

## 丹参素通过抑制 miR-199a-5p 对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用

史云<sup>1</sup>, 顾秀峰<sup>1\*</sup>, 李玉明<sup>2</sup>, 李辉<sup>2</sup>, 李焕明<sup>1</sup>

1. 天津市第四中心医院 心内科, 天津 300140

2. 武警后勤学院附属医院 心研所, 天津 300162

**摘要:** **目的** 评估丹参素对心肌缺血/再灌注 (MI/R) 损伤的保护作用及其可能机制。**方法** 32 只大鼠随机分为假手术组、模型组、丹参素 30 mg/kg 组和丹参素 60 mg/kg 组, 丹参素组在再灌注开始后 5 min 内 iv 相应剂量丹参素, 假手术组和模型组注射等量生理盐水; 再灌注 3 h 后, 向冠状动脉中注入 2 mL 的 3% 伊文思蓝染料; 取大鼠动脉血和心脏, 通过组织化学测定心肌梗死面积大小, 通过 ELISA 测定血清中的肌酸激酶-同工酶 (CK-MB) 和心肌肌钙蛋白 (cTnI) 水平。通过氧糖剥夺/恢复 (OGD/R) H9c2 心肌细胞模型评估丹参素预处理对细胞的直接作用, 使用 MTT、ELISA 和流式细胞术分别测定丹参素对细胞活力、乳酸脱氢酶 (LDH) 释放和细胞凋亡的影响, 使用 RT-PCR 和 Western blotting 免疫印迹测定 miR-199a-5p 及其下游蛋白 Akt 和 ERK1/2 的表达。**结果** 丹参素治疗可显著降低心肌梗死面积以及血清中 CK-MB 和 cTnI 的水平 ( $P < 0.05$ ); 丹参素预处理显著改善 OGD/R 心肌细胞活力恢复能力, 减少细胞凋亡水平, 显著提高 Akt 和 ERK1/2 的 mRNA 和蛋白表达水平, 降低 miR-199a-5p 的 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ ); 上调 miR-199a-5p 显著降低 Akt 和 ERK1/2 的 mRNA 和蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 而下调 miR-199a-5p 可显著提高 Akt 和 ERK1/2 的 mRNA 和蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ )。**结论** 丹参素可以通过抑制 miR-199a-5p 增加 Akt 和 ERK1/2 表达来发挥心脏保护作用。

**关键词:** 丹参素; 心肌缺血再灌注损伤; 微小 RNA; 氧糖剥夺/恢复; miR-199a-5p

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2021)06-1104-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.06.002

## Protection of Danshensu on myocardium against ischemia-reperfusion injury through inhibiting miR-199a-5p

SHI Yun<sup>1</sup>, GU Xiu-feng<sup>1</sup>, LI Yu-ming<sup>2</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, LI Huan-ming<sup>1</sup>

1. Department of Cardiology, Tianjin Fourth Central Hospital, Tianjin 300140, China

2. Heart Research Institute, Affiliated Hospital of Logistics College of PAP, Tianjin 300162, China

**Abstract:** **Objective** To evaluate the protective effects of Danshensu, the effective component of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), against myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury in cardiomyocytes and its possible underlying mechanism. **Methods** 32 rats were randomly divided into four groups: sham operation group, model group, Danshensu 30 mg/kg group and Danshensu 60 mg/kg group. Danshensu 30 mg/kg group and Danshensu 60 mg/kg group were given all drugs intravenously within 5 min after reperfusion, sham operation group and model group were injected with the same amount of physiological saline. Three hours after reperfusion, 2 mL of 3% Evans was injected into the coronary artery. The size of myocardial infarction was determined by histochemistry. The levels of creatine kinase MB (CK-MB) and cardiac troponin (cTnI) in serum were measured by ELISA. In addition, the direct toxicity of Danshensu on cardiomyocytes was evaluated by oxygen glucose deprivation/recovery (OGD/R) model. MTT, ELISA and flow cytometry were used to determine the effects of Danshensu on cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) release and apoptosis. RT-PCR and Western blotting were used to detect the effects of Danshensu on cell viability, LDH release and apoptosis. The expression of miR-199a-5p and its downstream proteins Akt and ERK1/2 were detected by Western blotting. **Results** Danshensu treatment significantly reduced myocardial infarction area and serum CK-MB and cTnI levels ( $P < 0.05$ ); Danshensu pretreatment significantly improved the viability of OGD/R myocardial cells, reduced the level of apoptosis, significantly increased the mRNA and protein

收稿日期: 2020-12-21

基金项目: 国家重点研发项目 (2017YFC1307602); 天津市科技计划项目 (15ZXLCSY00040)

作者简介: 史云, 女, 博士, 主要研究心血管内科疾病的治疗。E-mail: sy5241@126.com

\*通信作者: 顾秀峰, 硕士, 主任医师。E-mail: guxiufengdoctor@163.com

expression levels of Akt and ERK1/2, and decreased the mRNA expression level of miR-199a-5p ( $P < 0.05$ ). Up regulation of miR-199a-5p significantly decreased the mRNA and protein expression levels of Akt and ERK1/2 ( $P < 0.05$ ), and down-regulation of miR-199a-5p significantly increased the mRNA and protein expression levels of Akt and ERK1/2 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Danshensu provides the cardioprotective effects against MI/R injury via increasing Akt and ERK1/2 through inhibition of miR-199a-5p.

