

RNA 干扰沉默基质交感分子 1 减轻 H9C2 细胞低氧/复氧损伤

郑红静, 吴继雄, 王晓晨, 许邦龙

摘要 目的 探讨沉默基质交感分子 1 (STIM1) 对 H9C2 心肌细胞低氧/复氧损伤的影响。方法 培养 H9C2 心肌细胞, 建立心肌细胞低氧/复氧 (H/R) 模型, STIM1-siRNA 转染 H9C2 心肌细胞以下调 STIM1 表达。流式细胞术检测各组细胞凋亡率, Western blot 法检测各组 STIM1 及凋亡相关蛋白表达情况。结果 与对照组比较, H/R 组的 STIM1 表达量明显增加 ($P < 0.05$), Bax/Bcl-2 蛋白比率增高, Caspase-3 上调, 细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$)。STIM1-siRNA 转染能显著下调 STIM1 基因的表达 ($P < 0.05$), 减少细胞内 Ca^{2+} 浓度, 并且 Bax/Bcl-2 比率降低, Caspase-3 表达下调, 细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.05$)。结论 心肌细胞发生缺血再灌注时 STIM1 表达量明显增加, STIM1-siRNA 转染下调 STIM1 基因的表达可以减轻低氧/复氧引起的心肌细胞凋亡。

关键词 H9C2 心肌细胞; 低氧/复氧; 凋亡; 基质交感分子 1
中图分类号 R 322.11; R 845.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1136-06

急性心肌梗死是严重危害人类健康的常见病。再灌注治疗通过恢复缺血组织的供血有效地挽救缺血组织, 是治疗心肌梗死的最主要措施。但心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 的存在, 一定程度上限制了再灌注治疗的疗效^[1-2]。钙超载在 MIRI 引起的细胞凋亡过程中发挥着重要作用^[3]。基质交感分子 1 (stromal interaction molecule 1, STIM1) 是钙库操作性钙离子通道 (store-operated calcium entry, SOCE) 的主要组成部分, 通过调控 SOCE 从而影响细胞内钙离子浓度的变化, 进而调控细胞的生物学行为^[4]。该研究利用 H9C2 心肌细胞建立心肌细胞低氧/复氧模型, 从而模拟心肌细胞的缺血再灌注, 观察在心肌细胞发生缺血再灌注时 STIM1 表达量的变化, 同时利用 siRNA 技术沉默 STIM1 的表达以探讨其对低氧/复氧 H9C2 心肌细胞凋亡的影响。

2016-04-19 接收

基金项目: 安徽医科大学临床科学研究项目 (编号: 2015xkj112)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院心血管内科, 合肥 230601

作者简介: 郑红静, 女, 硕士研究生;

吴继雄, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

wjx8261@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 H9C2 心肌细胞株 (中国科学院上海生命研究所细胞资源中心); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程有限公司); DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (中国 Biosharp 公司); DMEM 低糖培养基、Opti-MEM 培养基 (美国 Gibco 公司); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (上海贝博生物技术有限公司); STIM1、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cysteiny aspartate specific proteinase 3, Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (美国 Cell Signaling Technologies 公司); β -actin、过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG (武汉博士德生物工程有限公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒及超敏 ECL 化学发光试剂盒 (上海碧云天公司); PVDF 膜 (美国密理博公司); STIM1-siRNA 和 scramble siRNA (即阴性对照组) (上海吉凯公司); RT-PCR 试剂盒、脂质体 Lipofectamine™ 2000 (美国 Invitrogen 公司)。

1.2 siRNA 构建及验证 采用 Block-iT RNAi Designer 系统设计针对 STIM1 的 stealth-siRNA, 由上海吉凯公司设计并合成 3 条 siRNA, 见表 1。该 3 条 siRNA 的干涉效率采用 Western blot 及 RT-PCR 检测, 将细胞随机分成 5 组 ($n = 8$), 即空白对照组、scramble siRNA 组 (阴性对照组)、siRNA1 组、siRNA2 组、siRNA3 组。

