

血浆外泌体源性 miR-29b-3p 靶向 IGF1 对七氟醚后处理低氧/复氧心肌细胞损伤的作用

邓方方¹, 李继勇¹, 张 力¹, 邹高锐¹, 陈治军¹, 乐 薇²

摘要 目的 探讨心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠血浆外泌体源性 miR-29b-3p 靶向 IGF1 在七氟醚(SEV)后处理的低氧/复氧(H/R)心肌细胞中的作用。方法 借助 GEO 数据库筛选在 MIRI 中差异表达的 miRNAs,通过 H/R 处理心肌细胞以构建 MIRI 细胞模型。干预经 SEV 后处理的 MIRI 细胞模型中 miR-29b-3p 和 IGF1 的表达,随后通过 MTT 检测心肌细胞存活率,流式细胞术检测细胞凋亡,ELISA 检测各组心肌细胞中炎症因子(IL-1 β 和 TNF- α)的变化。结果 与 Normal 组比较,miR-29b-3p 在 MIRI 大鼠血浆外泌体中表达增强($P < 0.05$),miR-29b-3p 和 IGF1 的靶向结合关系被证实($P < 0.05$)。SEV 后处理后,H/R 刺激的心肌细胞中 miR-29b-3p 的表达降低,而 IGF1 的表达升高(均 $P < 0.05$)。血浆外泌体中 miR-29b-3p 过表达可明显抑制 SEV 后处理的 H/R 细胞存活率,加重细胞凋亡和炎症反应,敲减 miR-29b-3p 则相反(均 $P < 0.05$)。挽救实验数据表明,过表达 IGF1 可部分逆转过表达 miR-29b-3p 对 SEV 后处理的 H/R 细胞损伤的影响(均 $P < 0.05$)。结论 血浆外泌体源性 miR-29b-3p 靶向 IGF1 促进 SEV 后处理的 H/R 心肌细胞损伤。**关键词** 血浆外泌体;miR-29b-3p;IGF1;七氟醚;心肌细胞损伤

中图分类号 R 542.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)09-1450-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.004

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)是指心肌在发生缺血后再次灌注后受到的损伤,MIRI 能够导致心肌细胞凋亡、坏死增多,引起严重心血管疾病^[1]。七氟醚(sevoflurane, SEV)是临床常用麻醉药物,研究表明 SEV 预处理和后处理在低氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)导致的心肌细胞损伤中具有保护作用,但是该作用也受到诸如基因、小分子 RNA 等多

种因素的影响^[2]。

有研究^[3]发现 miR-29 在 MIRI 大鼠心肌组织中表达上调,抑制 miR-29 的表达对于 MIRI 具有保护作用。此外也有研究表明抑制巨噬细胞外泌体中 miR-29 的表达则能够显著改善 H/R 对心肌细胞的损害^[4]。胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF1)是一种碱性多肽,在人体的免疫、代谢以及多种细胞的生长中发挥作用,有研究发现脂肪干细胞能够促进心肌细胞再生,且该作用可能与促进 IGF1 的表达有关^[5]。该研究将结合生物信息学分析以及基础实验,对血浆外泌体源性 miR-29b-3p 调控 IGF1 影响 SEV 处理的 H/R 心肌细胞及其具体机制进行探讨。

1 方法

1.1 实验动物 12 只成年雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体质量(210 ± 20)g,购自武汉大学动物实验中心。

1.2 仪器与试剂 戊巴比妥钠购自武汉科昊佳生物技术有限公司;真空负压采血管购自济南千司生物技术有限公司;HieffTM Quick 外泌体分离试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;外泌体转染试剂盒购自上海觅拓生物科技有限公司;DMEM 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;LipofectamineTM 3000 试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;SEV 购自厦门慧嘉生物科技有限公司;实验所需的质粒或载体由长沙艾碧维生物科技有限公司设计并合成;大鼠白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 的 ELISA 试剂盒购自上海通蔚实业有限公司;AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自上海抚生实业有限公司;MTT 试剂盒购自上海歌凡生物科技有限公司;Luciferase 荧光素酶报告检测试剂盒购自艾美捷科技有限公司;血浆/血清 miRNA 提取分离试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司;TRIzol 试剂和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;EasyScriptR First-Strand cDNA Synthesis

2023-08-02 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82071247);武汉市医学科研项目(编号:WX21D26)

作者单位:武汉市第一医院¹ 麻醉科、² 针灸科,武汉 430022

作者简介:邓方方,男,本科;

乐 薇,女,博士,副主任医师,责任作者, E-mail: 57342375@qq.com

SuperMix 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;PowerUp™ SYBR® Green Master Mix 试剂盒购自北京雅安达生物技术有限公司;RIPA 裂解缓冲液购自上海康朗生物科技有限公司;辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 购自上海远慕生物科技有限公司;ECL 化学发光检测试剂盒来自爱必信(上海)生物科技有限公司;CD9、CD63 和 β -肌动蛋白抗体均购自英国 Abcam 公司;透射电子显微镜购自北京欧波同光学技术有限公司;酶标仪购自上海巴玖实业有限公司;流式细胞仪购自上海三崑医疗设备有限公司;共聚焦显微镜购自 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 生物信息学分析 从 NCBI 数据库获取 GEO 芯片表达数据,选择 GSE74951 进行 MIRI 后血浆 microRNA 阵列分析,limma 包对进行对差异表达的基因进行筛选,筛选条件为 $\text{adj. } P. \text{Val} < 0.05$ 和 $|\text{Log}|\text{Fold Change}| > 2^{[6]}$ 。将其中最为显著差异表达的 miRNAs 利用 pheatmap 包绘制为热图。TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/)、miRDB (<http://mirdb.org>) 获取 miRNAs 的下游靶基因并取交集。借助 Venn 在线网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 绘制交集基因。将这些交集靶基因通过在线生物信息学工具 DAVID6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 数据库进行进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,绘制气泡图。

