

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.004

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.004

MiR-146b 在白藜芦醇保护缺氧 / 复氧心肌细胞损伤中的作用及其机制

李琼, 王磊, 高波

(汉川市人民医院心血管II科, 湖北 汉川 431600)

[摘要] 目的: 探讨miR-146b在白藜芦醇保护缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)心肌细胞损伤中的作用及其机制。方法: 将体外培养的心肌细胞分为正常组、H/R组、白藜芦醇组、白藜芦醇+anti-miR-NC组和白藜芦醇+anti-miR-146b组。采用荧光定量PCR检测miR-146b的表达, ELISA法检测细胞上清液中IL-1 β , TNF- α 和IL-6含量, MTT法检测细胞存活率, 比色法检测LDH漏出率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 蛋白质印迹法检测Bcl-2, caspase-3, NF- κ B和TRAF6蛋白的表达, 双荧光素酶报告基因实验检测miR-146b和TRAF6的靶向关系。结果: 与正常组相比, H/R组细胞中miR-146b和Bcl-2蛋白的表达水平、细胞存活率显著降低, 而细胞上清液中IL-1 β , TNF- α , IL-6含量和LDH漏出率、细胞凋亡率以及caspase-3, NF- κ B蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$); 与H/R组相比, 白藜芦醇组中miR-146b和Bcl-2蛋白的表达水平、细胞存活率显著升高, 而IL-1 β , TNF- α , IL-6含量和LDH漏出率、细胞凋亡率以及caspase-3, NF- κ B蛋白的表达水平显著降低($P < 0.05$); 与白藜芦醇组相比, 白藜芦醇+anti-miR-146b组中miR-146b和Bcl-2蛋白的表达水平、细胞存活率显著降低, 而IL-1 β , TNF- α , IL-6含量和LDH漏出率, 细胞凋亡率以及caspase-3, NF- κ B蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$); 而白藜芦醇+anti-miR-NC组与白藜芦醇组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。双荧光素酶报告基因和蛋白质印迹法证实TRAF6是miR-146b靶基因, 且miR-146b可靶向调控其表达。结论: miR-146b抑制心肌细胞凋亡和炎症反应是白藜芦醇减轻H/R心肌细胞损伤的调控机制, 其作用原理可能与靶向调控TRAF6有关。

[关键词] 白藜芦醇; 心肌细胞; 缺氧/复氧; miR-146b; TRAF6

Role of miR-146b in resveratrol protecting hypoxic/reoxygenated cardiomyocytes from injury

LI Qiong, WANG Lei, GAO Bo

(Department of Cardiovascular II, People's Hospital of Hanchuan, Hanchuan Hubei 431600, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role and mechanism of miR-146b in resveratrol protecting hypoxic/reoxygenated cardiomyocytes from injury. **Methods:** The cultured cardiomyocytes were divided into a normal group, a H/R group, a resveratrol group, a resveratrol + anti-miR-NC group, and a resveratrol + anti-miR-146b group. The

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-04

通信作者 (Corresponding author): 高波, Email: 379759547@qq.com

expression of miR-146 b was detected by fluorescence quantitative PCR, the contents of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in cell supernatant were measured by ELISA, the cell survival rate was checked by MTT, the leakage rate of LDH was tested by colorimetry, the apoptotic rate was examined by flow cytometry, and the expression of Bcl-2, caspase-3, NF- κ B and TRAF6 proteins were detected by Western blot. Double luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting relationship between miR-146b and TRAF6. **Results:** Compared with the normal group, the expression levels of miR-146b and Bcl-2 protein, cell survival rate in the H/R group were significantly decreased, while the contents of IL-1 β , TNF- α , IL-6 in cell supernatant and LDH leakage rate, apoptosis rate and the expression levels of caspase-3 and NF- κ B proteins were significantly increased ($P < 0.05$); compared with the H/R group, the expression levels of miR-146b and Bcl-2 protein, cell survival in resveratrol group were significantly increased, while the contents of IL-1 β , TNF- α , IL-6 in cell supernatant and LDH leakage rate, apoptosis rate and the expression level of caspase-3 and NF- κ B proteins decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the resveratrol group, the expression level of miR-146b and Bcl-2 protein, cell survival rate in the resveratrol + anti-miR-146b group decreased significantly, while the contents of IL-1 β , TNF- α , IL-6 in cell supernatant and LDH leakage rate, apoptosis rate and the expression levels of caspase-3 and NF- κ B proteins were significantly increased ($P < 0.05$); however, there was no significant difference between the resveratrol+anti-miR-NC group and the resveratrol group ($P > 0.05$). Double luciferase reporter gene and Western blotting experiments confirmed that TRAF6 was a target gene of miR-146b, and miR-146b can target regulating its expression. **Conclusion:** MiR-146b inhibits apoptosis and inflammation in cardiomyocytes, which is the regulatory mechanism of resveratrol to alleviate H/R cardiomyocyte injury. Its mechanism may be related to the targeting regulation of TRAF6.

