MiR-199a修饰的间充质干细胞来源外泌体通过Akt/HIF-1α/DRP1轴促进缺糖缺氧/复糖复氧模型心肌细胞H9c2线粒体修复

郑君毅[1]，李晓凤[2]，郭绪昆[1]

1. 天津市胸科医院 心内科，天津大学附属胸科医院 心内科，天津市心血管病研究所，天津 300222

2. 天津中医药大学 第二附属医院 心内科，天津 300150

摘 要：目的 探讨miR-199a修饰的间充质干细胞（MSCs）来源的外泌体修复缺糖缺氧/复糖复氧模型心肌细胞H9c2线粒体的作用机制。**方法** 体外培养MSCs，转染miR-199a mimics或miR-NC，48～72 h后收集外泌体，实时荧光定量PCR（qRT-PCR）法检测外泌体的miR-199a水平。将H9c2细胞分为对照组、模型组、miR-199a修饰外泌体（$Exos^{mimic}$，终质量浓度50 μg·mL^{-1}）组、miRNA阴性对照修饰外泌体（$Exos^{NC}$，终质量浓度50 μg·mL^{-1}）组和miR-199a修饰外泌体＋蛋白激酶B（Akt）抑制剂（$Exos^{mimic}$＋MK2206 10 μg·mL^{-1}）组，除对照组外，制备缺糖缺氧/复糖复氧模型。应用CCK-8法检测各组细胞存活率，酶标仪检测各组细胞三磷酸腺苷（ATP）、超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）水平以及上清液8-羟基脱氧尿苷（8-OHdG）、乳酸脱氢酶（LDH）水平；共聚焦显微镜检测各组线粒体膜电位（ΔΨm）和线粒体动力学变化；Western blotting法检测各组缺氧诱导因子1α（HIF-1α）和线粒体动力相关蛋白1（DRP1）蛋白表达变化。**结果** 与对照组比较，$Exos^{mimic}$中*miR-199a*表达水平明显升高（P＜0.05），提取的外泌体直径平均为109.3 nm，浓度为1×10^{6}颗粒·mL^{-1}。与对照组比较，模型组细胞存活率和ATP、SOD、ΔΨm水平显著下降，LDH、MDA、8-OHdG水平和HIF-1α和DRP1蛋白表达水平显著升高（P＜0.01、0.001），线粒体分裂水平增加；与模型组比较，$Exos^{mimic}$组细胞存活率和ATP、SOD和ΔΨm水平显著升高，LDH、MDA、8-OHdG水平和HIF-1α及DRP1蛋白表达水平显著下降（P＜0.01、0.001），线粒体分裂水平减少；MK2206能明显逆转$Exos^{mimic}$效果（P＜0.05、0.01）。**结论** miR-199a修饰的MSCs外泌体通过Akt/HIF-1α/DRP1轴促进缺糖缺氧/复糖复氧心肌细胞线粒体修复。

关键词： miR-199a；外泌体；间充质干细胞；心肌细胞H9c2；缺糖缺氧/复糖复氧；线粒体；Akt/HIF-1α/DRP1轴

中图分类号： R363 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2024）10-2317-09

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.011

MiR-199a-modified mesenchymal stem cell-derived exosomes promote mitochondrial repair in H9c2 cardiomyocytes of hypoxia/reoxygenation model through Akt/HIF-1α/DRP1 axis

ZHENG Junyi[1], LI Xiaofeng[2], GUO Xukun[1]

1. Department of Cardiology, Tianjin Chest Hospital, Tianjin Institute of Cardiovascular Disease, Tianjin 300222, China

2. Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of miR-199a-modified mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosomes in repairing mitochondria of H9c2 cardiomyocytes in a model of hypoglycemia/hypoxia/reoxygenation with hypoglycemia. **Method** Transfect miR-199a mimics or miR-NC into MSCs and collect exosomes 48—72 h later. Fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) method was used to detect miR-199a levels in different exosomes. H9c2 cells were divided into control group, model group, $Exos^{mimic}$ group (final concentration of 50 μg·mL^{-1}), $Exos^{NC}$ group (final concentration of 50 μg·mL^{-1}), and $Exos^{mimic}$+MK2206 (10 μg·mL^{-1}) group. Except for the control group, the model of hypoglycemia/hypoxia/reoxygenation with hypoglycemia was established. The survival rate of cells in each group was detected by CCK8 assay, and the levels of ATP, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in each group

收稿日期： 2024-07-02

基金项目： 国家自然科学基金资助项目（82004329）；天津市医学重点学科（专科）建设项目

第一作者： 郑君毅（1979—），男，副主任医师，主要从事心血管疾病临床和基础研究。E-mail：junyi_zh@163.com

were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The changes of mitochondrial membrane potential (ΔΨm) and dynamics were detected by confocal microscopy. The expression changes of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and mitochondrial dynamics-related protein 1 (DRP1) were detected by Western blotting. **Result** Compared with control group, the expression level of miR-199a in Exos^{mimic} was significantly increased ($P < 0.05$), and the average diameter of extracted exosomes was 109.3 nm, with a concentration of 1×10^6 particles·mL^{-1}. Compared with control group, the model group showed a significant decrease in cell survival rate and ATP, SOD, and ΔΨm levels, while LDH, MDA, 8-OHdG levels, HIF-1α and DRP1 protein expression levels were significantly increased ($P < 0.01$, 0.001), and mitochondrial division levels were increased. Compared with model group, the Exos^{mimic} group showed a significant increase in cell survival rate, ATP, SOD, and ΔΨm levels, while LDH, MDA, 8-OHdG levels, HIF-1α, and DRP1 protein expression levels were significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001), and mitochondrial division levels were reduced. MK2206 can significantly reverse the Exos^{mimic} effect ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** miR-199a modified MSCs exosomes exert mitochondrial protective effects by AKT/HIF-1α/DRP1 axis.