1.3.2 MIRI 大鼠模型建立 分别随机选取 6 只大鼠设为 MIRI 组和 Normal 组。首先采用戊巴比妥钠麻醉大鼠,麻醉后行心电监测和血管切开,使大鼠左侧颈总动脉暴露后于大鼠胸部左侧 3~4 肋骨间将胸腔和心包膜打开,使心脏暴露。之后再左心耳下部分以及肺动脉圆锥之间,从左侧冠状动脉浅心肌层穿过一根丝线,丝线两端使聚乙烯塑料管穿过,丝线末端借助动脉夹固定。借助动脉夹打开以及收紧造成大鼠冠状动脉的阻塞和通畅。观察心电图,计算室速和室颤的起始以及持续时间。心电图显示大鼠 ST 段抬高、反复灌注结束后心率失常则认为建模成功。Normal 组仅做开胸处理,不结扎。

1.3.3 血浆样本收集 采用含有 EDTA 抗凝剂的真空负压采血管于清晨对大鼠的外周血进行采集,在 3h 内采用 3 000 r/min 离心 10~15 min,小心去除上清液,加入 200 μl PBS 缓冲液重悬,即获得血浆外泌体悬液,放置于 -80°C 下保存。

1.3.4 血浆外泌体分离 取出部分样品于冰上溶解,待充分溶解后转移至无 RNA 酶的 EP 管中。在 4°C 下 3 000 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,上清转移至新的离心管。再次以 10 000 r/min 离心 15 min,弃去沉淀,转移。依据外泌体分离试剂盒说明书的指示分离外泌体。向样品中加入 $1 \times \text{PBS}$ 稀释,混匀后加入 41202-A 工作液,涡旋振荡 1min 后于 4°C 下静置 1.5 h 后再次以 10 000 r/min 离心 1 h。收集沉淀用 PBS 重悬,转移至新的 EP 管中再次以 12 000 r/min 离心,上清液中富含着外泌体颗粒。如见明显沉淀,则再次重悬后离心。随后进行外泌体纯化:用 100 kD 超滤管于 4°C 下以 15 000 r/min 离心 20min,内管中的颗粒即为纯化后的外泌体。随后使用 0.22 μm 的滤器进行除菌操作。

1.3.5 血浆外泌体鉴定 采用透射电子显微镜(TEM)对外泌体的形态进行鉴定:取 15 μl 外泌体悬液滴于 200 目的载样铜网上,静置 2 min 后将滤液吸干。2% 醋乙酸铀酰染色 15 s,室温下自然干燥后将铜网安装在 100 KV 的透射电镜上,观察外泌体的形态并拍照。然后利用 Western blot 检测外泌体相关标志物(CD63,CD9)的表达情况。检测方法参照 1.3.13 中方法。

1.3.6 外泌体转染以及细胞分组 依据外泌体转染试剂盒说明书要求将 miR-29b-3p mimic(miR-29b-3p 模拟物)、miR-29b-3p inhibitor(miR-29b-3p 抑制剂)及阴性对照 inhibitor NC、mimic NC 转入血浆外泌体中。细胞转染步骤依据试剂说明书进行。

1.3.7 MIRI 细胞模型建立以及心肌细胞转染 雄性 Sprague-Dawley 大鼠体重质量(210 ± 20) g,用于心肌细胞分离。常规饲喂清洁饲料,在(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 的 12/12 h 光/暗周期下自由获取食物和水。本研究经武汉市第一医院动物中心动物伦理委员会批准(批号:230118)。解剖心室组织,切成约 1 mm^3 的块,PBS 清洗后用胰酶和 II 型胶原酶消化。将细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中重悬,70 μm 细胞过滤器过滤。随后将分离的心肌细胞在 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。将处于对数生长期的心肌细胞接种至 6 孔板,随后使用 Lipofectamine™ 3000 进行瞬时转染并分为如下组:Control 组不做任何处理、H/R 组仅做缺氧/复氧处理、Sev 组接受缺氧/复氧和 Sev 处理、miR-29b-3p mimic exo + vector 组(心肌细胞中加入过表达 miR-29b-3p 的外泌体并且转染空载体)、miR-29b-3p mimic exo + IGF1 组(心肌细胞中加入过表达 miR-

29b-3p 的外泌体并且转染 IGF1)。转染 48 h 后将细胞进行缺氧/复氧处理。首先细胞缺氧 2 h, 3% SEV 后处理 20 min, 复氧 40 min。当细胞贴壁后转移至不含血清、葡萄糖的 DMEM 培养基, 在 37 ℃、5% CO₂、95% N₂ 中缺氧培养 4 h, 弃去培养基更换含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基, 在 37 ℃、5% CO₂、95% 空气中继续培养 2 h。

1.3.8 ELISA 检测 取经 SEV 后处理的心肌细胞培养上清液, 稀释后采用大鼠 IL-1 β 、TNF- α 的 ELISA 试剂盒分别检测 MIRI 心肌细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 的水平。设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品, 样本孔先加待测样本, 再加样本稀释液; 除空白外, 标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体, 封板膜封住反应孔, 37 ℃ 恒温箱温育 60 min。弃去液体, 吸水纸上拍干, 加满洗涤液, 静置 1 min, 甩去拍干, 洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μ l, 37 ℃ 避光孵育 15 min。加入终止液, 15 min 内, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的光密度 (optical density, OD) 值。

