

引用本文:李琼,王磊,高波.微小RNA-204-5p靶向蛋白质酪氨酸磷酸酶1B基因对缺氧复氧诱导的大鼠心肌细胞氧化应激的影响[J].安徽医药,2022,26(5):977-982.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.05.030.

◇临床医学◇



微小RNA-204-5p靶向蛋白质酪氨酸磷酸酶1B基因对缺氧复氧诱导的大鼠心肌细胞氧化应激的影响

李琼,王磊,高波

作者单位:汉川市人民医院心血管科,湖北 汉川 431600

通信作者:高波,男,副主任医师,研究方向为心血管,Email:379759547@qq.com

摘要: 目的 探讨miR-204-5p对缺氧复氧诱导大鼠心肌细胞H9C2氧化应激的调控作用机制。方法 体外培养大鼠胚胎心肌细胞H9C2,构建心肌细胞缺氧/复氧模型。实验分为空白组、缺氧复氧组、缺氧复氧+miR-con组、缺氧复氧+miR-204-5p组、缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA组、缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-蛋白质酪氨酸磷酸酶1B(PTP1B)组。实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blotting)检测miR-204-5p和PTP1B的表达。双荧光素酶报告基因实验和Western blotting验证miR-204-5p和PTP1B的靶向调控关系。四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色(MTT)法检测心肌细胞存活率。试剂盒检测乳酸脱氢酶(LDH)、心肌肌钙蛋白(cTnT)、超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧簇(ROS)和丙二醛(MDA)水平变化。流式细胞术检测心肌细胞凋亡情况。结果 缺氧复氧处理可显著抑制心肌细胞miR-204-5p表达,促进PTP1B表达。PTP1B是miR-204-5p的靶基因,miR-204-5p可负性调控PTP1B的表达。缺氧复氧处理显著抑制细胞存活,降低SOD水平,提高LDH、ROS和MDA水平,促进细胞凋亡。过表达miR-204-5p可降低LDH、ROS和MDA水平,促进细胞存活,降低细胞凋亡;过表达PTP1B可部分削弱miR-204-5p过表达对缺氧复氧诱导心肌细胞凋亡和氧化应激的影响。结论 miR-204-5p通过靶向下调PTP1B抑制心肌细胞氧化应激,促进细胞存活,抑制细胞凋亡,对心肌细胞发挥保护作用。

关键词: 心肌再灌注损伤; 微小RNA-204-5p; 蛋白质酪氨酸磷酸酶1B(PTP1B); H9C2细胞; 缺氧复氧; 氧化应激

Effects of miR-204-5p targeting PTP1B gene on oxidative stress of rat cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation and its mechanism

LI Qiong, WANG Lei, GAO Bo

Author Affiliation: Department of Cardiology, Hanchuan People's Hospital, Hanchuan, Hubei 431600, China

Abstract: **Objective** To investigate the regulatory mechanism of miR-204-5p on hypoxia-reoxygenation-induced rat cardiomyocytes oxidative stress. **Methods** Rat embryonic cardiomyocytes H9c2 were divided into blank group, hypoxia-reoxygenation group, hypoxia-reoxygenation+ miR-con group, hypoxia-reoxygenation+miR-204-5p group, hypoxia-reoxygenation+miR-204-5p+pcDNA group, and hypoxia reoxygenation+miR-204-5p+ pcDNA-PTP1B group. The expression of miR-204-5p and PTP1B was detected by qRT-PCR and Western blotting. The dual luciferase reporter gene assay and Western blotting were used to verify the targeted regulatory relationship between miR-204-5p and PTP1B. Cell survival rate was measured by MTT assay. The levels of lactate dehydrogenase (LDH), cardiac troponin (cTnT), superoxide dismutase (SOD), reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA) were detected by the kits. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. **Results** Hypoxia-reoxygenation significantly inhibited the expression of miR-204-5p in cardiomyocytes, while promoted the expression of PTP1B. PTP1B was a target gene of miR-204-5p, and miR-204-5p negatively regulated the expression of PTP1B. Hypoxia and reoxygenation significantly inhibited cell survival, reduced SOD level, increased LDH, ROS and MDA levels, and promoted cell apoptosis. Over-expression of miR-204-5p could reduce LDH, ROS and MDA levels, promote cell survival and reduce apoptosis. Over-expression of PTP1B could partially rescue the effects of miR-204-5p on hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress. **Conclusion** MiR-204-5p inhibits oxidative stress, promotes cell survival, and inhibits apoptosis by down-regulating PTP1B, thus playing a protective role on cardiomyocytes.

