

# 多柔比星对心肌细胞的损伤作用及对 microRNA 的影响

杨婉 金世云 许士进 张野 何淑芳

**摘要** 目的 探讨多柔比星对原代乳鼠心肌细胞的损伤作用及其对微小 RNA(miRNA)表达的影响。方法 原代培养 SD 大鼠乳鼠心肌细胞,随机分为 6 组:对照组,不同浓度多柔比星(0.125、0.25、0.5、1、2  $\mu\text{mol/L}$ )处理组。对照组细胞正常培养,处理组细胞使用终浓度分别为 0.125、0.25、0.5、1、2  $\mu\text{mol/L}$  的多柔比星处理 24 h。倒置显微镜下观察心肌细胞搏动频率,CCK-8 法检测细胞活力,微板法检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性,荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)法检测心肌细胞 miR-133a-5p、miR-133b-5p、miR-6216 和 miR-30e-5p 表达水平。结果 与对照组相比,多柔比星减慢心肌细胞搏动频率,降低细胞活力,升高 LDH 活性( $P < 0.05$ )。qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,多柔比星 1  $\mu\text{mol/L}$  处理组心肌细胞 miR-133b-5p、miR-6216 和 miR-30e-5p 表达显著上调,miR-133a-5p 表达显著下调。结论 多柔比星对原代乳鼠心肌细胞具有损伤作用,其机制可能与调控 miR-133a-5p、miR-133b-5p、miR-6216 和 miR-30e-5p 等 miRNA 表达有关。

**关键词** 多柔比星;心肌毒性;乳鼠心肌细胞;微小 RNA

**中图分类号** R 979.1+4

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)01-0086-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.018

多柔比星作为蒽醌类抗肿瘤药物的代表,由于其高效广谱的特点,被广泛用于临床,但因多柔比星与心肌组织的亲和力明显高于其他组织,其药物不良反应以心脏毒性较多见,且随剂量的增加而导致不可逆的心肌损伤,最终导致扩张型心肌病及充血性心力衰竭<sup>[1-2]</sup>,因而其临床使用受到限制。多柔比星导致心脏毒性的机制尚未明确,阐明其机制可能为临床预防多柔比星心脏毒性的发生和发展提供理论基础。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性的小分子非编码 RNA,长约 20~25 个核苷酸,介导调

控体内多种病理生理进程<sup>[3]</sup>。近年来,miRNA 在心脏的生长发育和心血管疾病的发生发展中所发挥的作用日渐受到人们关注。本课题组近期通过 miRNA 芯片筛选显示多柔比星诱导的心力衰竭大鼠心肌细胞 miRNA 表达谱发生显著改变<sup>[4]</sup>。该研究拟探讨多柔比星对乳鼠原代心肌细胞的损伤作用及其对 miRNA 表达的影响,为进一步明确多柔比星的心脏毒性机制提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级出生 2 d 内的 SD 乳鼠,雌雄不受限制。

**1.2 主要试剂及仪器** 多柔比星购自美国 LC Laboratories 公司;DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS)、胰酶购自加拿大 Wisent 公司;5-Bromo-2'-Deoxyuridine(BrdU)、4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)、II 型胶原酶购自美国 Sigma 公司; $\alpha$ -横纹肌肌动蛋白( $\alpha$ -sarcomeric actin antibody  $\alpha$ -SA)购自武汉博士德生物工程有限公司;FITC 标记的山羊抗鼠荧光二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;CCK-8 试剂盒购自合肥生物科技公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit、miRNA 引物购自广州复能基因公司。倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);细胞培养箱(美国 Thermo 公司);KHB ST-360 酶标仪(中国上海科华实验系统有限公司);StepOne 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 乳鼠原代心肌细胞分离培养** 选取出生 2 d 以内的 SD 大鼠,酒精浸泡约 3 min,于无菌条件下开胸取出心尖部,用 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 洗涤 3~4 遍,去除残存血液。然后将心脏剪成约 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm 大小,加入 0.25% 胰酶和 0.1% II 型胶原酶(1:1)的混合消化液,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化,第 1 次消化后待自然沉淀,弃上清液,取沉淀继续消化,待自然沉淀后取上清液,并加入含有 10% FBS 的 DMEM/

2016-08-15 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81200171);

安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2014ZD16)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院麻醉科,合肥 230601

作者简介:杨婉,女,硕士研究生;

