

• 基础研究 •

微小RNA-27a通过Nrf2对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响

徐桂萍 陈哲 王晓丽 古文玉

【摘要】 目的 探讨微小RNA(miRNA)-27a通过核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。**方法** 40只清洁级健康SD雄性大鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham组)、心肌缺血再灌注组(I/R组)、AAV9-miR-27a过表达+心肌缺血再灌注组(AAV组)、miR-27a antagonist+心肌缺血再灌注组(AG组)。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支30 min,再灌注120 min的方法制备心肌缺血再灌注损伤模型,Sham组穿线后不结扎冠状动脉。腹主动脉取血,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定血清心肌肌钙蛋白T(cTn-T)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)水平。取心肌缺血再灌注区域心肌组织行3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色并计算心肌梗死面积,生化法测定心肌组织谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平,采用实时定量聚合酶链反应测定心肌组织miR-27a表达,Western blot法测定缺血心肌组织Nrf2的蛋白表达水平。**结果** 与Sham组比较,I/R组血清cTnT、CK-MB和LDH水平及心肌梗死面积升高,心肌组织GSH、SOD水平降低,MDA水平升高,miR-27a表达水平升高,Nrf2的蛋白表达水平下降(P 均 <0.05);与I/R组比较,AAV组血清cTnT、CK-MB和LDH水平及心肌梗死面积升高,心肌组织GSH、SOD水平降低,MDA水平升高,miR-27a表达水平升高,Nrf2的蛋白表达水平下降(P 均 <0.05);与AAV组比较,AG组血清cTnT、CK-MB和LDH水平及心肌梗死面积降低,心肌组织GSH、SOD的水平升高,MDA水平降低,miR-27a表达水平降低,Nrf2的蛋白表达水平升高(P 均 <0.05)。**结论** miR-27a可能通过抑制Nrf2加重大鼠心肌缺血再灌注损伤。

【关键词】 心肌缺血再灌注损伤;微小核糖核酸-27a;核转录因子红系2相关因子2

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.05.010

Effect of miR-27a on myocardial ischemia-reperfusion injury via Nrf2 in rats XU Guiping¹, CHEN Zhe², WANG Xiaoli¹, GU Wenyu³. 1. Department of Anesthesiology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang Clinical Research Center for Anesthesia Management, Urumqi 830001; 2. Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 3. Graduate School of Shihezi University, Shihezi 832099, China

【Abstract】 Objective To assess the effect of miR-27a via nuclear transcription factor red lineage 2-related factor 2 (Nrf2) on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats. **Methods** Forty clean-grade healthy SD male rats (2-3 months old, weighing 220-280 g) were divided into 4 groups ($n=10$ in each group) according to the random number table method: sham-operated group (Sham group), myocardial I/R group (I/R group), AAV9-miR-27a overexpression group (AAV group), and miR-27a inhibitor group (AG group). The myocardial I/R model was established by ligating anterior descending coronary artery for 30 min followed by reperfusion for 120 min. Then, blood was collected from the abdominal aorta, and serum cardiac

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2022D01C612)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院麻醉科,新疆麻醉管理临床医学研究中心(徐桂萍,王晓丽);830054 乌鲁木齐,新疆医科大学研究生学院(陈哲);832099 石河子大学研究生学院(古文玉)

通信作者:徐桂萍, E-mail: xgpsy1@126.com

troponin T (cTn-T), CK-MB and lactate dehydrogenase (LDH) levels were measured by ELISA. Myocardial infarct area was evaluated by TTC technique, and levels of glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and propylene glycol (MDA) in the myocardial I/R tissue were determined by biochemical methods. The expression of miR-27a in myocardial tissue was assessed by qRT-PCR and the expression of Nrf2 was assessed by western blotting. **Results** Compared with Sham group, serum cTn-T, CK-MB and LDH levels, infarct area, myocardial MDA levels, and miR-27a expression were increased, but GSH and SOD level was decreased, and Nrf2 expression was down-regulated in I/R group ($P<0.05$). These changes were significantly aggravated in AAV group (all $P<0.05$ versus the values in I/R group), but were greatly alleviated in AG group (all $P<0.05$ versus the values in AAV group). **Conclusion** This study suggests that miR-27a may aggravate myocardial I/R injury in rats through the inhibition of Nrf2.

