

阿司匹林调节 miR-340-5p/HMGB1/TLR4 通路对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的影响

陈兴华^{1*}, 张继伟^{1#}, 韩露²(1.首都医科大学附属北京世纪坛医院心脏外科, 北京 100038; 2.首都医科大学附属北京朝阳医院医学研究中心, 北京 100020)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)20-2508-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.20.15



摘要 目的 探讨阿司匹林(Asp)通过调节微RNA-340-5p(miR-340-5p)/高迁移率族蛋白1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)通路对大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的影响。方法 将雄性SD大鼠分为假手术(Sham)组(开胸不结扎)、I/R组(构建I/R损伤模型)、Asp预处理(I/R+Asp)组(Asp预处理7 d+造模)、I/R+Asp+in-miR-340-5p组[Asp预处理7 d+提前转染miR-340-5p抑制物+造模]和I/R+Asp+HMGB1组(Asp预处理7 d+提前转染过表达HMGB1+造模),每组20只。检测各组大鼠心肌损伤指标(乳酸脱氢酶、肌酸激酶同工酶MB、心肌肌钙蛋白I)、炎症和氧化应激指标(髓过氧化物酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、丙二醛)水平,观察其心肌组织病理改变,检测其心肌梗死面积、细胞凋亡情况以及心肌组织中miR-340-5p和HMGB1、TLR4蛋白的表达情况;以大鼠心肌细胞H9C2为对象,考察miR-340-5p与HMGB1的靶向关系。结果 Asp预处理可显著抑制I/R损伤模型大鼠血清心肌损伤指标水平的升高,可减轻炎症反应、抑制氧化应激反应、缩小心肌梗死面积并减少细胞凋亡,可显著上调miR-340-5p的表达并下调HMGB1、TLR4蛋白的表达($P<0.05$);抑制miR-340-5p或过表达HMGB1均可逆转Asp的上述保护作用($P<0.05$)。细胞实验结果显示,miR-340-5p可靶向负调控HMGB1的表达($P<0.05$)。结论 Asp可通过调节miR-340-5p/HMGB1/TLR4通路来减轻大鼠炎症反应和氧化应激,减少心肌组织中的细胞凋亡,进而发挥对心肌I/R损伤的保护作用。

关键词 阿司匹林;微RNA-340-5p;高迁移率族蛋白1;Toll样受体4;心肌缺血/再灌注;心肌损伤;大鼠

Effects of aspirin on myocardial injury in rats with myocardial ischemia/reperfusion by regulating miR-340-5p/HMGB1/TLR4 pathway

CHEN Xinghua¹, ZHANG Jizhuo¹, HAN Lu²(1. Dept. of Cardiac Surgery, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Medical Research Center, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100020, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of aspirin (Asp) on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury by regulating microRNA-340-5p (miR-340-5p)/high mobility group box 1 (HMGB1)/Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway. **METHODS** Male SD rats were divided into sham operation (Sham) group (thoracotomy without ligation), I/R group (I/R injury model was constructed), and Asp pretreatment (I/R+Asp) group (7 d of Asp pretreatment+modeling), I/R+Asp+in-miR-340-5p group [Asp pretreatment 7 d+transfection with miR-340-5p inhibitor 48 h before modeling+modeling] and I/R+Asp+HMGB1 group (7 d of Asp pretreatment+transfection with overexpression of HMGB1 48 h before modeling+modeling), with 20 rats in each group. The levels of myocardial injury indexes [lactate dehydrogenase, creatine kinase isoenzyme-MB, cardiac troponin I], inflammation and oxidative stress indexes [myeloperoxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, malondialdehyde] were detected in each group, and the pathological changes of myocardial tissue were observed. The myocardial infarction area, cell apoptosis and the expression of miR-340-5p, HMGB1 and TLR4 in myocardial tissue were detected. Cardiomyocyte H9C2 of rats was used as the object to investigate the targeting relationship between miR-340-5p and HMGB1. **RESULTS** Asp pretreatment could significantly inhibit the increase of serum myocardial injury indexes in I/R model rats, reduce inflammation and inhibit oxidative stress, reduce myocardial infarct size and apoptosis, and significantly up-regulated the expression of miR-340-5p and down-regulated the expression of HMGB1 and TLR4 proteins ($P<0.05$); inhibition of miR-340-5p or overexpression of HMGB1 could reverse the above protective effects of Asp ($P<0.05$). miR-340-5p could target and negatively regulate HMGB1 expression ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Asp can reduce inflammation and oxidative stress by regulating the miR-340-5p/HMGB1/TLR4 pathway, reduce apoptosis in myocardial tissue, and play a protective role against myocardial I/R injury.