Key words: Myocardial reperfusion injury; MiR-204-5p; The protein tyrosine phosphatase 1B(PTP1B); H9C2 cells; Hypoxia-reoxygenation; Oxidative stress

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是由冠状动脉急性持续缺血缺氧引起心肌坏

死的心血管疾病,具有极高的致死率。目前,临床主要采用溶栓、经皮冠状动脉介入治疗和冠状动脉

搭桥手术等手段恢复心肌血液供应。然而,一旦心肌供血恢复,会引起心肌细胞氧化应激,导致细胞损伤和凋亡^[1]。近年来,越来越多的数据表明,微小RNA(microRNA, miRNA)的表达失调与人类多种心血管疾病有关^[2],包括缺氧复氧损伤^[3]。miR-204-5p位于人类染色体9q21.12, Xiao等^[4]研究发现,缺氧复氧诱导下心肌细胞中miR-204-5p表达下调,miR-204-5p通过靶向自噬相关蛋白LC3-II调控缺氧复氧诱导的心肌细胞自噬;此外, Qiu等^[5]研究表明,miR-204-5p通过调节沉默调节蛋白1(Silencing regulatory protein 1, sirt1)介导的自噬,保护H9C2细胞免受缺氧复氧诱导的损伤。然而,miR-204-5p对缺氧复氧诱导下的心肌细胞氧化应激的影响和机制仍有待阐明。本研究以心肌细胞缺氧复氧模型模拟AMI过程,旨在阐明miR-204-5p对缺氧复氧诱导下的心肌细胞氧化应激和凋亡的影响,探索其分子机制,以期为临床治疗AMI提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 大鼠胚胎心肌细胞株H9C2购于上海中科院典型培养物保藏细胞库;MTT试剂盒购于美国Sigma公司;荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自美国Promega公司;乳酸脱氢酶(LDH)、心肌肌钙蛋白(cTnT)、超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧簇(ROS)和丙二醛(MDA)检测试剂盒南京建成生物工程研究所;PCR引物、miR-con、miR-204-5p mimics、pcDNA、pcDNA-蛋白质酪氨酸磷酸酶1B(The protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)及WT-PTP1B和MUT-PTP1B的构建和测序均由上海生工公司提供。膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)试剂盒购于北京索莱宝生物科技有限公司;Trizol试剂和western相关试剂购于上海碧云天公司;细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和Bcl相关X(Bax)等鼠源I抗购于美国Santa Cruz公司;兔源PTP1B抗体购于Abcam公司;HRP标记的羊抗兔和羊抗鼠II抗购于武汉博士德公司;Lipofectamine™ 2000购于Invitrogen公司。

1.2 实验方法

1.2.1 H9C2心肌细胞缺氧复氧模型的建立 用高糖DMEM培养基(含10%胎牛血清和1%青链霉素混合液)在37℃含5%二氧化碳的细胞培养箱中培养H9C2。将H9C2细胞培养基更换为无糖DMEM培养基,置于缺氧培养箱中培养6h,复氧时更换为新鲜高糖DMEM培养基常规培养6h,标记为缺氧复氧组;未经任何处理的H9c2细胞标记为空白组。

1.2.2 细胞转染和实验分组 收集对数期的H9c2细胞,分别将miR-con、miR-204-5p mimics转染至

H9c2细胞,转染成功后按照“1.2.1”方法进行缺氧复氧处理,分别标记为缺氧复氧+miR-con组、缺氧复氧+miR-204-5p组。后续实验中为进一步验证miR-204-5p是通过调控PTP1B表达进而影响缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激,将miR-204-5p mimics和pcDNA共转染至H9c2细胞,进行缺氧复氧处理后标记为缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA组;将miR-204-5p mimics和pcDNA-PTP1B共转染至H9c2细胞,进行缺氧复氧处理后标记为缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B组。转染方法参照Lipofectamine™ 2000使用说明书。

