

网络出版时间:2023-10-08 16:25:04 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230929.1231.021>

miR-26a-3p 靶向调控 Survivin 表达对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响

黄建成¹,李红英¹,刘佳¹,李青泉²,张会军¹,李小兵¹

摘要 目的 探讨 miR-26a-3p 对缺氧/复氧(H/R)诱导的大鼠心肌细胞(H9c2)损伤的影响及其机制。方法 取对数生长期 H9c2 心肌细胞进行缺氧(1% O₂)6 h,复氧不同时间(2、4、8、12 h)建立细胞 H/R 模型,另设常氧组,细胞计数试剂盒(CCK-8)检测细胞增殖活性;比色法检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)水平;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞中 miR-26a-3p 和生存素(Survivin) mRNA 表达水平;Western blot 检测细胞中 Survivin 蛋白表达水平。将 miR-26a-3p inhibitor 及其阴性对照 inhibitor NC、Survivin 基因 siRNA 干扰质粒(si-Survivin)及其阴性对照 si-NC 共转染至 H9c2 细胞中,随后进行 H/R 干预,CCK-8 检测各组细胞增殖水平;比色法检测各组细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及上清液中 LDH 水平;流式细胞术检测各组细胞凋亡水平;Western blot 检测各组细胞中 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、活化型半胱天冬酶-3(cleaved caspase-3)和 Survivin 蛋白表达水平;双荧光素酶测定 miR-26a-3p 和 Survivin 基因的靶向关系。结果 与常氧组细胞比较,随着复氧时间的延长,H9c2 细胞增殖活性、Survivin mRNA 和蛋白表达水平逐渐降低($P < 0.05$),而 LDH 及 miR-26a-3p 表达水平逐渐升高($P < 0.05$)。下调 miR-26a-3p 表达可提高 H/R 暴露下 H9c2 细胞增殖活性、SOD 活性、Bcl-2 蛋白表达水平($P < 0.05$),同时降低 MDA 含量、LDH 释放量、凋亡率、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平($P < 0.05$);而 Survivin 缺失可明显逆转 miR-26a-3p inhibitor 对 H/R 诱导下 H9c2 细胞的保护作用。双荧光素酶报告基因实验表明 Survivin 是 miR-93-5p 的靶基因。结论 miR-26a-3p 在 H/R 诱导的心肌细胞损伤中高表达,抑制 miR-26a-3p 表达可通过靶向上调 Survivin 表达抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡和氧化应激。

关键词 miR-26a-3p;缺氧/复氧;心肌细胞;生存素;细胞凋亡;氧化应激

中图分类号 R 542.2

2023-07-17 接收

基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(编号:20210594)

作者单位:河北医科大学第一医院¹ 心脏外科、² 心脏重症监护室,石家庄 050030

作者简介:黄建成,男,硕士,副主任医师;

李红英,女,副主任医师,副教授,责任作者, E-mail:
wyx20230419@163.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)11-1934-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.022

近年,各种心脏病的发病率和病死率持续上升,已成为人类健康的头号杀手,如先天性心脏病和缺血性心脏病。及时恢复心脏供血是预防心脏病最有效的手段,但恢复供血后,心脏反而加重损伤的现象称为缺血再灌注(ischemia reperfusion,I/R)损伤^[1]。炎症、自噬、细胞凋亡、钙超负荷、神经体液激活和氧化应激等被认为是 I/R 损伤的主要原因^[2]。因此,深入探讨心肌 I/R 损伤,寻找新的战略或药物具有重要意义。微小 RNA(microRNA,miRNA)参与心肌 I/R 损伤的病理生理学,其中,miR-26a 与心肌细胞密切相关^[3]。敲低 miR-26a 可显著降低 I/R 诱导的心肌细胞凋亡,改善大鼠心脏功能^[4]。miR-26a-3p 对急性胰腺炎胰腺细胞增殖和凋亡有调控作用^[5],但关于心脏 I/R 损伤的作用未见报道。结合生物信息学软件的预测发现存活素(Survivin)可能是 miR-26a-3p 的靶基因。Survivin 作为凋亡抑制蛋白,参与 I/R 诱导的心肌细胞凋亡^[6]。该实验以大鼠心肌细胞(H9c2)为对象,用缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation,H/R)模拟 I/R 损伤,探讨 miR-26a-3p 对心肌 I/R 损伤的影响和作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 H9c2 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;Lipofectamine® 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;TaqMan miRNA 反转录试剂盒、TaqMan miRNA 定量 PCR 试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)、TB Green® Fast qPCR Mix 购自日本 TAKARA 公司;miR-26a-3p inhibitor 及其阴性对照 inhibitor NC、miR-26a-3p mimics 及其阴性对照 mimics NC、Survivin 基因 siRNA 干扰质粒(si-Survivin)及其阴性对照 si-NC 均购自广州锐博生物科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)

活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自美国MCE公司;Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体、B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、活化型半胱天冬酶-3(cleaved caspase-3)抗体、Survivin抗体和GAPDH抗体购自英国Abcam公司;Annexin V-FITC/PI荧光双染细胞凋亡检测试剂盒购自武汉普诺赛生命科技有限公司;Dual-Lumi双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及心肌细胞H/R损伤模型建立 将复苏的H9c2细胞培养于高糖细胞培养基(含100 U/L青霉素、100 U/L链霉素、10%胎牛血清)中,置于37℃、5%CO₂培养箱内培养,进行细胞传代。取对数生长期H9c2细胞常规培养至70%融合度后,放入37℃含94%N₂、5%CO₂和1%O₂的培养箱内缺氧培养6 h,再放置在37℃含95%O₂和5%CO₂的培养箱进行复氧培养。