**Key words:** Danshensu; myocardium ischemia-reperfusion injury; microRNA; oxygen glucose deprivation/recovery; miR-199a-5p

经皮腔内冠状动脉成形术 (PTCA) 是急性心肌梗死 (AMI) 患者干预的关键手段<sup>[1]</sup>。然而, 血管重建后心肌细胞不可避免地遭受心肌缺血/再灌注 (MI/R) 损伤, 从而导致临床预后较差<sup>[2]</sup>。心肌细胞凋亡是 MI/R 损伤的潜在机制之一<sup>[3-5]</sup>, 这一点已被广泛接受。越来越多的证据表明, 再灌注损伤挽救激酶 (RISK) 可以抑制再灌注损伤的心肌细胞的凋亡, RISK 包括 PI3K/Akt 和 ERK1/2<sup>[6-7]</sup>。因此, 调控 PI3K/Akt 和 ERK1/2 是 MI/R 损伤中保护心肌的关键。MicroRNA 通过降解或阻断靶信使 RNA (mRNA) 的翻译来调节转录后水平的基因表达<sup>[8-9]</sup>。各种研究表明, 增加的 miR-199a-5p 表达可导致一系列的病理生理改变, 从而促进房颤和心力衰竭等心脏病的进展<sup>[10-11]</sup>。Liu 等<sup>[12]</sup>研究表明通过靶向 HIF-1 $\alpha$ -GSK3 $\beta$ -mPTP 轴, 下调 miRNA-199a-5p 可减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞毒性。Zhang 等<sup>[13]</sup>研究表明去氧肾上腺素诱导的心肌细胞肥厚时 miR-199a-5p 升高, 而抑制 miR-199a-5p 后明显改善心肌细胞肥厚。还有研究表明, miR-199a-5p 参与了急性心肌梗死的进展并介导心肌细胞凋亡, 心脏中 miR-199a-5p 水平随着急性心梗的进展而升高, 且过表达 miR-199a-5p 显著增加了 H9c2 细胞的凋亡<sup>[14]</sup>。因此, 针对 miR-199a-5p 的治疗性干预成为治疗 MI/R 损伤的关键。

丹参素是丹参的有效成分, 已在临床实践中广泛用于治疗包括心血管疾病、脑血管疾病、肾功能不全、肝纤维化和糖尿病血管并发症在内的各种疾病<sup>[15-16]</sup>。多项研究表明, 丹参素改善微循环, 抑制活性氧的产生, 抑制血小板的聚集和黏附, 并保护心肌免受 MI/R 损伤<sup>[17-21]</sup>。但是, 丹参素的心脏保护作用的潜在机制尚未完全阐明。因此, 本研究假设丹参素的心脏保护作用可能与 miR-199a-5p/PI3K/Akt/ERK1/2 途径抑制 MI/R 损伤的细胞凋亡有关。为此, 本研究通过心肌缺血再灌注动物模型和氧-葡萄糖剥夺/恢复 (OGD/R) 心肌细胞模型检测心肌梗死面积大小的变化以及 miR-199a-5p、PI3K/Akt 和 ERK1/2 的 mRNA 和蛋白表达水平的变

化, 评估丹参素对 MI/R 损伤的影响, 旨在为 MI/R 损伤的预防和治疗提供新的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

成年雄性 SD 大鼠, 体质量 (250 $\pm$ 20) g, 由复旦大学动物研究中心提供, 许可证号: SCXK (沪) 2014-0004。实验遵循美国国家卫生研究院《实验动物使用指南》, 并经天津市第四中心医院伦理委员会批准。

### 1.2 药品与试剂

丹参素钠 (质量分数 97.8%, 批号 110855-201915, 中国食品药品检定研究院); 肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals, 德国); 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (建成生物工程研究所); DMEM 培养基和其他细胞培养物购自 Gibco BRL; 磷酸酶 ERK1/2 (p-ERK1/2)、总 ERK1/2 (T-ERK1/2)、磷酸化 Akt (p-Akt)、总 Akt (T-Akt, serine473) 抗体购自 BD Biosciences; Syn-rno-miR-199a-5p miScript miRNA Mimic、ani-rno-miR-199a-5p miScript miRNA 抑制剂、AllStars 阴性对照 siRNA、AllStars Mm/Rn 细胞死亡对照 siRNA 和 HiPerFect 转染试剂购自 QIAGEN。

## 2 方法

### 2.1 MI/R 损伤模型制备

MI/R 损伤模型的构建参考文献方法<sup>[19]</sup>。大鼠用戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹膜内麻醉。常规消毒后切开左胸, 暴露心脏, 在左冠状动脉前降支周围制作活结, 从而产生心肌缺血, 缺血 30 min 后, 释放活结, 然后再灌注 3 h, 形成 MI/R 损伤。

