

灯盏花素通过上调 miR-140 表达对心肌缺血再灌注损伤发挥保护作用

王娓娓¹, 张红苗¹, 王琳¹, 鲍天昊^{1,2*}

¹昆明医科大学第二附属医院; ²云南省精神病医院, 昆明 650101

摘要: 建立小鼠心肌缺血-再灌注损伤模型, 观察灯盏花素对心肌梗死面积, 凋亡因子 caspase3 及 miR-140 表达变化影响。体外建立细胞缺血-再灌注损伤细胞模型, MTT 测定小鼠心肌细胞细胞活性, 通过抑制与过表达 miR-140, 观察灯盏花素对 caspase3 及其上游分子 TLR4、NF- κ B 表达的影响。研究发现灯盏花素在体内能减小心肌梗死面积, 降低 caspase3 mRNA 表达, 增加 miR-140 表达。在体外, 抑制 miR-140 表达能抵消灯盏花素的抗凋亡作用, 使 caspase3 mRNA 及 TLR4、NF- κ B 蛋白表达增加; 过表达 miR-140 使 caspase3 mRNA 及 TLR4、NF- κ B 蛋白表达减少。因此, 我们认为灯盏花素可能是通过上调 miR-140 表达抑制缺血-再灌注损伤引起的心肌细胞凋亡。

关键词: 灯盏花素; 心肌缺血再灌注损伤; caspase3; miR-140

中图分类号: R54

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.021

Scutellarin Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Upregulating miR-140 Expression

WANG Wei-wei¹, ZHANG Hong-miao¹, WANG Lin¹, BAO Tian-hao^{1,2*}

¹The second affiliated hospital of Kunming medical university; ²Psychiatric hospital of Yunnan province, Kunming 650101, China

Abstract: In mice MIR model, the myocardial infarct size, levels of caspase3 mRNA and miR-140 were measured after scutellarin treatment. In cardiomyocytes MIR model, cell viability were assayed by MTT, the effects of scutellarin on caspase3 mRNA and protein expression of TLR4 and NF- κ B were observed when miR-140 was inhibited or overexpression. The results showed that scutellarin can decrease the area of myocardial infarction, decrease the expression of caspase3 mRNA and increase the expression of miR-140 *in vivo*. *In vitro*, inhibition of miR-140 expression can counteract the anti-apoptotic effect of scutellarin, and increase the expressions of caspase3 mRNA, TLR4 and NF- κ B. Overexpression of miR-140 reduced the expressions of caspase3 mRNA and TLR4 and NF- κ B, which had a similar role to scutellarin. In conclusion, scutellarin can inhibit the apoptosis of myocardial cells induced by ischemia-reperfusion injury by upregulating miR-140 expression.

Key words: scutellarin; myocardial ischemia-reperfusion injury; caspase3; miR-140

缺血性心脏疾病被视为“人类健康第一杀手”。近年来尽管溶栓疗法、心脏介入手术及药物治疗等方法在缺血性心脏病治疗中取得迅猛发展, 有效地挽救了患者濒临死亡的心肌, 降低了心梗面积, 改善了患者的预后, 但再灌注后缺血心肌的功能障碍和结构损伤不能立即恢复反而进一步加重, 该现象被称为心肌缺血-再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIR)^[1], 心肌的缺血-再灌注损伤

是缺血性心脏疾病血运重建后的主要病理生理特征, 目前缺少有一种可以防止 MIR 损伤的有效治疗方法。

灯盏花素是从灯盏花中提取的一种黄酮类活性成分, 又称野黄芩苷 (scutellarin, SCU)。由于灯盏花素可以通过对抗凋亡对不同性质心脑血管损伤发挥保护作用^[2], 使得其在临床上得到广泛运用。虽然灯盏花素可通过抑制细胞凋亡来改善有害刺激导致的心脏损害, 但具体作用机制尚未完全清楚。本研究力图揭示灯盏花素对缺血-再灌注损伤心肌发挥保护作用的部分机制, 为心脏 MIR 损伤治疗策略的制

