

江婷婷,马兴华. 咪唑安定通过上调 miR-290-5p 调节 PI3K/AKT 信号通路抑制缺氧诱导心肌细胞损伤的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 91-96.

Jiang TT, Ma XH. Midazolam inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte damage by up-regulating miR-290-5p to regulate the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 91-96.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.11.015

咪唑安定通过上调 miR-290-5p 调节 PI3K/AKT 信号通路抑制缺氧诱导心肌细胞损伤的机制研究

江婷婷,马兴华*

(西安交通大学医学院附属三二〇一医院麻醉科,陕西 汉中 723000)

【摘要】 目的 探讨咪唑安定(MID)对缺氧诱导心肌细胞损伤的影响和分子机制。方法 采用不同浓度的MID预处理H9C2细胞24 h,缺氧诱导后,细胞计数试剂盒(CCK-8)检测H9C2细胞存活率,确定MID最佳浓度。将H9C2细胞分为正常(NC)组、缺氧(hypoxia)组、MID+hypoxia组、miR-NC+hypoxia组、miR-290-5p+hypoxia组、anti-miR-NC+MID+hypoxia组、anti-miR-290-5p+MID+hypoxia组。CCK-8法检测细胞存活;流式细胞术检测细胞凋亡;实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-290-5p的表达;蛋白质印记(Western blot)检测磷脂酰肌醇-3-羟激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路相关蛋白的表达。结果 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的MID预处理H9C2细胞缺氧后细胞存活率显著升高($P<0.05$),16 $\mu\text{mol/L}$ 为MID的最佳浓度。与NC组比较,hypoxia组H9C2细胞凋亡率显著升高,miR-290-5p的表达和PI3K通路活性显著降低($P<0.05$)。与hypoxia组比较,MID+hypoxia组H9C2细胞凋亡率显著降低,miR-290-5p的表达显著升高,PI3K通路活性显著升高($P<0.05$)。与MID+hypoxia组比较,miR-290-5p+hypoxia组H9C2细胞存活率显著升高,凋亡率显著降低($P<0.05$)。与anti-miR-NC+MID+hypoxia组比较,anti-miR-290-5p+MID+hypoxia组H9C2细胞存活率显著降低,凋亡率显著升高,PI3K通路活性显著降低($P<0.05$)。结论 咪唑安定通过上调miR-290-5p激活PI3K/AKT信号通路有关进而对缺氧诱导的心肌细胞损伤具有保护作用。

【关键词】 咪唑安定;心肌细胞损伤;miR-290-5p;PI3K/AKT信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)11-0091-06

Midazolam inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte damage by up-regulating miR-290-5p to regulate the PI3K/AKT signaling pathway

JIANG Tingting, MA Xinghua*

(Department of Anesthesiology, 3201 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University Medical College, Hanzhong 723000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects and molecular mechanisms of midazolam (MID) on myocardial cell injury induced by hypoxia. **Methods** To determine the optimal MID concentration, H9C2 cells were pretreated with different concentrations of MID for 24 h, induced with hypoxia, and the survival rate was assayed using the cell counting kit (CCK-8). H9C2 cells were divided into seven groups: normal control (NC); hypoxia; MID + hypoxia; microRNA (miRNA) negative control (NC) + hypoxia; miR-290-5p + hypoxia; anti-miR-NC + MID + hypoxia; and anti-miR-290-5p + MID + hypoxia. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect miR-290-5p expression. Western blot was used to detect phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway-related protein expression. **Results** The cell survival rate of H9C2 cells pretreated with MID at

