

miR-34a-5p 靶向 Notch1 对 H/R 诱导的人心肌细胞凋亡的影响及机制

刘龙珍,洪亮,宋兵

摘要 **目的** 探讨微小 RNA(miR)-34a-5p/跨膜融合蛋白 1(Notch1)信号轴介导内质网应激对缺氧/复氧(H/R)人心肌细胞的改善作用。**方法** 人心肌细胞随机分为对照组(Control组)、缺氧复氧组(H/R组)、模拟物阴性对照组(mimic NC组)、模拟物组(mimic组)、抑制物阴性对照组(inhibitor NC组)、抑制物组(inhibitor组)。除 Control 组外,其余组细胞建立 H/R 损伤模型。定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)法检测 miR-34a-5p 和 Notch1 表达量,噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率,流式细胞仪检测细胞凋亡率,双荧光素酶基因报告法检测 miR-34a-5p 和 Notch1 的靶向关系,蛋白印迹法检测转录激活因子 6(ATF6)、肌醇需求酶 1(IRE1)、蛋白激酶样内质网激酶(PERK)以及葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)表达量。**结果** 与 Control 组比较,H/R 组 miR-34a-5p 表达量、细胞凋亡率以及 ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达量均升高,细胞存活率以及 Notch1 mRNA 和蛋白表达量均降低($P < 0.05$);与 H/R 组和 mimic NC 组比较,mimic 组 miR-34a-5p 表达量、细胞凋亡率以及 ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达量均升高,细胞存活率以及 Notch1 mRNA 和蛋白表达量均降低($P < 0.05$);与 H/R 组和 inhibitor NC 组比较,inhibitor 组 miR-34a-5p 表达量、细胞凋亡率以及 ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达量均降低,细胞存活率以及 Notch1 mRNA 和蛋白表达量均升高($P < 0.05$)。**结论** 下调 miR-34a-5p 可抑制 H/R 人心肌细胞凋亡,其可能是通过靶向激活 Notch1 介导内质网应激发挥作用。

关键词 缺氧/复氧;内质网应激;心肌细胞;miR-34a-5p;Notch1

中图分类号 R 541.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0815-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.011

2023-12-01 接收

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2021ZD0027);安徽医科大学第一附属医院与合肥中科离子医学技术装备有限公司合作项目(编号:CIM-HT-2018-327)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院心内科,合肥 230022

作者简介:刘龙珍,男,硕士研究生;

宋兵,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: anyisongbingok@aliyun.com

心肌缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡是造成心肌功能障碍的主要原因。内质网应激造成内质网功能受损,促进细胞凋亡^[1]。七氟醚可抑制内质网应激减轻心肌缺血再灌注损伤^[2]。通过调控靶基因的转录和翻译参与多种生理病理过程。微小 RNA(microRNA, miR)-34a 在心肌缺血再灌注引起的心肌损伤中表达上调^[3]。辣椒素通过抑制 miR-34a 表达可改善心肌缺血再灌注大鼠心功能障碍^[4]。跨膜受体蛋白 1(transmembrane receptor protein 1, Notch1)信号通路是一种进化上高度保守的信号通路,其在心肌缺血再灌注中的保护作用已有文献^[5-6]报道。此外,miR-34a 可靶向调控 Notch1 改善糖尿病大鼠血管内皮功能障碍^[7]。藏红花素通过降低缺血再灌注心肌细胞中 miR-34a 的表达,靶向抑制内质网应激^[8]。该研究探讨 miR-34a-5p 是否能通过靶向调控 Notch1 抑制内质网应激减轻缺氧/复氧(hypoxia-reoxygenation, H/R)造成的心肌细胞损伤。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人心肌细胞永生细胞(immortalized human cardiomyocytes, AC16)购自美国 ATCC 公司。miR-34a-5p 模拟物(mimic)、抑制物(inhibitor)以及各自阴性对照(mimic NC 和 inhibitor NC)均购自上海吉玛制药技术有限公司;噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT)试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号:43513);miR-34a-5p 和 Notch1 引物序列均由广州锐博生物科技有限公司合成;Notch1 野生型(Notch1-Wt)和 Notch1 突变型(Notch1-Mut)重组荧光素酶报告基因载体均购自上海生工生物工程有限公司,转录激活因子 6(activating transcription factor6, ATF6)、肌醇需求酶 1(inositol-requiring enzyme-1, IRE1)、蛋白激酶样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)以及葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78, GRP78)蛋白抗体购自美国 Abcam 公司(批号:ab227830、ab124945、ab229912、ab21685);TRIzol 试剂盒购自上海源叶生物科技有