### 2.2 动物分组和给药

根据模型制作方式将实验动物分为假手术组、模型组和丹参素 30、60 mg/kg 组, 每组各 8 只动物; 所有动物均暴露心脏, 除假手术组外, 其余各组冠状动脉左前降支结扎 30 min, 在再灌注开始后 5 min 内, 丹参素 30、60 mg/kg 组分别 iv 给予相应剂量药物, 假手术组和模型组 iv 等量生理盐水。

## 2.3 心肌梗死面积的测量

再灌注 3 h 后, 向冠状动脉中注入 2 mL 3% 伊文思蓝染料。染料均匀分布后, 将其快速切除, 将其冷冻在  $-80^{\circ}\text{C}$ , 然后将整个心室组织沿从顶点到房室沟的横轴切成 5 个部分, 将切片在 2% 2, 3, 5-三苯基四唑氯化物 (TTC) 中  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min。心脏中被 TTC 染成红色区域表示该区域没有缺血, 白色区域表示心肌梗死。梗死面积和危险区域通过计算机平面测量仪测量。梗死面积以危险区的百分比表示。

## 2.4 血清中 CK-MB 和 cTnI 释放的测定

眶下静脉从取血法收集大鼠血液,  $1\ 200\times g$  离心 5 min, 分离血清, 然后按照说明书使用酶联免疫吸附法测定血清中 CK-MB 和 cTnI 水平。

## 2.5 大鼠 H9c2 心肌细胞 OGD/R 实验

**2.5.1 细胞培养、处理** 大鼠 H9c2 心肌细胞(ATCC CRL 1446) 在添加 10% FBS (Hyclone)、青霉素 G (100 U/mL)、链霉素 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和谷氨酰胺 (2 mmol/L) 的 DMEM 中培养。按照文献方法<sup>[19]</sup>, 进行 OGD/R 实验。预处理包括 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  PI3K 抑制剂 wortmannin 或 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ERK 抑制剂 U0126 孵育 1 h。然后冲洗细胞 2 次, 在无葡萄糖的 DMEM 中培养, 随后放置在  $37^{\circ}\text{C}$  下含有 95%  $\text{N}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$  混合物的厌氧室中 6 h。氧糖剥夺后, 将葡萄糖添加到正常水平(最终质量浓度 4.5 mg/mL), 细胞在正常生长条件下 (95% 空气和 5%  $\text{CO}_2$ ) 培养 18 h。

**2.5.2 分组** (1) 实验一分 4 组: 对照组 (正常培养)、模型组 (OGD/R)、1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素组 (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素孵育 1 h 后行 OGD/R 处理) 和 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素组 (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素孵育 1 h 后行 OGD/R 处理)。

(2) 实验二分 5 组: 对照组 (正常培养)、模型组 (OGD/R)、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素组 (10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素孵育 1 h 后行 OGD/R 处理)、wortmannin 组 (PI3K 抑制剂 wortmannin 孵育 1 h 后 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素孵育 1 h, 行 OGD/R 处理) 和 U0126 组 (ERK 抑制剂 U0126 孵育 1 h 后 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  丹参素孵育 1 h, 再行 OGD/R 处理)。

(3) 实验三分组: 对照组 (正常培养)、miR-199a-5p mimic 组 (转染 miR-199a-5p 基因过表达)、miR-199a-5p inhibitor (转染抑制 miR-199a-5p 基因) 和空白对照组 (转染空白基因)。

(4) 实验四分组: 对照组 (正常培养)、模型组 (OGD/R)、miR-199a-5p inhibitor+模型组 (转染抑制 miR-199a-5p 基因后行 OGD/R 处理) 和 miR-199a-5p inhibitor (转染抑制 miR-199a-5p 基因)。

**2.5.3 细胞活力测定** MTT 比色法测定细胞活力。指数期 H9c2 细胞在 96 孔板中以  $1\times 10^4$  细胞/孔接种。经不同处理后, 向每个孔中添加 20  $\mu\text{L}$  5 mg/mL MTT 溶液 (培养基中最终质量浓度为 0.5 mg/mL), 在  $37^{\circ}\text{C}$  下培养 4 h。吸取上清液, 将每个孔中的甲氧嘧啶晶体溶解在 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜中, 并在微板阅读器上读取 490 nm 处的吸光度值。吸光度值的降低被认为是细胞活力的降低。单独使用 wortmannin 和 U0126 处理均未显著影响细胞活力 (数据未显示)。

**2.5.4 LDH 活性的测定** 培养上清液经 1 000 r/min 离心。按照试剂盒使用说明检测上清液中 LDH 的活性。

**2.5.5 流式细胞仪分析凋亡** 用异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联膜联蛋白 V 和碘化丙啶 (PI) 鉴定凋亡细胞。根据试剂供应商的说明使用 FITC-附录蛋白 V 和 PI 进行双重染色。取 H9c2 细胞, 用 PBS 冲洗 2 次。将细胞 ( $1\times 10^6$ ) 重新悬浮在结合缓冲液中, 然后加入 FITC 膜联蛋白 V 和 PI。混合物在室温下在黑暗中孵育 15 min。细胞荧光用双变量流式细胞仪 (BD) 测定, 并用 CellQuest 软件 (BD) 分析。该方法区分完整 (FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>)、早期凋亡 (FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) 和晚期凋亡 (FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) 细胞。

