

芍药内酯苷通过调控 *miR-219a-5p* 减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤

李霞, 王成, 侯永兰, 王建美, 金卫东*
新乡市中心医院 心血管内科, 河南 新乡 453000

摘要:目的 探讨芍药内酯苷改善缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 诱导的心肌细胞损伤的作用机制。方法 H/R 诱导大鼠 H9c2 心肌细胞建立心肌缺血再灌注损伤模型, 给予芍药内酯苷干预, 检测丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性; 流式细胞术测定细胞凋亡率; Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达; qRT-PCR 检测 *miR-219a-5p* 表达。转染 *miR-219a-5p* mimics 或 anti-*miR-219a-5p*, 考察下调 *miR-219a-5p* 对芍药内酯苷改善 H/R 诱导的心肌细胞损伤作用的影响。体内建立缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 小鼠模型, 给予芍药内酯苷干预, 检测血清中肌酸激酶同工酶 (creatinase isoenzyme, CK-MB) 活性和心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 水平; 检测心肌组织 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色考察心肌组织病理变化; 采用 TTC 染色检测心肌组织梗死情况。**结果** 与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞 MDA 水平、细胞凋亡率及剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.05$), 而 *miR-219a-5p* 表达、SOD、GSH-Px 活性显著下降 ($P < 0.05$); 给予芍药内酯苷干预后, MDA 水平、细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), *miR-219a-5p* 表达、SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性; 下调 *miR-219a-5p* 表达后, 显著逆转了芍药内酯苷对 H/R 诱导的心肌细胞损伤的抑制作用 ($P < 0.05$)。体内结果与体外结果一致, 芍药内酯苷显著缓解了 I/R 引发的小鼠心肌组织损伤和凋亡。**结论** 芍药内酯苷通过调控 *miR-219a-5p* 表达而抑制心肌细胞氧化应激及凋亡, 从而减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

关键词: 芍药内酯苷; *miR-219a-5p*; 缺氧/复氧; 心肌细胞; 细胞凋亡; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)12-4327-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.016

Albiflorin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by modulating *miR-219a-5p*

LI Xia, WANG Cheng, HOU Yonglan, WANG Jianmei, JIN Weidong

Department of Cardiovascular Medicine, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of albiflorin on improving hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced myocardial cell injury. **Methods** H/R was used to induce H9c2 cardiomyocytes to establish a myocardial ischemia-reperfusion injury model. Albiflorin was used to intervene, the level of malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected; Flow cytometry was used to measure the apoptosis rate of cells; Western blotting was used to detect the expressions of apoptosis-related proteins; qRT-PCR was used to detect the expression of *miR-219a-5p*. *miR-219a-5p* mimetics or anti-*miR-219a-5p* was transfected to investigate the effect of down-regulating of *miR-219a-5p* on improvement of H/R-induced myocardial cell injury by albiflorin. An ischemia-reperfusion (I/R) mouse model *in vivo* was established, albiflorin was used to intervene, creatine kinase isoenzyme (CK-MB) activity and cardiac troponin T (cTnT) level in serum were detected; Levels of MDA and activities of SOD and GSH-Px in myocardial tissue were detected; Hematoxylin eosin (HE) staining was used to investigate pathological changes in myocardial tissue; TTC staining was used to detect myocardial tissue infarction. **Results** Compared with control group, MDA level, apoptosis rate, and expression levels of cleaved cysteine aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) and cleaved Caspase-9 proteins in H9c2 cells of model group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression of *miR-219a-*

收稿日期: 2025-01-07

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20230886)

作者简介: 李霞, 主治医师, 硕士, 研究方向为心血管疾病研究。E-mail: lixia2689@163.com

*通信作者: 金卫东, 主任医师, 硕士, 研究方向为心血管疾病研究。E-mail: Doctorjin123456@163.com

5p, SOD and GSH Px activities were significantly decreased ($P < 0.05$); After intervention with albiflorin, MDA level, apoptosis rate, and expressions of apoptosis related proteins were significantly reduced ($P < 0.05$), while *miR-219a-5p* expression, SOD and GSH Px activity were significantly increased ($P < 0.05$), and showed a dose-dependent relationship; After down-regulating the expression of *miR-219a-5p*, the inhibitory effect of albiflorin on I/R-induced myocardial cell injury was significantly reversed ($P < 0.05$). The *in vivo* and *in vitro* results were consistent, albiflorin significantly alleviated myocardial tissue damage and apoptosis induced by I/R.

Conclusion Albiflorin inhibits oxidative stress and apoptosis of myocardial cells by regulating the expression of *miR-219a-5p*, thereby alleviating I/R-induced myocardial cell damage.