限公司(批号:R30506);荧光定量 PCR 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司(批号:ml077691);Forma Steri-Cycle i160 5% CO₂ 培养箱购自美国赛默飞世尔科技公司;FACS Canto II 流式细胞仪购自美国碧迪医疗器械有限公司;FC 酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 AC16 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养,每天更换一次新鲜培养液,当细胞密度达到 80% 以上时胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 细胞分组与转染 将第 3 代对数期细胞稀释成单细胞悬液,取 2 × 10⁵ 个细胞接种于 6 孔板,随机分为 mimic NC 组 (转染 miR-34a-5p mimic NC)、mimic 组 (转染 miR-34a-5p mimic)、inhibitor NC 组 (转染 miR-34a-5p inhibitor NC)、inhibitor 组 (转染 miR-34a-5p inhibitor),各组转染相应质粒,另设对照组 (Control 组) 和 H/R 组。转染 48 h 后,除 Control 组外其余组细胞均进行 H/R。

1.2.3 H/R 细胞损伤模型建立 除 Control 组外,弃掉其余各组细胞的培养基,换用 5% CO₂、95% N₂ 混合气饱和 1 h 的 DMEM 无糖无血清培养基,置于 5% CO₂、95% N₂ 的 37 °C 密闭培养箱中培养 4 h。弃掉旧培养基,加入经 5% CO₂、95% 空气饱和 1 h 的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 5% CO₂、95% 空气的 37 °C 密闭培养箱中培养 4 h。Control 组细胞换用正常培养基,置于 5% CO₂、95% 空气的 37 °C 密闭培养箱中培养。

1.3 检测指标

1.3.1 定量反转录聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法检测细胞中 miR-34a-5p 和 Notch1 基因表达水平 3 000 r/min 离心收集各组细胞, PBS 清洗 2 次, TRIzol 试剂提取细胞中总 RNA, 紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度。将 1 μg RNA 逆转录成 cDNA, 配制 20 μl 反应体系: TB Green Premix ExTaq II (2 ×) 10 μl, ROX Reference Dye or Dye II 0.4 μl, cDNA 2 μl, 上下游引物各 0.8 μl, 无核酶水 6.0 μl。进行荧光定量 PCR 反应, 反应条件设置为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s, 进行 40 个循环。2^{-ΔΔC_T} 法计算 miR-34a-5p 和 Notch1 基因相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
miR-34a-5p	F: ACACTCCAGCTGGGTGGCACTGTCTTAGC R: CTCAACTGGTGTCTGGAGTGGGCAAT
U6	F: CTC GCT TCG GCA GCACA R: AACGCTTCACGAATTGCGT
Notch1	F: GAGGCGTGGCAGACTATGC R: CTTGTA CTCCGTGACGCTGA
GAPDH	F: CTGGGCTACACTGAGCACC R: AAGTGGTCTTGAGGGCAATG