1.2.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 用Trizol法提取H9C2细胞总RNA,反转录合成cDNA,以cDNA为模板制备qRT-PCR反应体系,上实时荧光定量PCR仪检测miR-204-5p和PTP1B mRNA的相对表达量。

1.2.4 荧光素酶报告基因实验 TargetScan预测发现miR-204-5p与PTP1B序列的3'-UTR存在结合位点。将含有结合位点的PTP1B3'-UTR片段或cDNA插入荧光素酶报告基因载体构建WT-PTP1B、MUT-PTP1B。分别将WT-PTP1B、MUT-PTP1B与miR-204-5p mimics共转染至H9c2细胞,收集转染48h细胞并测定各组细胞中荧光素酶活性。

1.2.5 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色(MTT)法检测细胞增殖 收集各组对数生长期H9c2细胞,细胞接种至96孔板,每孔加入10 μL的MTT试剂(5 g/L)孵育4h,弃上清,向各孔内加入150 μL的DMSO,振荡10 min,利用酶标仪检测各孔490 nm处吸光度值(OD),细胞存活率(%)=(处理组OD/对照组OD)×100%。

1.2.6 检测LDH、cTnT、SOD、MDA、ROS水平 细胞分组处理后,收集细胞培养液,按试剂盒操作说明检测LDH、cTnT含量。同时收集各组H9C2细胞,加入RIPA裂解液,冰上裂解30 min,低温下12 000 r/min转速离心15 min,收集上清液,按照试剂盒说明书检测SOD、MDA、ROS水平。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 用1×binding buffer重悬各组细胞调整其浓度为1×10⁵个/毫升。取5 μL的Annexin V/FITC和10 μL的PI溶液依次加入到100 μL细胞悬液中,避光孵育15 min,补加1×binding buffer至500 μL后,于1 h内上机检测。

1.2.8 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 RIPA裂解液提取细胞总蛋白,每组取30 μg蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,经湿法转膜、脱脂奶粉封闭后,加入各蛋白I抗(1:500稀释)及内参β-actin一抗(1:1 000稀释),洗膜后,加入II抗(1:2 000),化学

发光显影,放入自动凝胶成像系统拍照,Image J 软件测定各蛋白条带相对灰度值。

1.3 统计学方法 用SPSS 19.0进行统计学分析,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据的比较采用 t 检验;多组数据采用单因素方差分析,组间多重比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

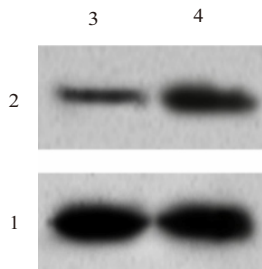
2 结果

2.1 缺氧复氧处理后心肌细胞中 miR-204-5p 和 PTP1B 表达情况 与空白组比较,缺氧复氧组心肌细胞 miR-204-5p 表达降低,PTP1B mRNA 和 PTP1B 蛋白的表达升高($P < 0.05$),见表 1 和图 1。

表 1 缺氧复氧处理心肌细胞影响 miR-204-5p 和 PTP1B 表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-204-5p	PTP1B mRNA	PTP1B 蛋白
空白组	9	1.00±0.09	1.00±0.13	0.31±0.05
缺氧复氧组	9	0.21±0.04 ^①	6.74±0.58 ^①	0.76±0.08 ^①
t 值		24.06	28.97	14.31
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与空白组向比较, $P < 0.05$ 。

