢[12]。许多研究证实，lncRNAs 在疾病的发生、发展和诊断中起着关键作用[13－14]。迄今为止，许多报告探讨了 lncRNAs 在心血管疾病中的作用[15－16]。MiRNAs 已被证明在细胞生物学发展中发挥作用，包括细胞增殖、凋亡、分化和代谢[17－18]。有报道称，lncRNAs 和 miRNAs 之间的相互作用在疾病的发展中起着重要作用[19－20]。有研究表明，在炎症性疾病（包括脓毒症、急性肺损伤和心肌再灌注损伤）中，lncRNA malat－1 通过与 miR－125b、miR－133、miR－146a 或 miR－203 相互作用而加速炎症[21－22]。HAN X R 等[23]研究表明 malat－1 通过 miR－133 作为竞争性内源性 RNA 调节血清反应因子（serum response factor，SRF），并在成肌细胞分化中建立了 malat－1、miR－133 和 SRF 之间的新型连接。Malat－1 调节缺氧诱导的血管生长，激活 ERK/MAPK 信号传导，并清除抗肥大的 miR－133[24]。

温阳振衰颗粒是导师陈新宇教授秉承扶阳宗旨，化裁于仲景经方之茯苓四逆汤所制，该方由制附子、红参、干姜、茯苓、五味子和甘草配伍而成，可以有效缓解慢性心力衰竭的症状和延缓病情进展，其疗效已经得到临床验证[25-26]。本细胞实验研究发现，在阿霉素诱导的心肌细胞损伤模型中，lncRNA malat-1的表达明显上调，miR-133的表达显著下降，且ERK1/2总蛋白及ERK1/2mRNA的表达无显著改变，但ERK1/2的磷酸化蛋白表达却显著上升，心肌细胞存活率也明显降低。在使用miR-133过表达和温阳振衰颗粒含药血清的组别中，lncRNA malat-1的表达明显下降，miR-133的表达明显升高，ERK1/2的磷酸化蛋白表达也显著下调，心肌细胞的存活率也相应上升。上述实验结果说明，miR-133的高表达有利于心肌细胞的存活，且与ERK1/2的蛋白磷酸化程度呈现相关性，温阳振衰颗粒可以通过调控ERK1/2的关键上游靶基因lncRNA malat-1和miR-133从而降低其蛋白磷酸化的表达，这可能是其治疗慢性心衰的重要机制之一。心肌细胞中的lncRNA malat-1/miR-133调控p-ERK1/2有可能成为治疗慢性心衰的新型生物学靶点，但具体调控模式尚需进一步研究。

参考文献

[1] MOLOCE M A, COSTACHE I I, NICOLAE A, et al. Pharmacological targets in chronic heart failure with reduced ejection fraction[J]. Life (Basel), 2022, 12(8): 1112.

[2] HUANG J Y, SU Y, MAO X C. Analysis of the application effect of multidisciplinary team cooperation model in chronic heart failure under WeChat platform [J]. Comput Intell Neurosci, 2022, 2022: 4051955.

[3] GONG X D, HU M W, LI M. Relationship of arterial tonometry and exercise in patients with chronic heart failure: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2022, 22(1): 345.

[4] TOUMPOURLEKA M, PATOULIAS D, KATSIMARDOU A, et al. Risk scores and prediction models in chronic heart failure: a comprehensive review[J]. Curr Pharm Des, 2021, 27(10): 1289-1297.

[5] 王楠，唐燕萍，蔡虎志，等. 温阳振衰颗粒对慢性心力衰竭大鼠的作用机制研究[J]. 中国临床药理学杂志，2021，37(18)：2456-2459.

[6] CHEN X Y, CAI H Z, CHEN Q Y, et al. Effects of Wenyangzhenshuai Granule on ERK1/2 and ERK5 activity in the myocardial tissue in a rabbit model of adriamycin-induced chronic heart failure[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20732-20741.

[7] HEIM P, MORANDI C, BROUWER G R, et al. Neuregulin-1 triggers GLUT4 translocation and enhances glucose uptake independently of insulin receptor substrate and ErbB3 in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867(3): 118562.