1.3.2 MTT 法检测细胞活性 取各组细胞制成 2 × 10⁴ 个/ml 的单细胞悬液, 取 200 μl 接种于 96 孔板, 每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后每孔加入 20 μl MTT 溶液, 继续培养 4 h, 再加入 150 μl 二甲亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 振荡混匀, 置于酶标仪上检测 490 nm 波长处吸光度 (A) 值, 细胞存活率 (%) = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 × 100%。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 3 000 r/min 离心收集各组细胞于离心管中, PBS 清洗 2 次, 1 × PBS 结合缓冲液将细胞调整成 1 × 10⁵ 个/ml 的单细胞悬液, 分别加入 5 μl Annexin V-FITC 和 PI, 振荡混匀, 避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.4 双荧光素酶报告实验检测靶向关系 TargetScan 软件预测显示 miR-34a-5p 与 Notch1 3' UTR 上存在结合位点, PCR 技术扩增含该结合位点的 Notch1 基因 3' UTR 的部分序列, 构建野生型 (Notch1 WT) 载体和突变型 (Notch1 Mut) 载体。将 Notch1 WT 或 Notch1 Mut 载体分别与 miR-34a-5p mimic 或 miR-34a-5p NC 转染细胞。转染 48 h 后, 双荧光素酶报告分析系统检测荧光素酶活性。

1.3.5 蛋白印迹法检测 Notch1、ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达量 3 000 r/min 离心收集各组细胞, RIPA 裂解液 40 μl 提取细胞中总蛋白, 调整蛋白浓度并煮沸变性。40 μg 蛋白采用 12% 的分离胶电泳分离, 电泳仪参数设置为: 120 V 2 h, 将蛋白湿转至 PVDF 膜上, 转膜仪参数设置为: 0.3 A 2 h。5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 抗体 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h, 洗膜, ECL 法显色, Image J 分析条带灰度值, 计算目的蛋白表达量。

1.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS 25.0 软件进行分析, 符合正态分布的定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-34a-5p 和 Notch1 基因表达水平检测结

果 与 Control 组比较,H/R 组 miR-34a-5p 升高, Notch1 降低($P < 0.05$);与 H/R 组和 mimic NC 组比较,mimic 组 miR-34a-5p 升高,Notch1 降低($P < 0.05$);与 H/R 组和 inhibitor NC 组比较,inhibitor 组 miR-34a-5p 降低,Notch1 升高($P < 0.05$)。见图 1。

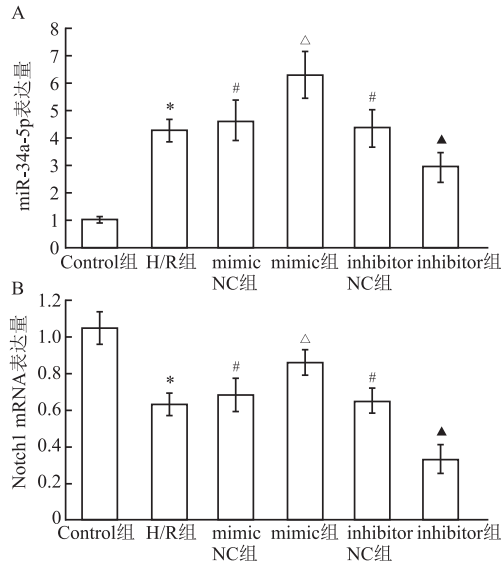


图1 过表达(抑制)miR-34a-5p对AC16细胞中 miR-34a-5p的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: miR-34a-5p 表达量;B: Notch1 mRNA 表达量;与 Control 组比较: * $P < 0.05$;与 H/R 组比较: # $P < 0.05$;与 mimic NC 组比较: Δ $P < 0.05$;与 inhibitor NC 组比较: ▲ $P < 0.05$

2.2 细胞存活率检测结果 与 Control 组比较,H/R 组细胞存活率降低($P < 0.05$);与 H/R 组和 mimic NC 组比较,mimic 组细胞存活率降低($P < 0.05$);与 H/R 组和 inhibitor NC 组,inhibitor 组细胞存活率升高($P < 0.05$)。见图 2。