[作者简介] 江婷婷(1982—)女,硕士,研究方向:心血管麻醉及脑保护。E-mail: gemyw62@163.com

[通信作者] 马兴华(1982—)男,本科,研究方向:医疗设备全生命周期监管。E-mail: mxh3203@163.com

8, 16 and 32 $\mu\text{mol/L}$ was significantly increased after hypoxia ($P < 0.05$); 16 $\mu\text{mol/L}$ was the optimal concentration. Compared with the NC group, the apoptosis rate of H9C2 cells in the hypoxia group was significantly increased, while the expression of miR-290-5p and the PI3K pathway activity were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the hypoxia group, the apoptosis rate of H9C2 cells in the MID + hypoxia group was significantly reduced, and the expression of miR-290-5p and the activity of the PI3K pathway were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the MID + hypoxia group, the survival rate of H9C2 cells in the miR-290-5p + hypoxia group was significantly increased, and the apoptosis rate was significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the anti-miR-NC + MID + hypoxia group, the survival rate of H9C2 cells in the anti-miR-290-5p + MID + hypoxia group was significantly reduced, the apoptosis rate was significantly increased, and PI3K pathway activity was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusions** Midazolam protected hypoxia-induced cardiomyocyte damage by upregulating miR-290-5p to activate PI3K/AKT signaling pathway.

[Keywords] midazolam; cardiomyocyte injury; miR-290-5p; PI3K/AKT signaling pathway

大量研究证实,缺氧是心肌缺血的潜在致病因素,急性或持续性缺氧可引起心肌细胞凋亡,造成心肌细胞损伤,从而导致心肌梗死发生^[1]。目前,保护缺氧诱导的心肌细胞损伤被认为是一种潜在的心肌梗死治疗策略^[2]。咪唑安定(midazolam, MID)别名咪达唑仑、速眠安,具有典型的苯二氮䓬类药活性。长期以来,MID被认为是一种快速短效的镇静药,广泛应用于临床麻醉术前给药、重症监护室镇静、诊断检查操作、新生儿难治性癫痫控制等多个领域^[3-4]。资料显示,MID可减轻缺氧复氧引起的心肌细胞凋亡,且舒芬太尼预处理联合MID后处理可明显减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤^[5-6]。然而,MID对缺氧诱导心肌细胞损伤的保护作用机制并不明确。miR-290-5p是近年来发现的微小RNA,研究显示在脓毒症诱导的肾损伤中miR-290-5p表达下调,异丙酚通过上调miR-290-5p减轻脓毒症引起的肾损伤^[7]。然而,miR-290-5p在心肌细胞缺氧损伤中的作用、MID是否通过调控miR-290-5p表达发挥保护作用尚不清楚。因此,本研究通过观察MID对缺氧条件下心肌细胞存活、凋亡以及miR-290-5p表达的影响,初步揭示其保护作用机制,以期MID用于预防缺氧诱导的心肌细胞损伤奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

大鼠心肌细胞H9C2购自中田科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 主要试剂

DMEM培养基、胎牛血清、青链霉素混合液购于武汉普诺赛生命科技有限公司;咪唑安定(批号:20111005)购于徐州恩华药业集团有限责任公司;

细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit 8, CCK-8)购于北京百奥莱博科技有限公司;膜联蛋白V异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司;逆转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒购于大连宝生物工程公司;miR-290-5p模拟物(miR-290-5p mimics)及其阴性对照(miR-NC)、miR-290-5p抑制物(anti-miR-290-5p)及其阴性对照(anti-miR-NC)、PCR引物由上海生工生物工程股份有限公司提供;兔源细胞周期素D1(cyclinD1)抗体、兔源活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved caspase 3, C-caspase-3)抗体、兔源 β -肌动蛋白(β -actin)、兔源磷酸化的磷脂酰肌醇-3-羟激酶(p-PI3K)抗体和兔源磷酸化的蛋白激酶B(p-AKT)抗体购于美国CST公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和模型构建

H9C2细胞采用DMEM培养基(含10%胎牛血清和1%青链霉素溶液)培养,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 缺氧培养箱(含1% O_2 、5% CO_2 、94% N_2)内培养48 h构建心肌细胞缺氧损伤模型^[8]。

1.3.2 MID对缺氧诱导的心肌细胞存活、凋亡以及miR-290-5p表达的影响

(1) CCK-8法检测细胞存活

将H9C2细胞(每孔 5×10^3 cells)接种到96孔板并分为正常(NC)组、缺氧(hypoxia)组、MID + hypoxia组(分别采用终浓度为8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的MID处理心肌细胞后进行缺氧处理)。各组细胞进行相应处理后,每孔加入10 μL 的CCK-8试剂,培养箱孵育4 h,酶标仪测定450 nm波长处的吸光度值。确定用药浓度为16 $\mu\text{mol/L}$ 。