1.2.2 细胞转染 将对数生长期H9c2细胞使用胰酶消化后接种于6孔板中(4×10^5 个/孔),细胞密度达到80%时,根据Lipofectamin® 2000转染试剂说明书将miR-26a-3p inhibitor及其阴性对照inhibitor NC、Survivin基因siRNA干扰质粒(si-Survivin)及其阴性对照si-NC共转染至H9c2细胞中,分为inhibitor NC组、inhibitor组、inhibitor+si-NC组和inhibitor+si-Survivin组,另设置空白对照组(blank组)。转染48 h后,qRT-PCR和Western blot检测验证细胞转染效率。

1.2.3 分组处理 (1)取对数生长期H9c2细胞进行H/R干预,分组如下:常氧组:95%O₂、5%CO₂条件下培养;H6R2组:缺氧6 h复氧2 h;H6R4组:缺氧6 h复氧4 h;H6R8组:缺氧6 h复氧8 h;H6R12组:缺氧6 h复氧12 h。(2)经试验(1)确定最佳复氧时间后,将转染后的H9c2细胞进行H/R干预,分组如下:对照组(Control):未经转染的H9c2细胞在95%O₂、5%CO₂条件下培养;缺氧/复氧组(H/R):未经转染的H9c2细胞进行缺氧6 h复氧4 h;H/R+inhibitor NC组:转染miR-26a-3p inhibitors NC的H9c2细胞进行缺氧6 h复氧4 h;H/R+inhibitor组:转染miR-26a-3p inhibitor的H9c2细胞进行缺氧6 h复氧4 h;H/R+inhibitor+si-NC组:转染miR-26a-3p inhibitor和si-Survivin-NC的H9c2细胞进行

缺氧6 h复氧4 h;H/R+inhibitor+si-Survivin组:转染miR-26a-3p inhibitor和si-Survivin的H9c2细胞进行缺氧6 h复氧4 h。

1.2.4 CCK-8检测 在96孔板中接种100 μl/孔的细胞悬液(2×10^7 个/L),另设空白组接种培养基溶液,每组3重复。分组处理后,每孔加入10 μl CCK-8溶液,置于37℃、5%CO₂培养箱内孵育4 h;用酶标仪测定在450 nm处的吸光度值(OD)。细胞增殖活性以细胞存活率表示,细胞存活率(%)=(OD_{实验组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组})×100%。

1.2.5 比色法检测 分组处理后,分别收集细胞上清液和细胞悬液(1×10^8 个/L),按照试剂盒说明书检测各组细胞中SOD活性、MDA含量及上清液中LDH释放量。

1.2.6 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)检测 分组处理后收集细胞沉淀,分别加入TRIzol试剂提取总RNA,经分光光度计鉴定,总RNA浓度和纯度合格。qRT-PCR检测细胞中miR-26a-3p的表达:按照TaqMan miRNA反转录试剂盒说明书进行操作将总RNA逆转录成cDNA。取2 μg cDNA进行PCR扩增,扩增条件按照TaqMan miRNA定量PCR试剂盒说明书进行,反应条件:95℃10 min,95℃10 s,60℃30 s,72℃30 s,35个循环;qRT-PCR检测细胞中Survivin的表达:根据PrimeScript™ RT reagent Kit(Perfect Real Time)说明书进行操作合成cDNA,按照TB Green® Fast qPCR Mix说明书以cDNA为模板进行PCR反应,反应条件:94℃30 s,94℃5 s,60℃30 s,40个循环。引物序列:miR-26a-3p引物F:5'-CTAGCG-CGATGCCAACGTG-3',R:5'-GCGTGAACGGCCGT-GACG-3';Survivin引物F:5'-GCATGGGTGCCCG-ACG TTG-3',R:5'-GCTCCGCCAGAGGCTCAA-3';U6引物F:5'-GAACGTGCCGGCGTGCAG-3',R:5'-GGTGAACGCCGTGGACGCC-3';β-actin引物F:5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3',R:5'-GGGCAC-GAAGGCTCATCATT-3'。miR-26a-3p以U6为内参,Survivin以β-actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-26a-3p和Survivin mRNA的相对表达量。

1.2.7 Western blot检测 分组处理后收集细胞沉淀,进行蛋白提取并定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转聚偏二氟乙烯膜,进行5%脱脂奶粉封闭1 h,加入一抗Survivin抗体(1:1 000)、Bax抗体(1:1 000)、Bcl-2抗体(1:1 000)、cleaved caspase-3抗体(1:1 000)和GAPDH抗体(1:1 000),于