Key words: miR-199a; exosomes; mesenchymal stem cell; H9c2 cardiomyocyte; hypoxia/reoxygenation; mitochondria; Akt/HIF-1α/DRP1 axis

微小RNA（miRNA）是约20 nt寡核糖核苷酸，通过特异性靶向mRNA诱导其降解或抑制翻译实现转录后基因调节，具有高度保守性[1]。miR-199a是心肌细胞缺氧时的重要调节因子，通过腺相关病毒载体过表达miR-199a的前体miRNA基因可以刺激心肌细胞的增殖，减少心肌梗死后心力衰竭的发生率，但是miR-199a的持续和不受控制的表达能够导致严重的心律失常性猝死[2]。因此，寻找有效的、新的miR-199a携带方式，严格控制其表达也许可以为心肌梗死提供新的治疗方式。

外泌体是一种纳米囊泡（30～150 nm），可以携带多种生物分子，包括DNA、RNA、蛋白质和脂质，从而能够同时调节多个生物过程[3]。外泌体具有更小的尺寸，可以更容易地到达受损的心肌组织。采用基因修饰的方法提高外泌体的miRNA载量，通过iv的方式进行治疗，不仅可以解决miRNA传递效率低下的问题，还可以增强外泌体的治疗靶向性和特异性，大大提高了临床的可用性[4]。本实验旨在建立心肌细胞缺糖缺氧/复糖复氧模型，探讨miR-199a修饰间充质干细胞（MSCs）外泌体对心肌细胞线粒体的保护作用。

1 材料

1.1 细胞

大鼠心肌细胞株H9c2，购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂

蛋白激酶B（Akt）抑制剂MK2206（货号S1078）购自Selleck公司；miR-199a mimic和阴性对照片段购自上海吉玛公司；RNA提取试剂Trizol、转染试剂脂质体Lipofectamine 3 000、青/链霉素、细胞培养液、胎牛血清和0.05% 胰酶/EDTA购自美国Thermofisher公司；ATP检测试剂盒、线粒体膜电位（ΔΨm）检测试剂盒、RIPA、5×loading buffer、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和BCA蛋白定量试剂盒购自索来宝公司；乳酸脱氢酶（LDH）、丙二醛（MDA）试剂盒购自碧云天生物技术有限公司；超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒购自南京建成生物有限公司；8-羟基脱氧鸟苷酸（8-OHdG）试剂盒购自酶联生物科技有有限公司；CCK-8检测试剂购自日本同仁公司；逆转录试剂盒、SYBR Green qPCR试剂盒购自全式金公司；miRcute miRNA提取分离试剂盒、miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA试剂盒和miRcute Plus miRNA qPCR试剂盒购自天根公司；兔源低氧诱导因子-1α（HIF-1α）和动力相关蛋白1抗体（DRP1）一抗购自CST公司；小鼠源GAPDH一抗、辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔和羊抗小鼠二抗购自proteinteck公司；ECL化学发光试剂盒购自Millipore公司。

1.3 主要仪器

HT7800透射电子显微镜（日本日立公司）；NS300纳米粒子追踪分析（英国莫尔文公司）；XPN-100超速离心机（美国贝克曼公司）；SpectraMax190多功能酶标仪（美国美谷公司）；LSM800激光扫描共聚焦显微镜（德国蔡司公司）；LightCycler 480荧光定量PCR仪（瑞士罗氏公司）；FX7凝胶成像仪（法国Vilber公司）。

1.4 实验动物

3～4周体质量100 g左右的雄性大鼠，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号SCXK（京）-2021-0006，动物实验经中国医学科学院放射医学研究所伦理委员会批准，编号