(2) 流式细胞术检测细胞凋亡

收集 NC 组、hypoxia 组、MID+hypoxia 组 H9C2 细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, 采用结合缓冲液调整为单细胞悬液。取 100 μ L 细胞悬液(1×10^5 cells/mL) 加入流式管, 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书检测细胞凋亡情况。

(3) RT-qPCR 检测 miR-290-5p 的表达水平

收集 NC 组、hypoxia 组、MID+hypoxia 组 H9C2 细胞, PBS 洗涤细胞 2 次, TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA, 随后进行逆转录反应和 RT-qPCR 反应。miR-290-5p 的表达以 U6 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其表达水平。引物序列如下(5' - 3') : miR-290-5p 上游引物: GCTGGGTTTCACGGGGTATCAA, 下游引物: TCAACTGAGTCCCGTAGGGTCCG; U6 上游引物: CTCGCTTCGGCAGCACATATACT, 下游引物: ACGC TTCACGAATTTGCGTGTC。

(4) Western blot 检测 Cleaved-caspase-3 的表达水平

收集 NC 组、hypoxia 组、MID+hypoxia 组 H9C2 细胞, 采用 RIPA 裂解液获得各组细胞蛋白。将细胞蛋白与适量上样缓冲液混合煮沸变性后, 取适量样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。随后利用湿法转膜装置将分离的细胞蛋白转移至硝酸纤维素膜。5%的脱脂牛奶封闭膜后, 采用 PBS 液洗膜 3 次, 将膜置于稀释的一抗溶液中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 液洗膜 3 次, 将膜置于稀释的二抗溶液中室温孵育 1 h, PBS 液洗膜 3 次, 进行化学发光显色。以目标蛋白与内参 β -actin 蛋白灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。

1.3.3 过表达 miR-290-5p 对心肌细胞存活和凋亡的影响

将 H9C2 细胞分为 miR-NC+hypoxia 组(转染 miR-NC 48 h 后进行缺氧诱导)、miR-290-5p+hypoxia 组(转染 miR-290-5p mimics 48 h 后进行缺氧诱导)。按照上述步骤检测各组细胞的存活、凋亡以及 CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达情况。

1.3.4 MID 调控 miR-290-5p 表达对缺氧诱导心肌细胞损伤的影响

将 H9C2 细胞分为 anti-miR-NC+MID+hypoxia 组(转染 anti-miR-NC 48 h 后, 进行 MID 干预和缺氧处理)、anti-miR-290-5p+MID+hypoxia 组(转染 anti-miR-290-5p 48 h 后, 进行 MID 干预和缺氧处理), 按照上述步骤检测各组细胞的存活、凋亡以及

CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达情况。

1.3.5 MID 调控 miR-290-5p 表达对缺氧诱导心肌细胞损伤 PI3K/AKT 信号通路的影响

收集 NC 组、hypoxia 组、MID+hypoxia 组、anti-miR-NC+MID+hypoxia 组、anti-miR-290-5p+MID+hypoxia 组 H9C2 细胞, 按照上述 Western blot 步骤检测各组细胞 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平。

1.4 统计学方法

各组数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有统计分析均采用 SPSS 20.0 进行。两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 采用 SNK-*q* 检验进行进一步组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 MID 对心肌细胞 H9C2 增殖的影响

CCK-8 实验结果表明, 见表 1, 与 NC 组比较, hypoxia 组 H9C2 细胞存活率显著降低; 与 hypoxia 组比较, 8 μ mol/L MID+hypoxia 组、16 μ mol/L MID+hypoxia 组、32 μ mol/L MID+hypoxia 组细胞存活率显著升高($P < 0.05$)。随着 MID 浓度增加, H9C2 细胞存活率呈先升高再降低趋势, 选择 16 μ mol/L 的 MID 进行后续实验。

2.2 MID 对心肌细胞 H9C2 凋亡的影响

流式细胞术和 Western blot 实验结果表明, 见图 1 和表 2, 与 NC 组比较, hypoxia 组 H9C2 细胞凋亡率、Cleaved-caspase-3 蛋白表达显著升高; 与 hypoxia 组比较, MID+hypoxia 组细胞凋亡率、Cleaved-