Keywords resveratrol; cardiac myocytes; hypoxia/reoxygenation; miR-146b; TRAF6

白藜芦醇是一种多酚化合物, 具有抗肿瘤、抗炎和抗氧化等广泛的生物学活性, 被证实可通过影响心肌细胞中微小RNAs(miRNAs)表达发挥保护心肌损伤的作用^[1-3]。miR-146b是miR-146家族成员, 可通过靶向调控相关靶基因的表达在细胞生长、凋亡和炎症反应等过程中发挥着重要作用^[4-6]。miR-146b在缺血/再灌注心肌组织中表达下调, 且上调其表达可改善心肌缺血/再灌注损伤^[7]。有研究^[8]指出: 白藜芦醇可通过上调miR-146b来保护小鼠软骨细胞免受脂多糖诱导的炎症损伤, 但miR-146b表达上调是否是白藜芦醇保护心脏缺血再灌注损伤的调控机制并不清楚。缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型是体外进行缺血再灌注损伤研究的常用细胞模型^[9-10], 本研究通过干扰H/R心肌细胞中miR-146b表达, 观察其对白藜芦醇抑制H/R心肌细胞凋亡和炎症反应的影响, 旨在阐明miR-146b在白藜芦醇保护H/R心肌细胞损伤中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠H9C2心肌细胞购自武汉博士德生物

工程有限公司; 白藜芦醇和MTT试剂购自美国Sigma公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司; DMEM培养基购自美国Gibco公司; LipofectamineTM 2000和TRIZOL试剂购自美国Invitrogen公司; miR-146b模拟物、miR-146b抑制剂及其相应对照购自广州市锐博生物科技有限公司; β -actin多克隆抗体、caspase-3多克隆抗体购自美国Proteintech公司; Bcl-2多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; NF- κ B多克隆抗体、HRP标记羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、反转录试剂盒和LDH测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司; ECL发光试剂盒购自美国Pierce公司; IL-1 β , TNF- α , IL-6的ELISA检测试剂盒购自上海纪宁生物科技有限公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司。

1.2 细胞培养、分组与转染

采用含10%DMEM培养基在5%CO₂和37℃的细胞培养箱中常规培养H9C2细胞。选取生长状况良好的对数生长期H9C2细胞进行实验。实验分

为正常组: 正常培养; H/R组: 构建H/R模型; 白藜芦醇组: 在H/R模型基础上给予75 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理, 其中白藜芦醇浓度的选取参照宋丽华等^[11]研究; 白藜芦醇+anti-miR-NC组: 转染inhibitor-NC 24 h后, 构建H/R模型并行白藜芦醇后处理; 白藜芦醇+anti-miR-146b组: 转染miR-146b抑制剂24 h后, 构建H/R模型并行白藜芦醇后处理。细胞转染: 将对数生长期的H9C2细胞以 10^5 个/孔密度种植于6孔板上, 于细胞培养箱中常规培养, 待细胞达80%融合度时, 参照转染试剂LipofectamineTM 2000说明书根据实验分组将培养基稀释后的LipofectamineTM 2000溶液与稀释后的miR-146b抑制剂或抑制剂阴性对照溶液混匀, 分别加入到细胞中进行瞬时转染。转染24 h后, 收集各组细胞, 运用荧光定量PCR测定miR-146b表达水平以评价其转染结果。

1.3 H/R 细胞模型的构建

将原培养液以5%CO₂-95%N₂混合气体平衡过的培养液进行置换后, 放于按照4 L/min流速通有5%CO₂-95%N₂混合气体的缺氧装置中处理4 h进行缺氧处理; 再用含血清的培养液替换培养液后, 放入含5%CO₂-95%O₂的培养箱中复氧培养4 h。

1.4 荧光定量 PCR 检测 miR-146b 的表达

采用TRIzol法提取H9C2细胞总RNA后, 微量核酸定量分析仪检测其浓度。参照反转录试剂盒说明书步骤将RNA进行反转录。取反转录产物2 μL , 用上海捷瑞生物合成的引物(终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$)按照如下PCR反应程序进行扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s(1个循环), 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s(40个循环)。以U6或 β -actin为内参, 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算H9C2细胞中miR-146b的表达水平。实验重复3次。

1.5 ELISA 法检测心肌细胞上清液中 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 水平

胰蛋白酶消化收集处理结束后的各组细胞, 取200 μL 上清液, 参照ELISA试剂盒的说明书步骤分别检测细胞上清液中IL-1 β , TNF- α 和IL-6含量。实验重复3次。