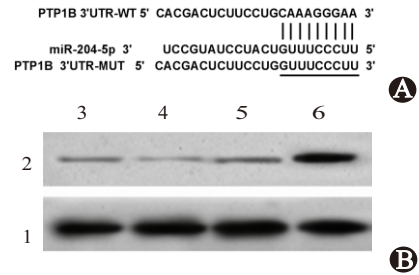


注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—PTP1B;3—空白组;4—缺氧复氧组。

图 1 检测心肌细胞中 PTP1B 蛋白表达

2.2 miR-204-5p 靶向调控 PTP1B 的表达 Targetscan 预测到 miR-204-5p 与 PTP1B 序列的 3' UTR 存在部分连续结合位点,见图 2A。当上调 miR-204-5p 表达后,转染 WT-PTP1B 的 3' UTR 报告基因心肌细胞的荧光素酶活性显著下降($P < 0.05$),而转染 MUT-PTP1B 的 3' UTR 报告基因心肌细胞的荧光素酶活性无显著变化($P > 0.05$),见表 2。当上调 miR-204-5p 表达后,心肌细胞中 PTP1B 蛋白的表达显著降低;当下调 miR-204-5p 表达后,心肌细胞中 PTP1B 蛋白的表达显著增加($P < 0.05$),见表 3 和图 2B。提示 PTP1B 是 miR-204-5p 的靶基因,miR-204-5p 可负性调控 PTP1B 的表达。

2.3 过表达 PTP1B 逆转 miR-204-5p 对缺氧复氧处理诱导的心肌细胞增殖的影响 与空白组相比,缺氧复氧处理显著抑制心肌细胞的存活,促进 PTP1B 表达,抑制 Cyclin D1 表达,促进 LDH 和 cTnT 的释



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—PTP1B;3—miR-con 组;4—miR-204-5p 组;5—anti-miR-con 组;6—anti-miR-204-5p 组。

图 2 miR-204-5p 靶向调控 PTP1B 的表达:A 为 PTP1B 的 3' UTR 中含有与 miR-204-5p 互补的核苷酸序列;B 为心肌细胞中 PTP1B 蛋白的表达

表 2 双荧光素酶报告实验/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	WT- PTP1B	MUT- PTP1B
miR-con 组	9	1.00±0.09	1.46±0.12
miR-204-5p 组	9	0.35±0.05	1.52±0.15
t 值		18.94	0.94
P 值		<0.001	0.363

表 3 miR-204-5p 靶向 PTP1B 调控其表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	PTP1B 蛋白
miR-con 组	9	0.31±0.04
miR-204-5p 组	9	0.06±0.03 ^①
anti-miR-con 组	9	0.29±0.05
anti-miR-204-5p 组	9	0.45±0.06 ^②
F 值		109.22
P 值		<0.001

注:①与 miR-con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 anti-miR-con 组比较, $P < 0.05$ 。

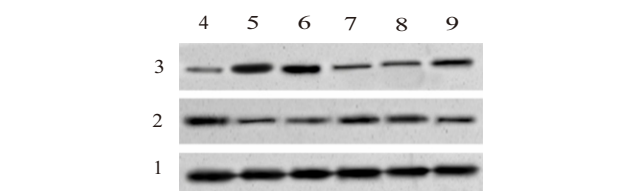
放;与缺氧复氧+miR-con 组相比,缺氧复氧+miR-204-5p 组心肌细胞存活率显著升高,PTP1B 表达含量显著降低,Cyclin D1 表达显著升高;与缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组比较,缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B 组心肌细胞存活率显著降低,PTP1B 表达和 LDH 含量显著升高,Cyclin D1 表达显著降低,LDH 和 cTnT 含量显著升高($P < 0.05$),见表 4 和图 3。以上结果表明,缺氧复氧处理可显著抑制心肌细胞存活,而 miR-204-5p 通过下调 PTP1B 表达促进心肌细胞存活。

2.4 过表达 PTP1B 逆转 miR-204-5p 对缺氧复氧处理诱导的心肌细胞氧化应激的影响 与空白组比较,缺氧复氧处理后心肌细胞 ROS 水平显著提高,SOD 活力显著降低,MDA 含量显著升高;与缺氧复氧+miR-con 组比较,缺氧复氧+miR-204-5p 组心肌细胞 SOD 活力显著升高,ROS 水平显著降低,MDA 含量显著降低;与缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组比较,缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B 组心肌