4 ℃ 孵育过夜。加入以辣根酶标记的二抗(1:10 000)室温振荡孵育1 h, 使用混合发光液曝光显色, 放入凝胶成像仪成像, 采用Image J软件计算蛋白条带灰度值, 以GAPDH为内参蛋白, 计算目的蛋白的相对表达量=目的蛋白的灰度值/内参蛋白的灰度值。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡率 使用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化收集分组处理后的细胞, 取 5×10^5 个重悬细胞, 加入500 μl稀释的1×Annexin V Binding Buffer工作液重悬细胞, 再依次加入5 μl Annexin V-FITC和10 μl碘化丙啶染色液涡旋混匀, 室温避光孵育20 min, 上流式细胞仪检测。在散点图上, 细胞凋亡率(%)=晚期凋亡及坏死的细胞百分率(Q2-2)+早期凋亡细胞百分率(Q2-4)。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验 Survivin蛋白由BIRC5基因编码, 查找BIRC5基因序列, 利用Target Scan Human 7.1在线网站预测miR-26a-3p和Survivin的靶向结合位点。根据结合位点序列, 设计合成野生型Survivin-3'-UTR(Survivin-WT)及突变型Survivin-3'-UTR(Survivin-MUT)片段序列, 构建Survivin-WT和Survivin-MUT荧光素酶报告质粒。采用Lipofectamine 2000转染试剂将miR-26a-3p mimics、mimics NC、Survivin-WT质粒和Survivin-MUT质粒分别转染至对数生长期H9c2细胞中, 共分为4组, 每组设置3个复孔。转染48 h后, 加入Cell Lysis Buffer重悬细胞, 收集细胞裂解物, 按照双荧光素酶报告检测试剂盒说明书进行操作, 并使用酶标仪分别检测萤火虫和海肾荧光素酶报告基因活性, 相对荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。

1.3 统计学处理 通过SPSS 22.0统计分析软件进行数据分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料; 多组之间的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK-q检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H/R诱导对心肌细胞增殖活性的影响 与常氧组比较, 不同复氧时间组H9c2细胞增殖活性降低, 差异有统计学意义($F = 196.149, P < 0.001$), 且随着复氧时间的增加, H9c2细胞增殖活性呈现先降低后增加的趋势。与常氧组比较, 不同复氧时间组H9c2细胞上清液中LDH释放量升高, 差异有统计学意义($F = 870.111, P < 0.001$), 随着复氧时间的增加, H9c2细胞上清液中LDH释放量呈现升高后

降低的趋势, 而H6R8与H6R12比较, 细胞增殖活性[($72.67 \pm 3.06\%$) vs ($69.00 \pm 2.65\%$)]和LDH释放量[(72.02 ± 1.90) U/L vs (74.47 ± 3.31) U/L]差异无统计学意义($P > 0.05$)。选择缺氧6 h复氧4 h作为心肌细胞H/R损伤模型诱导条件。见图1。

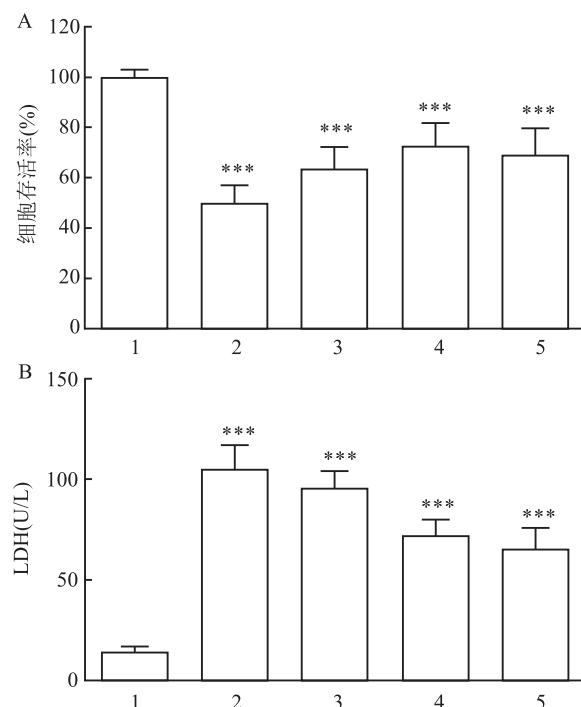


图1 不同时间复氧处理对H9c2心肌细胞的影响

A:H9c2细胞的细胞存活率;B:H9c2细胞上清液中LDH释放量;1:常氧组;2:H6R2组;3:H6R4组;4:H6R8组;5:H6R12组;与常氧组比较: *** $P < 0.001$

2.2 H/R诱导的心肌细胞中miR-26a-3p和Survivin表达水平 与常氧组比较, 不同复氧时间组H9c2细胞Survivin mRNA和蛋白表达水平降低, 而miR-26a-3p表达水平升高, 差异有统计学意义($F_{Survivin\ mRNA} = 71.481, F_{Survivin\ protein} = 179.429, F_{miR-26a-3p} = 15.691$, 均 $P < 0.001$)。此外, 随着复氧时间的增加, Survivin mRNA和蛋白表达水平呈现先降低后升高的趋势, 而miR-26a-3p表达水平呈现先升高后降低的趋势, 而H6R8与H6R12比较, Survivin mRNA[(0.40 ± 0.10) vs (0.38 ± 0.06)]和蛋白表达水平[(0.36 ± 0.06) vs (0.33 ± 0.05)]及miR-26a-3p表达水平[(5.93 ± 0.95) vs (6.08 ± 1.02)]差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图2。

2.3 抑制miR-26a-3p表达对H/R干预下心肌细胞增殖活性的影响 Western blot检测结果显示(图3A), 各组Survivin蛋白表达水平差异有统计学意义