1.6 MTT 法检测存活率

将对数生长期的H9C2细胞种植于96孔细胞板上后, 按照1.2中的分组处理。待处理结束后,

加入MTT试剂10 μL 孵育4 h, 再加入二甲基亚砷震荡反应10 min。采用酶标仪在490 nm波长处检测细胞的光密度(OD)值, 并计算出细胞存活率, 计算公式: 存活率=(OD_{实验}-OD_{调零})/(OD_{对照}-OD_{调零}) \times 100%。实验重复3次。

1.7 比色法检测 LDH 漏出率

将对数生长期的细胞以适当密度接种至96孔细胞板上, 置细胞培养箱中培养过夜后, 按照1.2进行分组和处理。其中每组设置6个复孔。待处理结束后, 取细胞培养上清液, 参照LDH试剂盒说明书步骤以酶标仪在490 nm处OD值检测上清液中LDH水平。另取细胞悬液, 加入150 μL LDH释放工作液孵育1 h后, 收集上清液, 酶标仪检测H9C2细胞LDH水平, 并根据公式计算出各组中LDH漏出率, LDH漏出率=(OD_{培养液上清}-OD_{空白对照})/(OD_{培养液上清}-OD_{空白对照}+OD_{心肌细胞}-OD_{空白对照}) \times 100%。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡率

以胰蛋白酶消化收集处理结束后的各组H9C2细胞, 经磷酸缓冲液洗涤后, 以500 μL 的缓冲液悬浮细胞。根据试剂盒说明书步骤分别加入5 μL 双染凋亡试剂Annexin-V-FITC与PI后, 避光反应15 min。运用流式细胞仪在1 h内检测各组细胞的凋亡率。实验重复3次。

1.9 蛋白质印迹法检测 TRAF6, bcl-2, caspase-3 和 NF- κB 蛋白的表达

以RIPA裂解液冰上裂解H9C2细胞30 min以提取细胞总蛋白, 运用BCA法检测总蛋白浓度后, 按照1:4比例加入5 \times 上样缓冲液, 放入沸水浴中煮沸5 min使其变性。将蛋白样品行SDS-PAGE凝胶电泳进行分离后, 转膜。将含有目的蛋白PVDF膜浸于5%脱脂奶粉中封闭处理1 h。加入TRAF6(1:500), Bcl-2(1:1 000), caspase-3(1:1 000), NF- κB (1:500)和 β -actin(1:1 000)一抗工作液于4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应24 h, 再加入二抗(1:2 000)工作液, 于室温下反应1 h。滴加ECL发光剂避光条件下显影曝光后, 凝胶成像仪成像, Image J软件分析, 并以内参 β -actin对目的条带的灰度值进行校正。实验重复3次。

1.10 双荧光素酶报告基因实验

TargetScan, miRanda及miRBase三大数据库预

测到miR-146b与TRAF6的3'-UTR存在结合位点。为证实miR-146b与TRAF6是否存在靶向关系, 构建含TRAF6 3'-UTR序列结构(野生型TRAF6-WT)或定位突变的序列结构(突变型TRAF6-MUT)的荧光素酶报告载体, 并行miR-NC/anti-miR-NC+TRAF6-WT, miR-146b(miR-146b模拟物)/anti-miR-146b(miR-146b抑制剂)+TRAF6-WT, miR-NC/anti-miR-NC+TRAF6-MUT, miR-146b/anti-miR-146b+TRAF6-MUT共转染。待转染48 h后, 收集各组细胞, 参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书检测各组细胞的荧光素酶活性。实验重复3次。

1.11 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较使用单因素方差分析, 组间多重比较采用SNK-*q*, 两组间比较采用独立样本*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞中 miR-146b 表达水平的比较

与正常组相比, H/R组细胞中miR-146b的表达水平显著降低, 而TRAF6 mRNA和蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$); 与H/R组相比, 白藜芦醇组中miR-146b表达水平显著升高, 但TRAF6 mRNA和蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$); 与白藜芦醇组相比, 白藜芦醇+anti-miR-NC组中miR-146b和TRAF6的表达无显著差异($P > 0.05$), 但白藜芦醇+anti-miR-146b组中miR-146b表达水平较白藜芦醇组显著降低, 而TRAF6 mRNA和蛋白的表达水平较白藜芦醇组均显著升高($P < 0.05$, 表1)。

2.2 各组细胞上清液中 IL-1 β , TNF- α 和 IL-6 含量的比较

与正常组相比, H/R组细胞上清液中IL-1 β , TNF- α 和IL-6含量均显著升高($P < 0.05$); 与H/R组相比, 白藜芦醇组中IL-1 β , TNF- α 和IL-6含量均显著降低($P < 0.05$); 与白藜芦醇组相比, 白藜芦醇+anti-miR-146b组中IL-1 β , TNF- α 和IL-6含量均显著升高($P < 0.05$), 但白藜芦醇+anti-miR-NC组与白藜芦醇组相比差异无统计学意义($P > 0.05$, 表2)。