何淑芳,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

hsf77@163.com

F12 培养基终止消化。重复消化 5~6 次,将收集到的全部上清液用 200 目不锈钢筛网过滤,去除残留心肌组织块,收集细胞悬液,而后 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞 1 次,1 000 r/min 离心弃上清液,将细胞重悬并接种于 100 mm 培养皿中,差速贴壁 60 min,吸取上清液重新种板,即为原代培养心肌细胞。为了抑制成纤维细胞的生长,在培养基中加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 Brdu,培养 24 h 后换液,之后每 2 d 换 1 次液。取培养第 3 天的细胞用于后续实验。

**1.3.2 心肌细胞纯度鉴定** 将提取的原代心肌细胞以  $5 \times 10^5$  个/ml 接种于 24 孔板内并制作细胞爬片,培养 3 d 后取出爬片,置于载玻片上,PBS 洗 2 次,每次 4 min;4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗 4 次,每次 10 min;0.3% Triton X-100 室温封闭 10 min,PBS 洗 4 次,每次 10 min;10% 山羊封闭血清 4 °C 封闭 30 min,用封闭液 1:50 稀释  $\alpha$ -SA 一抗接种于玻片上,4 °C 孵育过夜,PBS 洗 2 次,每次 10 min;1:100 FITC 标记山羊抗鼠二抗室温避光孵育 2 h,PBS 洗 3 次,每次 10 min;最后用 DAPI 染核,室温避光孵育 5 min,PBS 洗 3 次,每次 4 min,在荧光显微镜下观察细胞,并统计阳性细胞数。随机选择 10 个高倍视野计数阳性细胞和细胞总数。阳性细胞率(%) = 阳性细胞数/细胞总数  $\times$  100%。同时做阴性对照,一抗用 PBS 代替,其余步骤均同上。

**1.3.3 实验分组及处理** 原代培养 SD 大鼠乳鼠心肌细胞,实验分为 6 组:对照组、不同浓度多柔比星(0.125、0.25、0.5、1、2  $\mu$ mol/L)处理组,每组 4 个复孔。对照组细胞正常培养,多柔比星处理组细胞分别加入终浓度为(0.125、0.25、0.5、1、2)  $\mu$ mol/L 的多柔比星培养 24 h。实验独立重复 4 次。

**1.3.4 倒置显微镜观察心肌细胞搏动频率** 多柔比星孵育 24 h 后,倒置显微镜下观察各组心肌细胞,可见心肌细胞开始呈现成簇有规律、不同步的搏动,收缩明显而有力,由周边向心搏动。在相同的室温条件下,从每孔中自由选择 3 个视野进行观察,选取节律正常的细胞簇进行记录,计数心肌细胞的搏动频率。每组 4 个复孔,实验独立重复 4 次。

**1.3.5 CCK-8 法检查细胞增殖** 将提取的原代心肌细胞以  $5 \times 10^5$  个/ml 接种于 96 孔培养板内,并置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱内培养。多柔比星孵育 24 h 后,加入体积分数为 10% CCK-8 的 DMEM/F12 完全培养基,置于细胞培养箱内继续孵育 4 h,用酶标仪测定各组在 450 nm 处的吸光值。实验独立重

复 4 次。

**1.3.6 LDH 活性的测定** 将提取的原代心肌细胞以  $5 \times 10^5$  个/ml 接种于 96 孔培养板内,加入多柔比星 24 h 后,吸取各组细胞培养上清液,严格按照 LDH 试剂盒说明书操作,利用微板法检测 LDH 活性。实验独立重复 4 次。

**1.3.7 荧光定量 RT-PCR 检测心肌细胞 miRNA 表达水平** 接种于 6 孔培养板的原代心肌细胞,加入多柔比星 24 h 后,收集各组细胞,严格依照 RNA 提取试剂 TRIzol 的说明书操作,每个孔加入 1 ml TRIzol,然后将其置于冰上裂解 15 min,提取细胞总 RNA。先后经过氯仿萃取,异丙醇沉淀,75% 无水乙醇洗涤浓缩,最后用 DEPC 水溶解,制成 RNA 样品,提取总 RNA 的浓度和纯度用紫外分光光度计检测。miR-133a-5p、miR-133b-5p、miR-6216、miR-30e-5p、内参 U6 的扩增引物均购自广州复能基因公司(具体序列号保密)。按照 All-in-One™ miRNA qRT-PCR 试剂盒说明书,PolyA 加尾法进行逆转录 RNA,反应条件为:95 °C 预变性 10 min;95 °C 10 s,60 °C 20 s,72 °C 10 s,40 个循环,反应结束建立熔解曲线,同时设去离子水阴性对照。溶解曲线呈单一锐利主峰,说明 PCR 产物单一,扩增反应良好。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法<sup>[5]</sup> 计算目的基因的相对表达。实验独立重复 4 次。