Key Words: albiflorin; *miR-219a-5p*; hypoxia/reoxygenation; cardiomyocytes; apoptosis; oxidative stress

经皮冠状动脉支架植入术是冠心病、急性心肌梗死等多种心血管疾病的主要治疗方式之一,但心肌组织恢复血流供养后会发生心肌缺血再灌注损伤,从而引起心律失常等不良反应的发生^[1-2]。目前已有研究表明心肌细胞凋亡、氧化应激是造成细胞损伤的重要原因。许多中药被证实可以用于缓解心肌缺血再灌注损伤^[3-4]。芍药内酯苷是白芍 *Paeoniae Radix Alba* 的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化等作用^[5-6]。研究发现,芍药内酯苷可以抑制肝组织炎症和氧化应激从而减轻肝细胞损伤^[7]。但芍药内酯苷对心肌缺血再灌注损伤的影响及其潜在作用机制尚未可知。微小 RNA (microRNA, miRNA) 广泛存在于生物体内,可以通过抑制靶 mRNA 的翻译及表达从而调控细胞增殖、凋亡等生物学过程。研究表明 *miR-219a-5p* 在肝缺血再灌注损伤中表达降低,其过表达可减轻肝缺血再灌注损伤^[8]。但 *miR-219a-5p* 对心肌缺血再灌注损伤的影响尚不清楚。因此,本研究探讨芍药内酯苷是否通过调控 *miR-219a-5p* 表达影响心肌细胞损伤。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,购自湖南斯莱克精达实验室,合格证号 No.430727230101959046。本研究经新乡市中心医院伦理委员会批准(批准号 2023-202)。

大鼠 H9c2 心肌细胞(批号 CL-0089)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

芍药内酯苷(质量分数>98%,批号 39011-90-0)购自武汉欣欣佳丽生物科技有限公司;DMEM 培养基(批号 12100046)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,批号 A5670701)购自美国 Gibco 生物公司;反转录试剂盒(批号 KR116、KR211)、SYBR Green 试剂盒(批号 FP313)购自北京天根生化有限公司;Lipofectamine2000(批号 11668019)、

Trizol 试剂(批号 15596018CN)购自美国 Invitrogen 公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号 A003-1-2)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase SOD)检测试剂盒(批号 A001-3-2)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(批号 A005-1-2)购自南京建成科技有限公司;miR-NC (5'-UUCUCCGAACGUGUCAC-GUTT-3')、miR-219a-5p mimics (5'-UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU-3')、anti-miR-NC (5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3')、anti-miR-219a-5p (5'-AGAAUUGCGUUUGGACAAUCA-3') 购自广州市锐博生物科技有限公司;细胞凋亡检测试剂盒(批号 CA1040)购自北京索莱宝科技有限公司;剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)抗体(批号 ab32042)、cleaved Caspase-9 抗体(批号 ab32539)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 ab9485)、二抗(批号 ab150077)购自英国 Abcam 公司;肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)ELISA 试剂盒(批号 E-EL-M0355)、心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)ELISA 试剂盒(批号 E-EL-M1801)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 仪器

ProFlex 型实时定量 PCR 仪、E-Gel sizeselect 型电泳仪[赛默飞(中国)有限公司];DTX880 型酶标仪、chemiDOCXRS+ 凝胶成像分析仪、CytoFLEX SRT 型流式细胞仪[贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司];BZ-X810 型倒置显微镜(日本基恩士有限公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物分组、给药与缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型的构建 C57BL/6 小鼠随机分

为假手术组、模型组和芍药内酯苷(100 mg/kg)^[9]组,每组6只,小鼠造模前ig给予芍药内酯苷或生理盐水预处理7 d。按照文献方法^[10]制备I/R模型。小鼠ip 0.3%戊巴比妥钠麻醉后,于仰卧位固定,进行左侧开胸手术,打开心包,并使用压力控制呼吸机通气;左前降支冠状动脉用7-0号丝线结扎,缝合线末端用短聚乙烯管(PE10)穿过形成圈套;心肌缺血时夹紧套管,再灌注时松开套管。假手术组小鼠进行相同的手术,但不夹闭左心室动脉。为了模拟体内心肌I/R,小鼠心脏缺血45 min并再灌注24 h。

2.1.2 血清CK-MB活性和cTnT水平的检测 小鼠再灌注结束后,采血,4℃离心10 min,取上清液。按照试剂盒说明书测定血清中CK-MB活性和cTnT水平。

2.1.3 心肌组织MDA水平及SOD、GSH-Px活性的检测 实验结束后,对小鼠实施安乐死,从主动脉根部切下心脏,立即放入4℃预冷的PBS中冲洗血液。采用试剂盒说明书检测心肌组织MDA水平及SOD、GSH-Px活性。