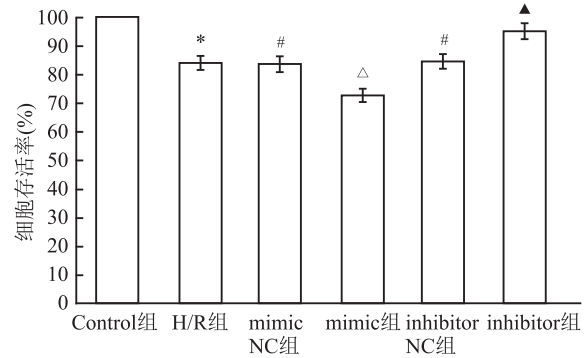


图2 过表达(抑制)miR-34a-5p对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$) 与 Control 组比较: * $P < 0.05$;与 H/R 组比较: # $P < 0.05$;与 mimic NC 组比较: Δ $P < 0.05$;与 inhibitor NC 组比较: ▲ $P < 0.05$

2.3 细胞凋亡率检测结果 与 Control 组比较,H/R 组细胞凋亡率升高($P < 0.05$);与 H/R 组和 mimic NC 组比较,mimic 组细胞凋亡率升高($P < 0.05$);与 H/R 组和 inhibitor NC 组比较,inhibitor 组细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。见图 3。

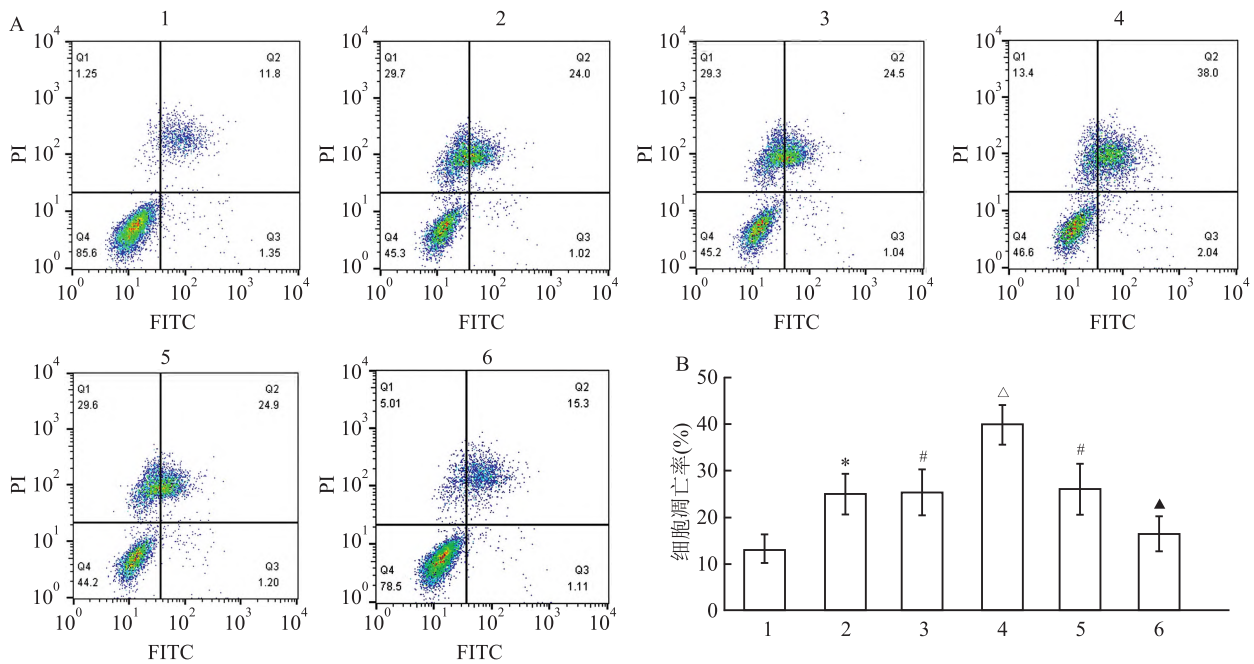


图3 过表达(抑制)miR-34a-5p对细胞凋亡率的影响

A: 流式细胞术检测细胞凋亡率;B: 定量分析细胞凋亡率;1: Control 组;2: H/R 组;3: mimic NC 组;4: mimic 组;5: inhibitor NC 组;6: inhibitor 组;与 Control 组比较: * $P < 0.05$;与 H/R 组比较: # $P < 0.05$;与 mimic NC 组比较: Δ $P < 0.05$;与 inhibitor NC 组比较: ▲ $P < 0.05$