定提供理论依据。

1 实验材料

C57 小鼠, 购买于昆明医科大学实验动物中心, 合格证号: SCXK(滇)-2011004。小鼠心肌细胞(CSC 细胞)购买于上海抚生实业有限公司。Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)高糖培养基, DMEM 培养基, 青/链霉素(P/S), L-谷氨酰胺的衍生物(Glut MAX), 0.05% 胰酶-乙二胺四乙酸(Trypsin-EDTA), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 均购买于 Gibco 公司。噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT], Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4), 核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 购买于 Sigma 公司。表皮细胞生长因子(Epidermal growth factor, EGF), 碱性纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 购买于 Millipore 公司。PCR 逆转录试剂盒购买于宝生物工程(上海)有限公司。SYBR Green Master 购买于 ABI 公司。灯盏花素购买于北京原叶生物科技有限公司。MicroRNA(miR)-140 激动剂(agomir), miR-140 抑制剂(antagomir) 购买于广州锐博生物科技有限公司。GAPDH、caspase3 及 miR-140 基因引物由 Invitrogen 公司合成。GAPDH: F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'; R: 5'-TTGGCTCCACCCTCAAGTG-3'。caspase3: F: 5'-ACCGATGTCGATG-CAGCTAA-3'; R: 5'-GGTCCGGTAGAGTAAGCATA-3'。miR-140: F: 5'-GATGCTCACAGTGGTTTTACCC-3'; R: 5'-TATCGTTGTTCTGCTCTCTGTCTC-3'。

2 实验方法

2.1 模型制作

2.1.1 小鼠心肌缺血-再灌注损伤模型

成年雄性 C57BL/6 小鼠(25 ± 3 g) 麻醉后用 6~0 圆针丝线于肺动脉下方 2~3 mm 处用活结结扎左冠状动脉前降支, 即开始缺血, 将活结线头预留 3~5 mm 在胸腔外, 30 min 后适当用力拉活结线头将活结松开, 即开始再灌注, 再灌注时程 120 min。假手术组开胸后在肺动脉下方 2~3 mm 处备线、不结扎。灯盏花素治疗组在造模前一周开始给予灯盏花素腹腔注射(50 mg/kg · d)^[3], 假手术组和缺血再灌注组在造模前一周开始给予同等剂量的生理盐水腹腔注射。

2.1.2 细胞缺血-再灌注损伤模型

CSC 细胞以 2×10^5 /孔的细胞浓度接种于 6 孔板, 24 h 后使用 PBS 清洗细胞, 然后将不含葡萄糖和血清的 DMEM 培养基加入 6 孔板, 在 37 °C, 5% CO₂, 1% O₂ 培养箱中培养 2 h, 然后更换为含有 10% 胎牛血清和高葡萄糖(4500 mg/L)的 DMEM 培养基在正常细胞培养箱中培养 6 h^[4]。正常对照组 CSC 细胞始终用含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基在正常细胞培养箱中培养。灯盏花素治疗组于缺血-再灌注开始前 6 h 将灯盏花素加入 6 孔板。

2.1.3 miR-140 抑制/激动实验

CSC 细胞以 2×10^5 /孔的细胞浓度接种于 6 孔板, 按厂家操作说明稀释抑制剂/激动剂, 制备混合液。将配好的混合液加入到 CSC 细胞培养基, 混匀。将培养板置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中培养 24h 后进行灯盏花素治疗及 1/R 模型制作。

2.2 梗死面积测定

结扎冠状动脉前降支, 剪下心脏, 放入 -20 °C 冰箱冷冻 15 min, 取出后垂直左室长轴将心脏切成 2 mm 薄片, 然后 2% TTC 避光染色 20 min, 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min, 心肌梗死区为灰白色, 正常灌注区为红色。心肌梗死区面积 = 梗死区心肌质量/心肌质量 × 100%。