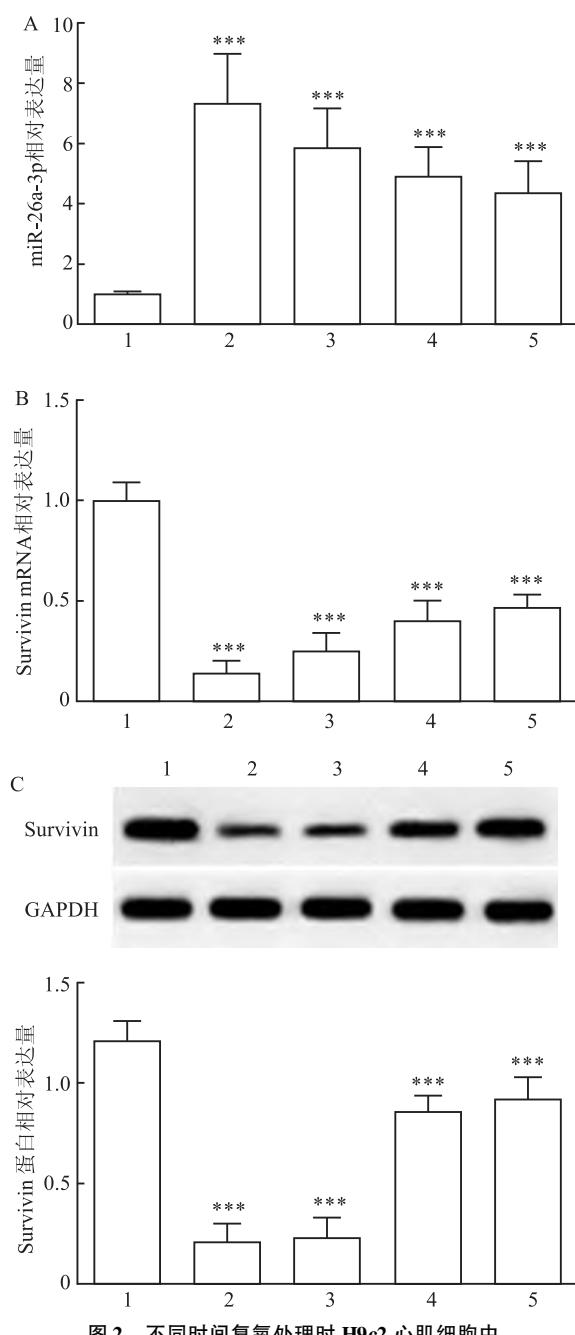


图2 不同时间复氧处理时H9c2心肌细胞中miR-26a-3p和Survivin表达水平

A-C: 不同 H/R 处理后 H9c2 细胞中 miR-36a-3p、Survivin mRNA、Survivin 蛋白的表达水平; 1: 常氧组; 2: H6R2 组; 3: H6R4 组; 4: H6R8 组; 5: H6R12 组; 与常氧组比较: *** $P < 0.001$

($F = 81.775$, $P < 0.001$)。与 blank 组 (0.15 ± 0.04) 或 inhibitor: NC 组 (0.16 ± 0.08) 比较, inhibitor 组细胞中 Survivin 蛋白表达水平 (1.14 ± 0.13) 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与 inhibitor 组比较, inhibitor + si-Survivin 组细胞中 Survivin 蛋白表达水平 (0.43 ± 0.10) 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 而 inhibitor + si-NC 组 (0.13 ± 0.11) 差

异无统计学意义 ($P > 0.05$)。CCK-8 结果显示 (图 3B), 各组 H9c2 细胞增殖活性差异有统计学意义 ($F = 252.637$, $P < 0.001$)。与 Control 组 [(100.00 ± 0.00)%] 比较, H/R 组 H9c2 细胞增殖活性 [(48.03 ± 2.00)%] 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与 H/R 组比较, H/R + inhibitor 组 H9c2 细胞增殖活性 [(83.80 ± 1.94)%] 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 而 H/R + inhibitor NC 组 [(48.22 ± 1.80)%] 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 H/R + inhibitor 组比较, H/R + inhibitor + si-Survivin 组 H9c2 细胞增殖活性 [(69.31 ± 3.51)%] 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 而 H/R + inhibitor + si-NC 组 [(85.51 ± 2.97)%] 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