2.1.4 qRT-PCR检测心肌组织miR-219a-5p mRNA表达 取缺血区心肌组织,采用Trizol试剂提取总RNA,反转录合成cDNA后进行qRT-PCR反应。应用实时荧光定量PCR仪检测miR-219a-5p相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成,引物序列:miR-219a-5p正向引物5'-GCCGAGTGATTGTCCAAAC-3',反向引物5'-CTCAACTGGTGTCTGGGA-3';U6正向引物5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTAA-3',反向引物5'-TATGGAACGCTTCACGAATTTGC-3'。

2.1.5 苏木素-伊红(HE)染色 将小鼠心脏用4%多聚甲醛进行固定,石蜡包埋后,切成5 μm厚的切片。然后进行HE染色,并于显微镜下进行观察和拍照。

2.1.6 TTC染色 小鼠心脏用预冷PBS冲洗,将心脏沿左心室长轴切成2~3 mm厚的薄片。切片平铺于培养皿中,完全浸没于1% TTC溶液,于37℃恒温箱中避光振荡染色20 min。PBS漂洗,浸入4%多聚甲醛固定24 h,拍照记录。使用Image J图像分析软件对照片进行处理,由于正常组织被TTC染成红色,在灰度图像中表现为较亮区域,而梗死组织未被染色呈白色,在灰度图像中为较暗区域。统计梗死区域和正常区域的面积,计算梗死面积占整

个组织面积的百分比。

梗死面积百分比=梗死区域面积/整个组织切片面积

2.2 体外实验

2.2.1 细胞缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型的构建 H9c2细胞用含10% FBS的DMEM培养基,于5% CO₂、37℃的培养箱内培养,当细胞融合度达到80%~90%时,使用0.25%胰蛋白酶消化后进行常规传代培养。取对数生长期的H9c2细胞,离心重悬后调整细胞密度为1×10⁴个/mL。将细胞用不含血清的DMEM培养基,置于95% N₂、5% CO₂、37℃的培养箱内缺氧培养6 h;随后更换为含10% FBS的DMEM培养基,置于5% CO₂、37℃的培养箱内复氧培养24 h^[11]。

2.2.2 细胞分组与给药 取对数生长期的H9c2细胞,以5×10³个/孔接种于96孔板。设置对照组、模型组和芍药内酯苷(25、50、100 μmol/L)组,各给药组加入相应药物培养24 h^[11],对照组和模型组加入不含药物的培养基。药物干预24 h后,除对照组外其余各组进行H/R处理。

H9c2细胞用Lipofectamine2000转染miR-NC、miR-219a-5p mimics、anti-miR-NC、anti-miR-219a-5p 24 h,分别记为miR-NC组、miR-219a-5p组、anti-miR-NC组、anti-miR-219a-5p组。细胞用Lipofectamine2000转染miR-NC、miR-219a-5p mimics 24 h后,再进行H/R处理,记为H/R+miR-NC组、H/R+miR-219a-5p组。细胞转染anti-miR-NC、anti-miR-219a-5p 24 h后,用含100 μmol/L芍药内酯苷的培养基培养24 h,再进行H/R处理,分别记为H/R+芍药内酯苷+anti-miR-NC组、H/R+芍药内酯苷+anti-miR-219a-5p组。

2.2.3 MDA水平及SOD、GSH-Px活性的检测 收集细胞,采用反复冻融法裂解细胞,按照试剂盒说明书检测MDA水平及SOD、GSH-Px活性。

2.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 收集细胞,用结合缓冲液重悬,加入5 μL Annexin V-FITC、5 μL PI孵育10 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.2.5 qRT-PCR检测miR-219a-5p mRNA表达 收集细胞,利用qRT-PCR实验方法检测miR-219a-5p相对表达量。

2.2.6 Western blotting检测cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9蛋白表达 收集细胞,加入RIPA裂解液提取总蛋白,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,封闭后,分别

加入 cleaved Caspase-3 (1 : 800)、cleaved Caspase-9 (1 : 800)、GAPDH (1 : 2000) 抗体, 4 ℃ 孵育过夜; 洗膜后加入二抗, 室温孵育 2 h, 暗室内曝光显影, 分析条带灰度值。

2.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析, 采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据。

3 结果

3.1 芍药内酯苷抑制 I/R 诱导的小鼠心肌组织损伤

如图 1 所示, 假手术组小鼠心肌纤维排列规则, 无断裂或坏死间隙, 心肌细胞核呈纺锤形或椭圆形; 模型组小鼠心肌纤维结构受损, 心肌纤维断裂、溶解, 肌间隙增大; 与模型组比较, 芍药内酯苷组心肌纤维结构的破坏有所改善。如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心脏组织的左室前壁可见楔形白色梗死灶, 梗死面积显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 芍药内酯苷组心肌组织梗死面积显著减少 ($P < 0.05$)。如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心肌组织 *miR-219a-5p* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 血清 CK-MB 活性及 cTnT