2.3 MTT 测定

CSC 细胞以 0.1×10^5 细胞/孔种于 96 孔板, 每孔加入 0.2 mL 培养基并给予灯盏花素处理(0、10、30、50、100 μmol/L), 体外培养 48 h, 加入 5 mg/mL 的 MTT 在 37 °C 作用 4 h, 去除培养基, 加入 DM-SO150 uL/孔, 室温下摇床上孵育 10 min, 使用酶标仪(Turner BioSystems 公司)450 nm 测定吸光度。细胞活力 = (吸光度/溶剂空白对照组吸光度) × 100%。

2.4 RT-PCR 测定

用于实验的细胞或组织加入 Trizol 裂解液, 提取总 RNA。根据逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA, 其中测定 miR-140 实验有加 Poly(A) 尾的过程。cDNA 加入引物建立扩增体系后按 RT-PCR 试剂盒说明书进行扩增。

2.5 Western blot 分析

细胞加入 RIPA 裂解液提取总蛋白并测定蛋白浓度, 以 40 ng 蛋白浓度进行上样。蛋白变性后在 10% 的分离胶上电泳。待溴酚蓝刚跑出胶, 停止电泳。进行转膜、封闭后加入一抗 TLR4(1:1000),

NF- κ B(1:1000)在4℃孵育过夜,次日洗去一抗加HRP二抗孵育1h。洗去二抗,ECL显影。凝胶成像仪Image Lab拍照,Image J软件检测灰度值。

2.6 统计分析

本研究的所有实验均重复3次以上,使用SPSS 17.0进行数据分析。计量资料的实验数据以均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,多组样本之间的差异用单



图1 Sham组(A)、I/R组(B)、SCU+I/R组(C)心肌梗死面积比较

Fig. 1 Comparison of myocardial infarct size between Sham group (A), I/R group (B) and SCU + I/R group (C)

3.2 灯盏花素对小鼠心肌 caspase3 表达的影响

与sham组相比,I/R组caspase3 mRNA表达增加($P < 0.01$),提示I/R组凋亡显著。与I/R组比较,灯盏花素治疗使小鼠心肌caspase3 mRNA表达减少,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示灯盏花素具有抗凋亡作用,见表1。

因素方差分析进行检测。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 实验结果

3.1 灯盏花素对小鼠心肌梗死面积的影响

灯盏花素治疗使小鼠左室梗死面积减小,与再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图1,表1。

3.3 灯盏花素对小鼠缺血-再灌注模型 miR-140 表达的影响

与sham组相比,I/R组miR-140表达减少($P < 0.01$)。与I/R组比较,灯盏花素治疗使小鼠心肌miR-140表达回升,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。本研究结果提示miR-140可能是灯盏花素分化抗凋亡作用的关键因子。

表1 灯盏花素对小鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of scutellarin on myocardial ischemia-reperfusion injury in mice($n = 10, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	梗死面积 Infarct area (%)	Caspase3 mRNA	miR-140
Sham组	0	0.987 \pm 0.099	1.036 \pm 1.278
I/R组	29.150 \pm 2.586	2.181 \pm 0.169**	0.706 \pm 0.098**
SCU + I/R组	21.838 \pm 2.758 ^{##}	1.900 \pm 0.233**.#	0.856 \pm 0.095*.#

注:与Sham组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与I/R组比较,# $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: compared with Sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with I/R group, # $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

