

miR-22 通过靶向 UCP2 保护心肌细胞免受硫酸吡啶酚诱导的凋亡和过度自噬

郭影, 梁婷, 王学忠

摘要 目的 探讨尿毒症微环境下 miRNA-22 对心肌细胞凋亡和过度自噬的影响,并阐明该过程的潜在机制。方法 收集硫酸吡啶酚(IS)刺激后的 H9c2 细胞,分别将 miR-22 模拟物(mimic-miR-22)、miR-22 抑制剂(anti-miR-22)和 UCP2 过表达物(LeUCP2)转染入细胞。采用流式细胞术分析 H9c2 细胞的存活情况和 Western blot 分析自噬相关蛋白 LC3、p62 的表达。结果 与接受对照处理的 H9c2 细胞相比,IS 组的存活 H9c2 细胞数量减少(87.5% vs 56.9%, $P < 0.01$),而凋亡和坏死细胞的数量却增加(6.2% vs 20.6%, 6.3% vs 22.5%, $P < 0.01$)。用 miR-22 模拟物治疗可减少坏死和凋亡细胞的百分比(11.0% vs 20.6%, 11.0% vs 22.5%, $P < 0.05$),而用 miR-22 抑制剂治疗可增加凋亡和坏死细胞的百分比(38.5% vs 20.6%, 40.9% vs 22.5%, $P < 0.01$)。Western blot 分析显示,miR-22 模拟物转染的 H9c2 细胞与相应的阴性对照 miRNA 转染的细胞相比具有更低的 LC3-II/I 比率[(1.24 ± 0.15) vs (3.26 ± 0.42), $P < 0.001$],而 p62 蛋白表达提高[(0.92 ± 0.06) vs (0.65 ± 0.05), $P < 0.05$];而 miR-22 抑制剂则产生了相反的结果[LC3-II/I 比值:(4.53 ± 0.42) vs (3.29 ± 0.40), $P < 0.01$; p62:(0.29 ± 0.04) vs (0.58 ± 0.05), $P < 0.01$]。此外,与空慢病毒载体对照相比,LeUCP2 转染导致暴露于 IS 的 H9c2 细胞或 miR-22 抑制剂转染的 H9c2 细胞中 p62 表达增加($P < 0.05$),LC3-II/I 比率降低($P < 0.05$)。结论 miR-22 通过靶向 UCP2 在减轻 IS 诱导的心肌细胞凋亡和自噬方面起着重要保护作用。

关键词 硫酸吡啶酚;心肌细胞;miRNA-22;解偶联蛋白 2;自噬

中图分类号 R 542.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0070-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.014

研究^[1]表明,硫酸吡啶酚(indoxyl sulfate, IS)在慢性肾病患者中观察到的心血管疾病进程中起促进作用。体外实验证实了 IS 通过增强氧化应激上调

心肌细胞的自噬水平^[2]。但是,尚不清楚 IS 诱导的心肌细胞自噬水平的更深层机制。解偶联蛋白 2(uncoupling protein 2, UCP2)位于线粒体内膜,在心肌组织中广泛表达^[3]。研究^[4]表明 UCP2 可以通过抑制活性氧生成来保护心肌细胞免受氧化应激引起的凋亡和过度自噬。据报道^[5],miRNA-22(miR-22)在心脏中高度表达,并作为心脏重塑的重要调节剂。然而,miR-22 是否通过 UCP2 保护心肌细胞免受 IS 诱导的凋亡和过度自噬尚不清楚。该研究探讨 miR-22 在调节 IS 诱导的心肌细胞自噬作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 10% 胎牛血清购自美国 HyClone 公司;Dulbecco 改良 Eagle 培养基购自美国 Thermo Scientific 公司;3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-溴化四唑(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、脂质体 2000 转染试剂、硫酸吡啶酚均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)测量试剂盒购自美国 Promega 公司;miR-22 模拟物(mimic-miR-22)、miR-22 抑制剂(anti-miR-22)和 UCP2 过表达物(LeUCP2)均购自上海吉玛制药技术有限公司;TRIzol 试剂、MicroRNA qRT-PCR Sybr Green 检测试剂盒、SYBR RT-PCR 试剂盒均购自日本 Takara Biochemical 公司;裂解缓冲液购自美国 Roche Applied Science 公司;PVDF 膜购自美国 Merck Millipore 公司;p-62 抗体、LC3 I/II 抗体、UCP2 抗体、Bcl-2 抗体、Bax 抗体、caspase-3 抗体和 β -actin 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;辣根过氧化物酶结合的第二抗体购自美国 Abcam 公司;膜联蛋白 V-FITC 和碘化丙啶(PI)检测试剂盒购自美国 BD Biosciences 公司;Quik 突变株试剂盒购自德国 Stratagene 公司;pmiRGLO 载体购自美国 Promega 公司。

1.1.2 仪器 FL-600 酶标仪购自美国 BioTek 公司;实时 PCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公

2021-10-27 接收

基金项目:宁夏自然科学基金(编号:2020AAC03366)

作者单位:宁夏医科大学总医院心脏中心内科,银川 750004

作者简介:郭影,女,硕士,副主任医师;

王学忠,男,硕士,主任医师,责任作者, E-mail: 546921182@qq.com

司;利用化学发光检测系统购自上海 Tanon 公司; BD FACSDiva Software v7.0 购自美国 Becton-Dickinson 公司;双荧光素酶报告系统购自美国 Promega 公司。