* 第一作者 主治医师,硕士。研究方向:心肌缺血/再灌注损伤。

E-mail:sjtxzkw@163.com

通信作者 主任医师,硕士。研究方向:心肌缺血/再灌注损伤。

E-mail:13911028861@163.com

KEYWORDS aspirin; microRNA-340-5p; high mobility group box 1; Toll-like receptor 4; myocardial ischemia/reperfusion; myocardial injury; rats

心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是临床常见疾病。有学者认为, I/R损伤在冠状动脉血流、心肌缺血恢复和心肌梗死面积缩小等过程中难以避免^[1]。近年来, 随着各种心脏介入治疗技术的广泛应用, 心血管疾病患者的治愈率虽有较大提高, 但由此产生的I/R损伤也日益增多^[2]。

有研究指出, 微RNA (microRNA, miRNA)可作用于心肌I/R损伤, 已成为相关研究的重要靶点, 如通过提高miRNA-340-5p(miR-340-5p)表达来改善小鼠心功能和心肌病变, 抑制心肌酶活性、炎症反应和氧化应激, 减少细胞凋亡, 进而缓解I/R损伤^[3]。结合上述研究, 本课题组借助生物学分析发现, 高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1, HMGB1)可能是miR-340-5p的靶点^[4]。既往研究表明, HMGB1是一种普遍存在且含量丰富的核蛋白, 在多种心血管疾病中均有关键作用^[5];此外, HMGB1被鉴定为内源性Toll样受体4(Toll-like receptors 4, TLR4)的配体, 下调HMGB1/TLR4信号通路可有效减轻I/R诱导的心肌细胞损伤^[6]。由此本课题组推测, miR-340-5p缓解I/R损伤可能与下调HMGB1/TLR4信号通路有关。

阿司匹林(aspirin, Asp)是心血管疾病二级预防的主要药物, 可参与调控HMGB1、TLR4等蛋白的表达, 并可通过减轻心肌I/R损伤来发挥心脏保护作用^[7-9]。然而, Asp在心肌I/R损伤中的调控机制尚不明确, 其干预作用是否与miR-340-5p/HMGB1/TLR4信号通路有关仍不清楚。为此, 本研究通过构建大鼠I/R模型来深入探究Asp对心肌I/R损伤的保护作用及相关机制, 以期为临床心肌I/R损伤的治疗提供新的参考依据。

1 材料

1.1 主要仪器

ALC-V8S型动物呼吸机购自上海奥尔科特生物科技有限公司; MedLab-U/4C501H型生物信号采集处理系统购自南京美易科技有限公司; Multiskan FC型酶标仪、BB15型CO₂细胞培养箱均购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 7500型定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcriptase-mediated PCR, qRT-PCR)仪购自美国ABI公司; Quantity One型凝胶成像系统、1658033型凝胶电泳系统均购自美国Bio-Rad公司; CKX53型光学显微镜购自日本Olympus公司; ZHS1220型相机购自日本Cannon公司; DU800型紫外分光光度计购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 主要药品与试剂

Asp对照品(批号A1189, 纯度≥98.0%)购自北京康瑞纳生物科技有限公司; miR-340-5p抑制物(in-miR-340-5p)、过表达HMGB1、过表达miR-340-5p及其阴性对照(miR-NC)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 腺病毒表达载体pacAd5 CMV-GFP购自北京华越洋

生物科技有限公司; 荧光素酶pmirGLO载体(批号GN1439)购自上海盖宁生物科技有限公司; Lipofectamine 2000转染试剂(批号11668019)购自美国Invitrogen公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号RL008)、肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB)ELISA试剂盒(批号RC044)均购自上海歌凡生物科技有限公司; 心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTn I)ELISA试剂盒(批号orb158935)购自英国Biobyte公司; 髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒(比色法, 批号AO44-1-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(WST-1法, 批号A001-3-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(比色法, 批号A005-1-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(TBA法, 批号A003-1-1)均购自南京建成生物工程研究所; 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号AG1120)、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(批号AT2190)均购自上海吉至生化科技有限公司; TTC染液(批号YT8072)、Triton X-100试剂(批号SY5134)均购自北京伊塔生物科技有限公司; 逆转录试剂盒(批号YST0010)购自桂林金优胜贸易有限公司; SYBR Premix Ex Taq试剂盒(批号DRR041A)购自日本TAKARA公司; 高效RIPA组织/细胞快速裂解液(批号R0010)、Trizol试剂盒(批号15596-018)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(批号D0010)均购自北京索莱宝科技有限公司; 兔HMGB1多克隆抗体(批号ab18256)、兔TLR4多克隆抗体(批号ab218987)、兔β-肌动蛋白(β-actin)多克隆抗体(批号ab5694)、兔辣根过氧化物酶标记的IgG二抗(批号ab205718)均购自英国Abcam公司; ECL化学发光试剂盒(批号P0018S)购自上海碧云天生物技术公司; 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