IRM-DWLL-2023190。

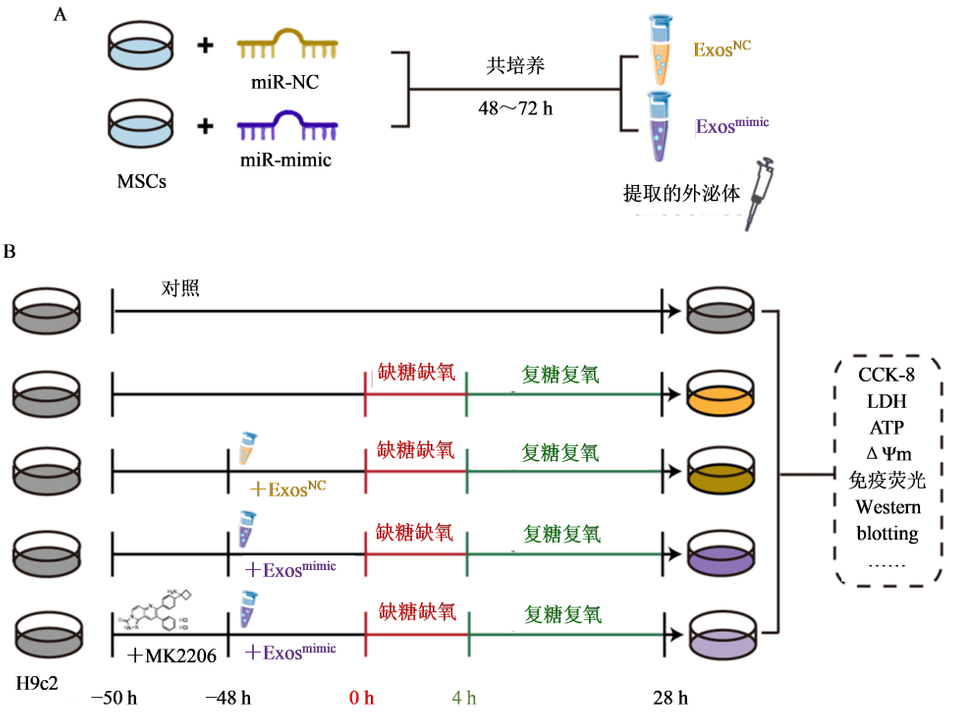
2 方法

2.1 MSCs培养和转染

在无菌条件下，从体质量100 g左右的雄性大鼠中分离股骨和胫骨的骨髓，使用磷酸盐缓冲液（PBS）充分冲洗并收集冲洗液，冲洗液在4 ℃、1 000×*g*离心5 min，弃上清，PBS重悬沉淀物并进行细胞计数，制成浓度为$1\times10^{7}\cdot mL^{-1}$的细胞悬液，将其接种于含15%胎牛血清（FBS）的DMEM/F12培养液中，于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养。每3天更换1次培养液，当细胞融合达85%左右时，进行消化和传代，此即为提取的骨髓MSCs。取第3代生长状态良好的MSCs，当细胞融合达75%左右时，用Lipofectamine 3000和Opti-MEM试剂将100 nmol·L^{-1} miR-NC或者miR-199a mimic转染MSCs，继续培养48～72 h后，提取外泌体后进行后续实验。

2.2 外泌体的提取及鉴定

外泌体的提取流程图见图1-A。收集转染miR-NC或者miR-199a mimic后培养的MSCs上清液，依次经过500×*g*离心10 min、2 000×*g*离心20 min和5 000×*g*离心30 min，将离心后收集的上清液用0.2 μm滤器滤过，在超速离心机中以4 ℃、130 000×*g*离心2 h，收集沉淀并重悬于PBS中，再以4 ℃、130 000×*g*超离心2 h，获得纯化的外泌体$Exos^{NC}$（转染miR-NC的MSCs来源的外泌体）和$Exos^{mimic}$（转染miR-199a mimic的MSCs来源的外泌体）。



A-miR-NC或miR-199a mimic转染MSCs，并提取不同外泌体的流程示意图；B-心肌细胞实验分组和检测指标流程示意图。

A-Schematic diagram of miR-NC or miR-199a mimic transfection of MSCs and extraction of exosomes; B-Schematic diagram of grouping and detection process for myocardial cell experiment.

图1 本实验流程图

Fig. 1 Flow chart of study

同法提取不转染的MSCs来源的外泌体作为对照，实时荧光定量PCR（qRT-PCR）法检测3种外泌体中miR-199a的表达水平。根据miRcute miRNA提取分离试剂盒说明书提取外泌体miRNA，依次使用miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA试剂盒和miRcute Plus miRNA qPCR试剂盒将miRNA逆转录成cDNA后进行qRT-PCR检测。PCR扩增条件为：95 ℃预变性15 min，94 ℃变性15 s，55 ℃退火30 s，70 ℃延伸30 s，扩增50个循环。以秀丽隐杆线虫的miR-39（*Cel-miR-39*）作为检测外参[9]，以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算外泌体中*miR-199a*水平。引物序列见表1。

取重悬于PBS中的外泌体20 μL滴在碳支持膜铜网上，室温放置5 min后，用滤纸吸去多余的液体，染色3 min，再次用滤纸吸去多余液体，室温干燥后，使用透射电子显微镜观察外泌体的形态，使用纳米粒子追踪分析检测外泌体溶液中的颗粒

表1 qRT-PCR实验使用的引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

引物名称	序列（3'→5'）
miR-199a 正向	GTCACAGTAGTCTGCACAT
miR-199a 反向	GTGCAGGGTCCGAGGT
Cel-miR-39-3p 正向	GGGTCACCGGGTGTAAATC
Cel-miR-39-3p 反向	GAGAGGAGAGGAAGAGGGAA

数和尺寸分布。

2.3 心肌细胞缺糖缺氧/复糖复氧模型制作和分组

按照文献报道方法培养H9c2心肌细胞[5]：将在液氮中冻存的细胞复苏并接种于完全培养液（含有10% FBS、1%青链霉素、1 mmol·L^{-1}丙酮酸钠、4.5 g·L^{-1}葡萄糖的DMEM）中，于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养。每2～3天传代1次，将对数生长期的细胞按照每孔1.5×10^5个的密度接种在6孔板中，分为对照组、模型组、$Exos^{NC}$组、$Exos^{mimic}$组、$Exos^{mimic}$＋MK2206组。对照组正常培养；模型组将细胞培养液换为缺糖培养液（不含FBS、葡萄糖和丙酮酸钠的DMEM培养液），在缺氧培养箱中缺氧（94% N_2，1% O_2，5% CO_2）处理4 h，取出细胞复糖复氧（正常培养）24 h；$Exos^{NC}$组：加入100 μg $Exos^{NC}$（终质量浓度50 μg·mL^{-1}）[6-7]，37 ℃培养48 h后进行造模；$Exos^{mimic}$组：加入100 μg $Exos^{mimic}$（终质量浓度50 μg·mL^{-1}）[6-7]，37 ℃培养48 h后造模；$Exos^{mimic}$＋MK2206组：加入$Exos^{mimic}$前2 h加入MK2206溶液（终质量浓度10 μg·mL^{-1}）[8]，37 ℃培养2 h后加100 μg $Exos^{mimic}$，37 ℃培养48 h后造模。流程图见图1-B。