1.2 细胞培养 人心肌母细胞 H9c2 购自美国 ATCC 公司,将其培养在含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基。

1.3 细胞增殖测定 使用 MTT 来检测细胞的活力。将 H9c2 接种在 96 孔板中,然后暴露于连续浓度的 IS(100、250、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$) 中 48 h。在另一个实验中,将 H9c2 与 500 $\mu\text{mol/L}$ IS 孵育 24、48、72 h。用 IS 处理后,将 20 μl MTT 工作溶液(5 mg MTT/ml 溶于磷酸盐缓冲液, PBS)添加到每个孔中,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 h。弃上清液,将沉淀用 150 μl 二甲基亚砜(DMSO)溶解 10 min。使用 FL-600 酶标仪在 570 nm 波长处检测吸光度。为了验证数据,每个测定进行了 3 次。

1.4 细胞毒性的测定 为了分析 IS 对 H9c2 的细胞毒性作用,使用 LDH 测量试剂盒测定细胞释放的 LDH。具体操作为:将 H9c2 接种在 96 孔板中,然后暴露于连续浓度的 IS(100、250、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$) 中 48 h。吸取 50 μl 上清液转移至 96 孔酶法测定板,向每个孔加入 50 μl 重组底物混合物。盖住平板,在室温下避光孵育 30 min。最后,加入停止液,并用 FL-600 酶标仪在 490 nm 处记录吸光度。实验进行了 3 次以验证结果。

1.5 细胞转染 取对数生长期的 H9c2 细胞,以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板,用脂质体 2000 转染试剂,分别将 mimic-miR-22(50 nmol/L)、anti-miR-22(100 nmol/L)和 LeUCP2(50 nmol/L)转染入细胞。加入乱码 miR-22 或空慢病毒载体作为对照。转染 48 h 后,收集细胞并进行以下测定。

1.6 逆转录酶反应和实时定量 PCR 使用 TRIzol 试剂从培养的细胞中分离了总 RNA。为了量化 miR-22 miRNA 的表达,使用针对特定 miRNA 的特殊茎环引物合成 cDNA,然后使用 MicroRNA qRT-PCR Sybr Green 检测试剂盒和 7500 序列检测实时 PCR 系统确定 miRNA 表达水平。比较 Ct(阈值周期)值用于量化 miRNA 表达水平。为了量化 UCP2 mRNA 的表达,使用 SYBR RT-PCR 试剂盒合成 cDNA 并进行 RT-PCR 分析。U6 和 β -actin 分别作为 miRNA 和 mRNA 的内部对照。miRNA 和 mRNA 表达水平以相对于对应对照样品表达水平的倍数变化表示,并使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。实验使用引物如下:

miR-22 引物,正向 5'-GCCTGAAGCTGCCAGTTGA-3' 和反向 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';大鼠 U6 引物,正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' 和反向 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; β -actin 引物,正向 5'-CGACCACACACAGAGGGAGAT-3' 和反向 5'-GC-CGATTACACCCGAGTA-3';UCP2 引物,正向 5'-TGC TGAGCTGGTGACCTATG-3' 和反向 5'-CCAGGGCAG AGTTCATGTAT-3'。

1.7 Western blot 分析 用 PBS 清洗细胞,并在含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的冰冷裂解缓冲液中裂解细胞。然后在 12 000 r/min 下 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min。在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离等量的细胞裂解物(20 μg),并转移到 PVDF 膜上。这些膜在 TBST 中用 5% 吐温-20 在室温下阻断 2 h,然后将 p-62 抗体(1 : 1 000)、LC3 I / II 抗体(1 : 800)、UCP2 抗体(1 : 800)、Bcl-2 抗体(1 : 2 000)、Bax 抗体(1 : 1 000)、caspase-3 抗体(1 : 1 000)和 β -actin(1 : 1 000)第一抗体与膜在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,在室温下用辣根过氧化物酶结合的第二抗体孵育 1 h。利用化学发光检测系统对抗体复合物进行了可视化和定量分析。用相对密度法测定靶蛋白表达水平,并将其标准化为 β -actin 对应的条带。

1.8 流式细胞仪分析 使用膜联蛋白 V-FITC 和碘化丙啶(PI)检测试剂盒对细胞进行了染色,并通过流式细胞仪分析细胞存活情况。首先,使用胰蛋白酶消化细胞(6×10^5 个),然后将细胞在室温下于黑暗中重悬于 100 μl 含 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 的结合缓冲液中 10 min,然后将 400 μl 结合缓冲液添加至混合物中。在停止反应后 1 h 内通过流式细胞术分析细胞。使用 BD FACSDiva Software v7.0 评估流式细胞仪数据。每组共计数 10 000 个细胞进行统计分析,每次评估重复 3 次。

1.9 双荧光素酶报告分析 使用引物 5'-AAACG-GACTCGCAGCGAGCTCCAG-3' 和 5'-CGACTCTAGACTAGATACATGACTCTAACATTTGCC-3' 通过 PCR 扩增含有推定的 miR-22 靶位点的 UCP2 的野生型(WT)3'非翻译区(3'UTR-WT)的片段。同时通过使用 Quik 突变株试剂盒对 pGL3-UCP2-3' UTR 载体上带有的 miR-22 靶点序列中的 seed sequence 序列进行点突变。随后,将包含 UCP2 的 3'UTR-WT 或 3'UTR-MUT(突变型)片段插入紧邻荧光素酶基因序列下游的 pmiRGLO 载体中。在报告分析中,该研究用荧光素酶报告构建物和 mimic-miR-22、anti-miR-22 或阴性对照 miRNAs 共转染了 H9c2 细胞。