1.3 实验动物与细胞

SPF级雄性SD大鼠100只, 体质量为200~250 g, 由中国科学院上海药物研究所提供, 动物生产许可证号为SCXK(沪)2020-0005。大鼠心肌细胞H9C2购自美国ATCC公司, 批号为ZB031。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

所有大鼠均被饲养于(25±1)℃、12 h/12 h光照/黑暗交替的恒温空调房内, 自由进食, 饮水。1周后, 将大鼠分为假手术(Sham)组、I/R组、Asp预处理(I/R+Asp)组、I/R+Asp+in-miR-340-5p组和I/R+Asp+HMGB1组, 每组20只。Sham组大鼠开胸后不结扎冠状动脉, 其余各组大鼠按下法建立模型: 经2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后以仰卧位固定, 插入气管导管并连接呼吸机; 分离大鼠右颈动脉, 插入动脉插管并连接到生物信号采集处理系统; 切开大鼠胸部, 沿胸骨左侧切开, 分离心包,

暴露心脏,用5/0丝线于左冠状动脉前降支底部结扎,结扎时放入特制线栓,以左室前壁发绀和ST段抬高为缺血成功的标志;缺血30 min后拔去线栓再灌注2 h,若上述变化消失,说明再灌注成功^[10]。Sham组、I/R组和I/R+Asp组大鼠在缺血前48 h分别灌胃生理盐水;I/R+Asp+in-miR-340-5p组和I/R+Asp+HMGB1组大鼠在缺血前48 h分别转染in-miR-340-5p或过表达HMGB1(即分别尾静脉注射含有in-miR-340-5p或过表达HMGB1的腺病毒,以miR-340-5p或HMGB1的表达情况判定是否转染成功)。各药物组大鼠在造模前7 d灌胃Asp 200 mg/(kg·d)[以生理盐水为溶剂,分2次,连续7 d],Sham组、I/R组平行灌胃等体积生理盐水^[8-9]。上述过程均经过首都医科大学附属北京世纪坛医院动物实验伦理委员会批准,严格参照相关规范要求操作^[11]。

2.2 血液和心肌组织标本采集

再灌注2 h后,以2%戊巴比妥钠麻醉大鼠,从心脏采集血液样本并分离血清。随后,断颈处死大鼠,剖取心脏,用滤纸吸干,称定质量,沿左心室长轴采集心肌组织,每组随机选取5只大鼠的心肌组织用10%中性甲醛溶液固定,用于病理观察和细胞凋亡检测;其余15只大鼠的心肌组织于-80℃冻存,用于炎症及氧化应激指标(5只)、心肌梗死面积(5只)和miR-340-5p、HMGB1、TLR4表达(5只)的检测。

2.3 血清心肌损伤指标检测

取“2.2”项下各组大鼠血清样本适量,采用ELISA法以酶标仪检测其血清LDH、CK-MB、cTn I水平,严格按照各试剂盒说明书操作。

2.4 心肌组织中炎症和氧化应激指标检测

取“2.2”项下冻存的各组大鼠心肌组织适量,经匀浆、离心后,取上清液,按试剂盒方法以酶标仪检测心肌组织中MPO、SOD、GSH-Px、MDA水平,严格按照各试剂盒说明书操作。

2.5 心肌组织病理观察

取“2.2”项下固定的各组大鼠心肌组织适量,用石蜡包埋后切片(厚度5 μm),经脱蜡、水化后,行HE染色并置于光学显微镜下观察其病理改变。

2.6 心肌梗死面积检测

取“2.2”项下冻存的各组大鼠心肌组织适量,切成5个切片(厚度3 mm),放入培养皿中,在37℃培养箱中温育10~15 min后用1% TTC试剂染色(缺血性心肌组织可被染成红色,而梗死区域仍为灰白色)。用相机拍照并采用Image-Pro Plus 6.0软件计算心肌梗死面积:心肌梗死面积=5个切片梗死面积之和/整个心脏面积×100%。