2.4 细胞存活率检测

将细胞按照每孔5×10^3个的密度接种在96孔板中，造模及给药操作同“2.3”项。各组实验结束后，每孔加入CCK-8溶液20 μL，37 ℃继续孵育4 h，用酶标仪测定溶解液在450 nm波长处的吸光度（*A*）值，计算细胞存活率。

$$细胞存活率=A_{实验}/A_{对照}$$

2.5 ATP含量检测

将细胞按照每孔1.5×10^5个的密度接种在6孔板中，造模及给药操作同“2.3”项。实验结束后，弃掉细胞上清，向6孔板的每个孔中加入200 μL裂解液。用移液管反复吹打以确保细胞裂解完全。将各孔细胞裂解混合液转移到新的Eppendorf管中，4 °C下12 000×*g*离心5 min，提取细胞总蛋白。使用BCA蛋白质浓度试剂盒测定蛋白浓度。根据试剂盒的说明书，检测板中每孔加入100 μL ATP检测工作液，室温放置3～5 min后加入20 μL样品总蛋白或标准品，迅速混匀后立刻放入多功能酶标仪中检测。根据标准曲线和蛋白浓度，计算样品中1 mg总蛋白中的ATP含量。

2.6 LDH、MDA、SOD和8-OHdG检测

将细胞按照每孔1.5×10^5个的密度接种在6孔板中，造模及给药操作同“2.3”项。分别收集各组细胞用于MDA和SOD检测，收集各组细胞上清液用于LDH和8-OHdG检测，按照检测试剂盒说明书进行操作，建立标准曲线，于多功能酶标仪相应波长处测量各组*A*值，计算出LDH、MDA、SOD和8-OHdG的含量。

2.7 共聚焦显微镜观察线粒体分裂

将细胞按照每孔3×10^4个的密度接种在24孔板细胞爬片中，造模及给药操作同“2.3”项。实验前48 h使用DsRed Mito标记细胞中的活线粒体。实验结束后去除培养基并用PBS洗涤细胞3次后，向每个孔中加入500 μL 4%多聚甲醛，在室温下孵育15 min。用PBS洗涤细胞3次，以去除残留的多聚甲醛。细胞核用4',6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）复染，并用盖玻片固定。使用激光扫描共聚焦显微镜进行成像。

2.8 ΔΨm的检测

将细胞按照每孔5×10^3个的密度接种在外径35 mm的共聚焦显微镜专用培养皿中，造模及给药操作同“2.3”项。按照带有JC-1的ΔΨm测定试剂盒说明书操作，在造模结束后吸弃细胞上清液，用PBS洗涤细胞2次，加入500 μL细胞培养液。加入500 μL JC-1染色工作液，充分混匀，将细胞在37 °C下孵育20 min。用JC-1染色缓冲液洗涤沉淀2次后，加入1 mL细胞培养液。使用激光扫描共聚焦显微镜进行成像。

2.9 Western blotting法检测蛋白表达

取按照“2.5”项方法提取的总蛋白，使用5× loading buffer进行变性后取20 μg进行SDS-PAGE电泳和转膜。在室温下用5%牛血清白蛋白（BSA）封闭含有总蛋白的聚偏二氟乙烯（PVDF）膜2 h，根据蛋白marker相对分子质量大小切取包含HIF-1α、DRP1或者GAPDH蛋白条带的PVDF膜，分别加入抗HIF-1α、DRP1（1∶1 000）或GAPDH（1∶10 000）抗体4 ℃孵育过夜。取出孵育好的PVDF膜用1×TBST洗膜3次，每次15 min，加入HRP标记二抗（1∶10 000），室温孵育1 h。再次用1×TBST洗膜3次后，在含有靶蛋白的PVDF膜上滴加1 mL ECL化学

发光液反应1 min后，在凝胶成像仪上进行化学模式曝光，扫描目的条带灰度值，以GAPDH为内参分析HIF-1α和DRP1蛋白表达水平。

2.10 统计学方法

应用SPSS 11.5软件处理数据，符合正态分布的计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，多组比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用LSD-t检验。

3 结果

3.1 外泌体miR-199a修饰效果检测

qRT-PCR结果（表2）显示，与对照组比较Exos^{NC}中*miR-199a*表达水平没有统计学差异，Exos^{mimic}中*miR-199a*表达水平明显升高（$P<0.05$）。

3.2 外泌体鉴定

透射电子显微镜扫描结果可见直径30～150 nm的囊泡（图2-A），符合外泌体的大小。纳米粒子追踪分析结果显示，提取的外泌体直径平均为109.3 nm，浓度为1×10^{6}颗粒·mL^{-1}（图2-B）。

表2 外泌体miR-199a修饰效果比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 2 Comparison of miR-199a content between groups ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	*miR-199a/Cel-miR-39*
对照	1.00±0.20
Exos^{NC}	1.02±0.26
Exos^{mimic}	4.87±0.68*

与对照组比较：$^{*}P<0.05$。

$^{*}P<0.05$ *vs* control group.