表 1 不同浓度 MID 对心肌细胞 H9C2 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of different concentrations of MID on the proliferation of cardiomyocyte H9C2

组别 Groups	细胞存活率(%) Cell survival rate
对照 NC	100.86 \pm 10.09
缺氧 Hypoxia	42.53 \pm 4.26*
8 μ mol/L 咪唑安定+缺氧	52.25 \pm 5.22#
8 μ mol/L MID+hypoxia	
16 μ mol/L 咪唑安定+缺氧	73.11 \pm 7.31#
16 μ mol/L MID+hypoxia	
32 μ mol/L 咪唑安定+缺氧	70.46 \pm 7.05#
32 μ mol/L MID+hypoxi	
<i>F</i>	30.088
<i>P</i>	0.000

注: 与 NC 比较, * $P < 0.05$; 与 hypoxia 比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC, * $P < 0.05$. Compared with hypoxia, # $P < 0.05$.

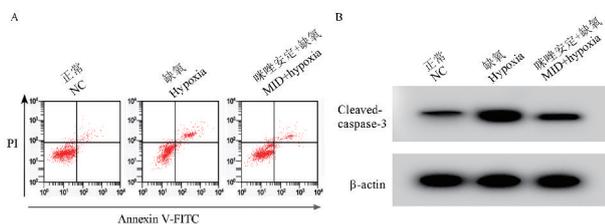
caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 MID 对 miR-290-5p 表达的影响

RT-qPCR 实验结果表明,见表 3,与 NC 组比较, hypoxia 组 H9C2 细胞 miR-290-5p 的表达显著降低;与 hypoxia 组比较, MID+hypoxia 组 H9C2 细胞中 miR-290-5p 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。

2.4 高表达 miR-290-5p 对心肌细胞 H9C2 增殖、凋亡的影响

结果见表 4 和图 2,与 miR-NC+hypoxia 组比较, miR-290-5p+hypoxia 组 H9C2 细胞 miR-290-5p 和 CyclinD1 蛋白的表达水平、细胞存活率显著升高, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平和细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。



注:A:流式细胞仪检测细胞凋亡;B:Western blot 检测 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达。

图 1 MID 对心肌细胞 H9C2 凋亡的影响

Note. A, Flow cytometry to detect apoptosis. B, Western blot detection of Cleaved-caspase-3 protein expression.

Figure 1 Effect of MID on apoptosis of cardiomyocyte H9C2

表 2 MID 对心肌细胞 H9C2 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of MID on apoptosis of cardiomyocyte H9C2

组别 Groups	Cleaved-caspase-3	凋亡率 (%) Apoptosis rate
NC 对照	0.30±0.03	6.99±0.70
Hypoxia 缺氧	0.92±0.09*	20.35±2.04*
咪唑安定缺氧 MID+hypoxia	0.45±0.05#	10.38±1.04#
<i>F</i>	81.887	75.712
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与 NC 比较, * $P < 0.05$; 与 hypoxia 比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC, * $P < 0.05$. Compared with hypoxia, # $P < 0.05$.

表 4 高表达 miR-290-5p 对心肌细胞 H9C2 增殖、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of high expression of miR-290-5p on proliferation and apoptosis of cardiomyocyte H9C2

组别 Groups	miR-290-5p	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	细胞存活率 (%) Cell survival rate	凋亡率 (%) Apoptosis rate
空载体+缺氧 miR-NC+hypoxia	1.00±0.11	0.40±0.04	0.90±0.09	43.02±4.31	20.88±2.09
miR-290-5p+缺氧 miR-290-5p+hypoxia	2.36±0.24*	1.02±0.10*	0.42±0.04*	90.21±9.02*	9.69±0.97*
<i>t</i>	8.922	9.971	8.441	8.176	8.412
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

注:与 NC 比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC, * $P < 0.05$.