表1 各组细胞中miR-146b表达的比较

Table 1 Comparison of the expression of miR-146b in cells of each groups

组别	miR-146b
正常组	1.01 ± 0.05
H/R组	0.41 ± 0.03*
白藜芦醇组	0.90 ± 0.05 [#]
白藜芦醇+anti-miR-NC组	0.87 ± 0.06
白藜芦醇+anti-miR-146b组	0.48 ± 0.03 [§]
<i>F</i>	105.188
<i>P</i>	<0.001

与正常组相比, * $P < 0.05$; 与H/R组相比, [#] $P < 0.05$; 与白藜芦醇组相比, [§] $P < 0.05$ 。

Compared with the normal group, * $P < 0.05$; Compared with the H/R group, [#] $P < 0.05$; Compared with the resveratrol group, [§] $P < 0.05$.

2.3 各组细胞活力、LDH 漏出率和凋亡率的比较

与正常组相比, H/R组细胞的存活率显著降低, LDH漏出率和细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$); 与H/R组相比, 白藜芦醇组心肌细胞的存活率显著升高, LDH漏出率和细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$); 与白藜芦醇组相比, 白藜芦醇+anti-miR-146b组细胞的存活率显著降低, LDH漏出率和凋亡率显著升高($P < 0.05$); 但白藜芦醇+anti-miR-NC组与白藜芦醇组相比差异无统计学意义($P > 0.05$; 表3, 图1)。

2.4 各组细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2, caspase-3 和 NF- κ B 表达水平的比较

与正常组相比, H/R组细胞中Bcl-2蛋白表达水平显著降低, caspase-3和NF- κ B蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$); 与H/R组相比, 白藜芦醇组中Bcl-2表达水平显著升高, caspase-3和NF- κ B蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); 与白藜芦醇组相比, 白藜芦醇+anti-miR-146b组中bcl-2表达水平显著降低, caspase-3和NF- κ B蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$); 然而, 白藜芦醇+anti-miR-NC组与白藜芦醇组之间bcl-2, caspase-3和NF- κ B蛋白的表达差异无统计学意义($P > 0.05$; 表4, 图2)。

表2 各组细胞上清液中IL-1 β , TNF- α 和IL-6水平的比较Table 2 Comparison of IL-1 β , TNF- α and IL-6 levels in cell supernatants of each group

组别	IL-1 β /(ng·mL ⁻¹)	TNF- α /(ng·mL ⁻¹)	IL-6/(ng·mL ⁻¹)
正常组	57.22 ± 3.85	128.96 ± 11.52	22.36 ± 2.85
H/R组	186.76 ± 8.52*	628.55 ± 48.64*	95.65 ± 6.92*
白藜芦醇组	84.68 ± 3.45 [#]	287.76 ± 25.82 [#]	42.96 ± 2.75 [#]
白藜芦醇+anti-miR-NC组	82.85 ± 3.57	305.48 ± 28.91	41.05 ± 2.06
白藜芦醇+anti-miR-146b组	167.86 ± 7.05 ^{&}	558.87 ± 33.15 ^{&}	88.24 ± 5.13 ^{&}
F	306.730	125.616	163.959
P	<0.001	<0.001	<0.001

与正常组相比, * P <0.05; 与H/R组相比, [#] P <0.05; 与白藜芦醇组相比, [&] P <0.05。

Compared with the normal group, * P <0.05; Compared with the H/R group, [#] P <0.05; Compared with the resveratrol group, [&] P <0.05.

表3 各组细胞存活率、LDH漏出率和凋亡率的比较

Table 3 Comparison of cell survival rate, LDH leakage rate, and apoptotic rate in each group

组别	存活率/%	LDH漏出率/%	凋亡率/%
正常组	97.85 ± 5.12	4.85 ± 1.02	3.48 ± 0.16
H/R组	51.36 ± 3.05*	26.54 ± 3.25*	23.36 ± 2.05*
白藜芦醇组	81.28 ± 4.46 [#]	18.25 ± 1.45 [#]	15.23 ± 2.02 [#]
白藜芦醇+anti-miR-NC组	83.13 ± 4.08	18.76 ± 2.02	12.75 ± 1.55
白藜芦醇+anti-miR-146b组	57.45 ± 3.17 ^{&}	24.66 ± 3.15 ^{&}	19.98 ± 1.62 ^{&}
F	68.119	39.110	65.383
P	<0.001	<0.001	<0.001

与正常组相比, * P <0.05; 与H/R组相比, [#] P <0.05; 与白藜芦醇组相比, [&] P <0.05。

Compared with the normal group, * P <0.05; Compared with the H/R group, [#] P <0.05; Compared with the resveratrol group, [&] P <0.05.