1.3.9 流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞贴壁后用不含 EDTA 的胰酶消化, 经过 3 次 PBS 洗涤后, 以 1 500 r/min 的速度离心, 去掉上清液。用 1X 上样缓冲液将细胞重悬, 将细胞悬液中分别加入 5 μ l FITC 标记的 Annexin V-异硫氰酸酯和碘化丙啶工作液, 混匀后在避光条件孵育 30 min, 用流式细胞仪检测。

1.3.10 MTT 检测细胞存活率 将 10% MTT 添加到生长培养基后, 将处理后的细胞接种在 96 孔板中, 随后在 37 ℃、5% CO₂ 下培养过夜。随后加入二甲基亚砜 (DMSO) 在摇床上振荡孵育 10 min。结晶产物溶解后在酶联免疫检测仪检测在波长 490 nm 处的吸光度值。

1.3.11 双荧光素酶验证靶向关系 使用生物信息学软件对 miR-29b-3p 和 IGF1 的靶向关系进行预测和分析。用 PCR 扩增含有 miR-29b-3p 结合位点的 IGF1 基因的 3'UTR 序列。将 IGF1-3'UTR 克隆到 pMIR-REPORT 荧光素酶载体 IGF1-WT (野生型) 中。扩增 IGF1-3'UTR 结合位点的突变, 克隆到 IGF1-MUT (突变型) 质粒中。将细胞分为 miR-29b-3p mimic + IGF1-WT 组、miR-29b-3p mimic + IGF1-MUT 组、miR-29b-3p mimic NC + IGF1-WT 组、miR-29b-3p mimic NC + IGF1-MUT 组。根据 Lipo-

fectamine 3000 试剂 (Invitrogen) 说明书将 miR-29b-3p mimic 或 miR-29b-3p mimic NC 和荧光素酶质粒 IGF1-WT 或 IGF1-MUT 按照分组联合转染到细胞中。转染 6 h 更换完全培养基, 48 h 后 PBS 洗涤。避光加入 Luciferase Assay Reagent 试剂, 检测荧光素酶的反应强度。

1.3.12 qRT-PCR 检测 用血浆/血清 miRNA 提取分离试剂盒提取血浆中总 RNA, 加入裂解液振荡匀浆, 室温放置 5 min, 加入 200 μ l 氯甲烷, 振荡后室温放置 5 min。在 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min, 水相转移加入无水乙醇混匀, 转入吸附柱室温放置, 再次离心 30 s, 向吸附柱中加入去蛋白液 MRD 静置, 离心, 弃废液。漂洗液漂洗后离心弃废液。再次离心 2 min。吸附柱转入新 EP 管加入 RNase-Free ddH₂O, 静置, 离心 2 min。采用 TRIzol 法提取血浆外泌体中 RNA, 具体操作详见 TRIzol 说明书。提取的 RNA 作为样本, 按照 EasyScriptR First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 操作说明书以 RNA 为模版逆转录, 使用 PowerUpTM SYBR[®] Green Master Mix 进行 PCR。结果使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 公式作进一步计算, 以 U6 作为 miRNAs 的内参, 其余内参为 GAPDH。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列 (5' - 3')

基因名称	引物序列
miR-29b-3p	F: TGCCTTAATTTTCACGGTTAT R: TTTGGTCCAGCCAATTTA
IGF1	F: CTTAGGAATTGTCAATGATC R: CGTGTGGGTAATCCATTATTCG
U6	F: TTGTGAGGTGGGGTGGGTC R: GCGCATGTCTAACGGATTCT
GAPDH	F: TGAAATTGGAGTGAGCTACGGTT R: ATGAGCAACCTAACCGTCTTGT

1.3.13 蛋白印迹试验 用 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白, 然后用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量。蛋白质样品用 5 倍负载缓冲液混合, 用 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS) - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。然后, 将蛋白质转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 在 37 ℃ 的 5.0% 脱脂牛奶中浸泡 45 min, 然后与一抗孵育, 包括 β -肌动蛋白、CD9、CD63。随后, 将膜与辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 在室温下孵育 1 h。用 ECL 化学发光检测试剂盒检测蛋白质条带。以 β -肌动蛋白为内参比。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件分析本研究中数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分

布和方差齐性的前提下,两组间数据比较采用 t 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析,进一步组内两两比较使用 SNK- q 检验。不符合正态分布和方差齐性的数据则两组间比较采用 Wilcoxon 符号秩检验或 Kruskal-Wallis 检验,多组比较采用 Friedman 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SEV 后处理减轻 H/R 心肌细胞损伤 如图 1 所示,与 Control 组比较,H/R 组心肌细胞的增殖能力减弱,凋亡率和炎症因子(IL-1 β 和 TNF- α) 浓度均升高(均 $P < 0.05$)。而较 H/R 组细胞相比,SEV 治疗后的细胞增殖能力增强、凋亡率及炎症因子浓度(均 $P < 0.05$) 均降低。提示 SEV 后处理可减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

2.2 miR-29b-3p 在 MIRI 大鼠血浆外泌体中表达增强 分析 GSE74951 芯片共发现 68 个与 MIRI 相关的 miRNA,其中 30 个表达显著上调,选取差异表达显著的 miRNA 绘制差异 miRNA 表达热图(图 2A)。经查阅相关文献将 miR-29b-3p 纳入研究。分离 MIRI 大鼠血浆外泌体,电子显微镜分析显示