**1.4 统计学处理** 选用 SPSS 10.0 统计软件分析数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 心肌细胞的纯度鉴定** 用免疫荧光法检测原代心肌细胞中特异性  $\alpha$ -SA 蛋白,在原代心肌细胞中  $\alpha$ -SA 抗原表达呈阳性,且位于胞质中,而非心肌细胞中则呈阴性。400 倍镜下取数个视野,计算平均值,结果显示阳性细胞率为 98%,见图 1A。

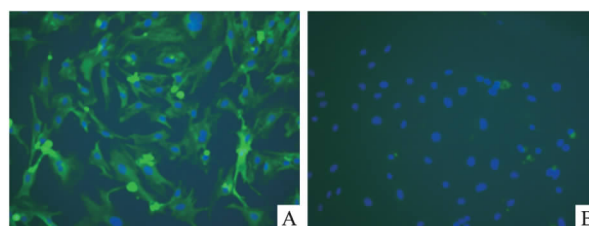


图 1 心肌细胞纯度鉴定  $\times 400$   
A:  $\alpha$ -SA 和 DAPI 的组合图; B: 阴性对照

**2.2 多柔比星降低心肌细胞搏动频率** 倒置显微镜下观察心肌细胞,并记录多柔比星处理后心肌细胞的搏动频率,结果显示,多柔比星孵育 24 h 后,对照组心肌细胞搏动频率为  $(175 \pm 10.52)$  次/min,多柔比星 0.125、0.25、0.5、1、2  $\mu\text{mol/L}$  组分别为  $(129.25 \pm 3.40)$ 、 $(98 \pm 5.16)$ 、 $(98 \pm 2.31)$ 、 $(87 \pm 10.00)$ 、 $(88 \pm 9.80)$  次/min;与对照组相比,多柔比星处理组心肌细胞搏动频率明显降低 ( $F = 80.28, P < 0.05$ )。

**2.3 多柔比星降低心肌细胞活力** 多柔比星处理 24 h 后,与对照组相比,多柔比星各浓度组心肌细胞细胞活性显著降低,且随着浓度增加,细胞活性受到的抑制更明显 ( $F = 120.4, P < 0.05$ ) 见图 2。

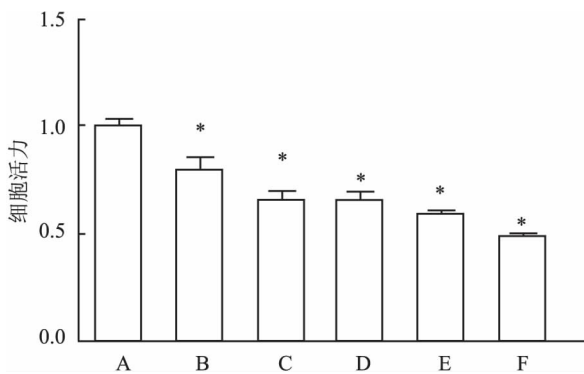


图 2 不同浓度多柔比星处理后心肌细胞的活力

A: 对照组; B ~ F: 0.125、0.25、0.5、1、2  $\mu\text{mol/L}$  多柔比星处理组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 多柔比星增加 LDH 活性** 心肌细胞培养液中的 LDH 水平可反映细胞损伤程度,与对照组  $(397 \pm 41)$  U/L 相比,多柔比星 0.125、0.25  $\mu\text{mol/L}$  浓度组 LDH 活性轻度升高,但差异无统计学意义;多柔比星 0.5、1、2  $\mu\text{mol/L}$  浓度组 LDH 活性显著升高,与对照组相比差异有统计学意义 ( $F = 5.899, P < 0.05$ )。见图 3。

**2.5 多柔比星对原代心肌细胞 miRNA 表达的影响** qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,多柔比星 1  $\mu\text{mol/L}$  浓度组可显著上调 miR-6216 ( $F = 6.663, P < 0.05$ ) 和 miR-30e-5p ( $F = 26.24, P < 0.05$ ),但显著降低 miR-133a-5p 水平 ( $F = 5.365, P < 0.05$ );多柔比星 0.5、1  $\mu\text{mol/L}$  均显著升高 miR-133b-5p 水平 ( $F = 20.24, P < 0.05$ )。见图 4。