表 1 各基因引物序列和基因片段长度

基因	引物序列 (5'-3')	片段长度 (nt)
siRNA 1	F: AAAGCUGAGCUUCUCAUCUACUG	547
	R: CAGUGAAGAUGAGAAGCUCAGCUUU	
siRNA 2	F: UAAUCAGCCACUGUAUACCCUCAUC	779
	R: GAUGAGGUGAUACAGUGGCCUGAUUA	
siRNA 3	F: CAAUCUGGAAACCACAGAGGAUCUC	1 676
	R: GAGAUCUCUGUGGUUCCAGAUUG	

1.3 H9C2 心肌细胞的培养及低氧/复氧模型的建

立 细胞培养基为含 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基。细胞置于 37 °C、5% CO₂ 和 95% 的空气培养箱中,培养 48 h 换液,以后隔天换液 1 次,待细胞覆盖率至少达到 80% 后用于建立低氧/复氧模型。

H9C2 细胞更换含 0.5% FBS、低糖 DMEM 培养基后在 37 °C、含 95% N₂/5% CO₂ 的低氧培养箱中处理 12 h 后,更换 0.5% FBS 的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行复氧处理 6 h 以建立低氧/复氧模型^[5]。对照组细胞在含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 18 h。

1.4 siRNA 转染细胞及实验分组 转染前 1 d 细胞被接种于 6 孔板中,用无双抗的完全培养基培养,当细胞密度达到约 80% 时,用 Lipofectamine™2000 介导转染 STIM1-siRNA 及 scramble siRNA,按说明书操作,后将细胞置于常规 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。实验分组:将培养的细胞随机分成 4 组($n=8$):对照组、低氧/复氧组(H/R 组)、低氧/复氧+STIM1-siRNA 组(STIM1-siRNA 组)、低氧/复氧+scramble siRNA 组(scramble siRNA 组)。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡变化 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒提供的方法,收集经 siRNA 转染 48 h 处理后的上清悬浮的细胞,同时用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁的细胞后,收集细胞,2 000 r/min 离心 5 min,弃培养基,用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphatebuffered saline, PBS)洗涤 2 次。使用 400 μ l 1 \times Binding Buffer 悬浮细胞,浓度约为 1 \times 10⁶ 个/ml。在细胞悬浮液中加入 5 μ l Annexin V-FITC 轻轻混匀后于室温避光反应 5 ~ 15 min。再加入 10 μ l PI 混匀后于室温避光反应 5 ~ 15 min。在 1 h 内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.6 Fluo3-AM 荧光探针检测细胞内 Ca²⁺ 浓度 将 H9C2 心肌细胞接种在培养皿中培养。将细胞分为对照组、H/R 组、STIM1-siRNA 组及 scramble siRNA 组。处理结束后各组加入 10 μ mol/L 的 Fluo3-AM 37 °C 孵育 60 min 后激光共聚焦显微镜扫描荧光强度(德国 Carl-Zeiss 公司)。Image-Pro Plus 6.0 软件(美国 Silver-Spring 公司)获取图像并分析荧光强度。

1.7 RT-PCR 法检测 STIM1 mRNA 的水平 TR-lzol 法提取细胞总 RNA,验证其纯度和完整性符合要求后进行逆转录,逆转录条件为 30 °C、10 min 42 °C、60 min 以及 85 °C、10 min。采用逆转录试剂盒

(美国 Invitrogen 公司)以逆转录获得的 cDNA 为模板, β -actin 为内参进行 RT-PCR 反应。STIM1 上游引物: 5'-ACTCTCCGGAAGCAGCTAGA-3', 下游引物: 5'-CCTTCGACAACCGAAGGTCA-3'。 β -actin 上游引物: 5'-ACGGTCAGGTCATCACTATCG-3', 下游引物: 5'-GGCATAGAGGTCTTTACGGATG-3'。逆转录条件为 95 °C、5 min, 95 °C、15 s, 60 °C、15 s, 72 °C、32 s 读板 40 个循环。反应体系 20 μ l, PCR 结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行定量比较, β -actin 为内参。