2.7 心肌细胞凋亡情况检测

采用TUNEL法进行检测。取“2.5”项下切片,依次置于二甲苯中脱蜡、乙醇中水合,通过0.1% Triton X-100

试剂渗透后,再使用3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶活性。将切片置于TUNEL反应混合物50 μL中,于37℃下孵育1 h,以DAB法显色后,使用Image J 1.8.0软件计算细胞凋亡指数:细胞凋亡指数=凋亡阳性细胞(呈棕色)/细胞总数(呈蓝色)×100%。

2.8 心肌组织中miR-340-5p表达情况检测

采用qRT-PCR法进行检测。取“2.2”项下冻存的各组大鼠心肌组织适量,匀浆,用Trizol试剂盒提取总RNA。检测总RNA纯度、浓度和完整度后,参照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录成cDNA,使用SYBR Premix Ex Taq试剂盒以U6作为内参进行PCR扩增。反应体系(共20 μL)包括:上、下游引物各0.4 μL,2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL,cDNA模板1 μL,用ddH₂O补足20 μL。反应程序如下:95℃预变性5 min;95℃变性20 s,57℃退火30 s,70℃延伸30 s,共37个循环。使用2^{-ΔΔC_t}法计算待测基因的相对表达量(以Sham组为参照)。miR-340-5p上游引物为5'-GCGGTTATAAAGCA-ATGAGA-3',下游引物为5'-GTGCGTGTCTGGAGT-CG-3';内参上游引物为5'-CTCGCTTCGGCAGCA-CA-3',下游引物为5'-AACGCTTTCACGAATTTGCGT-3'。

2.9 心肌组织中HMGB1、TLR4蛋白表达情况检测

采用Western blot法进行检测。取“2.2”项下冻存的各组大鼠心肌组织适量,经裂解液500 μL裂解后,于冰浴中匀浆,离心取上清液。将所获蛋白与上样缓冲液混合,于95℃下煮沸15 min变性。取变性蛋白,行电泳分离并转移到PVDF膜上,以5%脱脂牛奶封闭,加入HMGB1、TLR4、β-actin一抗(稀释比例均为1:1 000),4℃下孵育过夜;洗膜,加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),37℃下孵育1 h,经ECL显影后,使用凝胶成像系统成像并计算待测蛋白的相对表达量:待测蛋白的相对表达量=待测蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

2.10 miR-340-5p与HMGB1靶向关系的验证

体外常规培养H9C2心肌细胞用于验证miR-340-5p与HMGB1之间的靶向关系。采用Targetscan软件预测miR-340-5p与HMGB1的结合位点,随后将含有预测结合位点的HMGB1野生型(HMGB1 WT)或突变型(HMGB1 MUT)的3'-非翻译区(3'-untranslated regions,3'-UTR)片段克隆在荧光素酶pmirGLO载体上,经DNA测序验证后,按照Lipofectamine 2000转染试剂说明书操作,将HMGB1 WT或HMGB1 MUT与miR-340-5p(miR-340-5p组)或miR-NC(miR-NC组)共同转染至H9C2心肌细胞,培养48 h后取出,使用酶标仪对荧光素酶活性进行测定,并采用Western blot法检测单独转染过表达miR-340-5p或miR-NC后H9C2心肌细胞中HMGB1蛋白的相对表达量(具体操作同“2.9”项),实验重复5次。

2.11 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*检验;成对比较采用*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 Asp对I/R模型大鼠心肌损伤、炎症和氧化应激指标的影响

与Sham组比较,I/R组大鼠血清中LDH、CK-MB、cTn I水平和心肌组织中MPO、MDA水平均显著升高,心肌组织中SOD、GSH-Px水平均显著降低($P<0.05$);与I/R组比较,I/R+Asp组大鼠上述指标均显著改善($P<0.05$)。与I/R+Asp组比较,I/R+Asp+in-miR-340-5p组、I/R+Asp+HMGB1组大鼠血清中LDH、CK-MB、cTn I水平和心肌组织中MPO、MDA水平均显著升高,而心肌组织中SOD、GSH-Px水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表1、表2。

表1 各组大鼠血清心肌损伤指标的检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	LDH/(U/L)	CK-MB/(U/L)	cTn I/(ng/mL)
Sham组	215.36±18.56	114.35±10.54	1.25±0.18
I/R组	854.16±76.32 ^a	325.69±23.25 ^a	5.29±0.59 ^a
I/R+Asp组	368.29±24.33 ^b	186.65±12.36 ^b	2.45±0.22 ^b
I/R+Asp+in-miR-340-5p组	489.36±30.08 ^c	247.33±15.20 ^c	3.12±0.32 ^c
I/R+Asp+HMGB1组	518.69±32.55 ^c	268.39±18.30 ^c	3.45±0.35 ^c