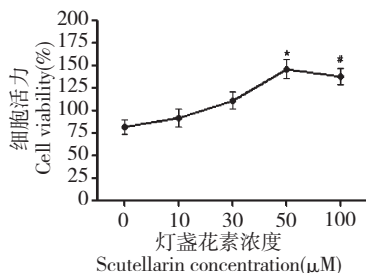


图2 灯盏花素对CSC细胞活力影响

Fig. 2 Effects of scutellarin on cell viability of CSC

注:与30 μ M比较,* $P < 0.05$;与100 μ M比较,# $P > 0.05$

Note: compared with 30 μ M, * $P < 0.05$; compared with 100 μ M, # $P > 0.05$

3.4 灯盏花素对CSC细胞活力影响

MTT测定发现0、10、30、50、100 μ mol/L的灯盏花素均增加CSC细胞活力,其中50 μ mol/L灯盏花素为最优选择,与30 μ mol/L相比有统计学差异($P < 0.05$),与100 μ mol/L相比无统计学差异($P > 0.05$),见图2。

3.5 灯盏花素对缺血-再灌注损伤细胞模型 caspase3 表达的影响

与control组相比,I/R组caspase3 mRNA表达增加($P < 0.01$),提示I/R组凋亡显著。与I/R组

比较,灯盏花素治疗使 caspase3 mRNA 表达减少,二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$),提示灯盏花素具有抗凋亡作用,见表2。

3.6 灯盏花素对缺血-再灌注细胞模型 miR-140 表达的影响

与 control 组相比,I/R 组 miR-140 表达减少($P < 0.01$)。与 I/R 组比较,灯盏花素治疗使 CSC 损伤模型 miR-140 表达回升,二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。在体外进一步印证 miR-140 可能是灯盏花素分化抗凋亡作用的关键因子,见表2。

3.7 过表达 miR-140 后,缺血-再灌注损伤模型中 caspase3 表达变化

将 I/R 组的细胞过表达 miR-140 后导致 caspase3 mRNA 表达减少,与 I/R 组相比,有统计学意义($P < 0.01$)。灯盏花素与 miR-140 激动剂对 caspase3 mRNA 表达的影响类似($P > 0.05$),见表2。

3.8 抑制 miR-140 后,灯盏花素在缺血-再灌注损伤模型中对 caspase3 表达的影响

将 miR-140 抑制剂加入 SCU + I/R 组后,灯盏花素的抗凋亡作用被部分抵消,caspase3 表达增加(与 SCU + I/R 组相比 $P < 0.05$),见表2。

3.9 miR-140 对凋亡蛋白 TLR4、NF- κ B 表达影响

CSC 受到缺血-再灌注损伤后 miR-140 表达减少,并伴有 TLR4、NF- κ B 表达增加(与对照组比较 $P < 0.01$)。灯盏花素治疗使 miR-140 表达回升,伴有 TLR4、NF- κ B 表达减少(与 I/R 组比较 $P < 0.01$)。将 I/R 组的细胞过表达 miR-140 导致 TLR4、NF- κ B 表达减少(与 I/R 组比较 $P < 0.01$)。灯盏花素与 miR-140 激动剂对 TLR4、NF- κ B 表达的影响类似($P > 0.05$)。将 miR-140 抑制剂加入 SCU + I/R 组后,灯盏花素的抗凋亡作用被部分抵消,TLR4、NF- κ B 表达增加(与 SCU + I/R 组相比 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表2,图3。

表2 灯盏花素对 CSC 细胞缺血-再灌注损伤的影响($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of scutellarin on ischemia-reperfusion injury in CSC cells ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	Caspase3 mRNA	miR-140	TLR4	NF- κ B
Control 组	1.028 \pm 0.202	1.001 \pm 0.059	0.237 \pm 0.056	0.238 \pm 0.049
I/R 组	2.375 \pm 0.294 **	0.615 \pm 0.052 **	0.492 \pm 0.039 **	0.476 \pm 0.033 **
SCU + I/R 组	1.639 \pm 0.214 **,#	0.764 \pm 0.092 **,#	0.375 \pm 0.065 **,#	0.307 \pm 0.055 **,#
Agomir + I/R 组	1.380 \pm 0.283 [#] , [^]	0.819 \pm 0.078 [#] , [^]	0.332 \pm 0.059 [#] , [^]	0.248 \pm 0.039 [#] , [^]
Antagomir + SCU + I/R 组	2.078 \pm 0.265 ^{&}	0.614 \pm 0.075 ^{&} ^{&&}	0.478 \pm 0.062 ^{&}	0.337 \pm 0.062 ^{&} ^{&&}