【Key words】 Myocardial ischemia-reperfusion injury; MicroRNA-27a; Nuclear transcription factor red lineage 2-related factor 2

心肌缺血患者的临床治疗通常首选再灌注治疗,然而缺血心肌再灌注往往会引起由氧化应激、炎症反应等造成的心肌细胞凋亡和坏死,即心肌缺血再灌注损伤(MIRI)^[1],严重影响临床治疗效果及患者预后。

微小RNA(miRNA)是长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子,参与转录后基因表达调控。研究表明,miRNA广泛参与调节与MIRI有关的心脏疾病的分子通路^[2-3],在MIRI的发生发展过程中起重要作用。miR-27a在缺血再灌注(I/R)心肌中显著上调^[4]。miR-27a过表达还可导致细胞活力降低、乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶同工酶(CK-MB)分泌增加以及细胞凋亡率增加^[5]。目前对miR-27a调控的下游靶基因研究较少。

核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)为氧化还原感应转录因子,参与细胞防御的调节,介导细胞修复或再生,具有抗炎、抗凋亡的作用^[6]。研究表明,Nrf2在减轻MIRI中起重要作用^[7],其活性受miRNA调节^[8]。Narasimhan等^[9]研究表明,miR-144、miR-153、miR27a和miR142-5p可通过结合Nrf2的3'非翻译区(3'-UTR)抑制内源性Nrf2的mRNA表达水平,继而影响Nrf2激活,诱发各种疾病。生物信息学分析软件示miR-27a可特异地与Nrf2的3'-UTR结合,本研究探讨miR-27a通过Nrf2对大鼠MIRI的影响。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

AAV9-miR-27a腺相关病毒购于上海汉恒生物科技有限公司。miR-27a antagomir购于上海诚鑫生物科技有限公司,大鼠心肌肌钙蛋白T(cTn-T)、

CK-MB、LDH酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购于中国Elabscience公司。谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒购于中国Elabscience公司。抗Nrf2抗体购于美国Affinity公司。

1.2 实验动物及分组

40只2~3月龄雄性成年清洁级SD大鼠购于新疆医科大学动物实验中心,体质量220~280g,许可证编号:SCXK(新)2018-0003。采用随机数字表法将大鼠分为4组(每组10只):假手术组(Sham组)、I/R组、AAV9-miR-27a过表达+心肌缺血再灌注组(AAV组)、miR-27a antagomir+心肌缺血再灌注组(AG组)。AAV组于缺血前14d,尾静脉单次注射AAV9-miR-27a腺相关病毒(2×10^{11} v.g./只大鼠),Sham组、I/R组、AG组尾静脉单次注射与腺相关病毒同等容积的生理盐水。AG组于缺血前3d,连续尾静脉注射miR-27a antagomir(2~10 mg/kg),Sham组、I/R组、AAV组连续尾静脉注射与miR-27a antagomir同等容积的生理盐水。

1.3 MIRI动物模型的制备

术前禁食禁水8h,腹腔注射10%水合氯醛溶液0.33 mL/100g进行麻醉,左侧胸部脱毛,气管插管后,连接小动物呼吸机维持呼吸。将大鼠仰卧,四肢固定于循环加热手术台上,连接心电图。随后消毒皮肤,在胸骨左侧第3、4肋间切开皮肤,逐层钝性分离,充分暴露心脏。经心肌表面于心耳下缘1mm处用6-0缝合针结扎左冠状动脉前降支。心电图ST段抬高提示心肌缺血。缺血30min后,松开结扎线,观察到左心室恢复红润,心电图ST段抬高部分回落,提示再灌注成功,再灌注时间共为

120 min。Sham 组穿线后不结扎冠状动脉。

1.4 心肌梗死面积测定

再灌注 120 min 后,每组随机取 5 只大鼠,立即处死并取出心脏,冲洗后 -20 °C 冰箱保存 120 min,沿心脏长轴方向将心肌切成厚度约 2 mm 的薄片,2,3,5- 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色后,37 °C 避光孵育 15 min,中性甲醛固定 15 min。染色后,心肌梗死区呈灰白色,缺血区呈红色,非缺血区呈蓝色。采用 ImageJ 图像软件分析,心肌梗死面积百分比=心肌梗死区面积÷缺血区面积×100%^[10]。