2.4 靶向关系验证结果 与 miR-34a-5p mimic NC + Notch1 WT 组比, miR-34a-5p mimic + Notch1 WT 组荧光素酶相对活性明显降低 ($P < 0.05$), 而 miR-34a-5p mimic NC + Notch1 Mut 组与 miR-34a-5p mimic + Notch1 Mut 组比较, 荧光素酶相对活性差异无统计学意义。见图 4 和表 2。

```

Notch1 3' UTR-WT 5' ...UAUUUUACACAGAAAACACUGCCU...
miR-34a-5p 3' UGGUCGAUUGUUAUGUGACGGU
Notch1 3' UTR-Mut 5' ...UAUUUUACACAGAAAAGAGUAAU...
    
```

图 4 miR-34a-5p 和 Notch1 的靶向结合位点和突变位点

表 2 荧光素酶相对活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Notch1 WT	Notch1 Mut
miR-34a-5p mimic NC	1.02 ± 0.13	1.05 ± 0.41
miR-34a-5p mimic	0.42 ± 0.06	1.04 ± 0.34
<i>t</i> 值	7.258	0.033
<i>P</i> 值	0.002	0.976

2.5 蛋白印迹法检测结果 与 Control 组比较, H/R 组 ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达量均升高, Notch1 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$); 与 H/R 组和 mimic NC 组比较, mimic 组 ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达量均升高, Notch1 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$); 与 H/R 组和 inhibitor NC 组比较, inhibitor 组 ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达量均降低, Notch1 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

该研究结果显示, H/R 造成心肌细胞存活率降低、凋亡率升高、细胞中 miR-34a-5p 表达上调, 而下调细胞中 miR-34a-5p 表达可提高细胞存活率, 降低细胞凋亡率, 上调细胞中 miR-34a-5p 表达则发挥相反作用。此结果提示 miR-34a-5p 与 H/R 造成的心肌细胞凋亡呈负相关。此结果与 Li et al^[9] 报道的 miR-34a 抑制剂缓解了 H/R 诱导的线粒体损伤, 降低心肌细胞凋亡这一结果具有一致性。内质网长期损伤时, 细胞内环境稳态难以维持, 最终会触发细胞凋亡机制, 引起细胞死亡^[10]。Li et al^[11] 研究表明, 心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡增加与内质网应激有关。Lai et al^[12] 报道显示抑制高迁移率组蛋白表达可减轻肾组织内质网应激, 减轻肾损伤。由此笔者推测抑制内质网应激可能降低 H/R 引起的心肌细胞凋亡。该研究表明, H/R 处理后心肌细胞中 Notch1 表达降低, 而抑制细胞中 miR-34a-5p 表达可

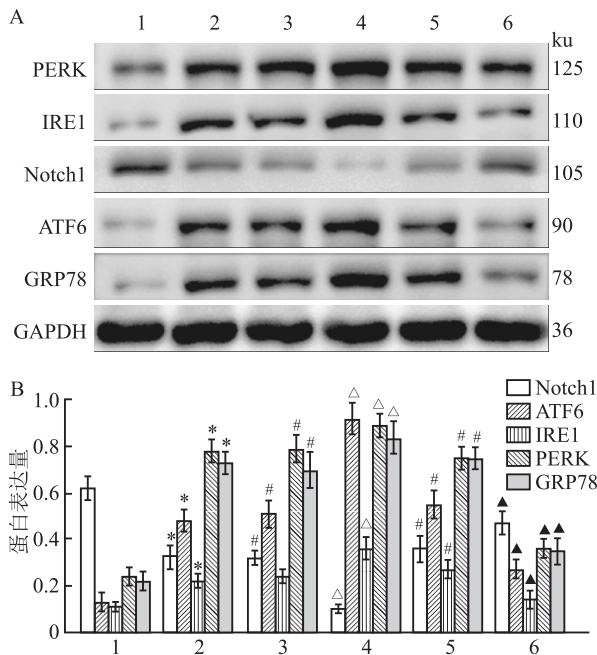


图 5 过表达 (抑制) miR-34a-5p 对细胞中 Notch1、ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达的影响