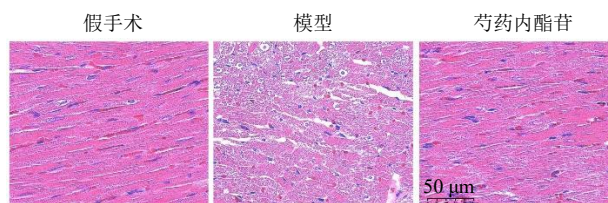


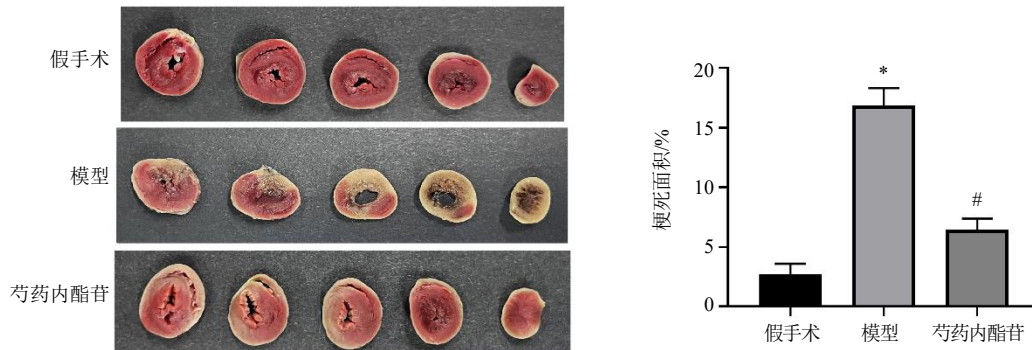
图 1 各组小鼠心脏组织病理变化 (HE, ×400)

Fig. 1 Pathological changes in cardiac tissue of mice in each group (HE, × 400)

水平显著升高 ($P < 0.05$), 心肌组织 SOD、GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.05$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 芍药内酯苷组心肌组织 *miR-219a-5p* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 血清 CK-MB 活性及 cTnT 水平显著降低 ($P < 0.05$), 心肌组织 SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05$), MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$)。以上表明芍药内酯苷能够抑制 I/R 诱导的小鼠心肌组织损伤。

3.2 芍药内酯苷抑制 H/R 诱导的心肌细胞氧化应激

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$), SOD、GSH-Px 活性显著



与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 2 各组小鼠心肌梗死面积比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Comparison of myocardial infarction area of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 1 芍药内酯苷抑制 I/R 诱导的小鼠心肌组织损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Albiflorin inhibits myocardial tissue damage in mice induced by I/R ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	<i>miR-219a-5p</i> mRNA 相对表达量	CK-MB/ (pg·mL ⁻¹)	cTnT/(pg·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/ (U·mL ⁻¹)
假手术	—	1.00 ± 0.00	89.15 ± 10.11	71.62 ± 7.45	7.56 ± 0.75	56.91 ± 6.14	41.22 ± 5.28
模型	—	0.23 ± 0.03*	2 638.36 ± 271.22*	327.21 ± 36.14*	38.69 ± 1.28*	25.63 ± 3.14*	14.26 ± 2.21*
芍药内酯苷	100	0.77 ± 0.08#	185.67 ± 20.63#	136.79 ± 14.59#	10.21 ± 1.02#	46.88 ± 4.63#	33.14 ± 4.28#

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs model group.

表 2 芍药内酯苷抑制 H/R 诱导的心肌细胞氧化应激 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Albiflorin inhibits H/R-induced oxidative stress in cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	MDA/ $(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$	SOD/ $(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$	GSH-Px/ $(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$
对照	—	5.85 ± 0.51	78.97 ± 6.71	62.68 ± 4.76
模型	—	$43.71 \pm 4.23^*$	$24.21 \pm 2.21^*$	$12.43 \pm 1.19^*$
芍药内酯苷	25	$33.23 \pm 3.01^\#$	$39.15 \pm 3.65^\#$	$27.01 \pm 2.49^\#$
	50	$23.11 \pm 2.32^\#$	$54.04 \pm 4.14^\#$	$40.28 \pm 3.65^\#$
	100	$9.66 \pm 0.83^\#$	$66.24 \pm 4.56^\#$	$53.61 \pm 4.53^\#$

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $^\#P < 0.05$, 表 3、4 同。

* $P < 0.05$ vs control group; $^\#P < 0.05$ vs model group, same as tables 3, 4.