1.5 血清cTnT、CK-MB和LDH水平测定

再灌注 120 min 后,随机取 5 只大鼠,经腹主动脉穿刺取血,4 °C、3 500 转/min 离心 15 min,离心半径 5 cm,离心后取上清液。采用 ELISA 法测定血清 cTnT、CK-MB 和 LDH 水平。

1.6 心肌组织GSH、SOD和MDA水平测定

穿刺取血后,取大鼠心肌缺血再灌注组织 120 mg,离心后取上清液。采用 ELISA 法测定 GSH、SOD 和 MDA 水平。

1.7 缺血心肌组织miR-27a表达水平测定

穿刺取血后,取大鼠心肌缺血再灌注组织 100 mg,加入 1 mL Trizol 溶液提取组织中的总 RNA。将 RNA 逆转录为 cDNA,采用实时定量聚合酶链反应法进行扩增,以 U6 作为内参。miR-27a 上游引物:5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3';下游引物:5'-AGGAACCCCTAGTGATG-3'。扩增反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,60 °C 30 s,40 个循环。

使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算 miR-27a 的相对表达水平。

1.8 Western blot法测定心肌组织Nrf2的表达

取少量左心室组织,提取总蛋白,进行蛋白浓度测定。取 60 μg 总蛋白进行电泳、转膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h。加入抗 Nrf2 抗体 (1 : 1 000, 美国 Affinity 公司),4 °C 孵育过夜。洗涤后加入二抗 (稀释 1 : 10 000, 美国 Santa Cruz 公司),室温孵育 2 h。ECL 显影,用 ImageJ 软件测定条带灰度值。目的蛋白的相对表达水平为目的蛋白与内参 GAPDH 条带灰度值的比值。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析。计量资料采用均数 ± 标准差表示,多组间比较使用单因素方差分析,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组大鼠心肌梗死面积及血清cTnT、CK-MB和LDH水平比较

与 Sham 组比较,I/R 组心肌梗死面积百分比及血清 cTnT、CK-MB 和 LDH 水平均升高 (P 均 < 0.05);与 I/R 组比较,AAV 组心肌梗死面积百分比及血清 cTnT、CK-MB 和 LDH 水平均升高 (P 均 < 0.05);与 AAV 组比较,AG 组心肌梗死面积百分比及血清 cTnT、CK-MB 和 LDH 水平均降低 (P 均 < 0.05)。见表 1。

表1 4组大鼠心肌梗死面积及血清cTnT、CK-MB和LDH水平比较 ($n=5$)

组别	心肌梗死面积百分比/%	血清cTnT/ng · L ⁻¹	血清CK-MB/ng · L ⁻¹	血清LDH/U · L ⁻¹
Sham组	0	105.77 ± 16.57	228.00 ± 35.62	2 662.46 ± 364.70
I/R组	28.18 ± 1.98 ⁽¹⁾	345.24 ± 13.34 ⁽¹⁾	500.39 ± 15.81 ⁽¹⁾	4 696.02 ± 366.59 ⁽¹⁾
AAV组	37.10 ± 2.76 ⁽²⁾	462.15 ± 32.90 ⁽²⁾	715.59 ± 24.29 ⁽²⁾	8 835.86 ± 906.26 ⁽²⁾
AG组	21.40 ± 2.89 ⁽³⁾	233.68 ± 17.32 ⁽³⁾	394.20 ± 23.52 ⁽³⁾	3 789.24 ± 448.88 ⁽³⁾
<i>F</i>	206.561	181.42	323.48	120.47
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.001

注:与Sham组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与I/R组比较,⁽²⁾ $P < 0.05$;与AAV组比较,⁽³⁾ $P < 0.05$

2.2 4组心肌组织GSH、SOD和MDA水平比较

与 Sham 组比较,I/R 组心肌组织 GSH、SOD 水平降低,MDA 水平升高 (P 均 < 0.05);与 I/R 组比较,AAV 组心肌组织 GSH、SOD 水平降低,MDA 水平升高 (P 均 < 0.05);与 AAV 组比较,AG 组心肌组织 GSH、SOD 水平升高,MDA 水平

降低 (P 均 < 0.05)。见表 2。

2.3 4组大鼠心肌组织中miR-27a及Nrf2表达水平比较

与 Sham 组 (0.70 ± 0.57) 比较,I/R 组 miR-27a 表达水平 (1.28 ± 0.43) 升高;与 I/R 组比较,AAV 组 miR-27a 表达水平 (1.57 ± 0.27) 升高;与