a:与Sham组比较, $P<0.05$;b:与I/R组比较, $P<0.05$;c:与I/R+Asp组比较, $P<0.05$

表2 各组大鼠心肌组织中炎症和氧化应激指标的检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	MPO/(U/g)	SOD/(U/mg)	GSH-Px/(U/mg)	MDA/(mmol/mg)
Sham组	5.26±0.45	162.36±12.65	29.65±2.08	4.69±0.37
I/R组	19.35±1.58 ^a	68.69±7.54 ^a	10.02±1.10 ^a	12.54±1.26 ^a
I/R+Asp组	9.26±0.87 ^b	130.12±10.02 ^b	23.63±1.25 ^b	7.25±0.59 ^b
I/R+Asp+in-miR-340-5p组	12.23±1.05 ^c	89.26±7.65 ^c	16.26±1.20 ^c	9.13±0.15 ^c
I/R+Asp+HMGB1组	14.36±1.10 ^c	95.23±8.52 ^c	18.32±1.30 ^c	10.26±1.05 ^c

a:与Sham组比较, $P<0.05$;b:与I/R组比较, $P<0.05$;c:与I/R+Asp组比较, $P<0.05$

3.2 Asp对I/R模型大鼠心肌病理改变和梗死面积的影响

HE染色结果显示,Sham组大鼠心肌细胞未见任何病理改变;I/R组大鼠心肌纤维断裂,细胞肿胀,细胞核不规则且固缩,并可见大量坏死细胞和炎症细胞。用Asp预处理后,I/R+Asp组大鼠的上述病理改变有所好转;而在转染in-miR-340-5p或过表达HMGB1后,Asp对I/R损伤心肌细胞的上述保护作用被削弱。结果见图1。

经TTC染色证实,与Sham组[(0.56±0.04)%]比较,I/R组大鼠心肌梗死面积[(25.69±2.58)%]显著增大($P<0.05$);与I/R组比较,I/R+Asp组大鼠心肌梗死面积[(9.23±0.86)%]显著缩小($P<0.05$);与I/R+Asp组比较,I/R+Asp+in-miR-340-5p组、I/R+Asp+HMGB1组大鼠心肌梗死面积[(15.69±1.23)%、(17.03±1.36)%]均显著增大($P<0.05$)。结果见图2。

3.3 Asp对I/R模型大鼠心肌组织中细胞凋亡的影响

与Sham组(3.25±0.32)比较,I/R组大鼠心肌组织中细胞的凋亡指数(28.36±2.15)显著增高($P<0.05$);与I/R组比较,I/R+Asp组大鼠心肌组织中细胞的凋亡指数(9.26±0.57)显著降低($P<0.05$);与I/R+Asp组比较,I/R+Asp+in-miR-340-5p组、I/R+Asp+HMGB1组大鼠心肌组织中细胞的凋亡指数(15.56±1.02、17.21±1.14)均显著增高($P<0.05$)。结果见图3。

3.4 Asp对I/R模型大鼠心肌组织中miR-340-5p/HMGB1/TLR4信号通路的影响

与Sham组比较,I/R组大鼠心肌组织中miR-340-5p的相对表达量显著降低,HMGB1、TLR4蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.05$);与I/R组比较,I/R+Asp组大鼠心肌组织中miR-340-5p的相对表达量显著升高,HMGB1、TLR4蛋白的相对表达量均显著降低($P<0.05$);与I/R+Asp组比较,I/R+Asp+in-miR-340-5p组、I/R+Asp+HMGB1组大鼠心肌组织中miR-340-5p的相对表达量均显著降低,HMGB1、TLR4蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。结果见图4。

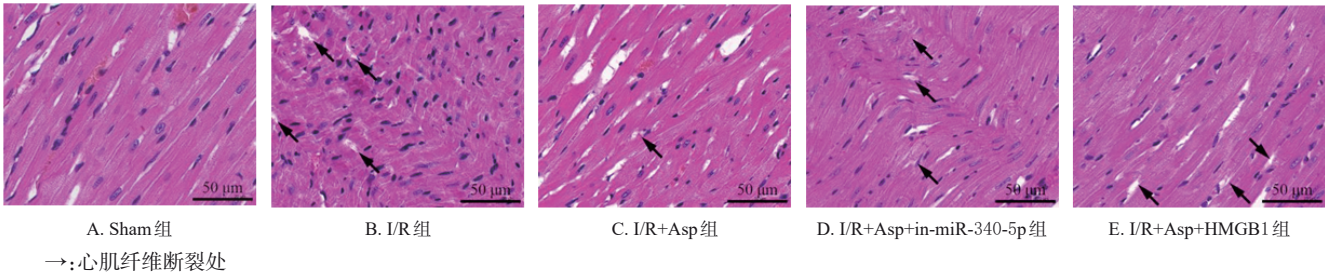


图1 各组大鼠心肌病理改变的显微图(HE染色)