**2.5.6 p-ERK、p-Akt mRNA 表达分析** 按试剂说明书用 TriZol 试剂盒提取总 RNA, 以总 RNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) 为原料, 反式合成 cDNA 转录系统。随后, cDNA 用 GoTaq-qPCR 母料进行实时聚合酶链反应 (PCR)。反应在 7500 实时 PCR 系统上进行。具体引物序列如下: p-ERK 正向 5'-ATCCCC-ATGGAACGACCTG-3' 和反向 5'-ACCCGCC-AGGACAAATG-3'; p-Akt 正向 5'-AGGCTACTGT-GCTCCAC-3', 反向 5'-TGGCGGTAACCCATC-AG-3';  $\beta$ -actin 正向 5'-CAGGTGTGGACGGGG-3' 和反向 5'-GGGAGGCAG-3'。使用  $\Delta\Delta\text{Ct}$  方法计算每个基因表达的倍数变化<sup>[21]</sup>。

**2.5.7 miR-199a-5p 表达分析** 按试剂说明书使用 TriZol 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA。使用多合一 miRNA qRT-PCR 检测试剂盒进行 qRT-PCR。反应在 7500 实时 PCR System 上进行。使用  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法计

算每个基因的表达倍数变化。

**2.5.8 H9c2 的转染** 将 H9c2 细胞接种在 6 孔板中 12 h, 转染前, 更换不含血清和抗生素的 DMEM 培养基。使用 10、20、50 nmol/L AllStars Mm/Rn 细胞死亡对照 siRNA 孵育 24、48、72 h 以选择最佳条件, 在显微镜下观察和评估转染效率, 最终选择 20 nmol/L (转染效率最高超过 70%)。使用 20 nmol/L Syn-rno-miR-199a-5p miScript miRNA Mimic 和 antirno-miR-199a-5p miScript miRNA Inhibitor 分别过表达和抑制 miR-199a-5p 表达。将 AllStars Negative Control siRNA 用作阴性对照。

**2.5.9 蛋白质印迹分析** 用 BCA 蛋白质测定试剂盒评估蛋白质总浓度。蛋白质经 10% SDS-PAGE 分离, 转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, 分别用一抗 p-ERK (1:2 000)、T-ERK 1/2 (1:2 000)、p-Akt (1:2 000)、T-Akt (1:5 000) 和 GAPDH (1:1 000) 在 4℃ 过夜, PBST 冲洗后与辣根过氧化物酶

结合的二级抗体 (1:5 000) 在 37℃ 下孵育 1 h。使用增强的化学发光系统 (ECL 试剂盒) 检测免疫反应性条带, 并使用 ImageJ 1.42q 软件程序分析图像。

## 2.6 统计分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本比较使用  $t$  检验, 组间比较使用单因素方差分析 (ANOVA), 然后通过 Newman-Keuls 检验。所有实验数据均采用 SPSS 17.0 进行分析。  $P < 0.05$  认为其差异具有统计学意义。  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法用于 RT-PCR 分析。

## 3 结果

### 3.1 丹参素对 MI/R 损伤大鼠的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠的梗死面积、血清 CK-MB 和 cTnI 水平均显著增加, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 丹参素 30、60 mg/kg 组大鼠梗死面积、血清 CK-MB 和 cTnI 水平均明显减少, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1、2。

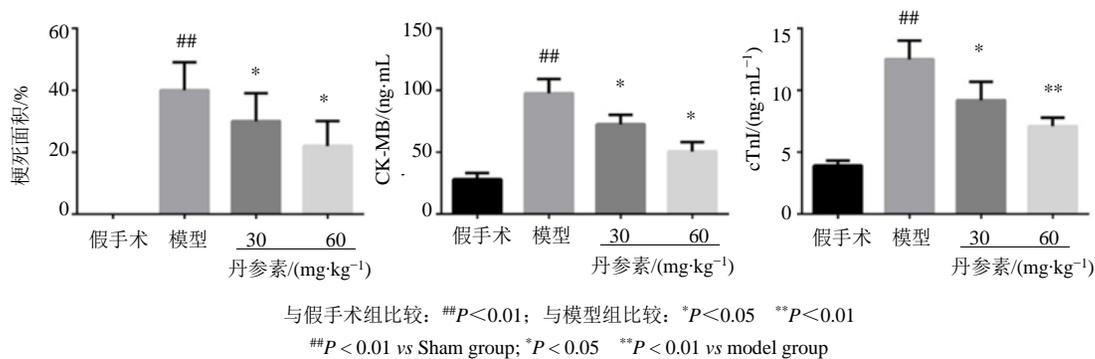


图 1 丹参素对 MI/R 损伤大鼠心肌梗死面积及血清 CK-MB 和 cTnI 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effect of Danshen on myocardial infarct size and serum CK-MB and cTnI levels in rats with MI/R injury ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