AAV 组比较, AG 组 miR-27a 表达水平(1.01 ± 0.37)降低(P 均 <0.05)。

与 Sham 组比较, I/R 组 Nrf2 的蛋白表达水平

明显降低; 与 I/R 组比较, AAV 组 Nrf2 的蛋白表达水平明显降低; 与 AAV 组比, AG 组 Nrf2 的蛋白表达水平明显升高(P 均 <0.05)。见图 1。

表2 4组大鼠心肌组织GSH、SOD和MDA水平比较($n=5$)

组别	GSH/mg · g ⁻¹	SOD/U · mg ⁻¹	MDA/μmol · g ⁻¹
Sham组	5.91 ± 0.47	299.03 ± 23.32	4.25 ± 0.20
I/R组	4.96 ± 0.21 ⁽¹⁾	178.01 ± 28.03 ⁽¹⁾	6.48 ± 0.19 ⁽¹⁾
AAV组	2.73 ± 0.28 ⁽²⁾	91.26 ± 14.66 ⁽²⁾	8.73 ± 0.32 ⁽²⁾
AG组	4.30 ± 0.51 ⁽³⁾	237.30 ± 21.53 ⁽³⁾	5.44 ± 0.15 ⁽³⁾
<i>F</i>	53.41	64.18	317.98
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与Sham组比较, ⁽¹⁾ $P<0.05$; 与I/R组比较, ⁽²⁾ $P<0.05$; 与AAV组比较, ⁽³⁾ $P<0.05$

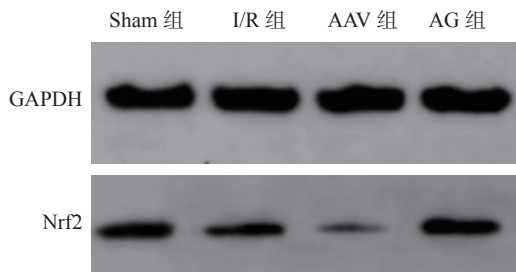


图1 4组大鼠心肌组织Nrf2的蛋白表达情况

3 讨论

心肌缺血后, 心肌组织血液供应减少或中断, 恢复缺血梗死区血供是治疗缺血性心肌病的主要手段。然而心肌血流恢复可能加重心肌细胞的损伤, 引起心肌细胞氧化应激加重和细胞凋亡, 导致心力衰竭^[11]。Liu 等^[12]研究发现, 在 I/R 小鼠的心肌中 miR-27a 的表达明显增加, 且下调 miR-27a 抑制了胸段硬膜外高位阻滞对小鼠 MIRI 的保护作用。Bao 等^[13]的研究表明, miR-27a 通过靶向三磷酸腺苷酶家族蛋白 3A (ATAD3A), 调节细胞凋亡诱导因子 (AIF) 从线粒体到细胞核的转运, 从而促进 MIRI。Lin 等^[14]研究发现, miR-27 和 miR-195 在缺氧诱导的心肌细胞中表达上调, 可抑制部分转录因子的表达, 而抑制 miR-27 和 miR-195 可部分逆转这些转录因子的表达。上述研究均表明, miR-27a 在 MIRI 过程中发挥着重要作用。

Liu 等^[15]研究发现, 当沉默 Nrf2 基因时, 缺氧对 miR-27a 的抑制作用被逆转。Wang 等^[16]通过小鼠六价铬 [Cr(VI)] 模型, 证实 Nrf2 是 miR-27a/b 的直接靶标, 抑制 miR-27a/b 使小鼠在 Cr(VI) 暴露的早期和晚期出现 Nrf2 上调。Teimouri 等^[17]研究

表明, miR-27a 的过表达可抑制 Nrf2 及其下游抗氧化基因的表达并增加活性氧的产生, 而抑制 miR-27a 的表达逆转了这些作用。因此, Nrf2 可能是 miR-27a 潜在的下游靶点。