[8] WINKLER M, FRIEDRICH J, BOEDICKER C, et al. Co-targeting MCL-1 and ERK1/2 kinase induces mitochondrial apoptosis in rhabdomyosarcoma cells[J]. Transl Oncol, 2022, 16: 101313.

[9] BIAN W S, TIAN F H, JIANG L H, et al. Influence of miR-34a on myocardial apoptosis in rats with acute myocardial infarction through the ERK1/2 pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(7): 3034-3041.

[10] CHEN S H, LI Z Y, WANG Y Y, et al. BTN3A3 inhibits the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells by regulating ERK1/2 phosphorylation [J]. Front Oncol, 2022, 12: 952425.

[11] CHEN X, ZHANG Z Y, ZHANG X W, et al. Paeonol attenuates heart failure induced by transverse aortic constriction *via* ERK1/2 signalling[J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 562-569.

[12] LIU W, TAO J C, ZHU S Z, et al. Expression and regulatory network of long noncoding RNA in rats after spinal cord hemisection injury[J]. Neural Regen Res, 2022, 17(10): 2300-2304.

[13] ZHOU T, QIN G W, YANG L H, et al. LncRNA XIST regulates myocardial infarction by targeting miR-130a-3p[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8659-8667.

[14] CHE M X, GONG W Q, ZHAO Y, et al. Long noncoding RNA HCG18 inhibits the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in osteoporosis by targeting miR-30a-5p/NOTCH1 axis[J]. Mol Med, 2020, 26(1): 106.

[15] VLACHOGIANNIS N I, SACHSE M, GEORGIOPOULOS G, et al. Adenosine-to-inosine Alu RNA editing controls the stability of the pro-inflammatory long noncoding RNA NEAT1 in atherosclerotic cardiovascular disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2021, 160: 111-120.

[16] YEH C F, CHANG Y E, LU C Y, et al. Expedition to the missing link: long noncoding RNAs in cardiovascular diseases[J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 48.

[17] TANG L. Recapitulating miRNA biogenesis in cells[J]. Nat Methods, 2022, 19(1): 35.

[18] BOTELLO-FLORES Y A, YOCUPICIO-MONROY M, BALDERRÁBANO-SAUCEDO N, et al. A systematic review on the role of MSC-derived exosomal miRNAs in the treatment of heart failure[J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(9): 8953-8973.

[19] ZHANG G L, PIAN C, CHEN Z, et al. Identification of cancer-related miRNA-lncRNA biomarkers using a basic miRNA-lncRNA network[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0196681.

[20] ZHAO Z, SUN W, GUO Z Y, et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis [J]. Life Sci, 2020, 254: 116900.

[21] WANG S, YU W Q, CHEN J Y, et al. LncRNA MALAT1 sponges miR-203 to promote inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Int J Cardiol, 2018, 268: 245.

[22] GENG F, LIU W, YU L. Potential role of circulating long noncoding RNA MALAT1 in predicting disease risk, severity, and patients´survival in sepsis[J]. J Clin Lab Anal, 2019, 33(8): e22968.

[23] HAN X R, YANG F, CAO H Q, et al. Malat1 regulates serum response factor through miR-133 as a competing endogenous RNA in myogenesis[J]. FASEB J, 2015, 29(7): 3054-3064.

[24] KUWABARA Y, ONO K, HORIE T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(4): 446-454.

[25] 欧阳过，蔡虎志，王雅乐，等. 温阳振衰颗粒对心肾综合征模型大鼠血浆外泌体及心、肾组织p38MAPK表达的影响[J]. 中医杂志，2020，61(15)：1344-1349.

[26] 袁轶峰，蔡虎志，王敏，等. 温阳振衰颗粒对HK-2细胞缺氧-复氧损伤模型细胞焦亡及纤维化的影响[J]. 时珍国医国药，2022，33(6)：1296-1299.