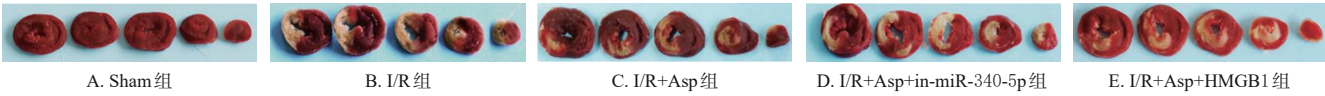


图2 各组大鼠心肌梗死面积的变化情况(TTC染色)

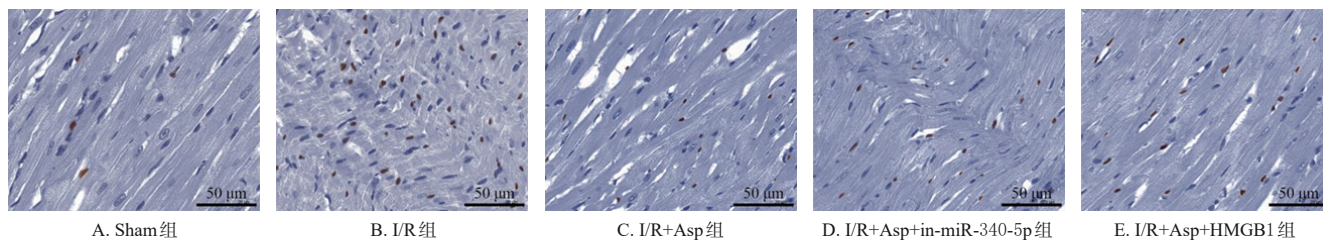
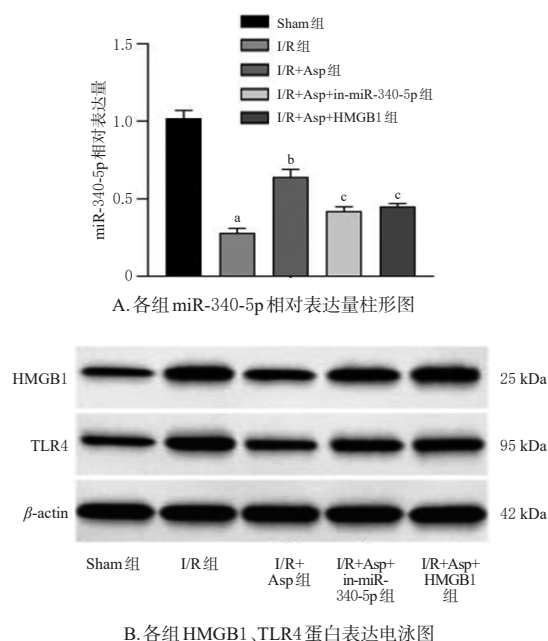
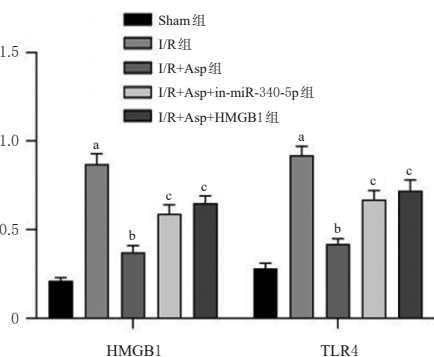


图3 各组大鼠心肌组织中细胞凋亡情况的显微图(TUNEL法)



B. 各组 HMGB1、TLR4 蛋白表达电泳图



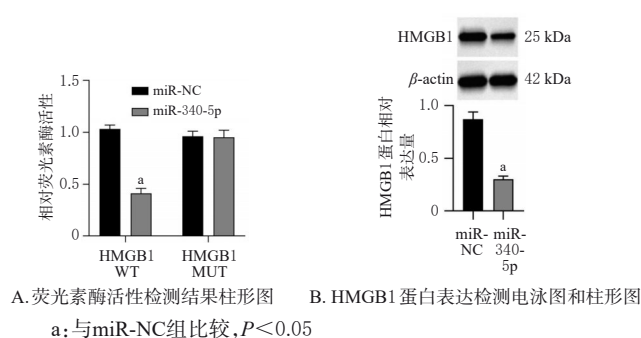
C. 各组 HMGB1、TLR4 蛋白相对表达量柱形图

a: 与Sham组比较, $P < 0.05$; b: 与I/R组比较, $P < 0.05$; c: 与I/R+Asp组比较, $P < 0.05$

图4 各组大鼠心肌组织中 miR-340-5p 和 HMGB1、TLR4 蛋白表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.5 miR-340-5p与HMGB1的靶向关系