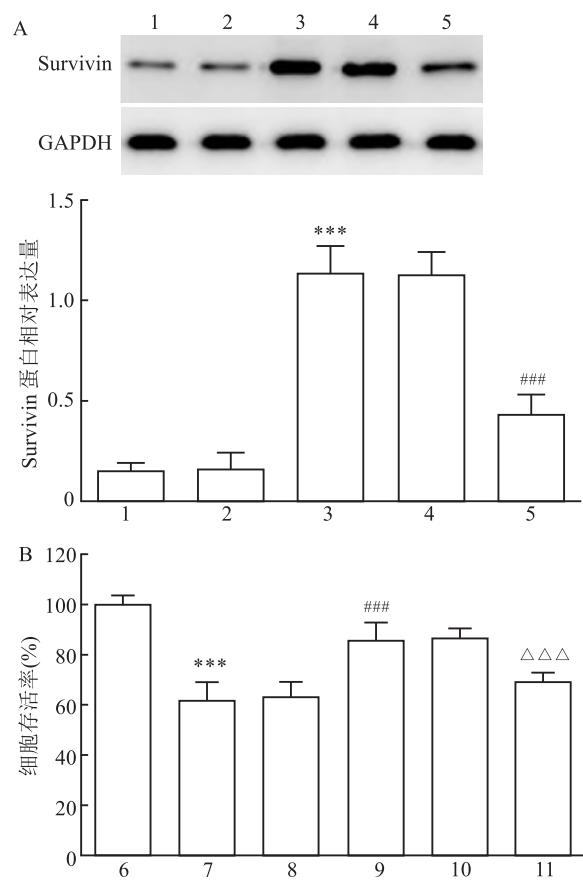


图3 抑制 miR-26a-3p 表达对 H/R 干预下 H9c2 心肌细胞中 Survivin 蛋白表达水平和增殖活性的影响

A: Western blot 检测各组 Survivin 蛋白表达水平; B: CCK-8 检测各组细胞增殖活性; 1: blank 组; 2: inhibitor NC 组; 3: inhibitor 组; 4: inhibitor + si-NC 组; 5: inhibitor + si-Survivin 组; 6: Control 组; 7: H/R 组; 8: H/R + inhibitor NC 组; 9: H/R + inhibitor 组; 10: H/R + inhibitor + si-NC 组; 11: H/R + inhibitor + si-Survivin 组; 与 blank/inhibitor NC/Control 组比较: *** $P < 0.001$; 与 H/R 组比较: ## $P < 0.001$; 与 H/R + inhibitor 组比较: △△△ $P < 0.001$

2.4 抑制 miR-26a-3p 表达对 H/R 干预下心肌细胞 SOD、MDA 及 LDH 水平的影响 各组 SOD、MDA 和 LDH 水平差异有统计学意义 ($F_{SOD} = 16.184, F_{MDA} = 21.495, F_{LDH} = 573.514, P < 0.001$)。与 Control 组比较, H/R 组 H9c2 细胞 SOD 活性降低, MDA 含量和 LDH 释放量升高, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 与 H/R 组比较, H/R + inhibitor 组 H9c2 细胞 SOD 活性升高, MDA 含量和 LDH 释放量降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 而 H/R + inhibitor NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 H/R + inhibitor 组比较, H/R + inhibitor + si-Survivin 组 H9c2 细胞 SOD 活性降低, MDA 含量和 LDH 释放量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$), 而 H/R + inhibitor + si-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

2.5 抑制 miR-26a-3p 表达对 H/R 干预下心肌细胞凋亡的影响 各组细胞凋亡率及 cleaved caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平差异有统计学意义 ($F_{\text{细胞凋亡率}} = 968.422, F_{\text{cleaved caspase-3}} = 52.139, F_{\text{Bcl-2}} = 76.854, F_{\text{Bax}} = 32.703, P < 0.001$)。与 Control 组比较, H/R 组 H9c2 细胞凋亡率及 Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平升高, 而 Bcl-2 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 与 H/R 组比较, H/R + inhibitor 组 H9c2 细胞凋亡率及 Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 而 H/R + inhibitor NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 H/R + inhibitor 组比较, H/R + inhibitor + si-Survivin 组 H9c2 细胞凋亡率及 Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 而 H/R + inhibitor + si-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

2.6 miR-26a-3p 与 Survivin 的靶向关系 qRT-PCR 结果 (图 6A) 显示, 与 blank 组或 inhibitor NC 组比较, inhibitor 组细胞中 miR-26a-3p 表达水平降低, 差异有统计学意义 [$(1.00 \pm 0.04)/(1.00 \pm 0.04) vs (6.54 \pm 1.03), F = 85.809, P < 0.001$]。Western blot 结果 (图 6B) 显示, 与 blank 组或 inhibitor NC 组比较, inhibitor 组细胞中 Survivin 蛋白表达水平显著升高 [$(0.97 \pm 0.09)/(0.99 \pm 0.05) vs (3.87 \pm 0.53), F = 86.894, P < 0.001$]。Target Scan 7.1 在线网站显示 (图 6C), Survivin 3'-UTR 区域存在与 miR-26a-3p 结合位点。双荧光素酶报告结果