基于 LncRNA malat－1/miR－133 通路调控 p－ERK1/2 探讨温阳振衰颗粒含药血清对阿霉素诱导 H9C2 心肌细胞损伤的影响

（正文见 89－93 页）

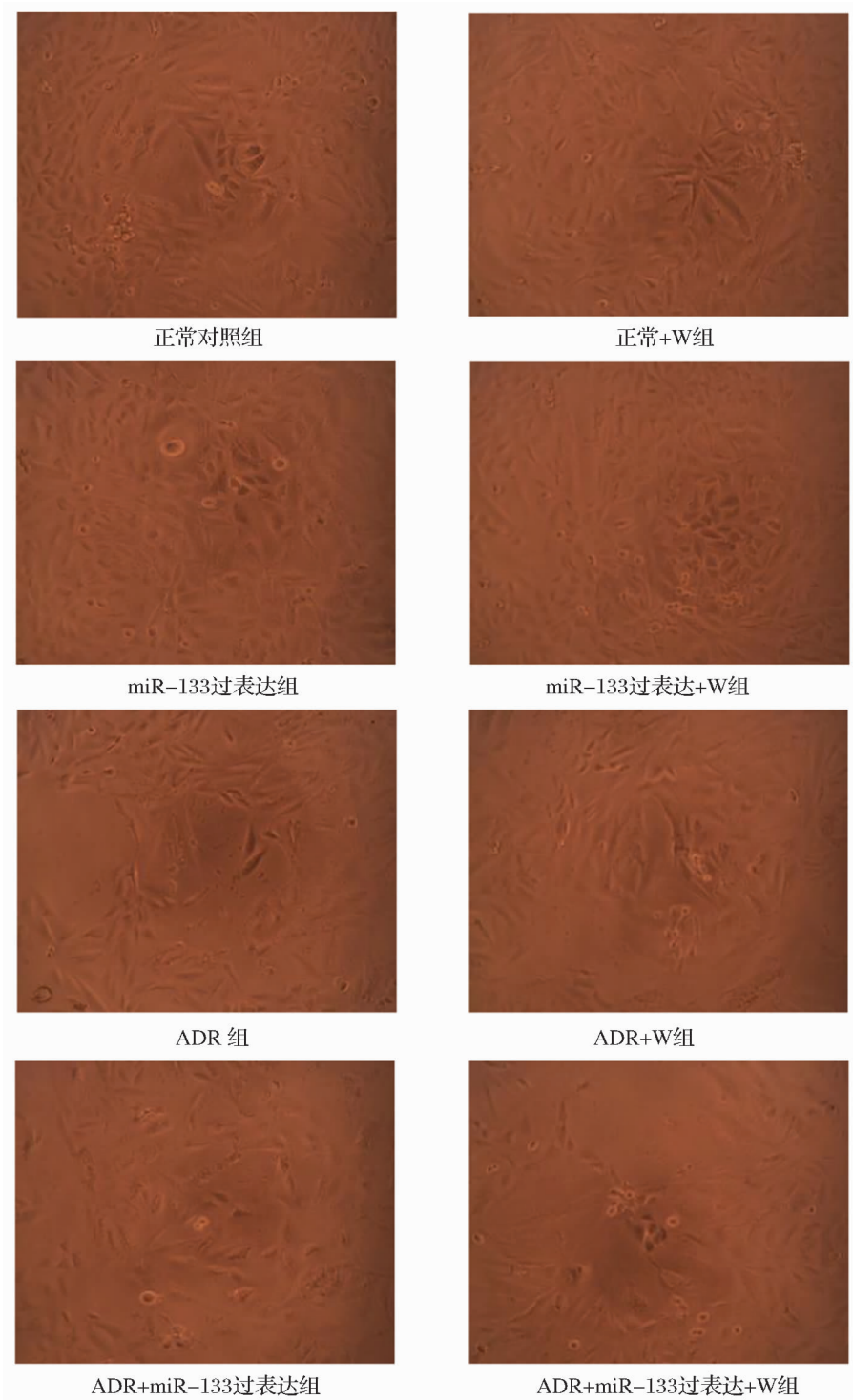


图 1 各组 H9C2 心肌细胞增殖活性（2.96 cm×3.71 cm）