转染后 48 h,裂解细胞,用双荧光素酶报告系统测定荧光素酶活性。荧光素酶活性水平被标准化为肾素荧光素酶活性水平。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验独立重复 3 次。

2 结果

2.1 IS 对 H9c2 细胞增殖、毒性和自噬的影响

MTT 分析结果显示,IS 可以剂量依赖性地抑制 H9c2 的增殖 (图 1A),并且随着暴露的时间的延长,由 500 $\mu\text{mol/L}$ IS 诱导的 H9c2 增殖的抑制作用增加 (图 1B)。同时,用 500 $\mu\text{mol/L}$ 或 1 000 $\mu\text{mol/L}$ IS 处理 48 h 可增加 H9c2 中 LDH 的释放 (图 1C)。此外,Western blot 分析显示,IS 可以剂量依赖性地降低 H9c2 细胞中 p62 的表达 ($F = 16.137, P < 0.001$),并促进 LC3-I 向 LC3-II 转化 ($F = 28.424, P < 0.001$,图 1D、E)。

2.2 miR-22 对 IS 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响

为了检查 miR-22 对 IS 处理过的心肌细胞的作用,研究通过用 miR-22 模拟物或抑制剂转染 H9c2 细

胞来诱导 miR-22 过表达和敲低。转染效率如图 2A、B 所示,与对照组相比,miR-22 模拟组中的 miR-22 水平升高 ($P < 0.001$),而 miR-22 抑制剂组中的 miR-22 水平降低 ($P < 0.001$)。在暴露于 IS 条件下,与接受对照处理的 H9c2 细胞相比,IS 组的存活 H9c2 细胞数量减少 ($t = 4.614, P = 0.006$),而凋亡和坏死细胞的数量却增加了 ($t = 4.526, 4.638, P = 0.007, 0.006$)。用 miR-22 模拟物治疗可减少坏死和凋亡细胞的百分比 ($t = 3.142, 3.315, P = 0.037, 0.034$),而用 miR-22 抑制剂治疗可进一步增加凋亡和坏死细胞的百分比 ($t = 6.753, 6.841, P < 0.001$) (图 2 C、D)。

2.3 miR-22 对 IS 诱导的自噬的影响 Western blot 分析显示,在暴露于 IS 条件下,miR-22 模拟物转染的 H9c2 细胞与相应的阴性对照 miRNA 转染的细胞相比具有更低的 LC3-II/I 比值 ($t = 8.259, P < 0.001$),p62 蛋白表达提高 ($t = 2.716, P = 0.043$) (图 3A、B);而 miR-22 抑制剂则产生了相反的结果 ($t = 4.329, P = 0.005$; p62: $t = 4.473, P = 0.004$) (图 3C、D)。

2.4 miR-22 靶向 UCP2 qRT-PCR 和 Western blot 分析表明,在暴露于 IS 条件下,miR-22 模拟物转染的 H9c2 细胞与相应的阴性对照 miRNA 转染的细胞相比具有更高的 UCP2 mRNA 和蛋白表达 ($t = 4.437$ 、