1.8 Western blot 法检测 STIM1-siRNA 转染效率及凋亡相关蛋白的表达情况 总蛋白样本的提取:向每瓶培养的心肌细胞内加入 400 μ l 含 PMSF 的裂解液,在冰上裂解 30 min 后于 4 °C、13 000 r/min 离心 5 min。将离心后含有蛋白的上清液分装收集放置 -20 °C 冰箱中保存,利用 BCA 法测定蛋白含量并制作标准曲线。使用 10% SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白质,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,之后孵一抗 4 °C 过夜。用 TBST 漂洗后于 37 °C 孵育二抗 2 h,洗膜后用 ECL 试剂盒显影,对胶片进行扫描,凝胶图象处理系统分析结果。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间进行单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 检验。若方差不齐则进行非参数分析(Kruskal-Wallis H 检验),组间多重比较采用 Tamhane 法。

2 结果

2.1 siRNA 对 H9C2 心肌细胞 STIM1 mRNA 和蛋白表达的影响 RT-PCR 和 Western blot 结果显示,与空白对照组比较,阴性对照组对 H9C2 心肌细胞 STIM1 表达的影响差异无统计学意义。3 条 siRNA 中,以 siRNA3 对 STIM1 表达的抑制效率最高,与空白对照组比较,siRNA3 使得心肌细胞 STIM1 mRNA 表达量下降了 71%,蛋白表达量减少了 69%。见图 1。

2.2 各组 H9C2 心肌细胞 STIM1 的表达 Western blot 结果显示,各组 STIM1 的表达差异有统计学意义($\chi^2=26.214, P<0.001$)。其中,与对照组比较,H/R 组 STIM1 表达量增加了 3.75 倍($P<0.05$),STIM1-siRNA 组的 STIM1 蛋白表达水平较 H/R 组和 scramble siRNA 组明显降低,分别为 0.2 倍和 0.21 倍($P<0.001$),而 scramble siRNA 组的 STIM1 蛋白表达水平与 H/R 组间的差异无统计学意义($P=0.948$)。见图 2。

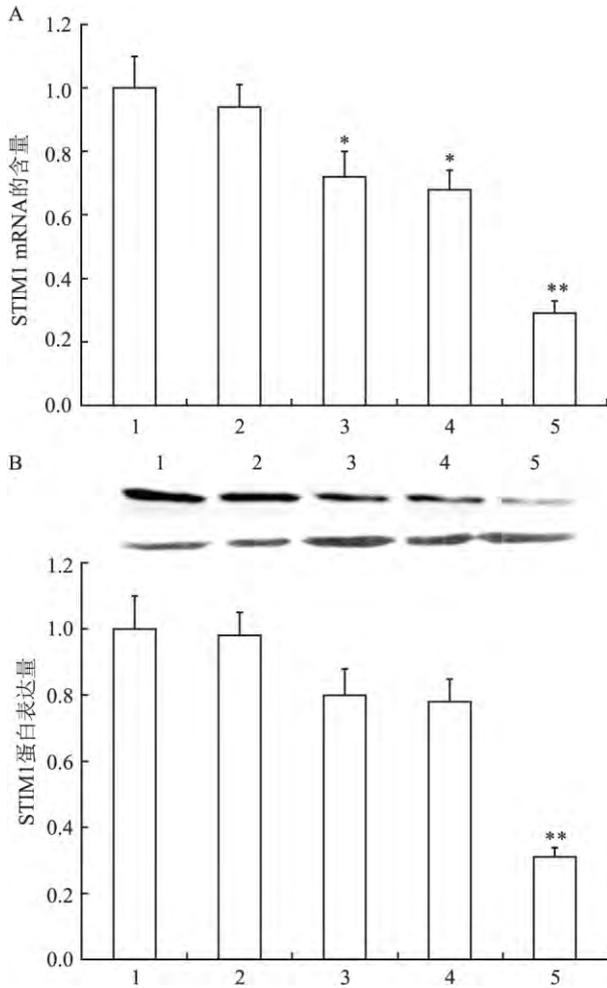


图1 siRNA对H9C2心肌细胞STIM1 mRNA和蛋白表达的影响 (n=10)

A: STIM1 mRNA表达; B: STIM1蛋白表达; 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: siRNA1组; 4: siRNA2组; 5: siRNA3组; 与空白对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