A: Notch1、ATF6、IRE1、PERK 和 GRP78 蛋白表达电泳图; B: 定量分析各蛋白表达量; 1: Control 组; 2: H/R 组; 3: mimic NC 组; 4: mimic 组; 5: inhibitor NC 组; 6: inhibitor 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较: # $P < 0.05$; 与 mimic NC 组比较: Δ $P < 0.05$; 与 inhibitor NC 组比较: ▲ $P < 0.05$

上调 Notch1 表达, 而且双荧光素酶报告基因检测显示, miR-34a-5p 与 Notch1 具有靶向结合位点。由此可推测降低 H/R 诱导的心肌细胞中 miR-34a-5p 表达水平, 可能通过激活 Notch1 蛋白表达, 从而降低 H/R 造成的心肌细胞凋亡, 提高细胞增殖活性。该研究结果与刘婷婷等^[13] 报道的 D-β-羟基丁酸通过激活 Notch1 抑制内质网应激改善大鼠急性心肌梗死这一结果具有一致性。

GRP78 是内质网应激的标志物, 正常生理状况下, GRP78 与 ATF6、IRE1、PERK 3 个内质网应激感受蛋白相结合, 处于无活性状态。一旦发生内质网应激时, 内质网中大量错误折叠和未折叠蛋白积聚, GRP78 从 3 种跨膜蛋白中解离出来, 与未折叠蛋白相结合, 恢复蛋白质正确构象, 维持内环境稳定, 同时激活上述 3 种跨膜蛋白可启动细胞凋亡途径^[14-15]。该研究中 H/R 处理后的细胞中 GRP78、ATF6、IRE1 和 PERK 蛋白表达量升高, 提示 H/R 可能通过激活心肌细胞内质网应激途径从而诱导心肌细胞凋亡。当下调细胞中 miR-34a-5p 表达后, GRP78、ATF6、IRE1 和 PERK 蛋白表达量降低, 上调细胞中 miR-34a-5p 表达则发挥相反作用, 此结果

提示 miR-34a-5p 可能通过调控内质网应激,参与 H/R 诱导的心肌细胞凋亡启动。

综上所述,抑制 miR-34a-5p 表达可降低 H/R 诱导的心肌细胞凋亡,其可能是通过靶向激活 Notch1 信号通路阻碍内质网应激发挥作用,为临床治疗缺血再灌注损伤提供新的思路。但是该研究仍存在不足,首先对机制的研究不够深入,其次缺少动物实验验证,因此,需要进一步补充和完善。