miR-340-5p 与 HMGB1 的 3'-UTR 区 (位点 1364-1371) 存在互补配对区,故推测 HMGB1 可能是 miR-340-5p 的靶点。荧光素酶活性检测结果(图 5A)显示,在转染 miR-340-5p 后, HMGB1 WT 的相对荧光素酶活性受到显著抑制($P < 0.05$)。此外, HMGB1 蛋白表达检测结果(图 5B)显示,转染 miR-340-5p 可显著降低 HMGB1 蛋白的相对表达量($P < 0.05$)。



A. 荧光素酶活性检测结果柱形图 B. HMGB1 蛋白表达检测电泳图和柱形图

a: 与miR-NC组比较, $P < 0.05$

图5 miR-340-5p 和 HMGB1 的靶向关系($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 讨论

临床研究表明,心肌梗死是患者心血管疾病发生和死亡的主要原因,而恢复心脏的血液供应被认为是心肌梗死最有效的治疗手段^[12]。然而,再灌注本身会使心肌损伤进一步恶化,这种现象被称为心肌 I/R 损伤^[13]。目前,心肌 I/R 损伤缺乏相应的治疗靶点,故寻找有效靶点十分必要。

研究表明,心肌细胞内氧自由基大量产生、细胞黏附分子改变、钙离子超载、心肌能量代谢障碍、细胞凋亡等都与心肌 I/R 损伤相关,这些机制的相互关联构成了一个复杂的信号网络,相互制约、平衡^[14-15]。Asp 属于非甾体抗炎药,其导致闭塞性心血管事件发生的风险低于传统的非甾体抗炎药,且可通过减轻炎症反应和线粒体氧化损伤、减少心肌细胞凋亡来改善心肌 I/R 损伤^[8-9]。为了探索 Asp 在心肌 I/R 损伤保护中的具体机制,本研究检测了各组大鼠血清中心肌损伤指标以及心肌组织中炎症和氧化应激指标水平。结果表明,Asp 能通过抑制 LDH、CK-MB、cTn I 的表达,减轻炎症反应,抑制氧化应激反应,从而发挥对 I/R 损伤的保护作用。此外,本研究发现,Asp 可明显改善 I/R 引起的心肌组织病理损伤,并可缩小心肌梗死面积,抑制心肌组织中的细胞凋亡,与已有研究基本相似^[8]。

miR-340-5p 定位于人 5 号染色体长臂 5q35.3,可通过靶向 *c-Met*、*FHL2*、*ROCK1*、*SKP2* 等多种癌基因来参与肿瘤的发生和发展^[16];可通过上调髓细胞性白血病 1 的表达来减少氧化损伤和细胞凋亡,从而改善糖尿病性心肌功能障碍^[17];除此之外,miR-340-5p 表达的上调还可有效缓解小鼠的心肌 I/R 损伤^[5]。本研究结果显示,

Asp 预处理可显著上调模型大鼠心肌组织中 miR-340-5p 的表达,而抑制 miR-340-5p 的表达则可逆转 Asp 对大鼠心肌 I/R 损伤的保护作用。由此笔者推测,Asp 可能通过上调 miR-340-5p 的表达来发挥心肌保护作用。有研究指出,成熟的 miRNA 与其靶 mRNA 的 3'-UTR 序列配对结合后,可被整合到 RNA 诱导的沉默复合体中,从而导致靶 mRNA 降解^[18]。本课题前期研究证实, HMGB1 编码基因是 miR-340-5p 的靶基因,且过表达的 miR-340-5p 可显著降低 HMGB1 蛋白的表达^[4]。结合本研究结果发现,miR-340-5p 介导的 HMGB1 通路在 Asp 保护心肌 I/R 损伤中发挥了作用。据报道, HMGB1 已被鉴定为内源性 TLR4 配体,可通过与髓样分化蛋白 2 结合来激活 TLR4^[19]。有研究指出,抑制 HMGB1/TLR4 信号通路可抑制心肌细胞凋亡、自噬和炎症反应等,可见该通路可能与改善缺血性心肌损伤有关^[6]。本研究结果显示,经 Asp 预处理后, HMGB1、TLR4 蛋白的相对表达量均显著降低,而 HMGB1 过表达可部分逆转 Asp 对心肌 I/R 损伤的改善作用,提示 HMGB1/TLR4 信号通路可能参与了 Asp 的 I/R 损伤保护机制。miR-340-5p 与 HMGB1 的靶向关系分析结果显示, miR-340-5p 可靶向负调控 HMGB1 的表达。