### 3 讨论

原代培养的 SD 大鼠乳鼠心肌细胞模型可以保

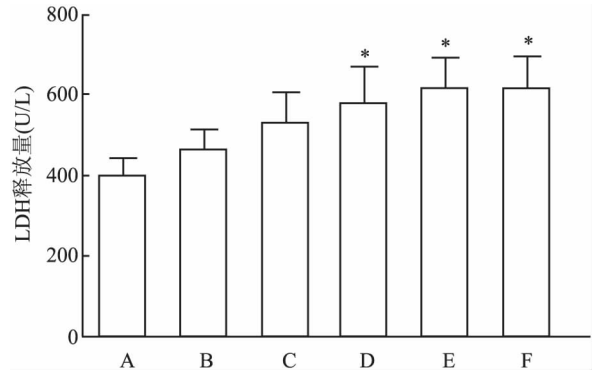


图 3 不同浓度多柔比星处理后心肌细胞培养液中 LDH 的表达

A: 对照组; B ~ F: 0.125、0.25、0.5、1、2  $\mu\text{mol/L}$  多柔比星处理组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

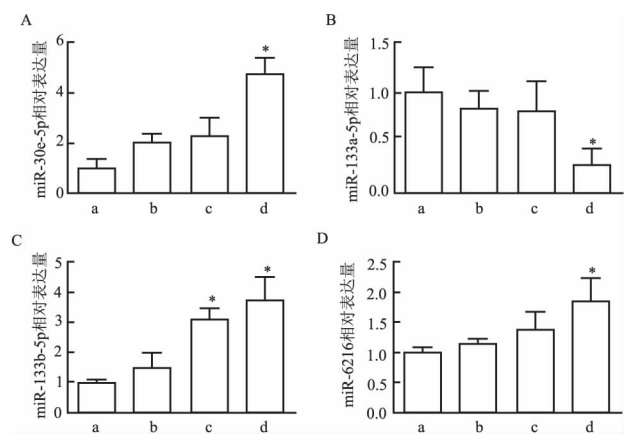


图 4 不同浓度多柔比星处理后心肌细胞中 miRNA 的表达

A: miR-30e-5p 的表达; B: miR-133a-5p 的表达; C: miR-133b-5p 的表达; D: miR-6216 的表达; a: 对照组; b ~ d: 0.25、0.5、1  $\mu\text{mol/L}$  多柔比星处理组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

持心肌在结构和功能方面的某些特质,并排除神经以及体液因素的影响,使心肌细胞处于相对稳定的环境中。除此之外,心肌细胞还具有自发性的规则的节律搏动,且心肌细胞的培养也比较简单、便捷、实验稳定性较好。利用原代培养的心肌细胞,探索多柔比星对心肌细胞的损伤作用以及其损伤机制,并对其安全性进行评价,对筛选相关药物具有重要作用。本研究结果显示,随多柔比星浓度增高,心肌细胞搏动频率减慢,细胞活力降低,细胞培养液中 LDH 活性升高,证实多柔比星可直接作用于心肌细胞,降低心肌细胞活力,导致心肌细胞损伤。

当前关于多柔比星心脏毒性的机制研究较多,其中氧化应激系统的激活被认为是最重要途径之一<sup>[6]</sup>。多柔比星会激活心肌细胞氧化应激系统,从而导致胞内 ROS 大量蓄积,后者可导致线粒体膜电位发生改变,从而引发细胞色素 C 和相关凋亡因

子的释放,触发心肌细胞凋亡程序。进一步研究<sup>[7]</sup>表明,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路,如 p38 MAPK、ERK1/2 和 PI3K/Akt 通路在多柔比星导致心肌细胞凋亡过程中发挥重要作用,特异性抑制上述通路可显著降低多柔比星诱导的心肌细胞凋亡水平。本研究观察了多柔比星处理对心肌细胞 miRNA 表达的改变,但 miRNA 表达的改变与心肌细胞的凋亡通路之间的关系如何,有待进一步探讨。