降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 芍药内酯苷各剂量组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$), SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

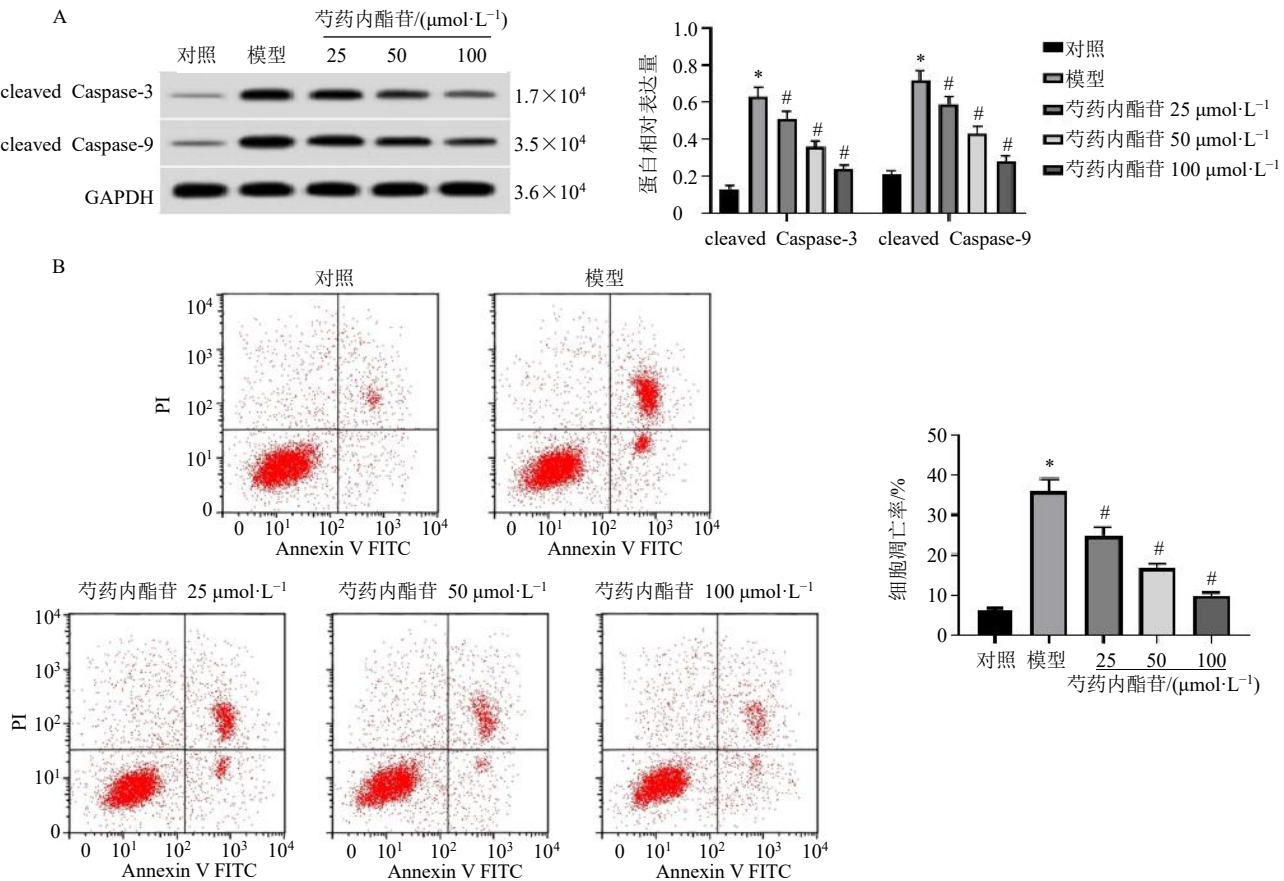
3.3 芍药内酯苷抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率及 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 芍药内酯苷各剂量组细胞凋亡率及 cleaved Caspase-3、

cleaved Caspase-9 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

3.4 芍药内酯苷上调 H/R 诱导的心肌细胞中 miR-219a-5p 表达

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组 miR-219a-5p mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 芍药内酯苷各剂量组 miR-219a-5p mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。



A-Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达; B-流式细胞仪检测细胞凋亡, 下图同; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $^\#P < 0.05$ 。

A-expressions of apoptosis-related proteins detected by Western blotting; B-cell apoptosis detected by flow cytometry, same as below figures; * $P < 0.05$ vs control group; $^\#P < 0.05$ vs model group.