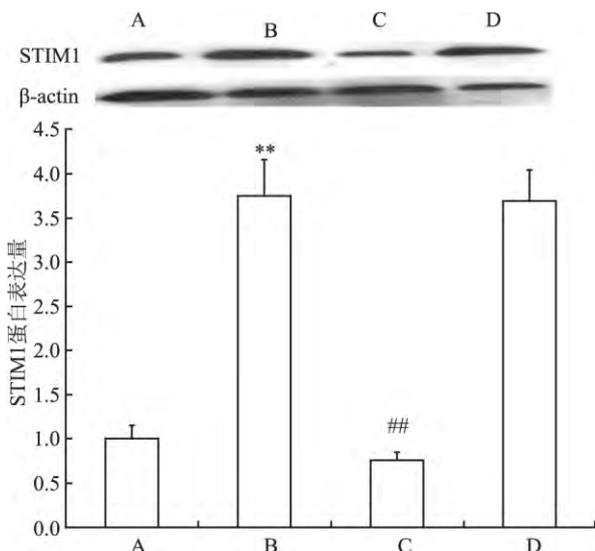


图2 STIM1在各组H9C2心肌细胞中的表达情况 (n=8)

A: 对照组; B: H/R组; C: STIM1-siRNA组; D: scramble siRNA组; 与对照组比较: ** P < 0.01; 与H/R组比较: ## P < 0.01

2.3 STIM1-siRNA转染后H9C2心肌细胞凋亡的变化 流式细胞术检测细胞凋亡变化提示各组细胞凋亡率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 26.591, P < 0.001$)。对照组细胞凋亡率只有 (0.1 ± 0.01)%; 与对照组比较, H/R组凋亡的细胞增多, 细胞凋亡率达 (33.5 ± 5.80)% (P < 0.001); STIM1-siRNA组细胞凋亡率为 (6.9 ± 0.94)% 较H/R组降低 (P < 0.001); scramble siRNA组细胞凋亡率为 (35.3 ± 4.10)% 与H/R组比较差异无统计学意义 (P = 0.897)。见图3。

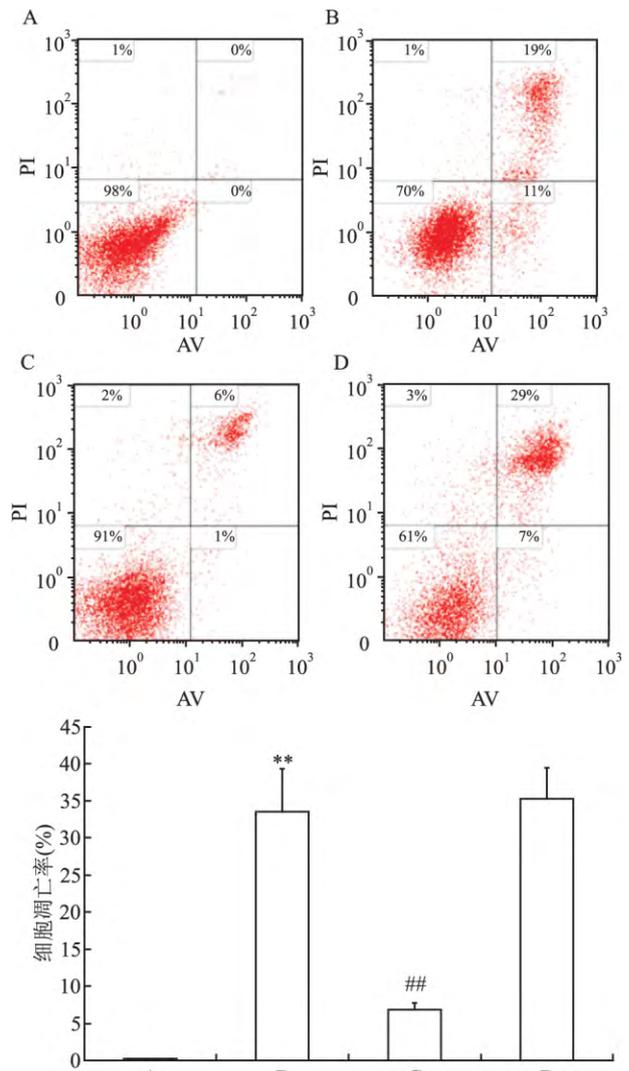


图3 流式细胞术检测各组心肌细胞凋亡变化

A: 对照组; B: H/R组; C: STIM1-siRNA组; D: scramble siRNA组; 与对照组比较: ** P < 0.01; 与H/R组比较: ## P < 0.01