2.5 低表达 miR-290-5p 可以部分逆转 MID 对心肌细胞 H9C2 增殖和凋亡的影响

见图 3 和表 5,与 anti-miR-NC+MID+hypoxia 组比较, anti-miR-290-5p+MID+hypoxia 组 H9C2 细胞 miR-290-5p 和 CyclinD1 蛋白的表达水平、细胞存活率显著降低, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平和细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。

2.6 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达

见图 4 和表 6,与 NC 组比较, hypoxia 组 H9C2 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平显著降低;与 hypoxia 组比较, MID+hypoxia 组 H9C2 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平显著升高;与 anti-miR-NC+MID+hypoxia 组比较, anti-miR-290-5p+MID+hypoxia 组 H9C2 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

缺氧是心肌梗死的主要危险之一。缺氧状态下,心肌细胞线粒体功能异常,能量代谢紊乱,同时引起大量的生理和病理反应,引起心肌细胞损伤和凋亡^[9]。因此,如何减轻缺氧诱导的心肌细胞损伤和凋亡对防治心肌梗死具有重要意义。

表 3 MID 对 miR-290-5p 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of MID on miR-290-5p expression

组别 Groups	miR-290-5p
NC 对照	1.00±0.12
Hypoxia 缺氧	0.35±0.04*
咪唑安定+缺氧 MID+hypoxia	0.86±0.09#
<i>F</i>	43.705
<i>P</i>	0.000

注:与 NC 比较, * $P < 0.05$; 与 hypoxia 比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC, * $P < 0.05$. Compared with hypoxia, # $P < 0.05$.

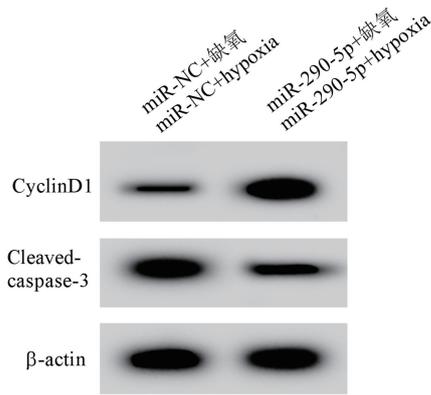


图 2 Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3 蛋白的表达

Figure 2 Western blot detects expression of CyclinD1, Cleaved-caspase-3 protein

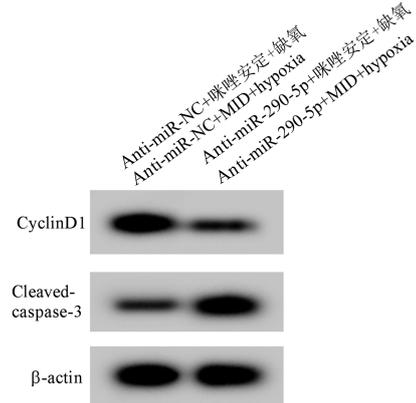


图 3 低表达 miR-290-5p 可以部分逆转 MID 对 H9C2 心肌细胞 CyclinD1 和 Cleaved-caspase-3 蛋白表达的影响

Figure 3 Low expression of miR-290-5p can partially reverse the effect of MID on the expression of CyclinD1 and Cleaved-caspase-3 in cardiomyocytes H9C2

表 5 低表达 miR-290-5p 可以部分逆转 MID 对心肌细胞 H9C2 增殖、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Low expression of miR-290-5p can partially reverse the effect of MID on the proliferation and apoptosis of cardiomyocyte H9C2

组别 Groups	miR-290-5p	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	细胞存活率 (%) Cell survival rate	细胞凋亡率 (%) Apoptosis rate
空载体+咪唑安定+缺氧 anti-miR-NC+MID+hypoxia	1.00±0.11	0.88±0.09	0.42±0.04	72.69±7.27	10.66±1.07
anti-miR-290-5p+咪唑安定+缺氧 anti-miR-290-5p+MID+hypoxia	0.33±0.04*	0.45±0.05*	0.80±0.08*	50.36±5.04*	17.89±1.79*
<i>t</i>	9.915	7.234	7.359	4.372	6.005
<i>P</i>	0.001	0.002	0.002	0.012	0.004

注:与 anti-miR-NC+MID+hypoxia 比较, * $P < 0.05$ 。
Note. Compared with anti-miR-NC + MID + hypoxia, * $P < 0.05$.