2.5 miR-146b 和 TRAF6 靶向关系的验证

生物信息学软件预测结果(表5)显示: TRAF6 mRNA的3'-UTR含有能够与miR-146b结合的核苷酸序列。同时, 双荧光素酶报告基因实验结果(表6)显示: 与miR-NC组相比, 转染miR-146b模拟物能够降低携带有野生型TRAF6 3'-UTR质粒(即TRAF6-WT)的SKOV3细胞荧光素酶活性(P <0.05); 与anti-miR-NC组相比, 转染miR-146b

抑制剂能够明显升高携带有野生型TRAF6 3'-UTR质粒SKOV3细胞荧光素酶活性(P <0.05); 然而, miR-146b对携带有突变型TRAF6 3'-UTR质粒(即TRAF6-MUT)的SKOV3细胞荧光素酶活性无显著影响(P >0.05)。同时, 蛋白质印迹检测结果(表6, 图3)显示: 与相应对照相比, miR-146b抑制剂能促进TRAF6蛋白的表达, 而miR-146b模拟物能抑制TRAF6蛋白的表达(P <0.05)。

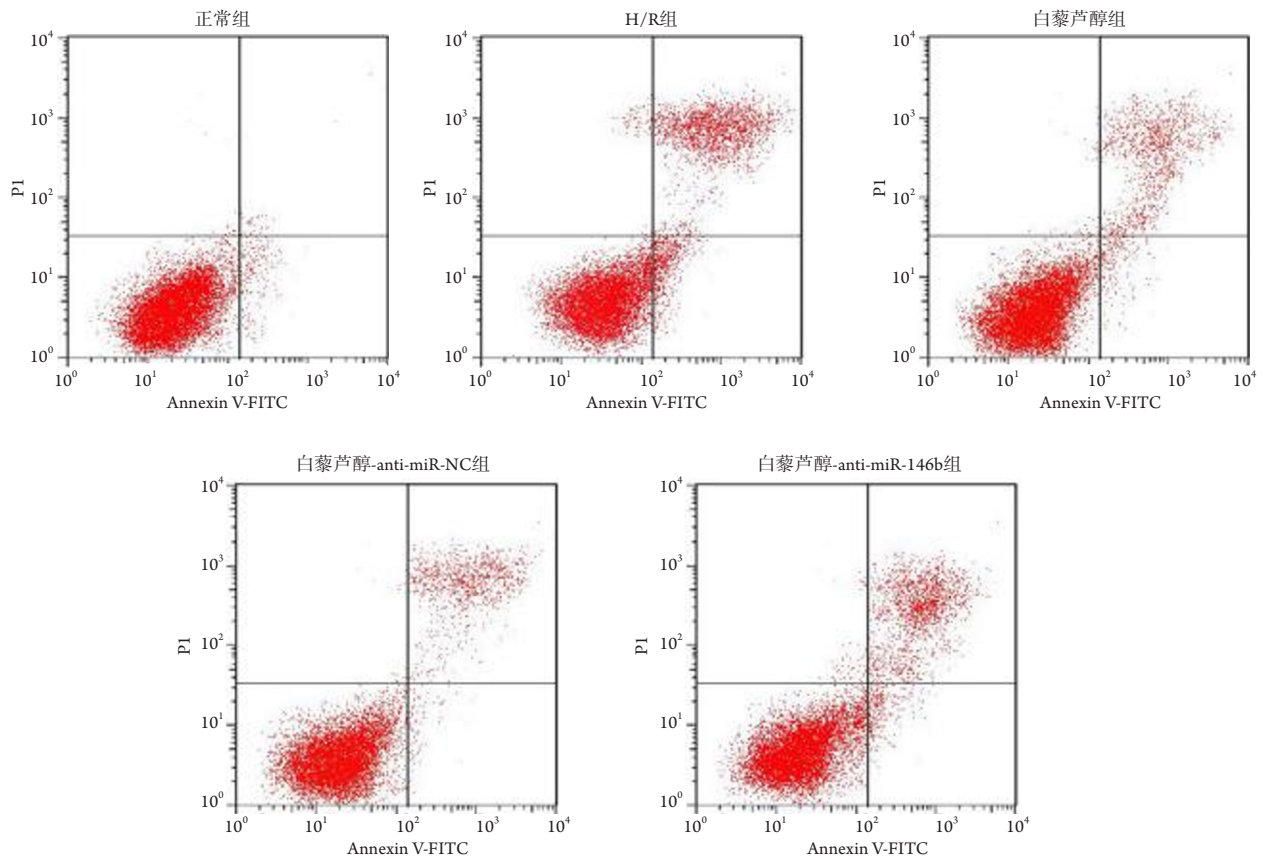


图1 流式细胞仪检测各组心肌细胞的凋亡情况

Figure 1 Apoptosis of myocardial cells in each group detected by flow cytometry

表4 各组细胞中caspase-3, bcl-2和NF-κB蛋白的表达

Table 4 Expression of caspase-3, bcl-2 and NF-κB protein in cells of each group

组别	Caspase-3	Bcl-2	NF-κB
正常组	0.13 ± 0.02	0.61 ± 0.04	0.15 ± 0.02
H/R组	0.76 ± 0.05*	0.17 ± 0.02*	0.44 ± 0.03*
白藜芦醇组	0.35 ± 0.03 [#]	0.39 ± 0.03 [#]	0.26 ± 0.03 [#]
白藜芦醇+anti-miR-NC组	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.22 ± 0.02
白藜芦醇+anti-miR-146b组	0.69 ± 0.05 [#]	0.15 ± 0.02 [§]	0.46 ± 0.03 [§]
<i>F</i>	128.298	126.143	80.914
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

与正常组相比, * $P < 0.05$; 与H/R组相比, [#] $P < 0.05$; 与白藜芦醇组相比, [§] $P < 0.05$ 。