图 3 芍药内酯苷对 H/R 诱导的心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 3 Effect of albiflorin on H/R-induced apoptosis of cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

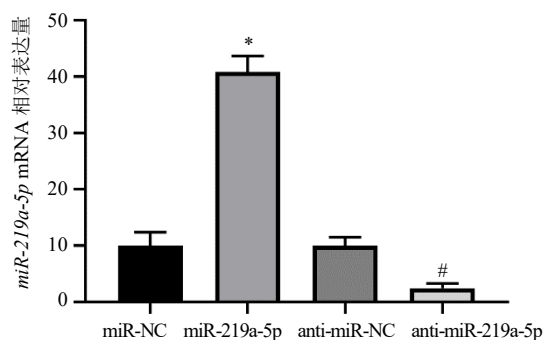
表 3 芍药内酯苷上调 H/R 诱导的心肌细胞中 *miR-219a-5p* 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 Albiflorin up-regulated expression of *miR-219a-5p* in cardiomyocytes induced by H/R ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>miR-219a-5p</i> mRNA 相对 表达量
对照	—	1.00 ± 0.00
模型	—	0.28 ± 0.03*
芍药内酯苷	25	0.42 ± 0.03#
	50	0.57 ± 0.04#
	100	0.73 ± 0.06#

3.5 *miR-219a-5p* 过表达抑制 H/R 诱导的心肌细胞损伤

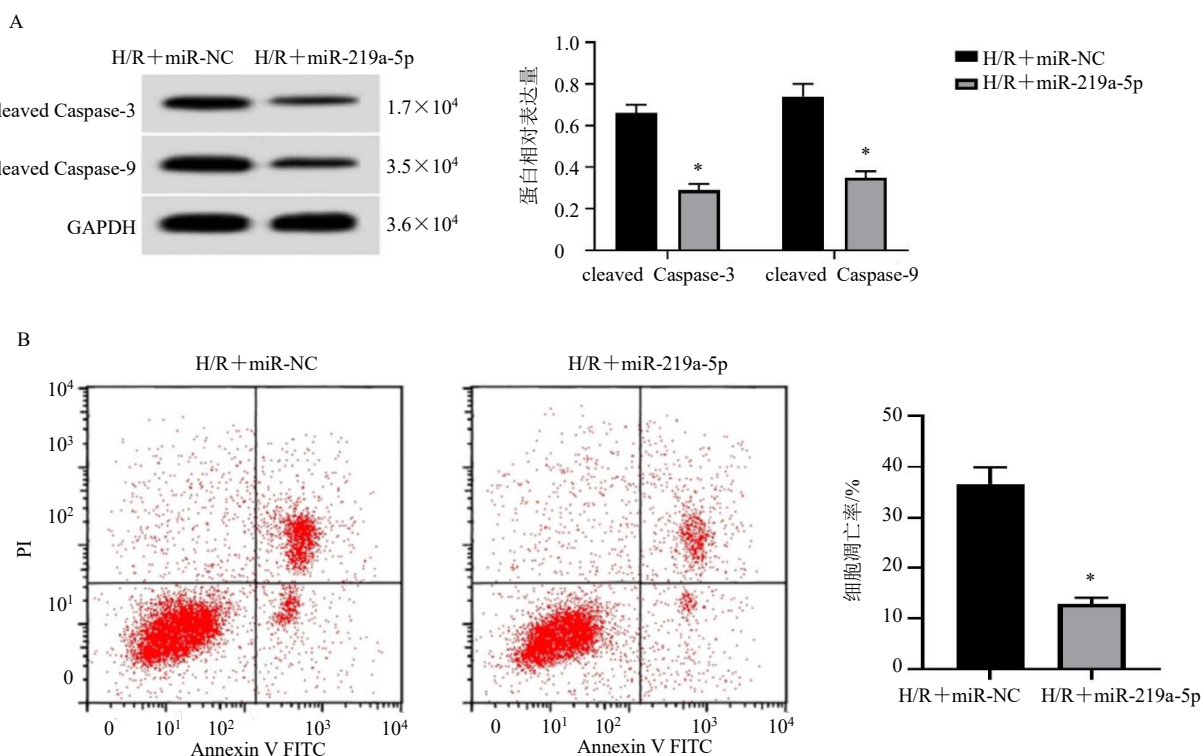
H9c2 细胞分别转染 *miR-NC*、*miR-219a-5p* mimics、*anti-miR-NC*、*anti-miR-219a-5p* 24 h, 如图 4 所示, 与 *miR-NC* 组比较, *miR-219a-5p* 组 *miR-219a-5p* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 *anti-miR-NC* 组比较, *anti-miR-219a-5p* 组 *miR-219a-5p* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。细胞转染 *miR-NC*、*miR-219a-5p* mimics 24 h 后, 再进行 H/R 处理, 如图 5 和表 4 所示, 与 H/R + *miR-NC* 组比



与 *miR-NC* 组比较: * $P < 0.05$; 与 *anti-miR-NC* 组比较: # $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs *miR-NC* group; # $P < 0.05$ vs *anti-miR-NC* group.