2.4 STIM1-siRNA转染对H9C2心肌细胞Ca²⁺浓度的影响 各组细胞荧光强度差异有统计学意义 (F = 278.808, P < 0.001), Ca²⁺浓度的差异有统计学意义。与对照组比较, H/R组心肌细胞内Ca²⁺浓

度明显增加 ($P < 0.001$) , 荧光强度是对照组的 2.93 倍; 而通过 STIM1-siRNA 转染下调 STIM1 表达后, 能抑制低氧/复氧导致的这一作用, 荧光强度为 H/R 组的 0.35 倍 ($P < 0.001$)。H/R 组与 scramble siRNA 组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.948$)。见图 4。

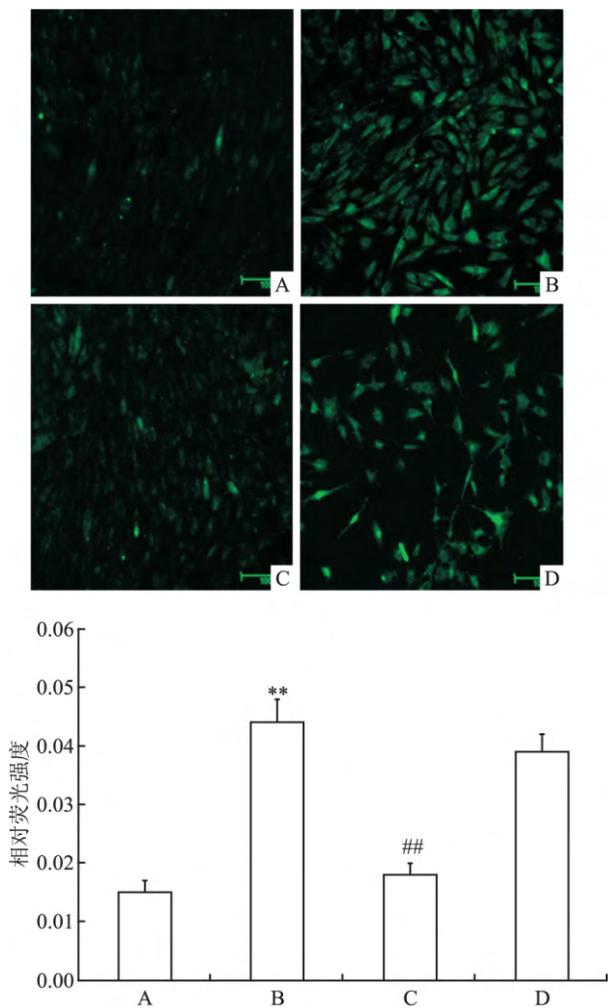


图4 STIM1-siRNA 转染对 H9C2 心肌细胞 Ca^{2+} 浓度的影响

A: 对照组; B: H/R 组; C: STIM1-siRNA 组; D: scramble siRNA 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 H/R 组比较: ## $P < 0.01$

2.5 STIM1-siRNA 转染对 H9C2 心肌细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3 表达的影响 Western blot 结果显示, 各组间 Bcl-2 ($\chi^2 = 27.606, P < 0.001$)、Bax ($\chi^2 = 26.647, P < 0.001$) 和 cleaved-Caspase-3 ($\chi^2 = 24.589, P < 0.001$) 差异有统计学意义, Bax/Bcl-2 ($\chi^2 = 26.241, P < 0.001$) 差异有统计学意义。其中, 与对照组比较, H/R 组心肌细胞内 Bax ($P < 0.001$) 和 Caspase-3 ($P < 0.001$) 的表达明显增加, Caspase-3 是对照组的 3.75 倍。Bcl-2 表达下降 (P

< 0.001) , Bax/Bcl-2 是对照组的 5.24 倍; 而通过 STIM1-siRNA 转染下调 STIM1 表达后, 能抑制低氧/复氧导致的这一作用, Caspase-3 为 H/R 组的 0.22 倍 ($P < 0.001$) , Bax/Bcl-2 为 H/R 组的 0.35 倍 ($P < 0.001$)。H/R 组与 scramble siRNA 组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.887$)。见图 5。