表4 转染 miR-204-5p 促进缺氧复氧处理心肌细胞存活率/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	PTP1B	Cyclin D1	LDH/(U/L)	cTnT/(μ g/L)	细胞存活/%
空白组	9	0.27 $\pm$ 0.07	0.75 $\pm$ 0.06	480.76 $\pm$ 36.96	0.26 $\pm$ 0.04	100.00 $\pm$ 6.80
缺氧复氧组	9	0.81 $\pm$ 0.05 ^①	0.34 $\pm$ 0.03 ^①	895.91 $\pm$ 51.84 ^①	0.73 $\pm$ 0.08 ^①	55.99 $\pm$ 4.69 ^①
缺氧复氧+miR-con 组	9	0.78 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.04	850.83 $\pm$ 62.11	0.75 $\pm$ 0.09	52.72 $\pm$ 4.59
缺氧复氧+miR-204-5p 组	9	0.42 $\pm$ 0.18 ^②	0.56 $\pm$ 0.06 ^②	629.63 $\pm$ 54.59 ^②	0.42 $\pm$ 0.05 ^②	78.37 $\pm$ 6.48 ^②
缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组	9	0.46 $\pm$ 0.18	0.61 $\pm$ 0.05	657.84 $\pm$ 56.76	0.44 $\pm$ 0.06	78.89 $\pm$ 5.74
缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B 组	9	0.61 $\pm$ 0.18 ^③	0.38 $\pm$ 0.04 ^③	721.85 $\pm$ 55.49 ^③	0.63 $\pm$ 0.08 ^③	61.23 $\pm$ 6.28 ^③
F 值		23.09	120.43	72.98	72.16	85.49
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与空白组向比较, $P<0.05$ 。②与缺氧复氧+miR-con 组向比较, $P<0.05$ 。③与缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组向比较, $P<0.05$ 。



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—细胞周期蛋白 D1(cyclin D1);3—PTP1B;4—空白组;5—缺氧复氧组;6—缺氧复氧+miR-con 组;7—缺氧复氧+miR-204-5p 组;8—缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组;9—缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B 组。

图3 检测心肌细胞中 Cyclin D1 蛋白表达

细胞 SOD 活力降低,ROS 水平显著提高,MDA 含量升高($P<0.05$),见表 5。结果表明,缺氧复氧可诱导心肌细胞氧化损伤,miR-204-5p 通过下调 PTP1B 表达则提高抗氧化物酶 SOD 的活力,降低 MDA 含量和

细胞内 ROS 水平,对心肌细胞具有保护作用。

2.5 过表达 PTP1B 逆转 miR-204-5p 对缺氧复氧处理诱导的心肌细胞凋亡的影响 与空白组比较,缺氧复氧处理显著抑制心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达,促进 Bax 蛋白表达,促进心肌细胞凋亡;与缺氧复氧+miR-con 组比较,缺氧复氧+miR-204-5p 组心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达显著升高,Bax 蛋白表达显著降低,细胞凋亡率降低;与缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组比较,缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B 组心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达显著降低,Bax 蛋白表达显著升高,细胞凋亡率升高($P<0.05$),见表 6 和图 4。以上结果表明,缺氧复氧处理可诱导心肌细胞凋亡,而 miR-204-5p 通过下调 PTP1B 表达可抑制缺氧复氧处理诱导的心肌细胞凋亡。