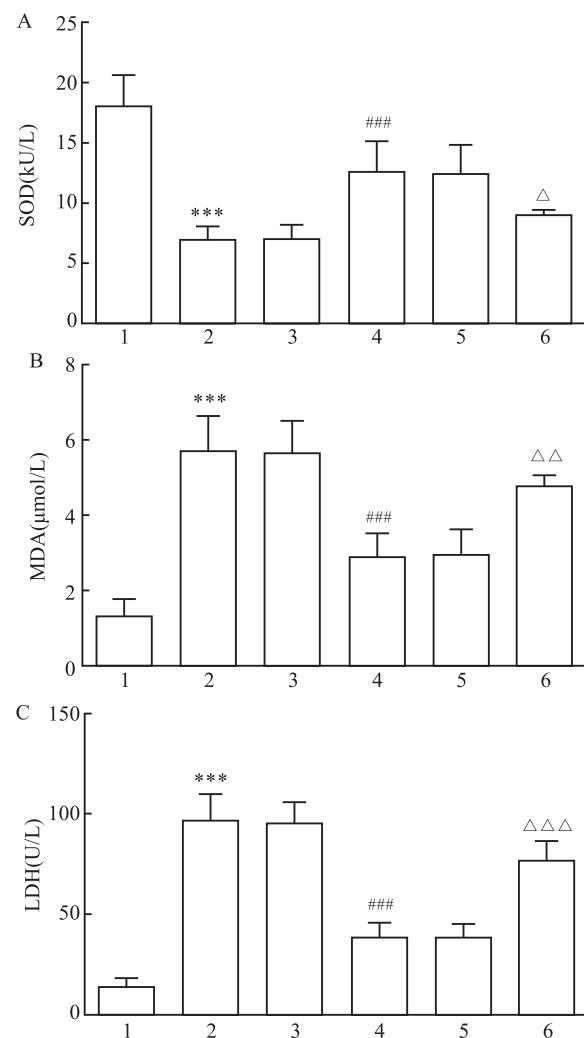


图 4 抑制 miR-26a-3p 表达对 H/R 干预下 H9c2 心肌细胞 SOD、MDA 及 LDH 水平的影响

A: SOD 活性; B: MDA 含量; C: LDH 释放量; 1: Control 组; 2: H/R 组; 3: H/R + inhibitor NC 组; 4: H/R + inhibitor 组; 5: H/R + inhibitor + si-NC 组; 6: H/R + inhibitor + si-Survivin 组; 与 Control 组比较: *** $P < 0.001$; 与 H/R 组比较: ## $P < 0.001$; 与 H/R + inhibitor 组比较: △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$, △△△ $P < 0.001$

显示 (图 6D), 转染 miR-26a-3p mimics 可降低 Survivin-WT 荧光素酶活性 [$(0.98 \pm 0.04) vs (0.26 \pm 0.06), F = 339.234, P < 0.001$], 但对 Survivin-MUT 荧光素酶活性差异无统计学意义 [$(1.00 \pm 0.00) vs (0.99 \pm 0.02), P > 0.05$]。结果提示 miR-26a-3p 可靶向调控 Survivin 表达。

3 讨论

心肌 I/R 损伤可造成心肌细胞坏死、凋亡, 脂质过氧化物增加和自由基大量生成, 而细胞凋亡是 I/R 损伤的重要发病机制^[7]。该研究表明, 经 H/R 干

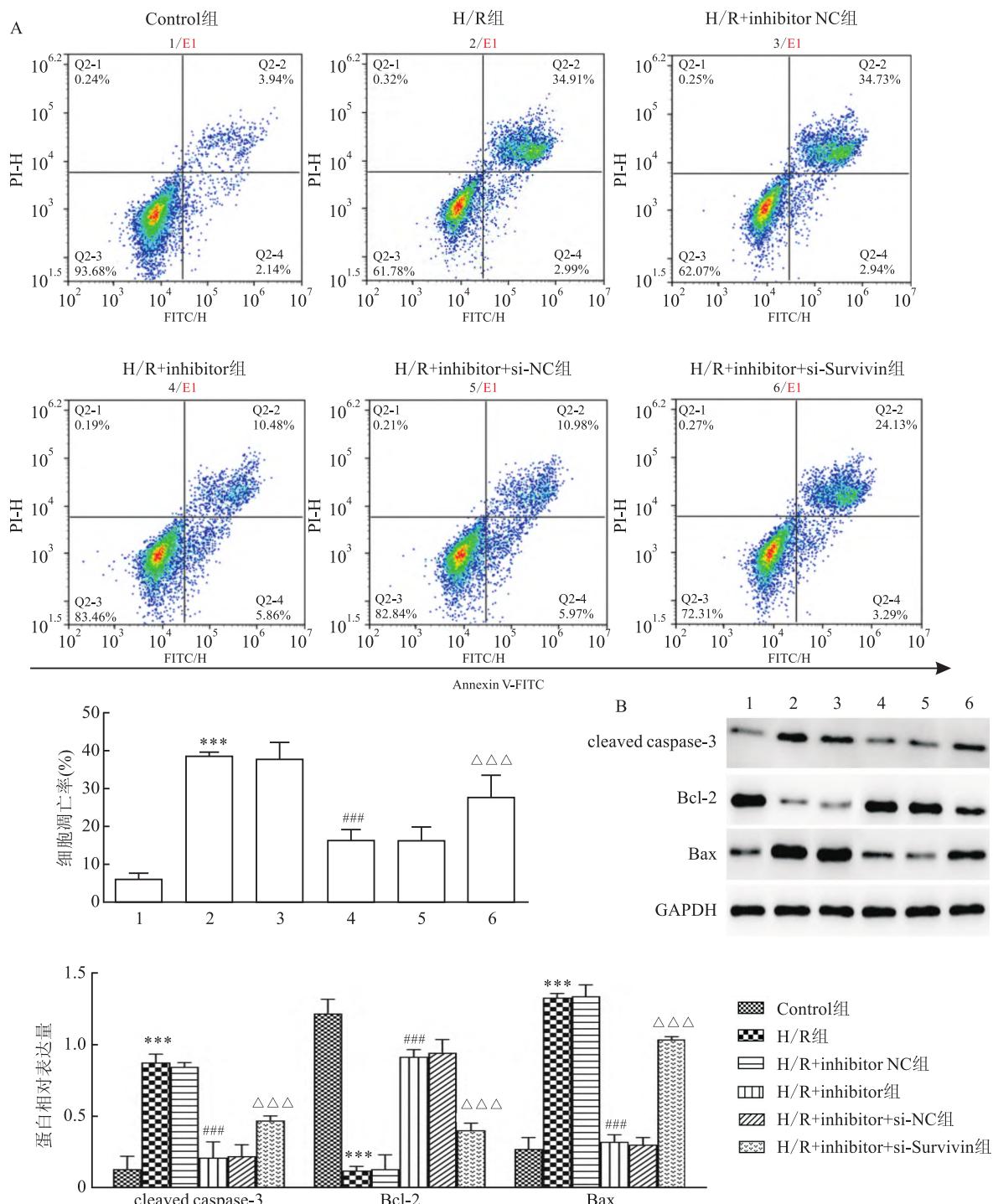


图 5 抑制 miR-26a-3p 表达对 H/R 干预下 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