图 4 qRT-PCR 检测 *miR-219a-5p* 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Fig. 4 Expression of *miR-219a-5p* detected by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

较, H/R + *miR-219a-5p* 组 MDA 水平、细胞凋亡率及 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.05$)。表明 *miR-219a-5p* 过表达抑制 H/R 诱导的心肌细胞损伤。



与 H/R + *miR-NC* 组比较: * $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs H/R + *miR-NC* group.

图 5 *miR-219a-5p* 抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 5 *miR-219a-5p* inhibits H/R-induced apoptosis of cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

表4 miR-219a-5p 抑制 H/R 诱导的心肌细胞损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 4 miR-219a-5p inhibits H/R-induced damage of cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	miR-219a-5p mRNA 相对表达量	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/(U·mL ⁻¹)
H/R+miR-NC	1.00±0.00	47.41±3.86	23.19±2.19	10.74±0.99
H/R+miR-219a-5p	2.93±0.24*	14.98±1.13*	58.07±4.39*	47.14±4.56*

与 H/R+miR-NC 组比较: *P<0.05。

*P<0.05 vs H/R+miR-NC group.

3.6 下调 miR-219a-5p 逆转了芍药内酯苷对 H/R 诱导的心肌细胞损伤的抑制作用

H9c2 细胞分别转染 anti-miR-NC、anti-miR-219a-5p 24 h 后, 给予 100 μmol/L 芍药内酯苷培养 24 h, 再进行 H/R 处理, 如图 6 和表 5 所示, 与 H/R+芍药内酯苷+anti-miR-NC 组比较, H/R+芍

药内酯苷+anti-miR-219a-5p 组 H9c2 细胞 MDA 水平、细胞凋亡率及 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达水平显著升高(P<0.05), SOD、GSH-Px 活性显著降低(P<0.05)。表明下调 miR-219a-5p 逆转了芍药内酯苷对 H/R 诱导的心肌细胞损伤的抑制作用。