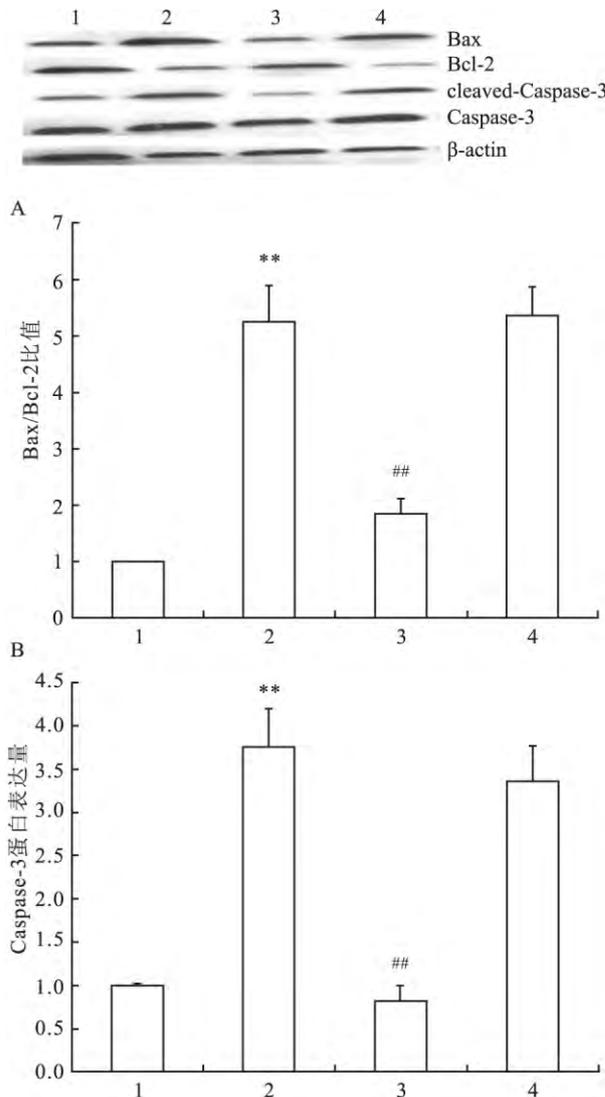


图5 Western blot 法检测各组中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达情况 ($n = 8$)

A: Bax/Bcl-2; B: Caspase-3; 1: 对照组; 2: H/R 组; 3: STIM1-siRNA 组; 4: scramble siRNA 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 H/R 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

本实验利用 H9C2 心肌细胞株建立心肌细胞低氧/复氧模型, 从而模拟心肌细胞的缺血再灌注, 观察到心肌细胞发生缺血再灌注时 STIM1 表达量明

显增加,随后用 siRNA-STIM1 转染沉默 STIM1 基因的表达后,可见 STIM1-siRNA 组较 H/R 组和 scramble siRNA 组的 STIM1 表达量明显减少,凋亡率明显减低,凋亡相关蛋白含量明显下降,这与 Zhang et al^[6] 在动物实验脑缺血模型中发现的结果相似,提示 STIM1 参与了 MIRI,而抑制 STIM1 的表达可以减轻再灌注损伤引起的细胞凋亡。

凋亡是生理性或某些因素诱发的有程序的细胞自主生化过程,在 MIRI 过程中扮演着重要角色^[7]。Bcl-2 家族蛋白在调节细胞凋亡中发挥关键作用,这些蛋白质包括促细胞凋亡的 Bax 和抑制细胞凋亡的 Bcl-2 等,这些诱导或抑制凋亡的蛋白相互作用,形成了一个复杂的调控网络,而这个网络中促凋亡和抗凋亡蛋白的比率决定细胞的存活或者死亡^[8],Bax/Bcl-2 比例增高,细胞凋亡明显增加^[9]。Caspase-3 被认为是细胞凋亡过程中的主要执行者^[10]。故 Bcl-2、Bax/Bcl-2、Caspase-3 是反映凋亡的经典指标。本实验结果表明,与对照组比较,H9C2 细胞经历 12 h 低氧和 6 h 复氧后凋亡率显著增加,说明体外细胞低氧/复氧模型的建立是成功的。Western blot 结果显示 Bax/Bcl-2 比例增高,cleaved-Caspase-3 显著上调。siRNA 抑制 STIM1 基因的表达可以显著降低细胞凋亡率及 Bax/Bcl-2 的比例,并使 Caspase-3 表达下调,从而说明了 STIM1 基因沉默可以抑制低氧/复氧损伤引起的心肌细胞凋亡。