近年研究<sup>[8-9]</sup>显示,miRNA 在调控细胞增殖、分化、凋亡等过程中起关键性作用,并且参与调节多种心血管疾病包括心肌肥厚、心肌梗死、心力衰竭等发生发展过程。本研究 qRT-PCR 法结果表明,多柔比星处理后,miR-6216、miR-30e-5p 和 miR-133b-5p 表达上调,miR-133a-5p 表达下调。miR-133 在心肌细胞中优势表达,是最早被证明可调控心肌细胞凋亡的 miRNA,其中,miRNA-133a 主要在心肌中表达,miRNA-133b 主要在骨骼肌中表达,广泛参与心肌的生理和病理过程,如心脏发育、心肌肥厚和心律失常等<sup>[10]</sup>。Nishimura et al<sup>[11]</sup>发现,对 SD 大鼠尾静脉注射多柔比星后,血清中 miR-133a、miR-133b 的表达均增加;Marques et al<sup>[12]</sup>发现,与正常人相比,心力衰竭患者血清中 miR-30e-5p 表达显著下降;黄习文等<sup>[13]</sup>发现注射毛冬青能改善慢性心力衰竭大鼠模型的心功能,并且能上调 miR-133a 的表达。以上研究证明 miRNA 在药物或者病理基础上引起的心肌细胞凋亡机制中发挥重要作用,但 miR-6216 在心肌细胞凋亡中的作用尚未见报道。因此,推测多柔比星引起心肌细胞凋亡的机制可能与 miRNA 表达相关。然而,本研究的检测手段目前仅局限于 qRT-PCR,并未通过转染实验进一步验证,此研究结果尚有待于完善。

### 参考文献

[1] 朱梁,裴茂炜,沈栋等.多柔比星心脏毒性发生机制及

其防治的研究进展[J].健康研究,2013,33(2):102-5.

- [2] Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, et al. New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(13):1656-72.
- [3] Fabbri M. TLRs as miRNA receptors. [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(24):6333-7.
- [4] 朱海娟,何淑芳,金世云,等.大鼠心力衰竭细胞 microRNA 表达谱及生物信息学分析 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2016, 25(4):439-43.
- [5] Hartman M E, Librande J R, Medvedev I O, et al. An optimized and simplified system of mouse embryonic stem cell cardiac differentiation for the assessment of differentiation modifiers [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e93033.
- [6] 郝刚,俞蕴莉.阿霉素心肌毒性机制研究进展 [J]. *中南药学*, 2014, 12(10):993-7.
- [7] 刘广交,郭润民,徐文明,等.依达拉奉通过调控 p38MAPK 通路抑制阿霉素的心肌毒性 [J]. *解剖学研究*, 2013, 35(5):321-5.
- [8] Chistiakov D A, Orekhov A N, Bobryshev Y V. Cardiac-specific miRNA incardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction) [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 94:107-21.
- [9] Souza R W, Fernandez G J, Cunha J P, et al. Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309(10):H1629-41.
- [10] Xu C, Hu Y, Hou L, et al.  $\beta$ -Blocker carvedilol protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis by up-regulating miR-133 expression [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 75:111-21.
- [11] Nishimura Y, Kondo C, Morikawa Y, et al. Plasma miR-208 as a useful biomarker for drug-induced cardiotoxicity in rats [J]. *J Appl Toxicol*, 2015, 35(2):173-80.
- [12] Marques F Z, Vizi D, Khammy O, et al. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart [J]. *Eur J Heart Fail*, 2016: [Epub ahead of print]
- [13] 黄习文,游志德,陈洁,等.毛冬青对心衰模型大鼠心功能及 miR133a 表达的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 25(1):48-50.

## Effects of doxorubicin on cardiomyocytes and the expression of microRNAs

Yang Wan, Jin Shiyun, Xu Shijin, et al

(Dept of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the cardiotoxic effects of doxorubicin on neonatal rat cardiomyocytes and its influence on the expression of microRNAs. **Methods** The neonatal rat cardiomyocytes were cultured for 72 h, then randomly divided into six groups as follow: control group, doxorubicin groups at different concentrations (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mol/L). The cells were cultured in normal condition in control group, while the cells in doxorubicin groups were pretreated with doxorubicin at different concentrations for 24 h. Beating frequency of cardiomyocyte