表5 过表达 PTP1B 逆转 miR-204-5p 对缺氧复氧处理诱导的心肌细胞氧化应激的影响/ $\bar{x} \pm s$

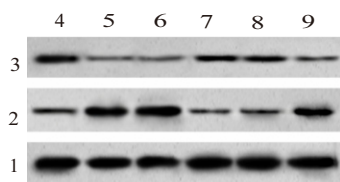
组别	重复次数	SOD/(U/L)	ROS 荧光强度	MDA/(nmol/mL)
空白组	9	24.60 $\pm$ 1.34	486.53 $\pm$ 75.69	4.83 $\pm$ 0.35
缺氧复氧组	9	9.85 $\pm$ 0.87 ^①	1486.24 $\pm$ 162.087 ^①	15.73 $\pm$ 1.18 ^①
缺氧复氧+miR-con 组	9	10.61 $\pm$ 0.95	1557.26 $\pm$ 156.86	15.35 $\pm$ 1.78
缺氧复氧+miR-204-5p 组	9	16.39 $\pm$ 0.78 ^②	789.57 $\pm$ 93.62 ^②	7.84 $\pm$ 0.85 ^②
缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组	9	17.46 $\pm$ 1.27	726.75 $\pm$ 86.45	8.13 $\pm$ 1.09
缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B 组	9	12.53 $\pm$ 0.86 ^③	1236.27 $\pm$ 126.58 ^③	12.21 $\pm$ 1.32 ^③
F 值		255.35	118.14	127.54
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与空白组向比较, $P<0.05$ 。②与缺氧复氧+miR-con 组向比较, $P<0.05$ 。③与缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组向比较, $P<0.05$ 。

表6 转染 miR-204-5p 抑制缺氧复氧处理心肌细胞凋亡/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	细胞凋亡率/%
空白组	9	0.67 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.04	5.57 $\pm$ 0.72
缺氧复氧组	9	0.14 $\pm$ 0.03 ^①	0.85 $\pm$ 0.06 ^①	23.26 $\pm$ 1.82 ^①
缺氧复氧+miR-con 组	9	0.18 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.07	22.81 $\pm$ 1.44
缺氧复氧+miR-204-5p 组	9	0.45 $\pm$ 0.05 ^②	0.34 $\pm$ 0.03 ^②	13.66 $\pm$ 1.35 ^②
缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组	9	0.40 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.04	12.59 $\pm$ 0.96
缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B 组	9	0.22 $\pm$ 0.03 ^③	0.57 $\pm$ 0.06 ^③	18.38 $\pm$ 1.16 ^③
F 值		237.52	256.77	249.22
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与空白组向比较, $P<0.05$ 。②与缺氧复氧+miR-con 组向比较, $P<0.05$ 。③与缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组向比较, $P<0.05$ 。



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—Bcl 相关 X(Bax);3—B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2);4—空白组;5—缺氧复氧组;6—缺氧复氧+miR-con 组;7—缺氧复氧+miR-204-5p 组;8—缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA 组;9—缺氧复氧+miR-204-5p+pcDNA-PTP1B 组。

图4 检测心肌细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

3 讨论

AMI 是临床最常见的心血管疾病之一。心肌细胞损伤发生在缺血再灌注损伤后的心肌组织中,氧化应激是心肌缺血再灌注损伤时心肌损伤扩大的重要因素,在急性心肌梗死中起重要作用^[6]。

近年来,miRNA 在心血管疾病中的作用引起研究者的兴趣,包括 miR-223-3p^[7]和 miR-210^[8]在内的许多 miRNA 参与心肌细胞氧化应激损伤和凋亡。此外, Li 等^[9]研究发现 miR-340-5p 通过调节 Act1/NF- κ B 通路对缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡和氧化应激具有保护作用。目前,对 miR-204-5p 的研究主要集中在肿瘤领域,其在心血管疾病中的作用并完全阐明。Koyama 等^[10]研究发现,miR-204-5p 是醛固酮刺激心肌细胞中 t 型钙通道表达的必需基因; Yu 等^[11]研究表明,敲减 lncRNA AK139328 通过调控 miR-204-3p 表达,抑制心肌细胞自噬,可减轻糖尿病小鼠心肌缺血/再灌注损伤;此外,miR-204 通过靶向 LC3- II 对缺血再灌注诱导的心肌细胞自噬具有抑制作用^[4]。PTP1B 是蛋白酪氨酸磷酸酶家族成员之一,广泛存在于心脏组织中,与心血管疾病密切相关^[12]。PTP1B 的缺失通过调节细胞自噬可消除内质网应激引起的心肌功能障碍^[13]。PTP1B 还是循环 ADP 核糖体诱导心室肌细胞钙离子信号转导的调节因子^[14]。此外,miR-135a 通过靶向 PTP1B 对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[15]。生物信息学分析显示,PTP1B 是 miR-204-5p 潜在靶基因,但 miR-204-5p 能否介导 PTP1B 表达调控缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激尚未可知。