注:与 control 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 I/R 组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 SCU + I/R 组比较,[&] $P < 0.05$,^{&&} $P < 0.01$;与 SCU + I/R 组比较,[^] $P > 0.05$ 。

Note:compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;compared with I/R group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;compared with SCU + I/R group,[&] $P < 0.05$,^{&&} $P < 0.01$;compared with SCU + I/R group,[^] $P > 0.05$ 。

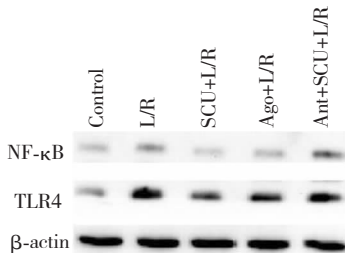


图3 TLR4,NF- κ B 蛋白表达测定

Fig. 3 Determination of TLR4,NF- κ B protein expression

4 讨论与结论

已有报道指出灯盏花素能够减少大脑中动脉梗死模型中的脑梗死体积,减少肿瘤坏死因子 α 和白

介素 1- β 的表达,抑制短暂前脑缺血大鼠的神经元凋亡^[5]。然而,灯盏花素对心脏缺血-再灌注损伤的影响并不完全清楚。早期的研究显示灯盏花素能够减小心肌梗死面积,增加心脏射血分数,我们的研究结果显示灯盏花素能够减少心肌梗死面积,降低凋亡相关蛋白 caspase3mRNA 表达。在体外研究中,灯盏花素能够增加缺氧-复氧损伤的心肌细胞的活力,降低 caspase3mRNA 的表达,降低 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达。灯盏花素可有效降低心肌缺血-再灌注损伤小鼠的心肌细胞凋亡可能与其调控的凋亡相关蛋白表达有关。而长期的研究表明,microRNAs 可在基因的转录后调控中发挥重要作用。

MicroRNA 是一种短序列(约 22nt),非编码蛋白质的单链小分子 RNA。它能够与 RNA 介导沉默

复合体结合,通过靶 mRNA 的 3'-UTR 的 microRNA 辨别点,调节靶 mRNA 的降解或者抑制翻译。MicroRNAs 广泛存在于真核生物的染色体中,作为非蛋白编码的小 RNAs,在调控基因表达、细胞分化、凋亡乃至个体发育中起重要影响^[6]。

心肌中特异性表达的 microRNAs 与心肌功能关系密切。Wang 等提出 miR-19b-3p、miR-134-5p 和 miR-186-5p 是急性心肌梗死的生物学标志^[7]。Huang 等发现 miR-21 和 miR-146a 与急性心肌梗死所致的心肌细胞凋亡相关^[8]。我们筛查比对了心肌缺血-再灌注损伤后心肌细胞中 microRNAs 的表达变化,并研究了这些变化与凋亡相关靶蛋白的关系,首次发现 miR-140 在心肌缺血-再灌注损伤后心肌细胞中表达下降,灯盏花素治疗后 miR-140 表达增加,本研究结果提示 miR-140 可能是灯盏花素发挥抗凋亡作用的关键调控点。为了进一步证实我们的假设,我们在体外研究中分别加入 miR-140 的激动剂与抑制组,结果发现 miR-140 激动剂导致 caspase3 mRNA 表达减少,灯盏花素与 miR-140 激动剂对 caspase3 mRNA 表达的影响类似。miR-140 抑制剂会部分抵消灯盏花素的抗凋亡作用,导致 caspase3 mRNA 表达增加。进一步证实 miR-140 可能是灯盏花素发挥抗凋亡作用的关键调控点。