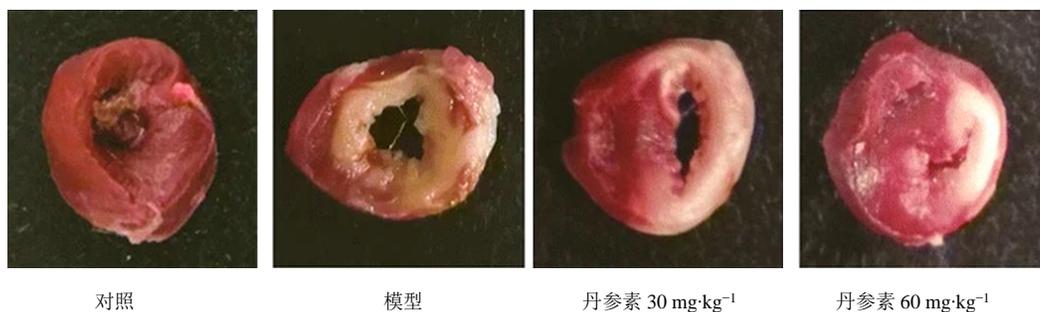


图 2 各组大鼠心肌 TTC 染色结果

Fig. 2 TTC staining results of myocardium of rats in each group

## 3.2 丹参素对大鼠 H9c2 心肌细胞 OGD/R 损伤的保护作用

**3.2.1 丹参素对 OGD/R 损伤 H9c2 细胞活力、LDH 和凋亡的影响** 与对照组相比, 模型组细胞活力显著

降低, LDH 释放和细胞凋亡显著增加, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 1、10  $\mu\text{mol/L}$  丹参素组细胞活力显著提高, LDH 释放和细胞凋亡显著下降, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

**3.2.2 丹参素对 OGD/R 损伤 H9c2 细胞 p-ERK、p-Akt 和 miR-199a-5p 表达的影响** 与对照组相比, 模型组 p-ERK 和 p-Akt mRNA 和蛋白表达水平显著降低, miR-199a-5p mRNA 水平显著升高, 差异具有统计学

意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 1、10  $\mu\text{mol/L}$  丹参素组 p-ERK 和 p-Akt 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著提高, miR-199a-5p mRNA 表达水平降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ 、0.01)。见图 4。

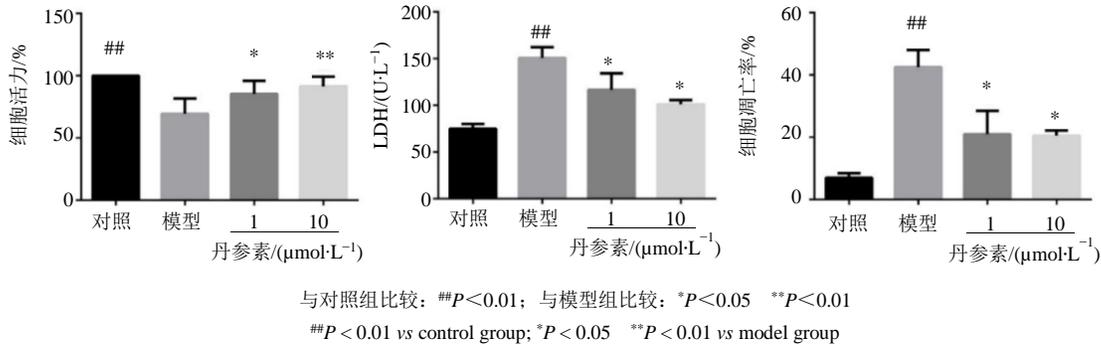


图 3 丹参素对 OGD/R 损伤 H9c2 细胞活力、LDH 和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of Danshensu on viability, LDH, and apoptosis of H9c2 cells after OGD/R injury ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