参考文献

- [1] Zhang R, Bian C, Gao J, et al. Endoplasmic reticulum stress in diabetic kidney disease: Adaptation and apoptosis after three UPR pathways[J]. *Apoptosis*, 2023, 28(7-8):977-96.
- [2] 秦佳月,朱志鹏,周红梅,等.七氟醚后处理对缺血再灌注大鼠心肌内质网应激反应的影响及可能机制[J].*浙江中西医结合杂志*, 2022, 32(11):1001-7.
- [3] Li W, Jin S, Hao J, et al. Metformin attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis of cardiac cells by downregulation of p53/microRNA-34a via activation of SIRT1[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99(9):875-84.
- [4] 刘钰,蔡民华,王聪,等.辣椒素对心肌缺血再灌注损伤大鼠心功能及 miR-34a/SIRT1 轴的影响[J].*中国老年学杂志*, 2023, 43(8):1894-9.
- [5] Xu W, Jiang S, Liu Q. microRNA-124a protects the myocardium against ischemia reperfusion injury through regulation of the Notch signaling pathway[J]. *Braz J Cardiovasc Surg*, 2022, 37(4):447-53.
- [6] Dai S H, Wu Q C, Zhu R R, et al. Notch1 protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury via regulating mitochondrial fusion and function[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5):3183-91.
- [7] Zhao D, Wang N S, Chen F, et al. Intravenous injection of miR-34a inhibitor alleviates diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction by targeting NOTCH1 [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2019, 127(4):255-62.
- [8] Wang X, Yuan B, Cheng B, et al. Crocin alleviates myocardial ischemia/reperfusion-induced endoplasmic reticulum stress via regulation of miR-34a/Sirt1/Nrf2 Pathway [J]. *Shock*, 2019, 51(1):123-30.
- [9] Li Q H, Ge Z W, Xiang Y, et al. Upregulation of microRNA-34a enhances myocardial ischemia-reperfusion injury via the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Free Radic Res*, 2022, 56(3-4):229-44.
- [10] Jin J, Ma Y, Tong X, et al. Metformin inhibits testosterone-induced endoplasmic reticulum stress in ovarian granulosa cells via inactivation of p38 MAPK[J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(5):1145-58.
- [11] Li W, Li W, Leng Y, et al. Ferroptosis is involved in diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury through endoplasmic reticulum stress[J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(2):210-25.
- [12] Lai H J, Zhan Y Q, Qiu Y X, et al. HMGB1 signaling-regulated endoplasmic reticulum stress mediates intestinal ischemia/reperfusion-induced acute renal damage[J]. *Surgery*, 2021, 170(1):239-48.
- [13] 刘婷婷,董红艳,马艳兰,等. D-β-羟基丁酸通过激活 Notch1/Hes1 通路和抑制内质网应激改善大鼠急性心肌梗死[J].*西部医学*, 2022, 34(12):1736-42.
- [14] Jiao P, Fan W, Ma X, et al. SARS-CoV-2 nonstructural protein 6 triggers endoplasmic reticulum stress-induced autophagy to degrade STING1 [J]. *Autophagy*, 2023, 19(12):3113-31.
- [15] Vartslu B, Caglayan C, Kandemir F M, et al. Chrysin mitigates diclofenac-induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress, apoptosis, autophagy and endoplasmic reticulum stress in rats[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(1):433-42.

Effect and mechanism of miR-34a-5p targeting Notch1 on H/R-induced apoptosis of human cardiomyocytes

Liu Longzhen, Hong Liang, Song Bing

(Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the improvement of endoplasmic reticulum stress mediated by microRNA (miR)-34a-5p/transmembrane fusion protein 1 (Notch1) signaling axis on hypoxia/reoxygenation (H/R) human cardiomyocytes. **Methods** Human cardiomyocytes were randomly divided into Control group, H/R group, mimic NC group, mimic group, inhibitor NC group and inhibitor group. Except the Control group, H/R injury model was established in other groups. The expression levels of miR-34a-5p and Notch1 were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), cell survival rate was detected by thiazolyl blue (MTT), cell apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the targeting relationship between miR-34a-5p and Notch1 was detected by dual luciferase gene reporting method. The expressions of transcriptional activator 6 (ATF6), inositol demand enzyme 1 (IRE1), protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and glucose regulatory protein 78