3.3 各组心肌细胞存活率、LDH和ATP比较

与对照组比较，模型组细胞存活率和ATP水平显著降低，LDH水平升高（$P<0.01$、0.001）；与模型组比较，Exos^{mimic}组细胞存活率和ATP水平显著升高，LDH水平显著降低（$P<0.01$、0.001）。与Exos^{mimic}组比较，Exos^{mimic}＋MK2206组细胞存活率和ATP水平显著降低，LDH水平显著升高（$P<0.01$）。结果见图3。

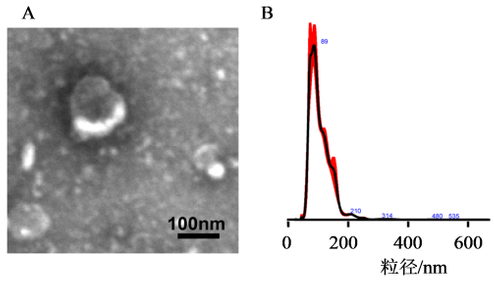
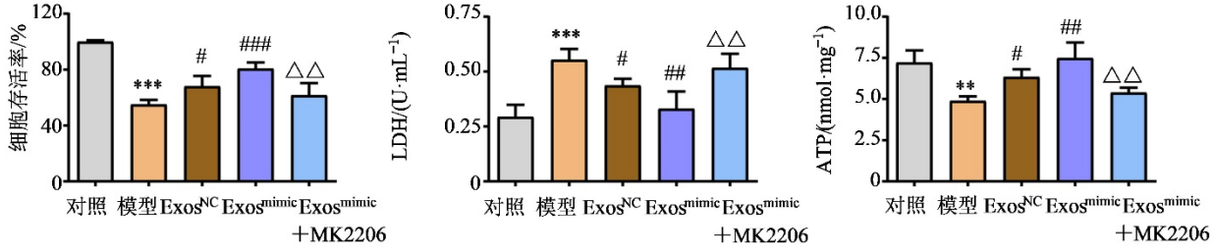


图2 MSCs来源外泌体形态观察（A，×6 000）及粒径分析（B）

Fig. 2 Morphological observation (A, ×6 000) and particle size analysis (B) of exosomes derived from MSCs



与对照组比较：$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$；与Exos^{mimic}组比较：$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ *vs* control group；$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* model group；$^{\triangle\triangle}P<0.01$ *vs* Exos^{mimic} group.

图3 各组细胞细胞存活率、LDH和ATP比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 3 Comparison of cell viability, LDH and ATP in each group ($\bar{x}\pm s$, n=3)

3.4 各组心肌细胞MDA、8-OHdG和SOD比较

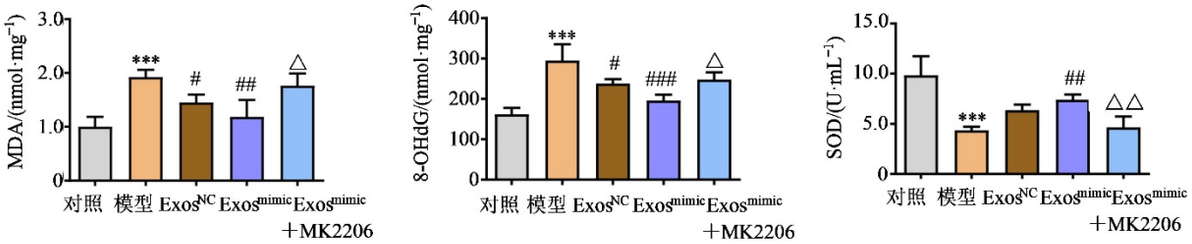
与对照组比较，模型组MDA和8-OHdG水平显著升高，SOD水平显著降低（$P<0.001$）；与模型组比较，Exos^{mimic}组细胞MDA和8-OHdG水平显著降低（$P<0.01$、0.001），SOD水平显著升高（$P<0.01$）；MK2206能显著逆转Exos^{mimic}的效果（$P<0.05$、0.01）。见图4。

3.5 ΔΨm检测结果

与对照组比较，模型组红色荧光强度明显减弱，绿色荧光强度明显增强（$P<0.001$）；与模型组和Exos^{NC}组比较，Exos^{mimic}组红色荧光强度明显增强，绿色荧光强度明显减弱（$P<0.01$）；与Exos^{mimic}组比较，MK2206组红色荧光强度明显减弱，绿色荧光强度明显增强（$P<0.01$）。见图5。

3.6 共聚焦观察线粒体动力学变化

对照组心肌细胞线粒体分裂与融合处于平衡状态，线粒体呈长的丝状结构，可见点状结构；与对照组比较，模型组心肌细胞线粒体分裂增多，点状结构明显增多；与模型组比较，Exos^{NC}组心肌细胞线粒体分裂与融合无明显变化；与模型组和Exos^{NC}组