外泌体形态多为杯状或圆形(图 2B),Western blot 检测发现,与无外泌体血浆组比较,外泌体中 CD9 和 CD63 的蛋白表达增强(均 $P < 0.05$) (图 2C - D)。对大鼠血浆外泌体中 miR-29b-3p 的表达进行检测后发现,相对于正常大鼠,MIRI 大鼠血浆外泌体中 miR-29b-3p 表达显著增强且差异具有统计学意义($t = 12.45$, $P = 0.0002$) (图 2E)。

2.3 IGF1 被证实为 miR-29b-3p 的靶基因 借助 Targetscan 和 miRDB 查找 miR-29b-3p 的靶基因并取交集,结果显示共 518 个交集基因(图 3A)。将上述靶基因于 David 网站中做 KEGG 富集分析并且取富集程度较高的前 10 个通路绘制气泡图(图 3B)。将关注点放在 PI3K/AKT 信号通路上面,对该通路中的富集基因进行蛋白互作用分析,发现 IGF1 和其他基因间存在较紧密的联系(图 3C)。因此选择 IGF1 作为重点关注基因。IGF1 和 miR-29b-3p 的靶向结合位点见图 2D,双荧光素酶报告实验进一步验证了 miR-29b-3p 和 IGF1 的靶向关系(图 3E)。

2.4 SEV 后处理降低 H/R 刺激的心肌细胞中 miR-29b-3p 的表达及升高 IGF1 的表达 为了研究 SEV 后处理在 H/R 损伤中的潜在分子机制,本

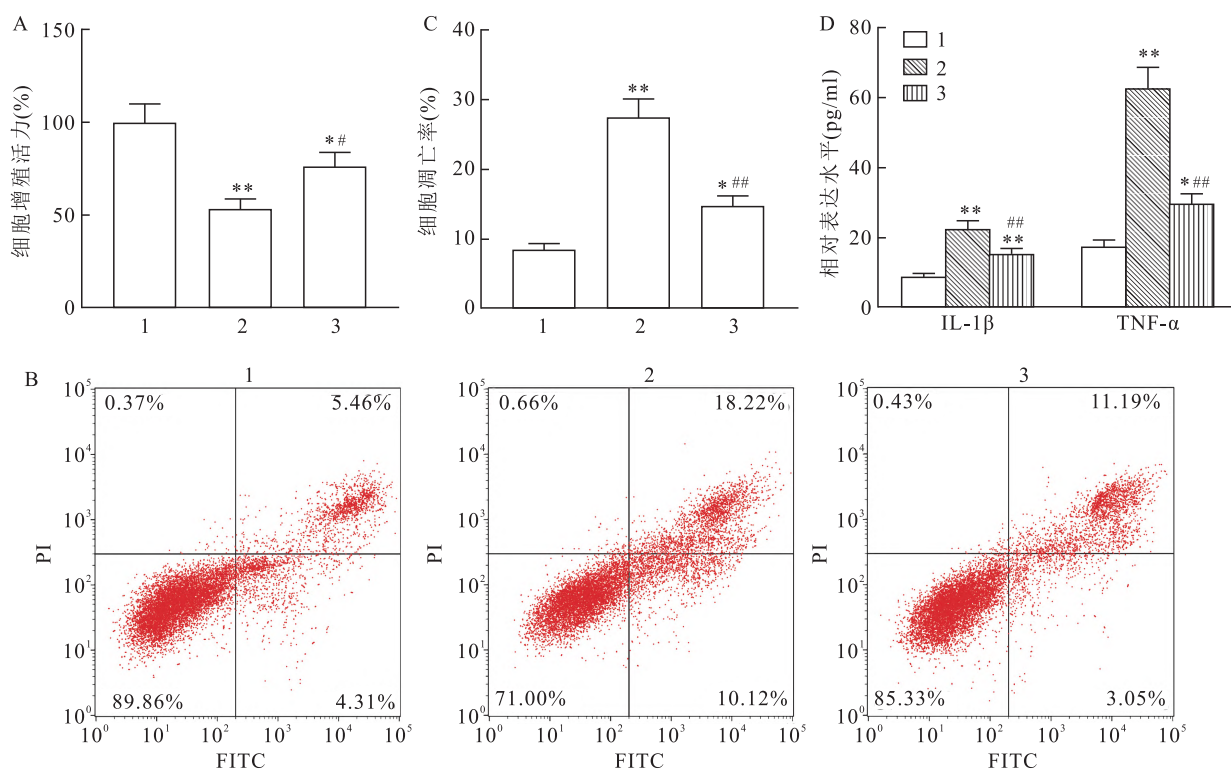


图1 SEV 治疗减轻 H/R 心肌细胞损伤

A: MTT 法检测细胞增殖活力; B - C: 流式细胞术检测细胞凋亡; D: ELISA 法检测 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度; 1: Control 组; 2: H/R 组; 3: SEV 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 H/R 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