本研究首先检测了缺氧复氧处理的心肌细胞中 miR-204-5p 和 PTP1B 的表达,结果显示,缺氧复氧处理可抑制 miR-204-5p 表达,促进 PTP1B 表达。进一步研究证实 miR-204-5p 可靶向负性调控 PTP1B 的表达,于是推测 miR-204-5p 通过下调 PTP1B 参与对缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激的调控。当心肌损伤发生时,LDH 和 cTnT 释放将明显增加,通过检测细胞培养液 LDH 和 cTnT 的渗漏率

能够有效反映细胞损伤程度^[16]。ROS 是引起氧化应激的主要因子,氧化应激引起细胞损伤,导致终产物 MDA 的累积^[17]。MDA 含量可以反映氧自由基攻击引起的细胞膜损伤的严重程度^[18]。研究人员发现,在缺氧复氧诱导的心肌损伤中 ROS 和 MDA 的水平升高,超氧化物歧化酶 SOD 活性降低^[19]。本研究中,缺氧复氧诱导后,心肌细胞存活率降低,细胞上清液中 LDH 和 cTnT 含量显著升高,细胞内 MDA 和 ROS 水平显著升高,而超氧化物歧化酶 SOD 水平显著降低,细胞凋亡率增加;而上调 miR-204-5p 可以促进心肌细胞存活,抑制 LDH 和 cTnT 的释放,抑制细胞内 MDA 和 ROS 水平,增加 SOD 水平,抑制缺氧复氧诱导的细胞凋亡。此外,我们发现过表达 PTP1B 可部分逆转 miR-204-5p 对心肌细胞氧化应激和凋亡的影响。这些结果表明,miR-204-5p 通过靶向 PTP1B 表达能够保护心肌细胞免受缺氧复氧诱导的细胞凋亡和氧化应激。

参考文献

- [1] HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ S, CHINDA K, BING OS, et al. The role of redox dysregulation in the inflammatory response to acute myocardial ischaemia-reperfusion injury-adding fuel to the fire[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(11): 1275-1293.
- [2] GRECO S, GAETANO C, MARTELLI F. Hypoxamir regulation and function in ischemic cardiovascular diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(8): 1202-19.
- [3] HUANG Z, WU S, KONG F, et al. MicroRNA-21 protects against cardiac hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive autophagy in H9c2 cells via the Akt/mTOR pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(3): 467-474.
- [4] XIAO J, ZHU X, HE B, et al. MiR-204 regulate cardiomyocyte autophagy induced by hypoxia-reoxygenation through LC3- II [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 148(1): 110-112.
- [5] QIU R, LI W, LIU Y. MicroRNA-204 protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury through regulating SIRT1-mediated autophagy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 15-19.
- [6] GONZÁLEZ-MONTERO J, BRITO R, GAJARDO AI, et al. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities[J]. *World J Cardiol*, 2018, 10(9): 74-86.
- [7] TANG Q, LI MY, SU YF, et al. Absence of miR-223-3p ameliorates hypoxia-induced injury through repressing cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress by targeting KLF15[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 841: 67-74.
- [8] DIAO H, LIU B, SHI Y, et al. MicroRNA-210 alleviates oxidative stress-associated cardiomyocyte apoptosis by regulating BNIP3[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017, 81(9): 1712-1720.
- [9] LI D, ZHOU J, YANG B, et al. microRNA-340-5p inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress in cardiomyocytes by regulating the Act1/NF- κ B pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14618-14627.
- [10] KOYAMA R, MANNIC T, ITO J, et al. MicroRNA-204 is neces-