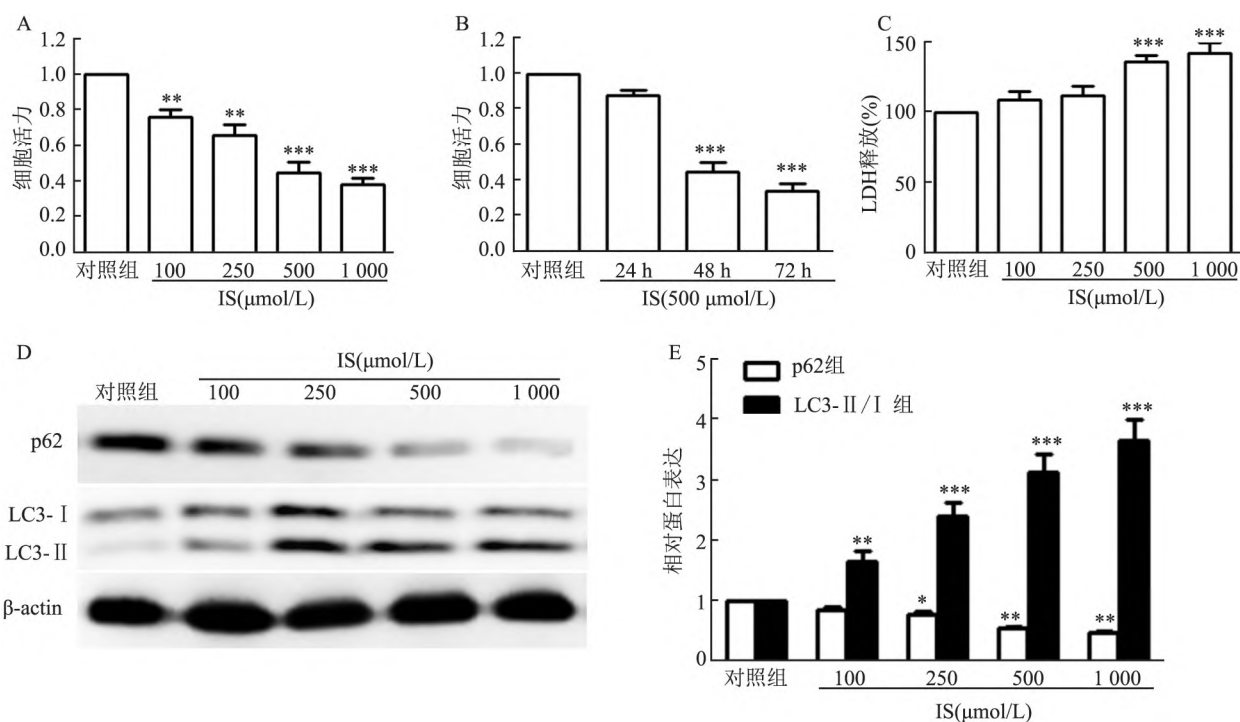


图 1 IS 对 H9c2 细胞增殖、毒性和自噬的影响

A: MTT 法检测不同浓度 IS 对 H9c2 细胞增殖的影响; B: MTT 法检测 IS 不同处理时间对 H9c2 细胞增殖的影响; C: 不同浓度 IS 对 H9c2 细胞毒性的影响; D、E: 不同浓度 IS 对 H9c2 细胞 p62 蛋白表达及 LC3-II/I 比值的 Western blot 结果和定量数据; 与对照组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

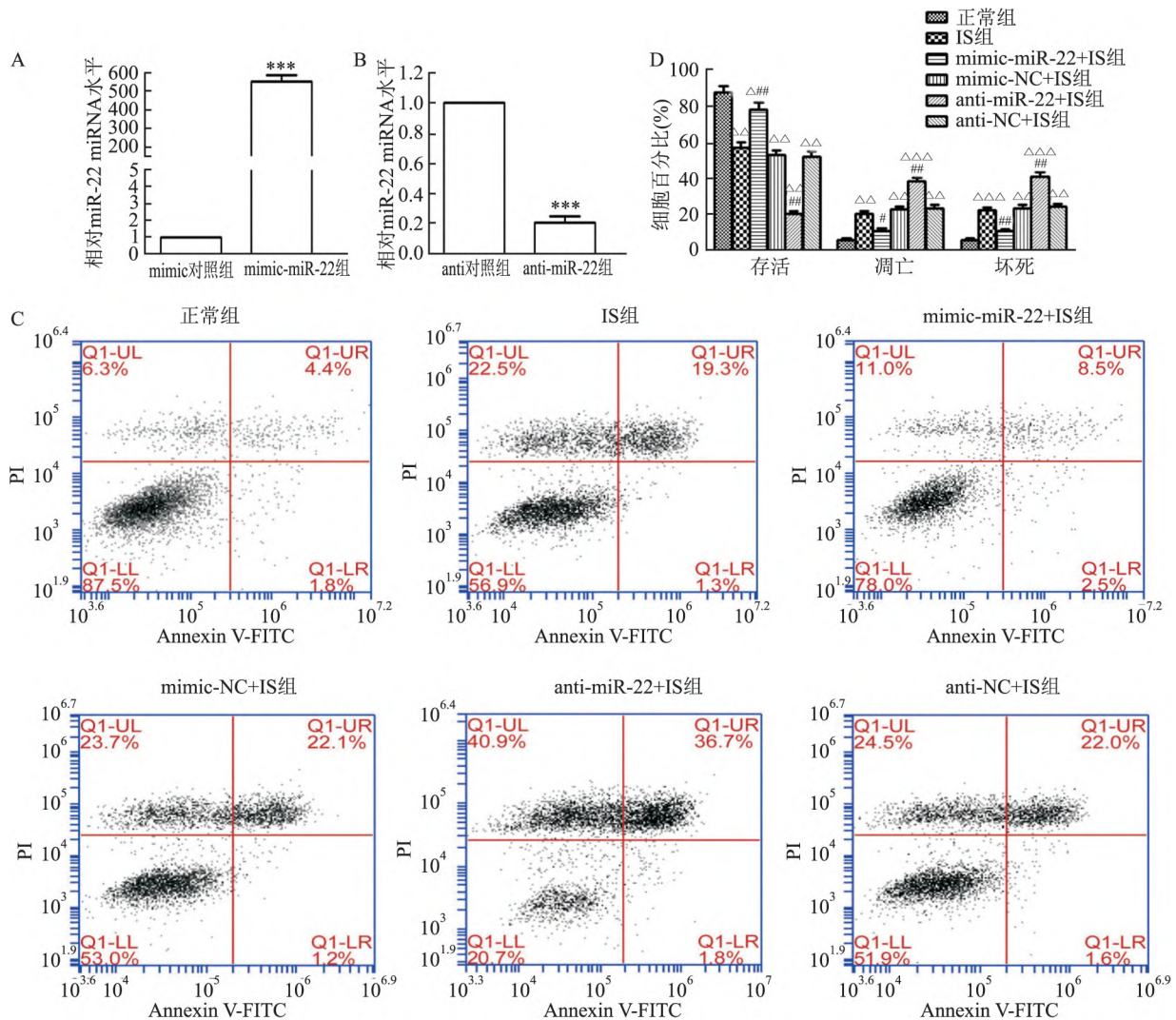


图2 miR-22对IS处理过的心肌细胞的作用

A、B: qRT-PCR分析miR-22模拟物、miR-22抑制剂或相应的阴性对照($n=3$)转染的H9c2细胞中miR-22表达;与对照组比较:*** $P<0.001$;C、D:流式细胞术分析显示miR-22对H9c2细胞坏死、凋亡和存活的影响($n=3$);与正常组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与IS组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$