A: 流式细胞术检测各组细胞凋亡水平；B: Western blot 检测 Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3 蛋白表达水平；1: Control 组；2: H/R 组；3: H/R + inhibitor NC 组；4: H/R + inhibitor 组；5: H/R + inhibitor + si-NC 组；6: H/R + inhibitor + si-Survivin 组；与 Control 组比较：***P < 0.001；与 H/R 组比较：###P < 0.001；与 H/R + inhibitor 组比较：△△△P < 0.001

预的 H9c2 细胞大量释放 LDH，细胞增殖活性降低，提示心肌细胞受损。随着复氧时间的延长，心肌细胞受损情况有所改善，但无法达到正常状态，说明 I/R 引起的损伤具有不可逆性。进一步研究表明，

受损的心肌细胞中 miR-26a-3p 高表达，Survivin 低表达。推测 miR-26a-3p 与 Survivin 可能参与心肌细胞损伤的作用机制。

多项研究^[8-9]表明 miRNA 在 I/R 损伤中通过

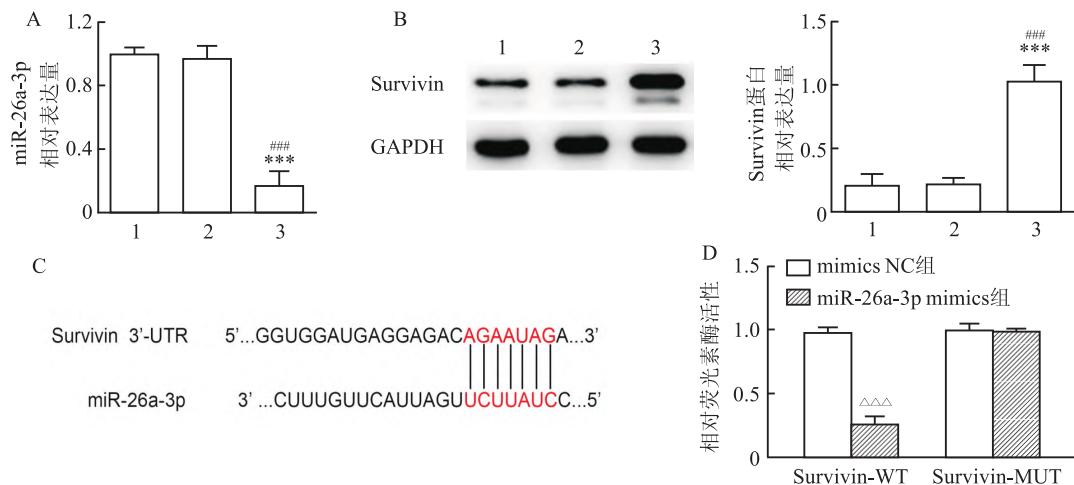


图 6 miR-26a-3p 靶向调控 Survivin 表达

A: qRT-PCR 检测各组 miR-26a-3p 的表达水平;B: Western blot 检测各组细胞中 Survivin 蛋白的表达;C: Target Scan7.1 在线预测的 miR-26a-3p 和 Survivin 3'-UTR 结合位点;D: 荧光素酶活性;1: blank 组;2: inhibitor NC 组;3: inhibitor 组;与 blank 组比较: *** P < 0.001; 与 inhibitor NC 组比较: *** P < 0.001; 与 mimics NC 组比较: △△△ P < 0.001

调控下游靶基因,影响心肌细胞凋亡,进而加重或减轻再灌注损伤。miR-26a-3p 作为 miRNA 家族的一员,主要参与神经系统疾病,具有调节神经元凋亡和海马体炎症反应的作用^[10-11]。但 miR-26a-3p 针对 I/R 损伤的研究鲜有报道。该研究表明,下调 miR-26a-3p 表达,可升高 H/R 干预下 H9c2 心肌细胞细胞增殖活性和 SOD 活性,降低 MDA 含量和 LDH 释放量。提示抑制 miR-26a-3p 表达可减轻氧化应激,提高细胞活力,改善受损心肌细胞。

Survivin 是一种在进化上高度保守的真核蛋白,具有抗细胞凋亡、抑制过度自噬、促进迁移和血管生成等作用^[12]。cleaved caspase-3 作为 caspase-3 活化形式,是参与细胞凋亡的重要蛋白酶^[13]。Bcl-2 和 Bax 相互关联并相互制约,共同作用于下游 caspase-3, 调控细胞凋亡^[14]。Survivin 可减轻心肌 I/R 损伤,通过激活 Survivin 调控 Bcl-2 和 Bax 表达,达到抗凋亡的作用^[15]。该研究表明,H/R 组心肌细胞出现明显细胞凋亡;经 miR-26a-3p inhibitor 处理后,Survivin 呈高表达,细胞内 Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白水平降低,Bcl-2 蛋白水平升高,细胞凋亡减轻。双荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-26a-3p 可靶向负调控 Survivin。为了进一步验证 miR-26a-3p 与 Survivin 的关系,将 H/R 干预的心肌细胞经 miR-26a-3p inhibitor 和 si-Survivin 共同处理后,结果显示 Survivin 缺失可明显逆转 miR-26a-3p inhibitor 对心肌细胞损伤的改善。提示,miR-26a-3p 可通过靶向负调控 Survivin 抑制心肌细胞凋亡。