- sary for aldosterone-stimulated T-type calcium channel expression in cardiomyocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 19102941. DOI: 10.3390/ijms19102941.
- [11] YU SY, DONG B, FANG ZF, et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10): 4886-4898.
- [12] THIEBAUT P A, BESNIER M, GOMEZ E, et al. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in cardiovascular diseases [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 101: 50-57.
- [13] WANG S, CHEN X, NAIR S, et al. Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B obliterates endoplasmic reticulum stress-induced myocardial dysfunction through regulation of autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(12): 3060-3074.
- [14] PARK SA, HONG BZ, HA KC, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B is a mediator of cyclic ADP ribose-induced Ca^{2+} signaling in ventricular myocytes [J/OL]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(6): e341. DOI: 10.1038/emm.2017.68.
- [15] WANG S, CHENG Z, CHEN X, et al. microRNA-135a protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by targeting protein tyrosine phosphatase 1B [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10421-10433.
- [16] JIANG WB, ZHAO W, CHEN H, et al. Baicalin protects H9c2 cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress through activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45(3): 303-311.
- [17] SEHIRLI O, TOZAN A, OMURTAG GZ, et al. Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, 71(1): 301-308.
- [18] CHEN M, WANG X, HU BO, et al. Ursolic acid stimulates UCP2 expression and protects H9c2 cells from hypoxia-reoxygenation injury via p38 signaling [J]. *J Biosci*, 2018, 43(5): 857-865.
- [19] HE Y, LI C, MA Q, et al. Esculetin inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(1): 139-144.

(收稿日期: 2019-08-22, 修回日期: 2019-10-07)

引用本文: 袁小笋, 张蕾, 马慧利, 等. 长链非编码RNA HULC在乳腺癌组织中表达及临床意义[J]. 安徽医药, 2022, 26(5): 982-985. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.05.031.

◇临床医学◇



长链非编码RNA HULC在乳腺癌组织中表达及临床意义

袁小笋¹, 张蕾¹, 马慧利¹, 薛永飞¹, 李长生¹, 张敬伟¹, 任中海¹, 张腾飞²

作者单位: ¹南阳市中心医院肿瘤内科二病区, 河南 南阳 473000;

²郑州市中心医院肿瘤科, 河南 郑州 450000

通信作者: 任中海, 男, 主任医师, 研究方向为肿瘤, Email: mengbei2010@126.com

基金项目: 河南省科技发展计划(142102310459)

摘要: 目的 探讨长链非编码RNA 肝癌高表达转录本(HULC)在乳腺癌组织中表达及临床意义。方法 选取2013年5月至2015年5月在南阳市中心医院乳腺科行手术治疗且资料完整的乳腺癌病人112例, 实时荧光定量PCR术检测乳腺癌和正常乳腺组织中HULC表达, 病人均于术后1 d开始随访, 随访截止日期2020年5月31日, 以死亡作为终点事件, 记录病人生存时间, 采用Kaplan-Meier法进行生存分析, 采用Cox比例风险回归模型分析影响乳腺癌病人预后的风险因素。结果 乳腺癌组织中HULC表达量为(2.27±0.18), 高于正常乳腺组织的(1.02±0.08), 差异有统计意义($t=67.38, P<0.001$); 不同组织学分级、TNM分期、淋巴结转移、ER和Ki-67的乳腺癌组织中HULC表达量差异有统计学意义($P<0.05$); 以乳腺癌组织中HULC表达量的 P_{25} 值为界值, 将病人分为低表达组($n=29$)和高表达组($n=83$), 低表达组病人生存时间(52.72±3.06)个月, 5年生存率为82.76%, 高表达组病人则分别为(35.51±2.25)个月和36.14%, 差异有统计学意义($\chi^2=15.16, P<0.001$); HULC表达是影响乳腺癌病人预后的独立风险因素[$HR=5.249(95\%CI: 1.965 \sim 14.024), P<0.05$]。结论 乳腺癌组织中HULC表达量升高, 可能发挥类似癌基因的作用而参与了乳腺癌进展, 且是影响病人预后的风险因素。

关键词: 乳腺肿瘤; 长链非编码RNA 肝癌高表达转录本; 临床病理指标; 预后; Cox比例风险回归模型

Expression and clinical significance of long non-coding RNA HULC in breast cancer

YUAN Xiaosun¹, ZHANG Lei¹, MA Huili¹, XUE Yongfei¹, LI Changsheng¹, ZHANG Jingwei¹, REN Zhonghai¹, ZHANG Tengfei²

Author Affiliations: ¹Department of Oncology Second Ward, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473000, China;

²Department of Oncology, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China