4.614, $P=0.007$ 、0.005);而miR-22抑制剂则产生了相反的结果($t=3.572$ 、4.533, $P=0.025$ 、0.005)。为了证实miR-22与UCP2之间的关系,研究进行了双重荧光素酶报告基因检测。结果显示,在UCP2 3'UTR WT组中,与阴性对照转染细胞相比,miR-22模拟转染的细胞中标准化荧光素酶活性水平增加($t=7.843$, $P<0.001$),而在抑制剂转染的细胞中则降低($t=4.823$, $P=0.003$)。但是在UCP2 3'UTR MUT组中,用miR-22模拟物或抑制剂转染后的荧光素酶构建体的活性水平较阴性对照未发生变化。见图4。

2.5 UCP2介导miR-22在IS刺激H9c2细胞中的保护作用 Western blot分析结果见图5所示,LeUCP2转染的H9c2细胞中UCP2表达水平明显升

高,表明LeUCP2转染的效率很高。与空慢病毒载体对照相比,LeUCP2转染导致暴露于IS的H9c2细胞或miR-22抑制剂转染的H9c2细胞中Bcl-2/Bax比率和p62表达增加($t_{LeUCP2}=7.162$ 、4.673, $P<0.001$ 、0.005; $t_{anti-miR-22}=7.514$ 、3.614, $P<0.001$ 、0.019)以及cleaved-caspase3和LC3-II/I比值降低($t_{LeUCP2}=3.044$ 、2.836, $P=0.024$ 、0.030; $t_{anti-miR-22}=3.173$ 、4.388, $P=0.024$ 、0.009)。

3 讨论

尿毒症性心肌病是慢性肾病最常见的并发症,其病死率较高。MicroRNA是目前有关心血管疾病的研究重点。该研究表明,miR-22上调可通过抑制细胞凋亡和过度自噬来保护心肌细胞免受IS诱导

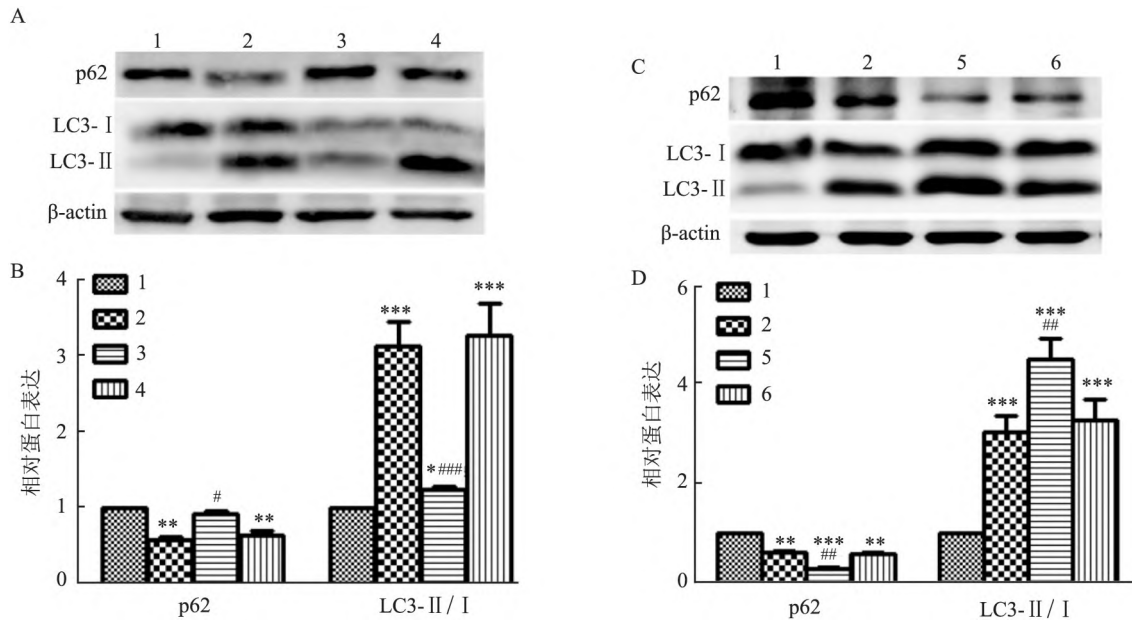


图3 miR-22对IS诱导自噬的影响

A、B: miR-22模拟物对H9c2细胞p62蛋白表达及LC3-II/I比值的Western blot结果和定量数据; C、D: miR-22抑制物对H9c2细胞p62蛋白表达及LC3-II/I比值的Western blot结果和定量数据; 1: 正常组; 2: IS组; 3: mimic-miR-22-IS组; 4: mimic-NC + IS组; 5: anti-miR-22-IS组; 6: anti-NC + IS组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与mimic-NC + IS或anti-NC + IS组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