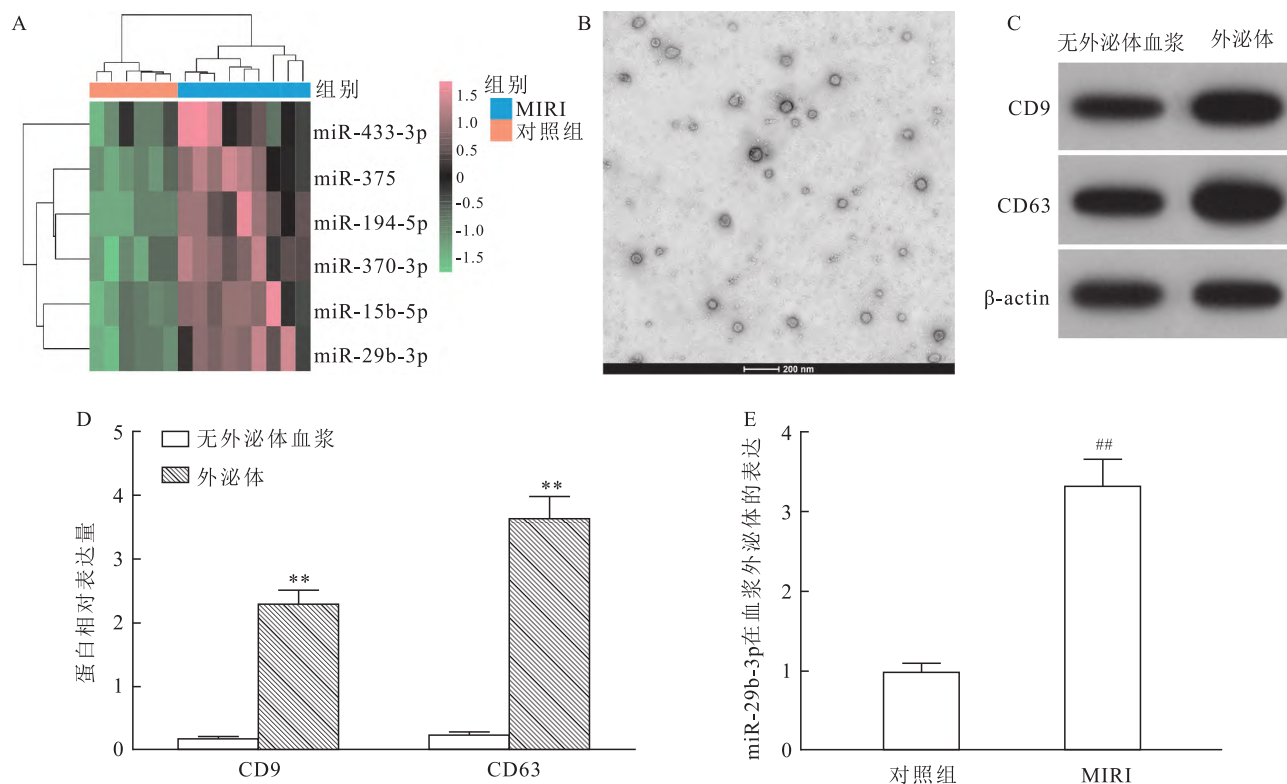


图2 miR-29b-3p在MIRI大鼠血浆外泌体中表达增强

A: 差异 miRNAs 的表达热图; B: 外泌体分离电镜图 $\times 20\ 000$; C - D: Western blot 检测得到 CD9 和 CD63 的蛋白表达水平; E: Normal 和 MIRI 大鼠血浆外泌体中 miR-29b-3p 的表达; 与无外泌体血浆组比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: ## $P < 0.01$

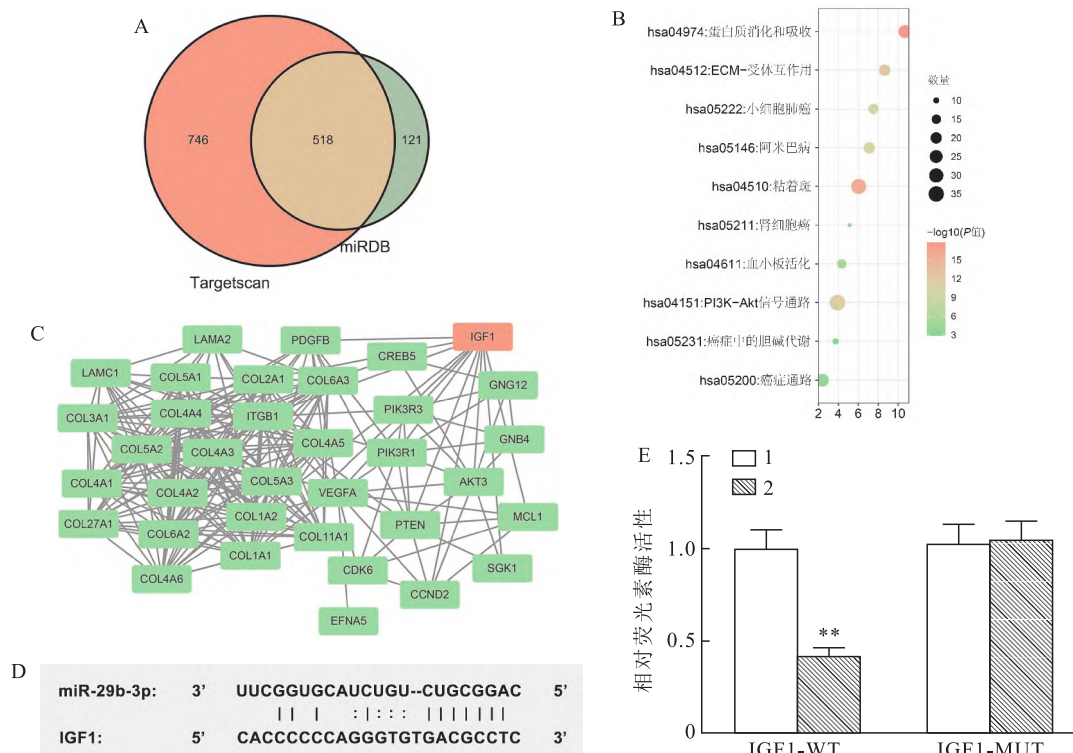


图3 miR-29b-3p和IGF1的靶向关系验证

A: Targetscan 和 miRDB 预测 miR-29b-3p 的靶基因; B: KEGG 富集分析结果; C: 蛋白互作分析结果; D: miR-29b-3p 个 IGF1 的特异性结合位点; E: 双荧光素酶报告实验结果; 1: miR-NC 组; 2: miR-29b-3p mimic 组; 与 miR-NC 组比较: ** $P < 0.01$