STIM1 是存在于内质网膜上的 I 型跨膜蛋白,是内质网钙离子浓度的感受器和 SOCE 的核心蛋白之一,其结构中包含一段长约 100 个氨基酸序列的具有活化功能的结构域即 SOAR。当内质网内的 Ca^{2+} 消耗之后,该结构域能够激活 Orai 通道,引起 SOCE 通路的开放及 Ca^{2+} 内流^[4,11-12]。当钙库内的 Ca^{2+} 得到补充后,STIM1 蛋白迅速地从内质网-细胞膜偶联中解离出来,Orai 蛋白也随之失活,最终 SOCE 通路关闭^[13]。Zhang et al^[6] 发现,SOCE 参与了脑缺血损伤,在此过程中 STIM1 和 Orai 表达均增加,而用 siRNA 抑制 STIM1 表达可以下调 Orai 的含量,减少神经元细胞内 Ca^{2+} 浓度,改善脑功能。本研究显示低氧/复氧损伤可导致 H9C2 细胞内 Ca^{2+} 浓度显著增加,用 siRNA 抑制 STIM1 表达可以减少 H9C2 细胞内 Ca^{2+} 浓度,与上述研究结果一致。因此推测抑制 STIM1 的表达,可能是通过减少 Ca^{2+} 内流而减轻低氧/复氧损伤中细胞的凋亡的。

综上所述,通过本实验研究显示心肌细胞发生

缺血再灌注时 STIM1 表达明显增加,siRNA 沉默 STIM1 基因的表达可以减少低氧/复氧损伤所致的心肌细胞 Ca^{2+} 浓度的增加和细胞的凋亡,并下调凋亡相关蛋白的表达。未来将在动物模型中进一步探讨 STIM1 影响 MIRI 的机制,希望为临床减少缺血再灌注损伤提供新的思路。

参考文献

- [1] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury [J]. *N Engl J Med* 2007, 357(11): 1121-35.
- [2] 位凯,王飞,张瑾,等.天麻素预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的可能机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(6): 756-8.
- [3] Yan W, Zhang F, Zhang R, et al. Adiponectin regulates SR Ca^{2+} cycling following ischemia/reperfusion via sphingosine 1-phosphate-CaMKII signaling in mice [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2014, 74(9): 183-92.
- [4] Soboloff J, Rothberg B S, Madesh M, et al. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(9): 549-65.
- [5] Park M, Youn B, Zheng X L, et al. Globular adiponectin, acting via AdipoR1/APPL1, protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis [J]. *PLoS One* 2011, 6(4): e19143.
- [6] Zhang M, Song J N, Wu Y, et al. Suppression of STIM1 in the early stage after global ischemia attenuates the injury of delayed neuronal death by inhibiting store-operated calcium entry-induced apoptosis in rats [J]. *Neuroreport* 2014, 25(7): 507-13.
- [7] Mokhtari B, Badalzadeh R, Alihemmati A, et al. Phosphorylation of GSK-3 β and reduction of apoptosis as targets of troxerutin effect on reperfusion injury of diabetic myocardium [J]. *Eur J Pharmacol* 2015, 765: 316-21.
- [8] Siddiqui W A, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update [J]. *Arch Toxicol* 2015, 89(3): 289-317.
- [9] Zhang Y, Li H, Zhao G, et al. Hydrogen sulfide attenuates the recruitment of CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid cells and regulates Bax/Bcl-2 signaling in myocardial ischemia injury [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(7497): 560.
- [10] Sun Y, Xu Y, Geng L. Caspase-3 inhibitor prevents the apoptosis of brain tissue in rats with acute cerebral infarction [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(1): 133-8.
- [11] Zhao G, Li T, Brochet D X, et al. STIM1 enhances SR Ca^{2+} content through binding phospholamban in rat ventricular myocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(34): E4792-801.
- [12] Didiasova M, Zakrzewicz D, Magdolen V, et al. STIM1/ORAI1-mediated Ca^{2+} influx regulates enolase-1 exteriorization [J]. *J Biol Chem* 2015, 290(19): 11983-99.
- [13] Yang X, Jin H, Cai X, et al. Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109(15): 5657-62.