本研究结果表明, MIRI 大鼠心肌组织中 miR-27a 的表达水平显著增高, 通过感染 miR-27a 腺相关病毒使 miR-27a 过表达, 大鼠心肌梗死面积及血清 cTn-T、CK-MB 和 LDH 水平增加, 心肌组织 GSH、SOD 水平降低, MDA 水平增加, 表明缺血心肌损伤加重, 氧化应激水平增强。而抑制 miR-27a 的表达则可显著改善心肌损伤及氧化应激水平, 提示 miR-27a 加重大鼠 MIRI。为探究 miR-27a 加重大鼠 MIRI 的分子机制, 即 miR-27a 潜在的下游靶点, 本研究通过 Western blot 检测相关蛋白, 发现过表达 miR-27a 可抑制 Nrf2 的表达, 这与我们在 Targetscan 软件中预测 miR-27a 可特异性与 Nrf2 的 3'-UTR 结合、抑制 Nrf2 表达一致。

以上研究表明, miR-27a 可能通过抑制 Nrf2 表达, 增强心肌细胞氧化应激损伤, 从而加重 MIRI。

参 考 文 献

- [1] Huang C, Zhou S, Chen C, et al. Biodegradable redox-responsive AIEgen-based-covalent organic framework nanocarriers for long-term treatment of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Small, 2022, 18(47):e2205062.
- [2] Major JL, Bagchi RA, Pires da Silva J. Application of microRNA database mining in biomarker discovery and identification of therapeutic targets for complex disease[J]. Methods Protoc, 2020, 4(1):5.
- [3] Bian B, Yu XF, Wang GQ, et al. Role of miRNA-1 in regulating connexin 43 in ischemia-reperfusion heart injury: a rat model[J]. Cardiovasc Pathol, 2017, 27:37-42.
- [4] Zhang J, Qiu W, Ma J, et al. MiR-27a-5p attenuates hypoxia-

- induced rat cardiomyocyte injury by inhibiting Atg7[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10):2418.
- [5] Zhuang YS, Liao YY, Liu BY, et al. MicroRNA-27a mediates the Wnt/ β -catenin pathway to affect the myocardial fibrosis in rats with chronic heart failure[J]. *Cardiovasc Ther*, 2018, 20:e12468.
- [6] Wang H, Yang G, Tian Y, et al. Sulforaphane inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte apoptosis by acetylation modification of Nrf2[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(16):6740-6755.
- [7] Xu G, Ma Y, Jin J, et al. Activation of AMPK/p38/Nrf2 is involved in resveratrol alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats as an endogenous antioxidant stress feedback[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(16):890.
- [8] Zhang C, Shu L, Kong AN. MicroRNAs: new players in cancer prevention targeting Nrf2, oxidative stress and inflammatory pathways[J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2015, 1(1):21-30.
- [9] Narasimhan M, Patel D, Vedpathak D, et al. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51111.
- [10] Wu Y, Liu H, Wang X. Cardioprotection of pharmacological postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2021, 264:118628.
- [11] Jiang Q, Dong X, Hu D, et al. Aquaporin 4 inhibition alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by restraining cardiomyocyte pyroptosis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):9021-9030.
- [12] Liu JY, Shang J, Mu XD, et al. Protective effect of down-regulated microRNA-27a mediating high thoracic epidural block on myocardial ischemia-reperfusion injury in mice through regulating ABCA1 and NF- κ B signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112:108606.
- [13] Bao Y, Qiao Y, Yu H, et al. MiRNA-27a transcription activated by c-Fos regulates myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting ATAD3a[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:2514947.
- [14] Lin J, Maimaitiyiming A, Chen S, et al. Hypoxia-induced miR-27 and miR-195 regulate ATP consumption, viability, and metabolism of rat cardiomyocytes by targeting PPAR γ and FASN expression[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(7):10158-10174.
- [15] Liu C, Deng J, Wang S, et al. Hypoxia promotes epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via regulating the NRF2/miR 27a/BUB1 pathway[J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(2):510-522.
- [16] Wang L, Bayanbold K, Zhao L, et al. Redox sensitive miR-27a/b/Nrf2 signaling in Cr(VI)-induced carcinogenesis[J]. *Sci Total Environ*, 2022, 809:151118.
- [17] Teimouri M, Hosseini H, Shabani M, et al. Inhibiting miR-27a and miR-142-5p attenuate nonalcoholic fatty liver disease by regulating Nrf2 signaling pathway[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(3):361-372.
- (收稿:2022-11-29 修回:2023-08-07)
(本文编辑:胡晓静)