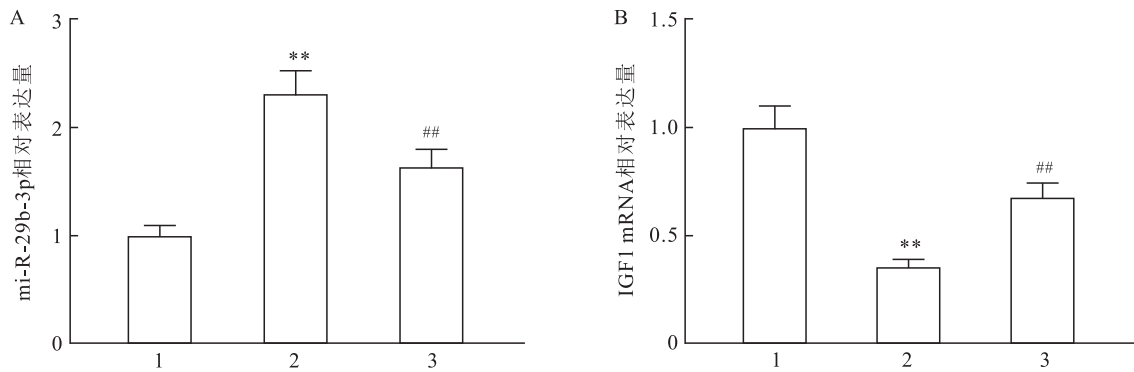


图4 SEV后处理对H/R刺激的心肌细胞中miR-29b-3p和IGF1表达的影响

A-B: qRT-PCR检测miR-29b-3p和IGF1在各组细胞中的表达; 1: Control组; 2: H/R组; 3: SEV组; 与Control组比较: ** $P < 0.01$; 与H/R组比较: ## $P < 0.01$

研究采用qRT-PCR检测miR-29b-3p和IGF1的表达变化。图4数据显示,与Control组相比,miR-29b-3p在H/R组细胞中表达升高,而IGF1表达降低($P < 0.05$)。与H/R组细胞相比,SEV组中miR-29b-3p的表达降低,而IGF1表达升高($P < 0.05$)。这些数据提示SEV后处理减轻的H/R刺激的心肌细胞损伤可能是通过调节miR-29b-3p和IGF1进行的。

2.5 血浆外泌体源性miR-29b-3p能够促进SEV后处理的H/R心肌细胞损伤 MTT和流式细胞术实验结果显示,过表达外泌体中miR-29b-3p明显降低心肌细胞增殖活力,提高细胞凋亡率,对SEV的治疗效果起抑制作用(均 $P < 0.05$)。而敲减miR-29b-3p则协同SEV进一步提高心肌细胞增殖活力,降低凋亡率($P < 0.05$)。此外,过表达miR-29b-3p显著升高IL-1 β 和TNF- α 的浓度,而敲减miR-29b-

3p则效果反转($P < 0.05$)。见表2。

2.6 过表达IGF1可部分挽救过表达miR-29b-3p对SEV后处理的H/R心肌细胞损伤的影响 将心肌细胞与转染miR-29b-3p mimic或mimic NC的血浆外泌体共孵育后,对心肌细胞转染vector或IGF1,进行SEV处理。结果显示,与SEV+mimic NC-exos组比较,SEV+miR-29b-3p mimic-exos组的细胞增殖活力被抑制,凋亡率增加,炎症因子浓度增加(均 $P < 0.05$)。与SEV+miR-29b-3p mimic-exos+vector组比较,SEV+miR-29b-3p mimic-exos+IGF1组细胞增殖活力提高,细胞凋亡减少,炎症因子浓度被抑制(均 $P < 0.05$)。见表3。表明过表达miR-29b-3p加重的心肌细胞凋亡和炎症反应,抑制的细胞存活率均通过过表达IGF1得到部分挽救。提示miR-29b-3p可通过靶向IGF1参与调控SEV后处理的H/R诱导的心肌细胞损伤。

表2 各组细胞增殖、凋亡和炎症因子表达检测结果[$n(\%)$, $\bar{x} \pm s$]

组别	细胞增殖活力(%)	细胞凋亡率(%)	IL-1 β 浓度(pg/ml)	TNF- α 浓度(pg/ml)
SEV+mimic NC-exos	60.48 $\pm$ 5.19	17.96 $\pm$ 1.72	16.04 $\pm$ 1.56	29.45 $\pm$ 2.82
SEV+miR-29b-3p mimic-exos	25.41 $\pm$ 2.12 **	36.47 $\pm$ 3.21 **	48.07 $\pm$ 4.52 **	79.46 $\pm$ 7.21 **
SEV+inhibitor NC-exos	61.08 $\pm$ 5.21	18.17 $\pm$ 1.78	15.98 $\pm$ 1.55	29.07 $\pm$ 2.81
SEV+miR-29b-3p inhibitor-exos	114.57 $\pm$ 10.05 ##	7.41 $\pm$ 0.71 ##	5.74 $\pm$ 0.51 ##	11.45 $\pm$ 1.23 ##