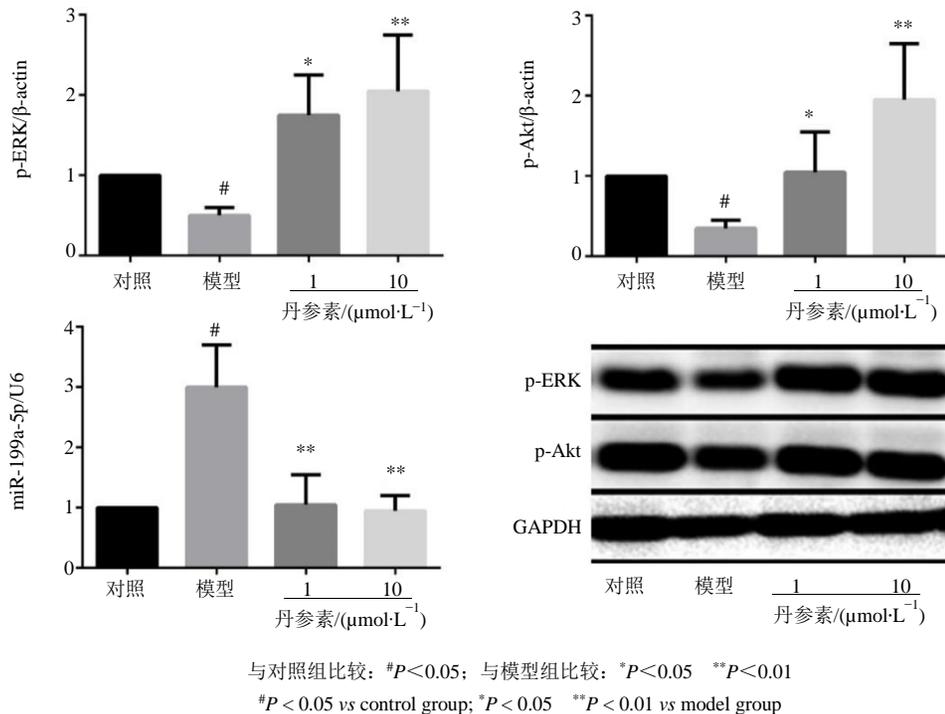


图 4 丹参素对 OGD/R 损伤 H9c2 细胞 p-ERK、p-Akt 和 miR-199a-5p 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Effect of Danshensu on the expression of p-ERK, p-Akt, and miR-199a-5p in H9c2 cells after OGD/R injury ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**3.3 丹参素通过抑制 miR-199a-5p 激活 PI3K/Akt 和 ERK 信号通路发挥保护作用**

**3.3.1 PI3K 抑制剂和 ERK 抑制剂对丹参素作用的影响** 与对照组相比, 模型组细胞活力显著降低, LDH 释放和细胞凋亡显著增加, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 10  $\mu\text{mol/L}$  丹参素组细胞活力显著提高, LDH 释放和细胞凋亡显著下降, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ 、0.01)。与 10  $\mu\text{mol/L}$

丹参素组相比, 分别经 wortmannin 预处理阻断 PI3K 和 U0126 预处理阻断 ERK 后, wortmannin 组和 U0126 组细胞活力明显下降, 其差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 5; 结果表明用 wortmannin 或 U0126 预处理后 10  $\mu\text{mol/L}$  丹参素并不能逆转氧糖剥夺/复氧诱导的 LDH 释放和细胞凋亡增加, 丹参素的保护作用与 PI3K/Akt 和 ERK 信号通路有关。

**3.3.2 过表达 miR-199a-5p 对 H9c2 细胞 p-ERK、**

p-Akt 表达的影响 过表达 miR-199a-5p 后, H9c2 细胞 p-ERK 和 p-Akt 的 mRNA 和蛋白表达明显减少, 其差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而当阻断 miR-199a-5p 表达后, p-ERK 和 p-Akt 的 mRNA 和蛋白表达明显增加, 其差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 6。

3.3.3 阻断 miR-199a-5p 对 OGD/R 损伤 H9c2 细胞的影响 miR-199a-5p inhibitor+模型组细胞活力与模型组相比明显提高, LDH 释放和细胞凋亡明显减少, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而 miR-199a-5p inhibitor 组与对照组相比, 差异没有统计学意义。见图 7。

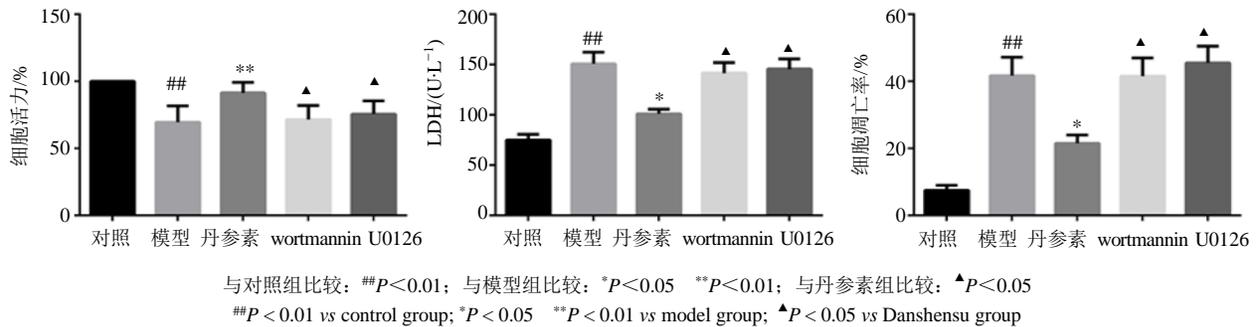


图 5 PI3K 抑制剂和 ERK 抑制剂对丹参素 H9c2 细胞保护作用的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Effects of PI3K inhibitor and ERK inhibitor on protection of Danshensu to H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