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.030.html>

◇ 药学研究 ◇

环靶明对 M1 型巨噬细胞分泌 iNOS 的影响

叶家宝 李俊 徐晓军 黄成 孟晓明

摘要 目的 研究环靶明在巨噬细胞极化过程中的作用。方法 用 100 ng/ml 脂多糖 (LPS) 和 20 ng/ml 干扰素 γ (IFN- γ) 处理 RAW264.7 24 h 刺激成 M1 型巨噬细胞,用 20 ng/ml 白介素-4 (IL-4) 处理 RAW264.7 24 h 刺激成 M2 型巨噬细胞,用荧光定量 PCR (QPCR) 法检测各分型中一氧化氮合成酶 (iNOS)、CD86、精氨酸酶-1 (Arg-1)、CD206、GLi1、ptch1 mRNA 水平的表达;用 QPCR 法、Western blot 法、免疫荧光法检测加入环靶明后对 M1 型巨噬细胞分泌 iNOS 的影响。结果 M1 型巨噬细胞高分泌 iNOS、CD86、M2 型巨噬细

胞高分泌 Arg-1、CD206 ($P < 0.01$); 40 nmol/L 环靶明刺激后 M1 型巨噬细胞中 ptch1 mRNA 水平的表达明显增强且在 100 nmol/L 时达到最大值 ($P < 0.01$); 经环靶明 1 000 nmol/L 刺激后有效降低了 iNOS 的 mRNA 和蛋白水平,可能提示环靶明会促进巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞分化。结论

环靶明能够明显地降低 M1 型巨噬细胞中 iNOS 的分泌。

关键词 环靶明; 巨噬细胞; RAW264.7; 一氧化氮合成酶
中图分类号 R 392.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1141-05

2016-05-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273526, 81473268); 安徽省自然科学基金(编号: 1308085MH145); 安徽省科技专项基金(编号: 1301042212); 高等学校博士学科点专项科研基金(编号: 20123420120001)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 叶家宝, 男, 硕士研究生;

李俊, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞之一, 通过免疫监视、免疫清除, 清除病原体, 维护内环境的稳态^[1]。在这个过程中, 巨噬细胞可在不同的生理病理状况下表现出不同的表型以调控炎症反应, 即定义为不同的极化状态。研究^[2]显示, 巨噬细胞极化与炎症相关疾病的发生发展有着密切关系, 例如类风湿性关节炎、细菌和寄生虫感染等。进一步的研

Inhibition of stromal interaction molecule 1 attenuates hypoxia/reoxygenation induced apoptosis in H9C2 cells

Jia Hongjing, Wu Jixiong, Wang Xiaochen, et al

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

Abstract Objective To investigate the role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in apoptosis of H9C2 cardiomyocytes after hypoxia/reoxygenation (H/R) injury. **Methods** H9C2 cardiomyocytes were cultured, the model of H/R injury was established. STIM1-siRNA was transfected into H9C2 cardiomyocytes to implement RNA interference. The apoptotic rate was detected by flow cytometry. Western blot analysis was used to detect the expressions of STIM1 and the apoptosis related proteins in each group. **Results** Compared with the control group, the expression of STIM1 was markedly increased in H/R group ($P < 0.05$), Bax/Bcl-2 was increased and the expression of Caspase-3 was up-regulated. Meanwhile, the apoptotic rate was increased ($P < 0.05$). However, inhibition of STIM1 through transfection of STIM1-siRNA resulted in significantly decreased expression of STIM1 ($P < 0.05$) and reduced influx of calcium, the ration of Bax/Bcl-2 was decreased and the expression of Caspase-3 was down-regulated, the apoptotic rate was also reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of STIM1 is significantly increased when cardiomyocytes suffered from the H/R injury. Inhibition of STIM1 through transfection of STIM1-siRNA can decrease the myocardial apoptosis after H/R injury.

Key words H9C2 cells; hypoxia/reoxygenation injury; apoptosis; stromal interaction molecule 1