与SEV+mimic NC-exos组比较: ** $P < 0.01$; 与SEV+inhibitor NC-exos组比较: ## $P < 0.01$

表3 各组细胞增殖、凋亡和炎症因子表达检测结果[$n(\%)$, $\bar{x} \pm s$]

组别	细胞增殖活力(%)	细胞凋亡率(%)	IL-1 β 浓度(pg/ml)	TNF- α 浓度(pg/ml)
SEV+mimic NC-exos	68.24 $\pm$ 6.45	17.82 $\pm$ 1.69	17.22 $\pm$ 1.53	29.88 $\pm$ 2.79
SEV+miR-29b-3p mimic-exos	22.43 $\pm$ 2.01 **	36.58 $\pm$ 3.31 **	55.41 $\pm$ 5.07 **	82.33 $\pm$ 7.68 **
SEV+miR-29b-3p mimic-exos+vector	21.36 $\pm$ 1.98	37.42 $\pm$ 3.36	54.68 $\pm$ 5.13	81.95 $\pm$ 7.69
SEV+miR-29b-3p mimic-exos+IGF1	31.44 $\pm$ 2.89 ##	26.51 $\pm$ 2.44 ##	34.20 $\pm$ 3.05 ##	49.63 $\pm$ 4.67 ##

与SEV+mimic NC-exos组比较: ** $P < 0.01$; 与SEV+miR-29b-3p mimic-exos+vector组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

既往研究^[7]表明,SEV 后处理可增强心脏对缺血再灌注损伤的抵抗力。本研究首先通过细胞实验发现 SEV 后处理 H/R 损伤的心肌细胞时,细胞增殖增加,细胞凋亡和炎症反应受到抑制,表明 SEV 后处理在 H/R 损伤中起到心脏保护作用。

miRNAs 以往被证实参与 SEV 后处理对缺血再灌注损伤的心脏保护机制,如在 I/R 损伤小鼠中,miR-155 过度表达可降低 SEV 治疗缺血再灌注小鼠的心功能,增加梗死面积^[8]。此外 Jiang et al^[9]在研究中发现 SEV 后处理能够通过上调 miR-107 靶向 STRADA 降低大鼠心肌细胞 H/R 损伤。这些研究表明,不同的 miRNAs 在心脏保护中具有不同的作用机制。本研究通过 GEO 数据库查找 MIRI 相关芯片并且发现 miR-29b-3p 在 MIRI 中表达显著上调。He et al^[10]在研究中证实 miR-29b-3p 能够通过靶向 PTX3 加重心脏 H/R 损伤。另有研究^[4]显示,miR-29 存在于外泌体中,来源于巨噬细胞外泌体的 miR-29 能够发挥促炎作用,诱导心肌细胞焦亡并促进心肌受损。为探究 miR-29b-3p 可能影响 MIRI 的途径,本研究对 MIRI 大鼠血浆外泌体中 miR-29b-3p 的表达进行了检测并且证实 miR-29b-3p 在血浆外泌体中显著高表达,推测血浆外泌体中 miR-29b-3p 表达的异常增强可能参与了 MIRI 的进展。

为进一步探究 miR-29b-3p 对 SEV 后处理的 H/R 细胞损伤中的分子机制,通过靶向关系预测网站筛选 miR-29b-3p 的靶基因,KEGG 富集分析发现了 PI3K/AKT 信号通路。PI3K/AKT 通路是 MIRI 中发挥重要作用的通路之一,如吴胜男^[11]等在研究中发现内啡肽-1 处理能够通过激活 PI3K/AKT 通路进而改善 MIRI。此外,何贵新^[12]等人在实验研究中证实芪参益气滴丸能够促进 PI3K/AKT 通路活性并且改善 MIRI。因此本研究将关注点放在富集到 PI3K/AKT 通路的基因中,IGF1 是富集在 PI3K/AKT 通路中的一个重要基因,先前的研究^[13]证实,心脏祖细胞分泌的外泌体对于心脏具有显著保护作用,该作用可能与促进 IGF1 的释放有关。IGF1 也被发现能够促进心肌祖细胞存活^[14]。另有报道^[15]指出,Ghrelin 通过上调 IGF1 的表达保护 H/R 诱导的心肌细胞。本实验数据显示,miR-29b-3p 在 H/R 诱导的心肌细胞中表达增强而 IGF1 在 H/R 诱导的心肌细胞中的表达被抑制,SEV 后处理则能够显著抑制 miR-29b-3p 的表达并促进 IGF1 的表达。

进一步的功能实验证实,在 MIRI 大鼠血浆外泌体中过表达 miR-29b-3p 能够加重 SEV 后处理的 H/R 心肌损伤,抑制心肌细胞活力并且促进凋亡和炎症因子表达,但是过表达 IGF1 则能够部分挽救 miR-29b-3p 对 SEV 后处理的 H/R 心肌细胞损伤的影响。这表明血浆外泌体源性 miR-29b-3p 能够靶向 IGF1 进而加重 SEV 后处理的 H/R 细胞损伤。

本研究的局限性在于未进一步对 miR-29b-3p 是否还靶向 MIRI 中的其他分子及信号通路进行探究。本研究证实了 MIRI 大鼠血浆外泌体源性 miR-29b-3p 能够靶向 IGF1 促进 SEV 后处理的 H/R 心肌细胞损伤,干预外泌体中 miR-29b-3p 的表达有望在 MIRI 的治疗中发挥作用。本研究机制图见图 5。