Compared with the normal group, * $P < 0.05$; Compared with H/R group, [#] $P < 0.05$; Compared with resveratrol group, [§] $P < 0.05$.

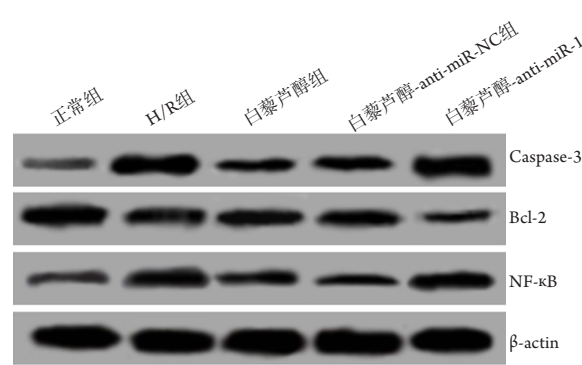


图2 蛋白质印迹法检测caspase-3, Bcl-2和NF-κB蛋白的表达

Figure 2 Expression of caspase-3, Bcl-2 and NF-κB protein detected by Western blot

表5 TRAF6 3'-UTR与miR-146b的结合位点

Table 5 Binding sites of TRAF6 3'-UTR to miR-146b

基因	互补的核苷酸序列	结合位点
TRAF6	5'...UGCUCUAGAAAGUUGAGUUCUCA...3'	473~480 of TRAF6 3'-UTR
miR-146b	3'...UCGGAUACCUUAAGUCAAGAGU.....5'	

表6 各组细胞荧光素酶活性和TRAF6蛋白表达水平的比较

Table 6 Comparison of luciferase activity and TRAF6 protein expression in cells of different groups

组别	荧光素酶活性		TRAF6蛋白
	TRAF6-WT	TRAF6-MUT	
miR-NC	1.00 ± 0.07	0.98 ± 0.06	0.41 ± 0.03
miR-146b	0.32 ± 0.02*	0.96 ± 0.05	0.12 ± 0.02*
Anti-miR-NC	1.02 ± 0.08	0.97 ± 0.06	0.43 ± 0.03
Anti-miR-146b	3.75 ± 0.13 [#]	0.98 ± 0.06	0.65 ± 0.04 [#]
F	969.689	0.083	149.342
P	<0.001	0.968	<0.001

与miR-NC组相比, * $P < 0.05$; 与anti-miR-NC, [#] $P < 0.05$ 。

Compared with the group of miR-NC, * $P < 0.05$; Compared with anti-microRNA-NC, [#] $P < 0.05$.



图3 蛋白质印迹法检测TRAF6蛋白的表达

Figure 3 Expression of TRAF6 protein detected by Western blot

3 讨论

心脏缺血再灌注损伤是制约经皮冠状动脉成形术、动脉搭桥术和药物溶栓等临床治疗效果的瓶颈,严重影响着缺血性心脏病患者的预后。因此,寻找有效改善心脏缺血再灌注损伤药物一直是研究的焦点。白藜芦醇是从植物中提取的天然成分,对预防心血管疾病具有较好的效果;其被