参考文献

- [1] Deguchi H, Ikeda M, Ide T, et al. Roxadustat markedly reduces myocardial ischemia reperfusion injury in mice[J]. Circ J, 2020, 84(6):1028-33.
- [2] Ge X, Meng Q, Wei L, et al. Myocardial ischemia-reperfusion induced cardiac extracellular vesicles harbour proinflammatory features and aggravate heart injury[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(4):e12072.
- [3] Yao L, Lv X, Wang X. MicroRNA 26a inhibits HMGB1 expression and attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. J Pharmacol Sci, 2016, 131(1): 6-12.
- [4] Gong D D, Yu J, Yu J C, et al. Effect of miR-26a targeting GSK-3β/β-catenin signaling pathway on myocardial apoptosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(16):7073-82.
- [5] 曾小华,廖辉军,刘柏京,等.黄连调控 miR-26a-3p 对急性胰腺炎胰腺细胞增殖和凋亡的影响[J].河北医药,2021,43(10):1445-50.
- [6] Zhuo Y, Chen P F, Zhang A Z, et al. Cardioprotective effect of hydrogen sulfide in ischemic reperfusion experimental rats and its influence on expression of survivin gene [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(8):1406-10.
- [7] Yi C, Song M, Sun L, et al. Asiatic acid alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the ROS-mediated mitochondria-dependent apoptosis pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022:3267450.
- [8] Li Y, Li Z, Liu J, et al. MiR-190-5p alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting PHLPP1 [J]. Dis Markers, 2021, 2021:8709298.
- [9] Hu S, Cao S, Tong Z, et al. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autoph-

- agy [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(11):3677–88.
- [10] Wang C, Li Y, Yi Y, et al. Hippocampal microRNA-26a-3p deficit contributes to neuroinflammation and behavioral disorders via p38 MAPK signaling pathway in rats [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1):283.
- [11] Li Y, Fan C, Wang L, et al. MicroRNA-26a-3p rescues depression-like behaviors in male rats via preventing hippocampal neuronal anomalies [J]. J Clin Invest, 2021, 131(16):e148853.
- [12] Wheatley S P, Altieri D C. Survivin at a glance [J]. J Cell Sci, 2019, 132(7):jcs223826.
- [13] Wang R, Song F, Li S, et al. Salvianolic acid a attenuates CCl₄-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR, Bcl-2/Bax and caspase-3/cleaved caspase-3 signaling pathways [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13:1889–900.
- [14] Zhang Y, Yang X, Ge X, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/ cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109:726–33.
- [15] Lee B S, Oh J, Kang S K, et al. Insulin protects cardiac myocytes from doxorubicin toxicity by Sp1-mediated transactivation of Survivin [J]. PLoS One, 2015, 10(8):e0135438.

Effect of miR-26a-3p targeting Survivin on hypoxia/reoxygenation injury of H9c2 cardiomyocyte

Huang Jiancheng¹, Li Hongying¹, Liu Jia¹, Li Qingquan², Zhang Huijun¹, Li Xiaobing¹

(¹Dept of Cardiovascular Surgery, ²Cardiac Intensive Care Unit,

The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050030)

Abstract Objective To investigate the effects of miR-26a-3p on rat myocardial cell (H9c2) injury induced by hypoxia/reoxygenation (H/R) and its mechanism. **Methods** H9c2 cardiomyocytes in logarithmic growth phase were subjected to hypoxia (1% O₂) for 6 h, and reoxygenated at different times (2, 4, 8, 12 h) to establish H/R model cell. Normoxia group was also set up, and cell proliferation activity was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The level of lactic dehydrogenase (LDH) in cell supernatant was determined by colorimetry. The expression levels of miR-26a-3p and Survivin mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The expression level of Survivin protein in the cells was detected by Western blot. H9c2 cells were transfected with miR-26a-3p inhibitor and negative control inhibitor NC, Survivin gene siRNA interference plasmid (si-Survivin) and negative control si-NC, followed by H/R intervention. CCK-8 was used to detect cell proliferation in each group. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malonaldehyde (MDA) in cell and the level of LDH in supernatant were determined by colorimetry. The apoptosis level of each group was detected by flow cytometry. The protein expression levels of Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cleaved caspase-3 and Survivin were detected by Western blot. Targeting relationship between miR-26a-3p and Survivin gene was determined by dual luciferase. **Results** Compared with the normoxia group, proliferative activity, mRNA and protein expression levels of Survivin in H9c2 cells gradually decreased with the extension of reoxygenation time ($P < 0.05$), while LDH and expression level of miR-26a-3p gradually increased ($P < 0.05$). Down-regulating the expression of miR-26a-3p increased proliferative activity, SOD activity, and expression level of Bcl-2 protein in H9c2 cells exposed to H/R ($P < 0.05$), while MDA content, LDH release amount, apoptosis rate, expression levels of Bax and cleaved caspase-3 protein decreased ($P < 0.05$). Survivin deficiency reversed the protective effect of miR-26a-3p inhibitor on H9c2 cells induced by H/R. Dual luciferase reporter gene assay confirmed that Survivin was the target gene of miR-93-5p. **Conclusion** miR-26a-3p is highly expressed in cardiomyocyte injury induced by H/R. Inhibition of miR-26a-3p expression can inhibit H/R-induced cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress by targeted up-regulation of Survivin expression.

Key words miR-26a-3p; hypoxia/reoxygenation; cardiomyocyte; survivin; cell apoptosis; oxidative stress