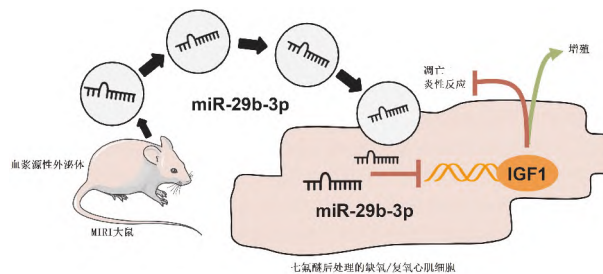


图5 MIRI 大鼠血浆外泌体源性 miR-29b-3p 靶向 IGF1 加重 SEV 后处理的 H/R 心肌细胞损伤

参考文献

- [1] 李玉为, 张巧云, 曹亚红, 等. AKT/mTOR 信号通路介导神经病理性疼痛对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(6): 850-5.
- [2] Lu Y, Bu M, Yun H. Sevoflurane prevents hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting PI3KC3-mediated autophagy[J]. Hum Cell, 2019, 32(2): 150-9.
- [3] Ye Y, Hu Z, Lin Y, et al. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(3): 535-44.
- [4] Wang Y, Qiu Z, Yuan J, et al. Hypoxia-reoxygenation induces macrophage polarization and causes the release of exosomal miR-29a to mediate cardiomyocyte pyroptosis[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2021, 57(1): 30-41.
- [5] Lin Y, Li X, Fan C, et al. Cardioprotective effects of rat adipose-derived stem cells differ under normoxic/physiologic conditions and are associated with paracrine factor secretion[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(5): 1591-600.
- [6] 毛琳慎, 任 维, 梁 盼, 等. 基于 GEO 数据库多芯片联合分析与网络药理学探索黄芪治疗心肌缺血再灌注损伤的机制研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(9): 2140-4.
- [7] 张 静, 纪延炜, 王 城, 等. 七氟醚后处理减轻大鼠心肌缺

- 血-再灌注损伤[J]. 临床麻醉学杂志, 2021, 37(5):6.
- [8] Huang G, Hao F, Hu X. Downregulation of microRNA-155 stimulates sevoflurane-mediated cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury by binding to SIRT1 in mice[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15494–505.
- [9] Jiang Q, Gu S. Sevoflurane postconditioning reduces hypoxia-reoxygenation injury in h9c2 embryonic rat cardiomyocytes and targets the STRADA gene by upregulating microRNA-107[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e920849.
- [10] He D, Yan L. MiR-29b-3p aggravates cardiac hypoxia/reoxygenation injury via targeting PTX3[J]. *Cytotechnology*, 2021, 73(1): 91–100.
- [11] 吴胜男, 张露, 樊红莲, 等. PI3K/Akt 通路在内啡肽-1 后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(6): 870–5
- [12] 何贵新, 肖婷, 秦伟彬, 等. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨芪参益气滴丸改善心肌缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(9): 762–8.
- [13] Barile L, Cervio E, Lionetti V, et al. Cardioprotection by cardiac progenitor cell-secreted exosomes: role of pregnancy-associated plasma protein-A[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(7): 992–1005.
- [14] Andrade D, Oliveira G, Menezes L, et al. Insulin-like growth factor-1 short-period therapy improves cardiomyopathy stimulating cardiac progenitor cells survival in obese mice[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2020, 30(1): 151–61.
- [15] Liu Y, Liu Y, Li G, et al. Ghrelin protects the myocardium with hypoxia/reoxygenation treatment through upregulating the expression of growth hormone, growth hormone secretagogue receptor and insulin-like growth factor-1, and promoting the phosphorylation of protein kinase B[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(6): 3037–46.

Effects of plasma exosome-derived miR-29b-3p on myocardial cell injury in hypoxia/reoxygenation after sevoflurane postconditioning via targeting IGF1

Deng Fangfang¹, Li Jiyong¹, Zhang Li¹, Zou Gaorui¹, Chen Zhijun¹, Le Wei²

(¹Dept of Anesthesia, ²Dept of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022)

Abstract Objective The purpose of this study was to investigate the effects of plasma exosome-derived miR-29b-3p in myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) rats on hypoxia/reoxygenation (H/R) cardiomyocyte after sevoflurane (SEV) postconditioning through targeting IGF1. **Methods** The GEO database was used to screen differentially expressed miRNAs in MIRI, and cardiomyocytes were treated with H/R to construct a MIRI cell model. The expression of miR-29b-3p and IGF1 in the MIRI cell model post-treated with SEV was intervened, and then the survival rate of cardiomyocytes was detected by MTT, apoptosis was detected by flow cytometry, and inflammatory factors (IL-1 β and TNF- α) in cardiomyocytes in each group were detected by ELISA. **Results** Compared with Normal group, the expression of miR-29b-3p in plasma exosomes of MIRI rats was enhanced ($P < 0.05$), and the target-binding relationship between miR-29b-3p and IGF1 was confirmed ($P < 0.05$). After SEV post-treatment, the expression of miR-29b-3p in H/R-stimulated cardiomyocytes decreased, while the expression of IGF1 increased (both $P < 0.05$). Overexpression of miR-29b-3p in plasma exosomes could significantly inhibit the survival rate of H/R cells after SEV treatment, aggravate apoptosis and inflammatory response, while knockdown of miR-29b-3p showed a opposite effects (all $P < 0.05$). The rescue experimental data showed that overexpression of IGF1 could partially reverse the effects of overexpression of miR-29b-3p on H/R cell injury after SEV treatment (all $P < 0.05$). **Conclusion** Plasma exosome-derived miR-29b-3p promotes H/R cardiomyocyte injury after SEV treatment by targeting IGF1.

Key words plasma exosomes; miR-29b-3p; IGF1; sevoflurane; cardiomyocyte injury