Erastin 通过 MAPK 介导的氧化应激信号通路诱导肺成纤维细胞铁死亡

王沂然¹, 张诗捷¹, 关予博², 李渺渺², 蔡汝忆³, 武琦¹

摘要 目的 探究 Erastin 对肺成纤维细胞铁死亡的作用机制。方法 向小鼠肺成纤维细胞(C57/B6-L)中加入不同浓度的铁死亡诱导剂 Erastin,通过细胞计数试剂(CCK-8)检测细胞活性、荧光显微镜观察氧化应激水平,蛋白质印迹法(Western blot)检测丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路相关蛋白表达,之后分别加入 p38 和人细胞外信号调节激酶(ERK)的抑制剂 SB203580 和 U0126,进一步验证 Erastin 诱导肺成纤维细胞铁死亡的作用机制。结果 Erastin 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度时,能够明显诱导肺成纤维细胞铁死亡,同时伴有氧化应激表达增强,此外 MAPK 通路中的 p38 和 ERK 蛋白磷酸化水平升高($P < 0.05$)。而在加入 SB203580、U0126 抑制剂后,肺成纤维细胞氧化应激水平明显下降,同时细胞的活性明显升高($P < 0.05$)。结论 Erastin 能够诱导肺成纤维细胞铁死亡,其作用机制可能与 MAPK 信号通路介导的氧化应激有关。

关键词 肺纤维化;肺成纤维细胞;铁死亡;活性氧;MAPK

信号通路

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)05-0820-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.012

肺纤维化是一种由于肺泡外基质蛋白过度沉积导致的肺部不可逆的结构和功能改变的疾病,表现为纤维化重构和肺泡破坏^[1]。在肺泡和内皮细胞损伤后,可释放多种细胞因子,在这些细胞因子刺激下,肺成纤维细胞可被激活增殖并分化为肌成纤维细胞,这可进一步导致肺纤维化的加重^[2]。通过各种方式诱导肺成纤维细胞死亡,可能为肺纤维化的治疗带来新的突破。

铁死亡是一种新发现的调节细胞死亡类型,主要机制为铁积聚过多导致氧化应激水平增加,进而引起细胞死亡。目前研究^[3]表明铁死亡与肺纤维化疾病息息相关。铁死亡在肺纤维化中的作用也逐渐得到了证实,有研究^[4]表明,肺纤维化患者肺组织切片和博来霉素诱导的肺纤维化小鼠肺组织中的铁积累均显著增加,铁的沉积程度与肺纤维化严重程度呈明显正相关。目前针对诱导肺成纤维细胞铁死亡的研究较少,且其作用机制仍不明确。因此,该实验探究 Erastin 诱导肺成纤维细胞铁死亡的作用机制,以期对肺纤维化发病机制和药物开发的探索

2024-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82104624);江苏省高等学校自然科学基金面上项目(编号:21KJB320003);江苏省高校大学生创新创业重点项目(编号:202210313048Z)

作者单位:¹徐州医科大学生理学教研室,徐州 221004

²徐州医科大学病理生理学教研室,徐州 221004

³徐州医科大学第一临床医学院,徐州 221004

作者简介:王沂然,男,硕士研究生;

武琦,男,博士,硕士生导师,责任作者,E-mail: wuqi@xzhmu.edu.cn

(GRP78) were detected by Western blot. **Results** miR-34a-5p targeted Notch1 ($P < 0.05$); compared with Control group, the expression level of miR-34a-5p, apoptosis rate and protein expressions of ATF6, IRE1, PERK and GRP78 in H/R group increased, while the cell survival rate and Notch1 mRNA and protein expressions decreased ($P < 0.05$). Compared with H/R group and mimic NC group, miR-34a-5p expression, apoptosis rate, and protein expressions of ATF6, IRE1, PERK and GRP78 in mimic group increased, while cell survival rate and Notch1 mRNA and protein expressions decreased ($P < 0.05$). Compared with H/R group and inhibitor NC group, the expression of miR-34a-5p, apoptosis rate and protein expressions of ATF6, IRE1, PERK and GRP78 decreased in inhibitor group, while cell survival rate and Notch1 mRNA and protein expressions increased ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-34a-5p can inhibit the apoptosis of H/R human cardiomyocytes, possibly through the targeted inhibition of Notch1-mediated endoplasmic reticulum stress.

Key words hypoxia/reoxygenation; endoplasmic reticulum stress; myocardial cells; miR-34a-5p; Notch1