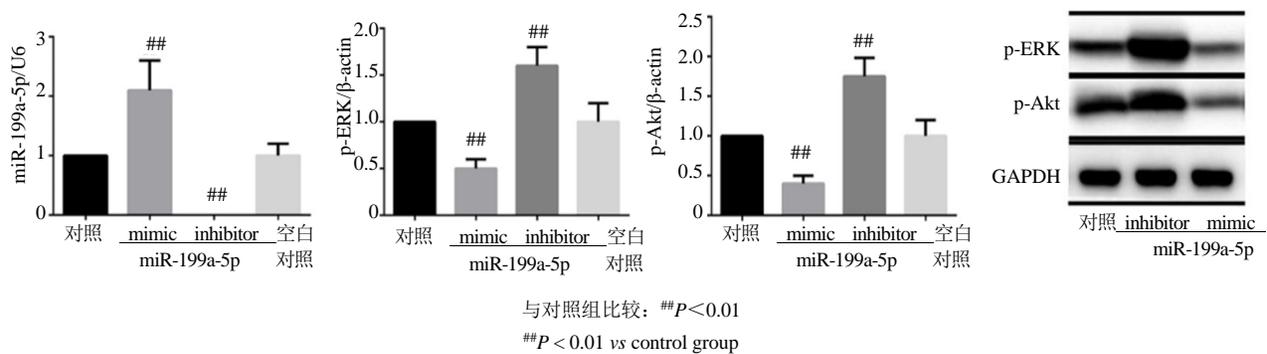


图 6 miR-199a-5p 过表达对 H9c2 细胞 p-ERK、p-Akt 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 6 Effect of miR-199a-5p overexpression on the expression of p-ERK and p-Akt in H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

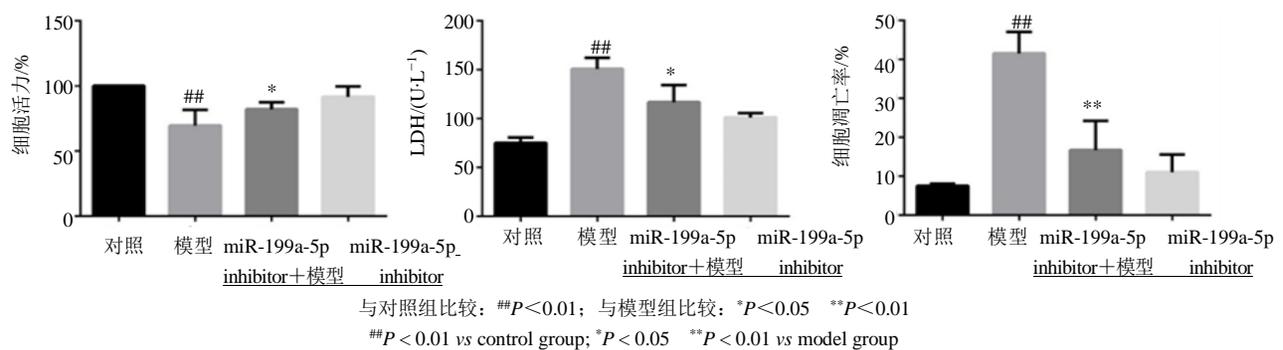


图 7 阻断 miR-199a-5p 对 OGD/R 损伤 H9c2 细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of blocking miR-199a-5p on OGD/R injury in H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

#### 4 讨论

细胞凋亡是与 MI/R 损伤相关的心肌细胞死亡的重要病理生理机制, 凋亡的预防和治疗可以最大程度地减少 MI/R 引起的心脏损伤<sup>[22]</sup>。本研究发

丹参素可以保护心肌细胞免受 OGD/R 引起的细胞凋亡, OGD/R 后心肌细胞显示出大量的凋亡, 丹参素预处理显著减少了心肌细胞的凋亡, 表明凋亡的抑制可能是丹参素保护 MI/R 损伤的机制。这与 Yin

等<sup>[23]</sup>的研究结果一致。PI3K/Akt 和 ERK 信号通路属于再灌注损伤挽救激酶 (RISK) 通路, 是一组赋予强大心脏保护作用的存活蛋白激酶。有研究表明, PI3K 及其下游效应子 Akt 的激活对于 MI/R 损伤的心脏保护十分重要<sup>[24-25]</sup>。Jae 等<sup>[26]</sup>的研究亦证实激活 ERK1/2 可以抑制 MI/R 损伤引起心肌细胞凋亡。在本研究中, OGD/R 降低了 p-Akt 和 p-ERK 的 mRNA 和蛋白水平, 而丹参素预处理则逆转了这种现象。此外, PI3K 抑制剂 wortmannin 和 ERK1/2 抑制剂 U0126 则显著逆转了丹参素的抗凋亡作用, 表明丹参素发挥抗凋亡的作用与 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路有关。

MicroRNA (miRNA) 是小的非编码 RNA, 可调节众多基因表达, 并在心血管疾病中发挥重要作用<sup>[27]</sup>。有研究表明, miR-199a-5p 是一种对缺氧敏感的 miRNA<sup>[28]</sup>。提示丹参的抗凋亡机制可能与 miR-199a-5p 有关, 为此本研究进一步对作用机制进行了探讨。结果发现 miR-199a-5p 模拟转染组中 p-Akt 和 p-ERK 降低, 而 miR-199a-5p 抑制剂转染组中 p-Akt 和 p-ERK 升高, 表明 miR-199a-5p 的下调有助于丹参素对 MI/R 损伤的心脏保护作用。miR-199a-5p 的调节与多种疾病相关, Wang 等<sup>[29]</sup>发现抑制 miR-199a-5p 可以通过调节生存前的途径来减少 HCV 的复制。Sun 等<sup>[30]</sup>发现通过靶向 CDKN1C 抑制 miR-199a-5p 可以降低常染色体显性多囊肾疾病的细胞增殖。本实验结果显示 OGD/R 后 miR-199a-5p mRNA 水平显著增加, 而丹参素预处理可抑制其表达, 转染后 miR-199a-5p mRNA 的下调和上调分别使 p-Akt 和 p-ERK 的 mRNA 和蛋白水平升高和降低, 表明 miR-199a-5p mRNA 可通过 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路发挥作用。

综上所述, 本研究揭示了丹参素的心脏保护作用的潜在机制, 首次提出丹参素通过抑制 miR-199a-5p 激活 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路来减轻 OGD/R 诱导的心肌细胞凋亡, 为临床 MI/R 损伤提供新的治疗方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Wong N D. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2014, 11: 276-289.
- [2] Prasad A, Stone G W, Holmes D R, et al. Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection:

the "dark side" of reperfusion [J]. *Circulation*, 2009, 120: 2105-2112.