表 6 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Expression of PI3K/AKT signaling pathway related proteins

组别 Groups	p-PI3K	p-AKT
对照 NC	0.70±0.07	0.62±0.06
缺氧 Hypoxia	0.32±0.03*	0.20±0.02*
咪唑安定+缺氧 MID+hypoxia	0.62±0.06 [#]	0.50±0.05 [#]
空载体+咪唑安定+缺氧 Anti-miR-NC+MID+hypoxia	0.60±0.07	0.52±0.06
Anti-miR-290-5p+咪唑安定+缺氧 Anti-miR-290-5p+MID+hypoxia	0.40±0.04 ^{&}	0.33±0.03 ^{&}
<i>F</i>	24.264	38.155
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与 NC 比较, * $P < 0.05$; 与 hypoxia 比较, [#] $P < 0.05$; 与 anti-miR-NC + hypoxia+MID 比较, [&] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with NC, * $P < 0.05$. Compared with hypoxia, [#] $P < 0.05$. Compared with anti-miR-NC + hypoxia + MID, [&] $P < 0.05$.

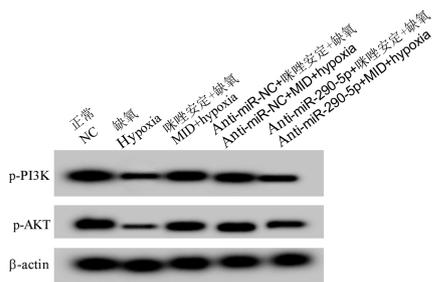


图 4 Western blot 检测 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达

Figure 4 Western blot detects p-PI3K, p-AKT protein expression

长期以来, MID 被认为对心肌细胞损伤具有保护作用。刘保江等^[10]研究发现 MID 预处理可改善心脏收缩和舒张功能,减轻再灌注心律失常发生频率,提高心肌细胞抗氧化能力,降低脂质过氧化反应,减轻心肌细胞损伤程度。覃军等^[11]指出 MID 缺氧前预处理可明显增高心肌组织及血浆中血管

内皮生长因子的表达量,对改善缺血心肌功能具有积极作用。本研究发现缺氧诱导后心肌细胞存活率显著降低,细胞凋亡率和促凋亡蛋白表达水平均

显著升高,说明缺氧诱导的心肌细胞损伤模型建立成功。进一步研究发现一定浓度的 MID 预处理可改善缺氧诱导对心肌细胞的存活抑制作用,并减轻缺氧诱导的心肌细胞凋亡,与前人研究结论相吻合^[5, 10-11]。以上研究说明, MID 预处理通过抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡,提高心肌细胞存活率,对缺氧诱导的心肌细胞损伤发挥保护作用。

miR-290-5p 是 miR-290-295 簇的成员之一,研究显示 miR-290-295 在小鼠胚胎干细胞中具有潜在的促生存功能,其表达缺失可导致小鼠部分胚胎致死和生殖细胞缺陷^[12]。此外, miR-290-295 簇还可促进细胞 G1 期向 S 转换,加速细胞增殖,在防止小鼠胚胎干细胞凋亡中发挥保护作用^[13]。然而, miR-290-5p 在缺氧诱导的心肌细胞损伤中的作用尚未可知。本研究显示缺氧诱导后心肌细胞 miR-290-5p 的表达显著降低,而咪唑安定预处理可提高缺氧诱导下心肌细胞 miR-290-5p 表达水平。进一步功能分析显示,过表达 miR-290-5p 可提高缺氧诱导下心肌细胞存活率,降低缺氧诱导的心肌细胞凋亡,并升高促增殖蛋白 CyclinD1、降低促凋亡蛋白 Cleaved-caspase-3 的表达水平,与 MID 预处理对缺氧诱导的心肌细胞损伤的保护作用相同。此外,本研究发现抑制 miR-290-5p 表达还可部分逆转 MID 对缺氧诱导的心肌细胞和存活抑制的影响。以上研究说明上调 miR-290-5p 是 MID 对缺氧诱导的心肌细胞损伤发挥保护作用的重要机制。