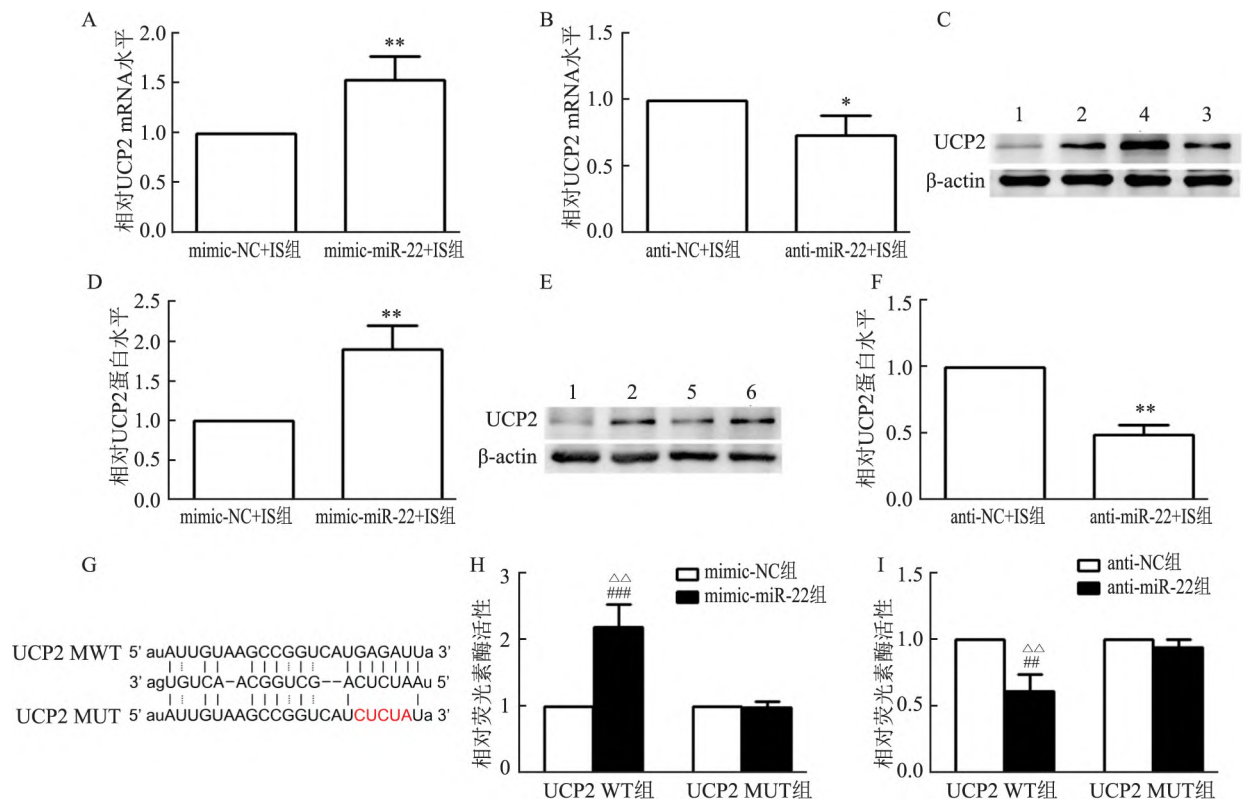


图4 miR-22靶向UCP2

A、B: qRT-PCR分析转染miR-22模拟物、miR-22抑制剂或相应阴性对照后48 h的H9c2细胞中UCP2 mRNA表达水平; C~F: miR-22模拟物、miR-22抑制剂对H9c2细胞中UCP2蛋白表达的Western blot结果和定量数据; 与mimic-NC + IS或anti-NC + IS组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; G: miR-22在UCP2的WT 3'UTR和MUT 3'UTR中的预测结合位点; H、I: 双荧光素酶报告基因测定miR-22模拟物和miR-22抑制剂转染的H9c2细胞中的荧光素酶活性水平; 1: 正常组; 2: IS组; 3: mimic-miR-22-IS组; 4: mimic-NC + IS组; 5: anti-miR-22-IS组; 6: anti-NC + IS组; 与mimic-NC或anti-NC组比较: △△ $P < 0.01$; 与mimic-miR-22 + UCP2 3'UTR或anti-miR-22 + UCP2 3'UTR组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