# 右美托咪定对 LPS 诱导星形胶质细胞 MCP-1 分泌的影响

朱翔<sup>1</sup> 戴林<sup>2</sup> 姜保春<sup>3</sup> 杨建平<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究右美托咪定对脂多糖(LPS)诱导大鼠星形胶质细胞 MCP-1 mRNA 分泌的影响。方法 培养原代大鼠星形胶质细胞,待诱导分化成熟,免疫组化检测 α-2A 肾上腺受体的表达;不同浓度 LPS 刺激星形胶质细胞,观察 LPS 浓度与 MCP-1 mRNA 表达的量效关系;随后将细胞随机分为 6 组:对照组(control 组)、LPS(200 ng/ml)刺激组(LPS 组)、右美托咪定(DEX)500 ng/ml 孵育组(DEX 组)、DEX(10、100、500 ng/ml)+LPS(200 ng/ml)组[DEX(10、100、500 ng/ml)+LPS 组],荧光实时定量 PCR 检测各组 MCP-1 mRNA 的表达。结果 α-2A 肾上腺受体在星形胶质细胞表达,与细胞标志物 GFAP 完全共标;不同浓度 LPS 刺激可引起 MCP-1 剂量依赖性的表达增加( $F_{(6,41)} = 289.35, P < 0.001$ ),LPS 刺激引起 MCP-1 mRNA 表达量增加的 ED50 为 150.8 ng/ml,ED95 为 344.1 ng/ml  $r = 0.86$ ;与 LPS 组相比,不同浓度右美托咪定均可抑制 LPS 刺激引起的星形胶质细胞 MCP-1 mRNA 升高( $F_{(5,21)} = 454.15, P < 0.001$ )。结论 右美托咪定可抑制 LPS 刺激大鼠星形胶质细胞 MCP-1 mRNA 的表达,该作用可能是其减轻疼痛的机制之一。

**关键词** 右美托咪定;MCP-1;星形胶质细胞;α-2A 肾上腺受体

中图分类号 R 392.12;R 363.1;R 961

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0090-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.019

神经病理性疼痛常反复发作且渐加重,有效治疗方法不多,因此研究其发病机制及有效治疗措施有重要的临床意义<sup>[1]</sup>。大脑皮层和脊髓星形胶质细胞的激活在神经病理性疼痛中起重要作用<sup>[2-3]</sup>,激活的星形胶质细胞能分泌单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),通过其受体 CCR2 在慢性疼痛中起重要作用<sup>[4]</sup>。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是细菌内毒素的一种,能引发多种炎症反应,激活星形胶质细胞并释放 MCP-1,导致神经病理性疼痛。右美托咪定(dexmedetomidine, DEX)是一种高选择性的 α-2 肾上腺素能受体激动剂,目前临床常用于镇静催眠和镇痛<sup>[5]</sup>。但 DEX 的镇痛机制目前还不清楚。该研究观察 DEX 对 LPS 诱导星形胶质细胞 MCP-1 mRNA 分泌的影响,探讨其在慢性疼痛中的可能机制。

2016-08-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81400915);南通大学附属医院转化医学基地科研项目(编号:TDFzh2014013)

作者单位:<sup>1</sup>苏州大学附属第一医院麻醉科 苏州 215006

<sup>2</sup>南通大学附属医院风湿免疫科 南通 226001

<sup>3</sup>南通大学航海医学研究所 南通 226001

作者简介:朱翔,男,博士研究生,副主任医师;

杨建平,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: szyangjp@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级新生 1~2 d SD 大鼠,由南通大学实验动物中心提供。

**1.1.2 药品和试剂** 右美托咪定(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:09081232);Rabbit-anti-α-2A 抗体(美国 Santa Cruz 公司);Mouse-anti-GFAP 抗体

was observed using an inverted microscope. The cell viability was detected by CCK-8 kit and the lactic dehydrogenase(LDH) activity in the culture medium was assessed by microplate. The expressions of miRNAs, including miR-133a-5p, miR-133b-5p, miR-6216 and miR-30e-5p were analyzed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** Compared with the control group, doxorubicin significantly decreased the beating frequency of cardiomyocytes and cell viability, while markedly elevated the LDH activity in the Supernatant ( $P < 0.05$ ). In addition, the expressions of miR-133b-5p, miR-6216 and miR-30e-5p were markedly up-regulated, while the expression of miR-133a-5p was down-regulated by doxorubicin at the concentration of 1 mol/L significantly. **Conclusion** Doxorubicin might exert cardiotoxic effects on the neonatal rat cardiomyocytes via regulating the expressions of miR-133a-5p, miR-133b-5p, miR-6216 and miR-30e-5p.

**Key words** doxorubicin; cardiotoxicity; neonatal rat cardiomyocytes; microRNA