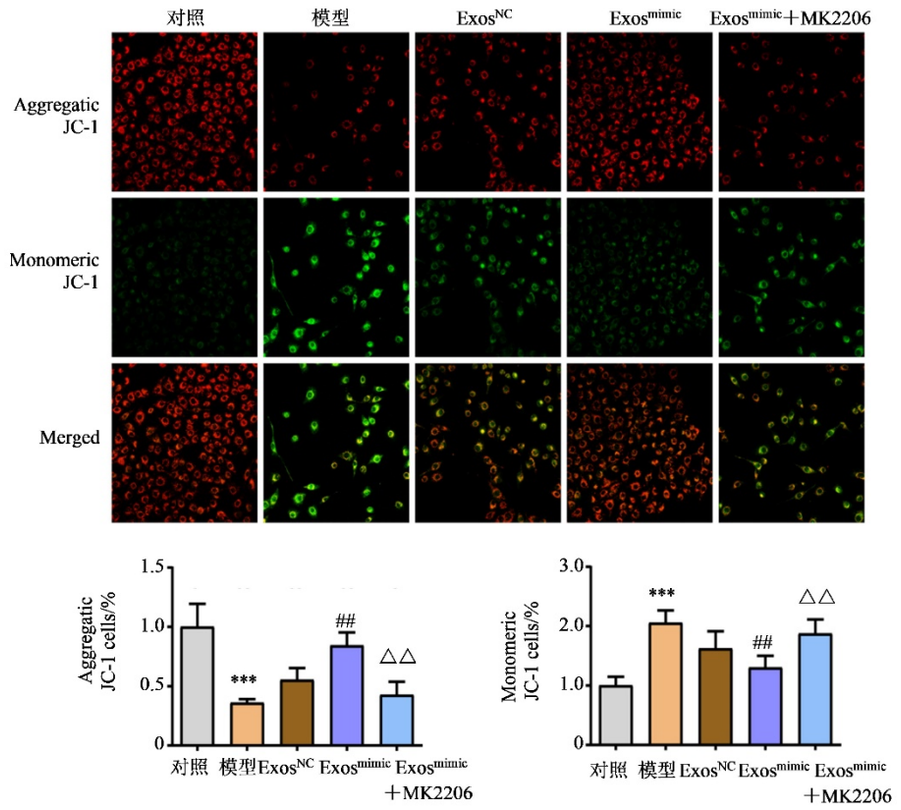


与对照组比较：$^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$；与 $Exos^{mimic}$ 组比较：$^{\triangle}P<0.05$ $^{\triangle\triangle}P<0.01$。

$^{***}P<0.001$ *vs* control group；$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* model group；$^{\triangle}P<0.05$ $^{\triangle\triangle}P<0.01$ *vs* $Exos^{mimic}$ group.

图 4 各组细胞 MDA、8-OHdG 和 SOD 比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 4 Comparison of MDA, 8-OHdG, and SOD in each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）



与对照组比较：$^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#\#}P<0.01$；与 $Exos^{mimic}$ 组比较：$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

$^{***}P<0.001$ *vs* control group；$^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group；$^{\triangle\triangle}P<0.01$ *vs* $Exos^{mimic}$ group.

图 5 激光共聚焦检测各组细胞 ΔΨm 情况（$\bar{x}\pm s$，n=3，×20）

Fig. 5 Laser confocal images of ΔΨm of each group ($\bar{x}\pm s$, n=3, ×20)

比较，$Exos^{mimic}$ 组心肌细胞线粒体融合增多，长的丝状结构明显增多；与 $Exos^{mimic}$ 组比较，MK2206 能明显增加线粒体分裂。见图 6。

3.7 各组蛋白表达水平比较

与对照组比较，模型组 HIF-1α 和 DRP1 蛋白表达水平明显升高（$P<0.001$）；与模型组比较，$Exos^{NC}$ 组 HIF-1α 和 DRP1 蛋白表达水平无明显变化；与模型组和 $Exos^{NC}$ 组比较，$Exos^{mimic}$ 组 HIF-1α 和 DRP1 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$、0.001）；与 $Exos^{mimic}$ 组比较，MK2206 组 HIF-1α 和 DRP1 蛋白表达水平明显升高（$P<0.05$、0.01）。结果见图 7。

4 讨论

心肌缺血再灌注损伤过程中，线粒体对缺血时的低氧水平和再灌注过程中产生的活性氧（ROS）非常敏感，常常导致线粒体功能丧失。研究显示，miRNA 通过转录后机制调控缺氧诱发的信号通路，在线粒体的保护方面显示了巨大的潜力。Zhang 等[10]采用氧糖剥夺建立人心肌细胞系 AC16 的缺氧损伤模型，发现 miR-1203 通过激活 ANT2/mTOR/PGC-1α 反馈回路减轻线粒体损伤。在高脂饮食建立的大鼠动脉粥样硬化模型中，怡脉颗粒通过下调 miRNA-125a-5p 的表达，激活 Pink1-Mfn2-Parkin 介

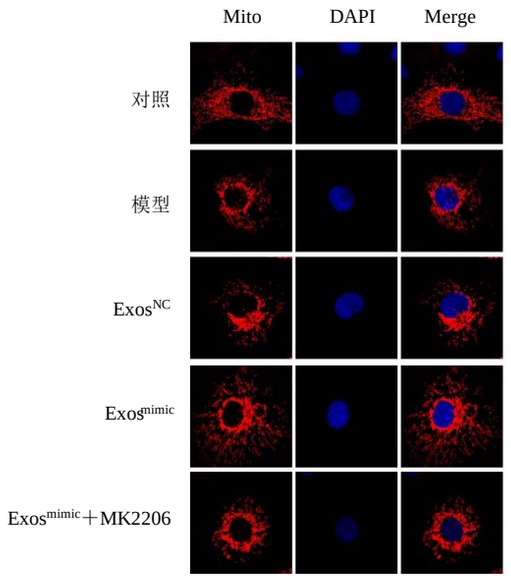
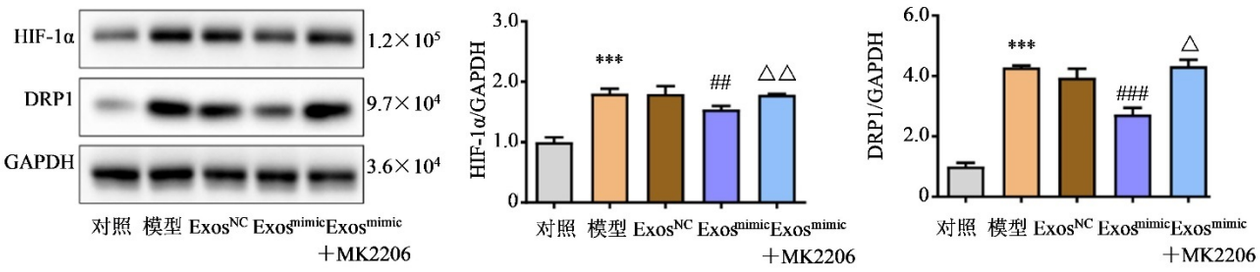