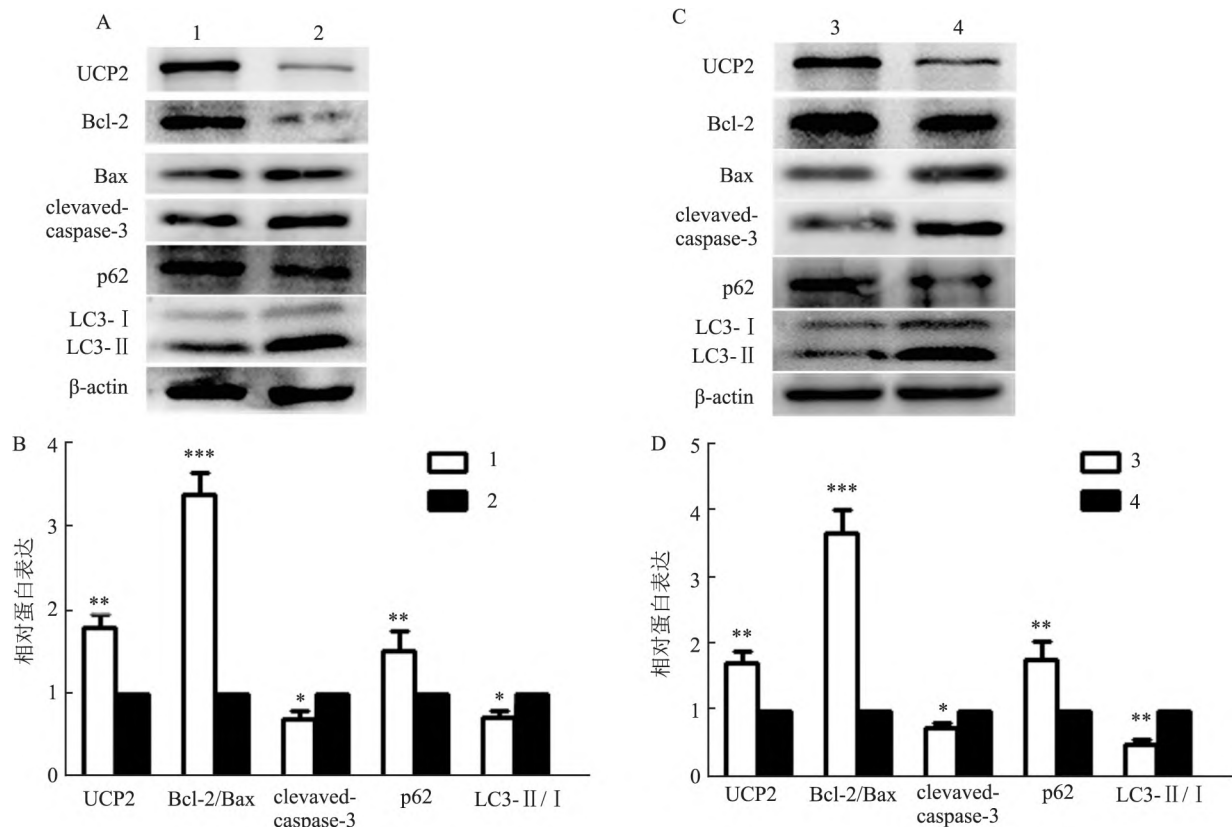


图5 UCP2介导miR-22在IS刺激H9c2细胞中的作用

A、B: Western blot 分析 LeUCP2 对暴露于 IS 的 H9c2 细胞中 UCP2、Bcl-2、Bax、cleaved-caspase3、p62、LC3-I 和 LC3-II 蛋白表达; C、D: Western blot 分析 LeUCP2 对暴露于 IS 且接受 miR-22 抑制剂转染的 H9c2 细胞中 UCP2、Bcl-2、Bax、cleaved-caspase3、p62、LC3-I 和 LC3-II 蛋白表达; 1: LeUCP2 + IS 组; 2: Le-NC + IS 组; 3: LeUCP2 + IS + anti-miR-22 组; 4: Le-NC + IS + anti-miR-22 组; 与 Le-NC + IS 或 Le-NC + IS + anti-miR-22 组比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

的损伤。机理研究^[5]表明, miR-22 直接靶向 UCP2, UCP2 过表达保护心肌细胞免受凋亡和过度自噬。该研究揭示了诱导性心肌病的潜在机制。

据报道^[6-7], miR-22 在几种癌症中异常表达, 并且其在这些癌症中的作用已得到广泛研究。研究^[8]表明 miR-22 与多种心肌疾病有关, miR-22 通过直接靶向 TNNI3K 抑制心肌肥大。Li et al^[9]研究表明, miR-22 通过靶向 p38 α 调节饥饿诱导的心肌细胞自噬和凋亡。在其他研究中, Yang et al^[10]揭示了 miR-22 抑制了缺血/再灌注诱导的心肌坏死和炎症, 因此, 有利于损伤后的心肌修复。该研究旨在通过模拟体内尿毒症微环境, 阐明在 IS 刺激下 miR-22 对心肌细胞凋亡和自噬的影响。有研究^[11]显示, 尿毒症患者的血清 IS 水平升高了约 50 倍, 而慢性肾病患者的血清 IS 最高浓度可超过 500 $\mu\text{mol/L}$ 。通常将 100 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内的 IS 浓度用于体外研究^[12]。因此, 该研究也选择此 IS 浓度范围来进行体外实验。结果显示, 在 IS 刺激下, miR-22 通过抑制细胞凋亡和自噬促进细胞存活。

研究^[13]表明, 位于线粒体内膜中的 UCP2 通过

抑制活性生成和抑制氧化应激而对心血管系统具有保护作用。此外, UCP2 抑制会降低细胞内 NAD^+ 和 ATP 的水平, 最终导致细胞功能障碍和死亡^[14]。虽然 UCP2 在心血管疾病中的作用已得到广泛研究, 但是, UCP2 是否会影响尿毒症性心肌病发病过程中的自噬过程尚不清楚。以往在线数据库进行的 MicroRNA 靶基因预测研究^[15]已表明 miR-22 可以靶向 UCP2。因此, 该研究选择 UCP2 作为 miR-22 调控 IS 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡和过度自噬中的靶标, 结果显示, 上调 miR-22 可以在 mRNA 和蛋白质水平上提高 UCP2 表达, 而下调 miR-22 可以降低 UCP2 表达。双荧光素酶报告基因检测结果证实 miR-22 与 UCP2 相互作用。此外, 该研究表明通过用慢病毒预处理 H9c2 心肌细胞来上调 UCP2 可以减轻 IS 诱导的细胞凋亡和过度自噬。结果表明, LeUCP2 对 H9c2 心肌细胞存活具有有利影响。研究还表明 LeUCP2 消除了 miR-22 抑制剂对 IS 诱导的 H9c2 心肌细胞的促凋亡和自噬作用。因此, UCP2 可能是 miR-22 的下游效应物, 并可能介导 miR-22 对 IS 诱导的心肌细胞损伤的作用。