证实可通过抑制心肌细胞凋亡和改善炎症损伤等发挥保护心肌缺血再灌注损伤的作用^[12-13], 但其在该过程中的保护机制尚不明确。

越来越多的研究^[14-16]证实: 白藜芦醇可通过调控miRNAs表达影响细胞增殖、凋亡和炎症反应等发挥改善机体损伤的作用。MiR-146b是miRNAs中的重要一员, 与肿瘤和心血管疾病等多种疾病的发生发展密切相关。杨开雯等^[17]研究指出, 在糖尿病心肌炎中miR-146b表达异常降低, 可能通过调控IRAK1表达介导的炎症反应在心肌损伤中发挥着重要作用。Wang等^[18]研究指出, miR-146可保护肺癌A549和H1975细胞免受脂多糖诱导的凋亡和炎症损伤。同时, Di等^[7]研究证实: miR-146b过表达可降低梗死面积和心肌细胞凋亡, 改善心肌缺血再灌注损伤。可见, miR-146b在细胞凋亡和炎症反应中发挥着重要调控作用。Jin等^[8]研究指出白藜芦醇可通过上调miR-146b表达保护小鼠软骨前体ATDC5细胞免受脂多糖诱导的炎症损伤, 但miR-146b表达上调是否为白藜芦醇改善心肌缺血再灌注损伤的调控机制尚待研究证实。

为探讨miR-146b在白藜芦醇改善心肌缺血再灌注损伤中的作用, 本研究构建H/R细胞模型, 以75 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理后发现, H/R引起的炎症因子IL-1 β , TNF- α , IL-6含量, LDH释放量, 细胞凋亡率和caspase-3, NF- κB 蛋白表达水平升高以及细胞存活率和Bcl-2蛋白的表达降低这些现象均明显受到抑制。该结果与既往研究^[12-13]得出的白藜芦醇改善心肌缺血再灌注损伤的结果相吻合。通过转染miR-146b抑制剂成功下调miR-146b表达后发现, 白藜芦醇对H/R心肌细胞凋亡和炎症反应的抑制作用明显减弱或消除。这提示miR-146b在白藜芦醇抑制H/R心肌细胞凋亡和炎症损伤过程中发挥着积极作用。采用生物信息学软件进一步预测miR-146b的靶基因, 最后将TRAF6作为研究对象。TRAF6属于肿瘤坏死因子受体相关因子家族, 与白细胞介素-1受体/Toll样受体(IL-1 R/TLR)超家族相互作用传递包括凋亡信号在内的细胞外信号, 在细胞凋亡、炎症反应和免疫应答等过程中发挥着重要作用^[19]; 并被证实可通过介导炎症和凋亡信号通路参与心肌缺血再灌注损伤^[20-21]。本研究采用双荧光素酶报告基因实验和蛋白质印迹法检测证实TRAF6是miR-146b的靶基因。赵思嘉等^[22]发现miR-146b可通过靶向抑制TRAF6表达减轻自身免疫性心肌炎大鼠心脏炎症并改善其心功能。

Jiang等^[23]研究指出: miR-146b可通过抑制TRAF6表达改善肝缺血/再灌注损伤。结果提示miR-146b可能通过靶向抑制TRAF6表达在白藜芦醇改善H/R心肌细胞损伤过程中发挥积极作用。