我们对 miR-140 进行了生物信息学筛查。使用项目申请人研究团队自主研发的 microRNAs 筛查软件 miR-match V1.0 对 miR-140 进行了详细的凋亡相关靶基因筛查。我们发现,Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是 miR-140 调节的靶基因其中之一(图 4)。

```

Position 2909-2915 of TLR4 3' UTR   5' ...CCUGGGAAGUGAAACUGUGGAU...
                                     |||||
hsa-miR-140                        3'  CAGGCACCAAGAUGGGACACCA
  
```

图 4 miR-140 与 Toll 样受体 4 调控关系

Fig. 4 Regulatory relationship between miR-140 and Toll-like receptor 4

有研究表明,TLR4 在心肌中的表达与心肌组织细胞损伤相关,尤其与细胞凋亡密切相关。Yao S 等研究发现激动 TLR4 通路可以导致巨噬细胞凋亡增加^[9],Gáspár R 等发现 TLR4 调控缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡^[10]。TLR4 基因缺乏的大鼠心肌梗死范围明显减少,抑制 TLRs 下游信号通路分子 NF- κ B 也能减轻心肌缺血-再灌注损伤,表明 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活参与缺血再灌注心肌

损伤的发生和进展^[11]。我们的研究表明心肌损伤后 TLR4、NF- κ B 表达增加,心肌细胞凋亡增加;灯盏花素治疗后 TLR4、NF- κ B 表达减少,同时伴随着心肌细胞凋亡减少。miR-140 激动剂对 TLR4、NF- κ B 的影响与灯盏花素类似。在灯盏花素治疗的 I/R 细胞模型中加入 miR-140 抑制剂导致灯盏花素抗心肌细胞凋亡作用被部分抵消,TLR4、NF- κ B 表达增加。

凋亡主要通过两个信号通路触发:线粒体(内在)途径和死亡受体(外源性)途径。死亡受体途径涉及经典的配体与细胞表面受体的相互作用。线粒体凋亡途径通常是细胞对刺激因素的一种自主性反应,并伴随着半胱天冬蛋白酶(caspase)的活化。死亡受体和线粒体两条凋亡途径均参与心肌细胞凋亡^[12],而两条凋亡信号途径下游的共有通路是 caspase3。caspase3 处于凋亡有序级联反应的下游,是最重要的效应型 caspase。caspase3 活化标志着凋亡进入了不可逆转的阶段^[13]。我们研究结果发现灯盏花素治疗可以使 caspase3 表达减少,抑制缺血-再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡。灯盏花素可能是通过调控 miR-140-TLR4/NF- κ B-caspase 3 抗凋亡通路在小鼠缺血-再灌注心肌组织内发挥抗凋亡的作用。

参考文献

- 1 Wang J, Hu X, Jiang H. The Nrf-2/ARE-HO-1 axis: An important therapeutic approach for attenuating myocardial ischemia and reperfusion injury-induced cardiac remodeling. *Int J Cardiol*, 2015, 184: 263-264.
- 2 Wang WW, Lu L, Bao TH, et al. Scutellarin alleviates behavioral deficits in a mouse model of multiple sclerosis, possibly through protecting neural stem cells. *J Mol Neurosci*, 2016, 58 (2): 210-220.
- 3 Lin LL, Liu AJ, Liu JG, et al. Protective effects of scutellarin and breviscapine on brain and heart ischemia in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50: 327-332.
- 4 Wang Z, Yu J, Wu J, et al. Scutellarin protects cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury by reducing apoptosis and oxidative stress. *Life Sci*, 2016, 13: 184-195.
- 5 Yuan Y, Zha H, Rangarajan P, et al. Anti-inflammatory effects of Edaravone and Scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-2 microglia. *BMC Neurosci*, 2014, 15: 125-128.
- 6 Sokol NS. An overview of the identification, detection, and functional analysis of Drosophila microRNAs. *Methods Mol Biol*, 2008, 420: 319-334.