参考文献

- [1] 白运焕, 杨媛媛, 蒋亚芬, 等. 慢性肾病患者血尿酸/肌酐浓度与心血管疾病相关指标的关系分析[J]. 中华全科医学, 2016, 14(7): 1141-3.
- [2] Hsu Y J, Hsu S C, Chang Y L, et al. Indoxyl sulfate upregulates the cannabinoid type 1 receptor gene *via* an ATF3/c-Jun complex-mediated signaling pathway in the model of uremic cardiomyopathy[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 252: 128-35.
- [3] 金佩瑶, 李志强, 徐 娟, 等. 中国汉族 2 型糖尿病人群中 UCP 基因单核苷酸多态性与视网膜病变的关联分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(8): 737-42.
- [4] Yang K, Xu X, Nie L, et al. Indoxyl sulfate induces oxidative stress and hypertrophy in cardiomyocytes by inhibiting the AMPK/UCP2 signaling pathway[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 234(2): 110-9.
- [5] 李国然. miR-22 对心肌细胞自噬和凋亡的调控研究[D]. 第二军医大学, 2016.
- [6] 张玉洁, 王微微, 商安全, 等. 非小细胞肺癌患者血清 miR-22 和 miR-126 的检测及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(12): 1403-8.
- [7] Gai P, Sun H, Wang G, et al. miR-22 promotes apoptosis of osteosarcoma cells *via* inducing cell cycle arrest[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2354-8.
- [8] Wang J, Liew O W, Richards A M, et al. Overview of microRNAs in cardiac hypertrophy, fibrosis, and apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 749.
- [9] Li G, Wang G, Ma L, et al. miR-22 regulates starvation-induced autophagy and apoptosis in cardiomyocytes by targeting p38 α [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(3): 1165-72.
- [10] Yang J, Chen L, Yang J, et al. MicroRNA-22 targeting CBP protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through anti-apoptosis in rats[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(1): 555-61.
- [11] 申 燕, 王 沛, 周 娟, 等. 慢性肾功能不全患者血清及硫酸吡啶酚对巨噬细胞脂质聚集的影响[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(5): 631-8.
- [12] Ichii O, Otsuka-Kanazawa S, Nakamura T, et al. Podocyte injury caused by indoxyl sulfate, a uremic toxin and aryl-hydrocarbon receptor ligand[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108448.
- [13] Wu H, Ye M, Liu D, et al. UCP2 protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury *via* induction of mitochondrial autophagy[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15455-66.
- [14] Su J, Liu J, Yan X Y, et al. Cytoprotective effect of the UCP2-SIRT3 signaling pathway by decreasing mitochondrial oxidative stress on cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1599.
- [15] Wang Y M, Ding X B, Dai Y, et al. Identification and bioinformatics analysis of miRNAs involved in bovine skeletal muscle satellite cell myogenic differentiation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 404(1-2): 113-22.

miR-22 protects cardiomyocytes from indole sulfate induced apoptosis and autophagy by targeting UCP2

Guo Ying, Liang Ting, Wang Xuezhong

(Internal Medicine of Heart Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

Abstract Objective To investigate the effect of miRNA-22 on cardiomyocyte apoptosis and autophagy under uremic toxin stimulation and to elucidate the underlying mechanisms of this process. **Methods** H9c2 cells stimulated by indoxyl sulfate (IS) were collected and transfected with mimic-miR-22, anti-miR-22 and LeUCP2 respectively. Flow cytometry was used to analyze the survival of H9c2 cells, and Western blot was used to analyze the expression of autophagy related proteins LC3 and p62. **Results** Compared with H9c2 cells subjected to the control treatment, the number of healthy H9c2 cells decreased (87.5% *vs* 56.9%, $P < 0.01$), while the number of necrotic and apoptotic cells increased (6.2% *vs* 20.6%, 6.3% *vs* 22.5%, $P < 0.01$) after IS treatment. Treatment with the miR-22 mimics reduced the percentages of necrotic and apoptotic cells (11.0% *vs* 20.6%, 11.0% *vs* 22.5%, $P < 0.05$), while treatment with the miR-22 inhibitors increased the percentages of necrotic and apoptotic cells (38.5% *vs* 20.6%, 40.9% *vs* 22.5%, $P < 0.01$). Western blot analysis showed that H9c2 cells transfected with miR-22 mimics exhibited a low LC3-II-to-LC3-I ratio [(1.24 $\pm$ 0.15) *vs* (3.26 $\pm$ 0.42), $P < 0.001$] but high p62 protein [(0.92 $\pm$ 0.06) *vs* (0.65 $\pm$ 0.05), $P < 0.05$] expression compared with cells transfected with corresponding negative control miRNAs; however, miR-22 inhibitors yielded contrasting results [LC3-II/I ratio: (4.53 $\pm$ 0.42) *vs* (3.29 $\pm$ 0.40), $P < 0.01$; p62: (0.29 $\pm$ 0.04) *vs* (0.58 $\pm$ 0.05), $P < 0.01$]. In addition, LeUCP2 transfection resulted in an increase in p62 expression ($P < 0.05$) and a decrease in LC3-II-to-LC3-I ratio ($P < 0.05$) in H9c2 cells exposed to IS or miR-22 inhibitor-transfected H9c2 cells compared with empty lentivirus vector. **Conclusion** miR-22 plays an important role in reducing IS induced cardiomyocyte apoptosis and autophagy by targeting UCP2.

Key words indole sulfate; cardiomyocytes; miRNA-22; uncoupling proteins 2; autophagy