综上所述, miR-146b抑制心肌细胞凋亡和炎症反应是白藜芦醇改善H/R心肌细胞损伤的调控机制, 而其作用机制可能与靶向调控TRAF6表达有关。

参考文献

1. 张莹, 沐晓芹, 梁海海, 等. 白藜芦醇对H₂O₂所致乳鼠心肌细胞损伤的保护机制研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2013, 47(1): 43-45. ZHANG Ying, MU Xiaoqin, LIANG Haihai, et al. Study on the protective mechanism of resveratrol on myocardial cell injury induced by hydrogen peroxide in suckling mice[J]. Journal of Harbin Medical University, 2013, 47(1): 43-45.
2. Yang B, Ma S, Wang YB, et al. Resveratrol exerts protective effects on anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes via miR-34a/Sirt1 signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(12): 2734-2741.
3. 塔方欣, 张涛, 祝春梅. 白藜芦醇保护缺血再灌注大鼠心肌作用与miR-21的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(6): 493-496. TA fangxin, ZHANG Tao, ZHU Chunmei. Resveratrol protects myocardium from ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Chinese Journal of Atherosclerosis, 2013, 21(6): 493-496.
4. Hu Q, Song J, Ding B, et al. miR-146a promotes cervical cancer cell viability via targeting IRAK1 and TRAF6[J]. Oncol Rep, 2018, 39(6): 3015-3024.
5. Li T, Li M, Xu C, et al. miR-146a regulates the function of Th17 cell differentiation to modulate cervical cancer cell growth and apoptosis through NF- κB signaling by targeting TRAF6[J]. Oncol Rep, 2019, 41(5): 2897-2908.
6. Jiang S, Hu Y, Deng S, et al. miR-146a regulates inflammatory cytokine production in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated B cells by targeting IRAK1 but not TRAF6[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(3): 925-933.
7. Di YF, Li DC, Shen YQ, et al. MiR-146b protects cardiomyocytes injury in myocardial ischemia/reperfusion by targeting Smad4[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(2): 656-663.
8. Jin H, Zhang H, Ma T, et al. Resveratrol protects murine chondrogenic ATDC5 cells against LPS-induced inflammatory injury through up-regulating miR-146b[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(3): 972-980.
9. 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.
10. Ren Z, Xiao W, Zeng Y, et al. Fibroblast growth factor-21 alleviates hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiomyocytes by promoting autophagic flux[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(3): 1321-1330.
 11. 宋丽华, 张晓一, 来丽娜, 等. PKC/HSP70通路介导白藜芦醇对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(16): 1585-1589.
SONG Lihua, ZHANG Xiaoyi, LAI Lina, et al. Protective effects of resveratrol on cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury through a PKC/HSP70 pathway[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2017, 37(16): 1585-1589.
 12. Cheng L, Jin Z, Zhao R, et al. Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress induced by myocardial ischemia-reperfusion injury: role of Nrf2/ARE pathway[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7): 10420-10428.
 13. 蔡银链, 许朝祥, 王耀国. 白藜芦醇通过抑制TNF- α 的释放缓解大鼠缺血再灌注心脏损伤[J]. *免疫学杂志*, 2018, 34(11): 20-25.
CAI Yinlian, XU Chaoxiang, WANG Yaoguo. Resveratrol alleviates ischemia-reperfusion heart injury in rats by inhibiting the release of TNF- α [J]. *Journal of Immunology*, 2018, 34(11): 20-25.
 14. Alghetaa H, Mohammed A, Sultan M, et al. Resveratrol protects mice against SEB-induced acute lung injury and mortality by miR-193a modulation that targets TGF- β signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(5): 2644-2655.
 15. Bian H, Shan H, Chen T. Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced brain injury in the neonatal rat via the miR-96/Bax axis[J]. *Childs Nerv Syst*, 2017, 33(11): 1937-1945.
 16. Wang X, Zhang Y. Resveratrol alleviates LPS-induced injury in human keratinocyte cell line HaCaT by up-regulation of miR-17[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(1): 106-112.
 17. 杨开雯, 强郑, 靳贝芳, 等. MicroRNA-146在糖尿病心肌病中的调控作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(11): 35-40.
YANG Kaiwen, QIANG Zheng, JIN Beifang, et al. Regulation of microRNA-146 in diabetic cardiomyopathy[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2018, 34(11): 35-40.
 18. Wang Q, Li D, Han Y, et al. MicroRNA-146 protects A549 and H1975 cells from LPS-induced apoptosis and inflammation injury[J]. *J Biosci*, 2017, 42(4): 637-645.
 19. 张亚琳, 芮元祎, 李园, 等. 肿瘤坏死因子受体相关因子6与凋亡关系的研究进展[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2013, 20(6): 680-684.
ZHANG Yalin, RUI Yuanzhen, LI Yuan, et al. Advances in the relationship between tumor necrosis factor receptor-related factor 6 and apoptosis[J]. *Chinese Journal of Basic and Clinical Sciences*, 2013, 20(6): 680-684.
 20. Wang X, Ha T, Liu L, et al. Increased expression of microRNA-146a decreases myocardial ischaemia/reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 97(3): 432-442.
 21. Wang X, Ha T, Zou J, et al. MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(3): 385-395.
 22. 赵思嘉, 许蔚起, 刘娜, 等. MiR-146a通过抑制TRAF6减轻自身免疫性心肌炎大鼠心脏炎症并改善其心功能[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2015, 15(1): 1202-1205.
ZHAO Sijia, XU Weiqi, LIU Na, et al. MiR-146a alleviates cardiac inflammation and improves cardiac function in rats with autoimmune myocarditis by inhibiting TRAF6[J]. *Chinese Journal of Molecular Cardiology*, 2015, 15(1): 1202-1205.
 23. Jiang W, Kong L, Ni Q, et al. miR-146a ameliorates liver ischemia/reperfusion injury by suppressing IRAK1 and TRAF6[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101530.

本文引用: 李琼, 王磊, 高波. MiR-146b在白藜芦醇保护缺氧/复氧心肌细胞损伤中的作用及其机制[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(3): 556-564. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.004

Cite this article as: Cite this article as: LI Qiong, WANG Lei, GAO Bo. Role of miR-146b in resveratrol protecting hypoxic/reoxygenated cardiomyocytes from injury[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(3): 556-564. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.004