PI3K/AKT 信号通路的激活在缺氧缺血损伤后心脏保护中起着关键作用^[14-15]。研究发现, miR-181c、miR-335 等多种 miRNA 通过调控 PI3K/AKT 信号通路改善心肌缺血复氧损伤^[16-17]。本研究显示 MID 预处理可减轻缺氧诱导对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用,而抑制 miR-290-5p 表达则部分逆转 MID 对缺氧诱导的心肌细胞 PI3K/AKT 信号通路活化的影响。提示 MID 通过上调 miR-290-5p 激活 PI3K/AKT 信号通路进而对缺氧诱导的心肌细胞损伤具有保护作用。

综上所述,本研究证实 MID 通过上调 miR-290-5p 可减轻缺氧诱导的心肌细胞凋亡,促进心肌细胞存活,对缺氧诱导的心肌细胞损伤具有保护作用,其机制与激活 PI3K/AKT 信号通路有关,这为 MID 在临床预防缺氧诱导的心肌细胞损伤中应用奠定理论基础。

参考文献:

[1] Lu L, Liu M, Sun R, et al. Myocardial infarction symptoms and

- treatments [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(3): 865-867.
- [2] Guo ZX, Zhou FZ, Song W, et al. Suppression of microRNA-101 attenuates hypoxia-induced myocardial H9C2 cell injury by targeting DIMT1-Sp1/survivin pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(20): 6965-6976.
- [3] Dao K, Giannoni E, Diezi M, et al. Midazolam as a first-line treatment for neonatal seizures: Retrospective study [J]. *Pediatr Int*, 2018, 60(5): 498-500.
- [4] 延柏文. 探讨小剂量咪唑安定辅助腰硬联合麻醉在妇科腹腔镜手术中的可行性 [J]. *临床医学研究与实践*, 2018, 3(3): 58-59.
- [5] 刁玉刚, 祖剑宇, 刘海梅, 等. 咪唑安定对缺氧复氧损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(4): 410-411, 417.
- [6] 巩固, 陈亮, 代雪梅, 等. 舒芬太尼预处理联合咪唑安定后处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(10): 995-1000.
- [7] Zheng G, Qu H, Li F, et al. Propofol attenuates sepsis-induced acute kidney injury by regulating miR-290-5p/CCL-2 signaling pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(11): e7655.
- [8] 舒璇, 戴波, 肖定璋, 等. 过表达 miR-29b1 在缺氧诱导的心肌细胞凋亡中的作用 [J]. *广州医科大学学报*, 2018, 46(3): 1-5.
- [9] Guo ZX, Zhou FZ, Song W, et al. Suppression of microRNA-101 attenuates hypoxia-induced myocardial H9C2 cell injury by targeting DIMT1-Sp1/survivin pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(20): 6965-6976.
- [10] 刘保江, 郭志佳. 麻醉药物对心肌缺血再灌注损伤的保护研究进展 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2008, 29(2): 189-192.
- [11] 覃军, 周美容, 徐道妙, 等. 咪唑安定预处理对急性缺氧大鼠心肌细胞血管内皮生长因子的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2010, 27(2): 200-202.
- [12] Zheng GX, Ravi A, Calabrese JM, et al. A latent pro-survival function for the mir-290-295 cluster in mouse embryonic stem cells [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(5): e1002054.
- [13] Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1478-1483.
- [14] Jiang YQ, Chang GL, Wang Y, et al. Geniposide prevents hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9C2 cells: Improvement of mitochondrial dysfunction and activation of GLP-1R and the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1): 407-421.
- [15] Qin L, Fan S, Jia R, et al. Ginsenoside Rg1 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced injury through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Pharmazie*, 2018, 73(6): 349-355.
- [16] Li X, Zhong J, Zeng Z, et al. miR-181c protects cardiomyocyte injury by preventing cell apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(4): 849-858.
- [17] Wu N, Zhang X, Bao Y, et al. Down-regulation of GAS5 ameliorates myocardial ischaemia/reperfusion injury via the miR-335/ROCK1/AKT/GSK-3 β axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12): 8420-8431.

[收稿日期] 2020-03-27