图6 激光共聚焦检测各组细胞线粒体动力学情况（×63）

Fig.6 Laser confocal images of mitochondrial dynamic of each group (×63)

导的线粒体自噬，调节炎症因子、血管收缩因子和血脂水平，从而缓解动脉粥样硬化[11]。本研究发现，过表达miR-199a可以促进缺血再灌注心肌细胞ATP的生成、升高线粒体膜电位，促进线粒体的融合。虽然本研究在体外心肌细胞的培养和缺血再灌注损伤的制作上与Zhang等[9]和Kong等[10]并不完全相同，但是都证实了miRNA在调节线粒体的功能中具有重要的作用。

MiR-199a通过调节多种信号通路参与不同疾病的发生发展，且逐渐成为多种疾病潜在的治疗靶点。Erfan等[12]发现，在克罗恩病和溃疡性结肠炎等炎症性肠病的患者中，血液循环中miR-199a的表达水平均较高，不仅通过介导核因子-κB在炎症性肠病中发挥作用，而且具有炎症性肠病的诊断生物标志物的特异性。在小鼠异种移植的弥漫性胃癌模型中，胃癌细胞中miR-199a表达加速了癌细胞的生长速度、活力和运动性，增加了肿瘤体积和质量。



与对照组比较：$^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$；与Exos^{mimic}组比较：$^{\triangle}P<0.05$ $^{\triangle\triangle}P<0.01$。

$^{***}P<0.001$ *vs* control group; $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* model group; $^{\triangle}P<0.05$ $^{\triangle\triangle}P<0.01$ *vs* Exos^{mimic} group.

图7 Western blotting检测各组细胞HIF-1α和DRP1蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 7 Western blotting assay of HIF-1α and DRP1 proteins ($\bar{x}\pm s$, n=3)

高表达水平的miR-199a不仅与淋巴血管浸润增强、T期晚期和淋巴结转移相关，而且可以区分胃黏膜中早期和晚期弥漫性胃癌，成为胃癌进展的病理标志物[13]。Guo等[14]发现过表达miR-199a可通过靶向HIF-1α缓解阻塞性睡眠呼吸暂停综合征相关高血压氧化酶应激和炎症，成为一种新的潜在治疗靶点。Gabisonia等[2]在猪心肌梗死区周围注射携带miR-199a的腺病毒相关病毒（AAV）可以刺激心肌细胞去分化和增殖，减少梗死面积，减少心肌纤维化，提高心脏功能，但较长时间的观察中，AAV载体介导的miR-199a的持续和不受控制的表达导致了大多数治疗猪的心律失常猝死。因此，使用miR-199a作为基因工具需要寻找有效的、新的携带方式。

携带生物活性miRNA的外泌体是近年来的研究热点，是药物和分子递送的天然纳米载体[7]。外泌体可以包裹miRNAs，这种生物膜结构保护miRNAs不被降解，从而使miRNAs更容易被内吞[15]。使用人羊膜干细胞来源的外泌体（hASC-Exos）治疗皮肤色素沉着过度时，研究人员通过测序发现，hASC-Exos富含miR-199a，通过激活自噬促进黑色素体降解抑制皮肤色素沉着过度[16]。Lee等[17]发现MSCs来源的外泌体通过其富含的miR-199a作用于sp1/p53信号通路提高存活素表达，保护心肌细胞免受多柔比星诱导的心肌病，且miR-199a表达水平受到Akt的调控。

为了实现外泌体的卓越治疗效果，已有多种工程化外泌体作为靶向miR-199a递送载体[18-20]。通过慢病毒感染和嘌呤霉素选择构建miR-199a修饰的脂肪组织来源的MSCs的外泌体（AMSC-Exo-199a），可有效介导miR-199a递送并靶向抑制mTOR通路，可改善HCC细胞对化疗药物敏感性。此外，静脉注射的AMSC-Exo-199a可以分布到肿瘤

组织，并显着增加阿霉素（Dox）在体内对 HCC 细胞的作用[7]。基因工程人诱导多能干细胞（hiPS）和表达 miR-199a 的脐带间充质干细胞（UC-MSCs）来源的外泌体，均能有效地将 miRNA 转移给受体心脏成纤维细胞，减少细胞凋亡、降低促炎细胞因子对心脏成纤维细胞表现出细胞保护作用[21]。MiRNA 模拟物修饰的工程化的细胞外囊泡介导的 miR-199a-3p 递送增加了 3D 打印心脏贴片的生存能力[20]。过表达 miR-199a-5p 的人脐带 MSCs 来源的外泌体（HMSCs-Exo）比 HMSCs-Exo 能更有效地减少人肺泡上皮细胞和小鼠急性肺损伤模型中的 ROS、脂质过氧化产物和增加抗氧化酶的活性，在降低肺细胞氧化应激和凋亡中发挥了重要作用[21]。这些都说明外泌体不仅提高了 miR-199a 传递效率和靶向性，还可通过静脉注射的方式给药，使其更具临床可行性。

在心脏疾病的研究中，miR-199a 主要集中在调控心肌细胞的增殖和纤维化，对线粒体的调控报道较少。本实验初步探索了 miR-199a 修饰的 MSCs 外泌体促进缺氧心肌细胞线粒体修复的机制，证实 miR-199a 可以调控 HIF-1α 表达水平，进一步调控线粒体分裂蛋白 DRP1 的表达，从而调节线粒体的分裂与融合，发挥心肌保护机制，以期为 miR-199a 治疗心肌梗死提供新的治疗靶点和理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 周菲, 庄敏之, 吴瑛. 黄芩苷联合奥沙利铂调控 miR-433-3p/SRC 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(3): 529-537.
Zhou F, Zhuang M Z, Wu Y. Mechanism of regulation of miR-433-3p/SRC by baicalin combined with oxaliplatin on proliferation and invasion of gastric cancer cells [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(3): 529-537.