综上所述, Asp 可通过调节 miR-340-5p/HMGB1/TLR4 通路来减轻炎症反应和氧化应激,减少心肌组织中的细胞凋亡,进而发挥对心肌 I/R 损伤的保护作用。然而, Asp 的主要作用靶点为环氧合酶 1/2 和前列腺素 E₂,上述靶点是否与 miR-340-5p/HMGB1/TLR4 信号通路关联尚有待探究;此外,本研究并未单独设置不受药物干预的 miR-340-5p、HMGB1 过表达组,加之心肌 I/R 损伤调控机制复杂,故 Asp 的具体机制和其他途径仍有待进一步论证。

参考文献

- [1] DRAGASEVIC N, JAKOVLJEVIC V, ZIVKOVIC V, et al. The role of aldosterone inhibitors in cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99(1):18-29.
- [2] WANG W J, WANG B L, SUN S K, et al. Inhibition of adenosine kinase attenuates myocardial ischaemia/reperfusion injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(6):2931-2943.
- [3] BAI Q J, LI Y, SONG K P, et al. Knockdown of XIST up-regulates 263294miR-340-5p to relieve myocardial ischaemia-reperfusion injury via inhibiting cyclin D1[J]. *ESC Heart Fail*, 2022, 9(2):1050-1060.
- [4] GAO Y Z, WANG L M, NIU Z Q, et al. miR-340-5p inhibits pancreatic acinar cell inflammation and apoptosis via targeted inhibition of HMGB1[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(2):140.
- [5] CHEN C B, LU C H, HE D W, et al. Inhibition of HMGB1 alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice via suppressing autophagy[J]. *Microvasc Res*, 2021, 138:104204.

- [6] DINGH S, YANG J, YANG J, et al. Fluvastatin attenuated ischemia/reperfusion-induced autophagy and apoptosis in cardiomyocytes through down-regulation HMGB1/TLR4 signaling pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(5):3893-3901.
- [7] 吴咏梅. 疏血通与阿司匹林合用对大鼠脑缺血/再灌注损伤的药效学研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2018.
- [8] WU X L, WEI M H, ZHANG H F, et al. The protective effect of aspirin against myocardial hypertrophy in rats[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021:2043415.
- [9] WU Z J, LI X W, LI X Y, et al. Effects of aspirin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through STAT3 signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021:9931885.
- [10] YANG J, YANG C J, YANG J, et al. RP105 alleviates myocardial ischemia reperfusion injury via inhibiting TLR4/TRIF signaling pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(6):3287-3295.
- [11] MCCORMICK-ELL J, CONNELL N. Laboratory safety, biosecurity, and responsible animal use[J]. *ILAR J*, 2019, 60(1):24-33.
- [12] WENZ J, XIN H, WANGY C, et al. Emerging roles of circRNAs in the pathological process of myocardial infarction[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26:828-848.
- [13] WIJNTJENSG W, FENGLER K, FUERNAU G, et al. Prognostic implications of microcirculatory perfusion versus macrocirculatory perfusion in cardiogenic shock: a CULPRIT-SHOCK substudy[J]. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2020, 9(2):108-119.
- [14] HAUSENLOYD J, SCHULZ R, GIRAO H, et al. Mitochondrial ion channels as targets for cardioprotection[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13):7102-7114.
- [15] ANDREADOU I, SCHULZ R, PAPAPETROPOULOS A, et al. The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H₂S in ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(12):6510-6522.
- [16] HUANG Z, XU Y S, WAN M P, et al. miR-340: a multifunctional role in human malignant diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(1):236-246.
- [17] ZHU Y H, YANG X W, ZHOU J, et al. miR-340-5p mediates cardiomyocyte oxidative stress in diabetes-induced cardiac dysfunction by targeting Mcl-1[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:3182931.
- [18] YANG M L, WOOLFENDENH C, ZHANG Y Y, et al. Intact RNA structurome reveals mRNA structure-mediated regulation of miRNA cleavage *in vivo*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(15):8767-8781.
- [19] YANG H, WANG H C, ANDERSSON U. Targeting inflammation driven by HMGB1[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:484.

(收稿日期:2022-03-31 修回日期:2022-08-15)

(编辑:张元媛)