- [3] Gottlieb R A, Bursleson K O, Kloner R A, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94: 1621-1628.
- [4] Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acutemyocardial infarction [J]. *Circulation*, 1997, 95: 320-323.
- [5] Freude B, Masters T N, Robicsek F, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32: 197-208.
- [6] Yellon D M, Baxter G F. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? [J]. *Trends Cardiovasc*, 1999, 9(8): 245-249.
- [7] Hausenloy D J, Yellon D M. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 448-460.
- [8] Lai E C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative posttranscriptional regulation [J]. *Nat Genet*, 2002, 30: 363-364.
- [9] Bartel D P. MicroRNAs. genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- [10] Chiang D Y, Zhang M, Voigt N, et al. Identification of microRNA-mRNA dysregulations in paroxysmal atrial fibrillation [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 184: 190-197.
- [11] Haghikia A, Missol-Kolka E, Tsikas D, et al. Signal transducer and activator of transcription 3-mediated regulation of miR-199a-5p links cardiomyocyte and endothelial cell function in the heart: a key role for ubiquitin-conjugating enzymes [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32: 1287-1297.
- [12] Liu D W, Zhang Y N, Hu H J, et al. Downregulation of microRNA-199a-5p attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cytotoxicity in cardiomyocytes by targeting the HIF1 $\alpha$ -GSK3 $\beta$ -mPTP axis [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5335-5344.
- [13] Zhang H, Li S, Zhou Q, et al. Qiliqiangxin attenuates phenylephrine-induced cardiac hypertrophy through downregulation of MiR-199a-5p [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(5): 1743-1751.
- [14] Yan M, Yang S, Meng F, et al. MicroRNA 199a-5p induces apoptosis by targeting JunB [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6699.
- [15] Zhou L, Zuo Z, Chow M S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45: 1345-1359.

- [16] 王冰瑶, 吴晓燕, 樊官伟. 丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2571-2575.
- [17] Cheng T O. Cardiovascular effects of Danshen [J]. *Int J Cardiol*, 2007, 121: 9-22.
- [18] Wang F, Liu Y Y, Liu L Y, *et al.* The attenuation effect of 3, 4-dihydroxy-phenyl lactic acid and salvianolic acid B on venular thrombosis induced in rat mesentery by photochemical reaction [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2009, 42: 7-18.
- [19] Han J Y, Horie Y, Fan J Y, *et al.* Potential of 3, 4-dihydroxy-phenyl lactic acid for ameliorating ischemia-reperfusion-induced microvascular disturbance in rat mesentery [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296: G36-G44.
- [20] Chan K, Chui S H, Wong D Y, *et al.* Protective effects of Danshensu from the aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (danshen) against homocysteine-induced endothelial dysfunction [J]. *Life Sci*, 2004, 75: 3157-3171.
- [21] Yang G D, Zhang H, Lin R, *et al.* Down-regulation of CD40 gene expression and inhibition of apoptosis with Danshensu in endothelial cells [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009, 104: 87-92.
- [22] Song J Q, Teng X, Cai Y, *et al.* Activation of Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway is involved in intermedin (1-53) protection against myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion [J]. *Apoptosis*, 2009, 14: 1299-1307.
- [23] Yin Y, Guan Y, Duan J, *et al.* Cardioprotective effect of Danshensu against myocardial ischemia/reperfusion injury and inhibits apoptosis of H9c2 cardiomyocytes via Akt and ERK1/2 phosphorylation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 699(1/3): 219-226.
- [24] Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, *et al.* Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72: 152-162.
- [25] Armstrong S C. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 427-436.
- [26] Jae J J, Yu M H, Yong C J. Rutin from *Lonicera japonica* inhibits myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis *in vivo* and protects H9c2 cells against hydrogenperoxide-mediated injury via ERK1/2 and PI3K/Akt signals *in vitro* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47: 1569-1576.
- [27] Latronico M V, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2009, 6: 419-429.
- [28] Rane S, He M, Sayed D, *et al.* Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 2009, 104(7): 879-886.
- [29] Wang H, Gao H, Duan S, *et al.* Inhibition of microRNA-199a-5p reduces the replication of HCV via regulating the pro-survival pathway [J]. *Virus Res*, 2015, 208: 7-12.
- [30] Sun L, Zhu J, Wu M, *et al.* Inhibition of MiR-199a-5p reduced cell proliferation in autosomal dominant polycystic kidney disease through targeting CDKN1C [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 195-200.

[责任编辑 刘东博]