[2] Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro G D, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs [J]. Nature, 2019, 569 (7756): 418-422.

[3] Gotoh S, Kawabori M, Fujimura M. Intranasal administration of stem cell-derived exosomes for central nervous system diseases [J]. Neural Regen Res, 2024, 19 (6): 1249-1255.

[4] Moghassemi S, Dadashzadeh A, Sousa M J, et al. Extracellular vesicles in nanomedicine and regenerative medicine: A review over the last decade [J]. Bioact Mater, 2024, 36: 126-156.

[5] 郑君毅, 张莹莹, 刘园园, 等. FUNDC1 通过调控线粒体分裂影响高糖损伤 H9c2 心肌细胞凋亡的机制研究 [J]. 天津医药, 2022, 50(8): 791-795.
Zheng J Y, Zhang Y Y, Liu Y Y, et al. Mechanism of FUNDC1 affacting apoptosis of H9c2 cardiomyocytes with high glucose injury by regulating mitochondrial fission [J]. Tianjin Med J, 2022, 50(8): 791-795.

[6] 闫霖, 陆珏秀, 罗颖, 等. BM-MSCs 来源外泌体介导铁死亡减轻大鼠心肌细胞系 H9c2 缺氧/复氧损伤 [J]. 基础医学与临床, 2023, 43(5): 771-776.
Yan L, Lu J X, Luo Y, et al. Protective effect of BM-MSCs-derived exosome-mediated ferroptosis against Anoxia-reoxygenation injury in rat cardiomyoblastl cell line H9c2 [J]. Basic Clin Med, 2023, 43(5): 771-776.

[7] Lou G H, Chen L, Xia C X, et al. MiR-199a-modified exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve hepatocellular carcinoma chemosensitivity through mTOR pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 4.

[8] Zhao L G, Li P L, Dai Y, et al. Mibefradil alleviates high-glucose-induced cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2020, 76(2): 246-254.

[9] 孙铃, 朱文武, 张健, 等. MiR-133a-3p 修饰的间充质干细胞外泌体促进心肌梗死后大鼠心肌修复 [J]. 中华心血管病杂志, 2024, 52(1): 72-78.
Sun L, Zhu W W, Zhang J, et al. Exosomes derived from miR-133a-3p engineered mesenchymal stem cells promote myocardial repair in rats after acute myocardial infarction [J]. Chin J Cardiol, 2024, 52(1): 72-78.

[10] Zhang M, Yang Y Z, Zhu Z, et al. Implications of activating the ANT2/mTOR/PGC-1α feedback loop: Insights into mitochondria-mediated injury in hypoxic myocardial cells [J]. Curr Issues Mol Biol, 2023, 45(11): 8633-8651.

[11] Kong D Z, Sun P, Lu Y, et al. Yi Mai granule improve energy supply of endothelial cells in atherosclerosis via miRNA-125a-5p regulating mitochondrial autophagy through Pink1-Mfn2-Parkin pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117114.

[12] Erfan, Shaker O G, Khalil M A F, et al. Circulating miR-199a and long noncoding-RNA ANRIL as promising diagnostic biomarkers for inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2024, 30(9): 1500-1509.

[13] Hong S A, Lee S, Park J, et al. MiR-199a and miR-199b facilitate diffuse gastric cancer progression by targeting Frizzled-6 [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 17480.

[14] Guo C Y, Zhang M H, Su W, et al. MiR-199a-5p relieves obstructive sleep apnea syndrome-related hypertension by targeting HIF-1α [J]. J Immunol Res, 2022, 2022:

7236647.

[15] Hu S J, Zhu M, Xing H Y, et al. Thread-structural microneedles loaded with engineered exosomes for annulus fibrosus repair by regulating mitophagy recovery and extracellular matrix homeostasis [J]. Bioact Mater, 2024, 37: 1-13.

[16] Wang X Y, Guan X H, Yu Z P, et al. Human amniotic stem cells-derived exosmal miR-181a-5p and miR-199a inhibit melanogenesis and promote melanosome degradation in skin hyperpigmentation, respectively [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 501.

[17] Lee J Y, Chung J, Byun Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles protect cardiomyocytes from Doxorubicin-induced cardiomyopathy by upregulating survivin expression via the miR-199a-3p-Akt-Sp1/p53 signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 7102.

[18] Zhao S, Xiu G H, Wang J, et al. Engineering exosomes derived from subcutaneous fat MSCs specially promote cartilage repair as miR-199a-3p delivery vehicles in Osteoarthritis [J]. J Nanobiotechnol, 2023, 21(1): 341.

[19] Kmiotek-Wasylewska K, Bobis-Wozowicz S, Karnas E, et al. Anti-inflammatory, anti-fibrotic and pro-cardiomyogenic effects of genetically engineered extracellular vesicles enriched in miR-1 and miR-199a on human cardiac fibroblasts [J]. Stem Cell Rev Rep, 2023, 19(8): 2756-2773.

[20] Bar A, Kryukov O, Etzion S, et al. 316Engineered extracellular vesicle-mediated delivery of miR-199a-3p increases the viability of 3D-printed cardiac patches [J]. Int J Bioprint, 2023, 9(2): 670.

[21] Gong C C, Gu Z Y, Zhang X K, et al. HMSCs exosome-derived miR-199a-5p attenuates sulfur mustard-associated oxidative stress via the CAV1/NRF2 signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(15): 2165-2182.

[责任编辑 兰新新]