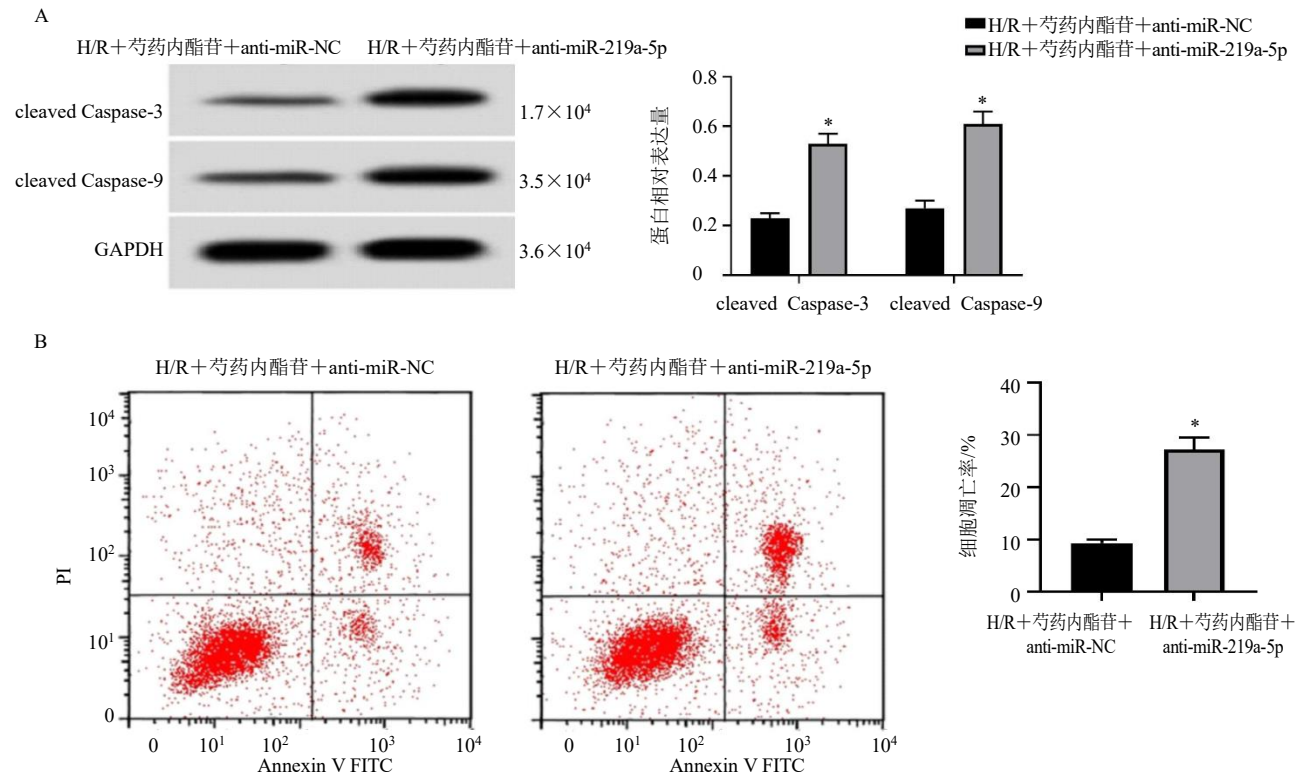


图6 下调 miR-219a-5p 逆转了芍药内酯苷对 H/R 诱导的心肌细胞凋亡的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 6 Down-regulated of miR-219a-5p reverses effect of albiflorin on H/R-induced apoptosis of cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

表5 下调 miR-219a-5p 逆转了芍药内酯苷对 H/R 诱导的心肌细胞损伤的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 5 Down-regulated of miR-219a-5p reverses effect of albiflorin on H/R-induced damage of cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ (μmol·L ⁻¹)	miR-219a-5p mRNA 相对表达量	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/ (U·mL ⁻¹)
H/R+芍药内酯苷+anti-miR-NC	100	1.00±0.00	9.42±0.62	68.85±4.69	54.37±5.09
H/R+芍药内酯苷+anti-miR-219a-5p	100	0.25±0.02*	32.66±3.12*	35.64±3.14*	24.19±2.22*

与 H/R+芍药内酯苷+anti-miR-NC 组比较: *P<0.05。

*P<0.05 vs H/R+albiflorin+anti-miR-NC group.

4 讨论

目前尚无预防心肌缺血再灌注损伤的有效方法。中药具有作用效果好且不良反应小等优点,已被用于减轻心肌缺血再灌注损伤,但关于其具体作用机制尚未完全阐明^[12-13]。研究表明 miRNA 在 H/R 诱导的心肌细胞中表达异常,并可与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 结合而抑制靶基因的表达,还可通过调节心肌细胞增殖及凋亡而参与心肌缺血再灌注损伤过程^[14-15]。但 miRNA 是否可作为中药治疗心肌缺血再灌注损伤的潜在靶点尚需进一步验证。

芍药内酯苷具有抗炎、抗氧化等作用,可以通过抑制炎症反应而减轻神经细胞损伤^[16-17]。芍药内酯苷通过调节赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶 1 (lysine specific demethylase 1, LSD1) 介导的小胶质细胞激活和铁死亡,减轻脊髓损伤后的神经炎症并改善功能恢复^[18]。然而,芍药内酯苷是否影响 H/R 诱导的心肌细胞损伤暂不清楚。与既往研究结果一致^[19-20],本研究发现 H/R 诱导的心肌细胞中 MDA 水平、细胞凋亡率及 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 蛋白表达升高,而 SOD、GSH-Px 活性降低,表明心肌缺血再灌注损伤模型诱导成功;芍药内酯苷干预后 H/R 诱导的心肌细胞损伤得到改善,且呈剂量相关性,表明芍药内酯苷可以抑制 H/R 诱导的心肌细胞氧化应激和凋亡从而减轻心肌细胞损伤。本研究 I/R 小鼠模型心肌组织中 MDA 水平和血清中 CK-MB 活性、cTnT 水平升高,SOD、GSH-Px 活性降低,表明 I/R 模型制备成功。与体外实验结果一致,芍药内酯苷可以提高 I/R 小鼠模型心肌组织中 SOD、GSH-Px 活性,降低 MDA 水平,进一步验证了芍药内酯苷能够缓解 H/R 诱导的心肌细胞氧化应激。同时,在体内实验中结果证实了芍药内酯苷处理能够降低 I/R 小鼠模型心肌损伤的 2 种生物标志物(血清 CK-MB 和 cTnT)的表达,心肌组织的 HE 染色结果也证实了芍药内酯苷可以显著缓解 I/R 模型引发的心肌损伤。*miR-219a-5p* 在脑缺血再灌注损伤小鼠模型中低表达,上调其表达可以抑制脑缺血再灌注损伤^[21]。*miR-219a-5p* 在慢性酒精性肝病中表达下调,原儿茶酸通过上调其表达抑制氧化应激反应而减轻慢性酒精性肝损伤^[22]。*miR-219a-5p* 在炎症性肠病中呈低表达,上调其表达可抑制炎症反应而减轻肠道损伤^[23]。本研究结果显示,芍药内酯苷能够以浓度相关性的方式上调 H/R 诱导的心肌细胞中 *miR-219a-5p* 表达,提示芍

药内酯苷上调 *miR-219a-5p* 表达而减轻心肌细胞损伤。与体外实验结果一致,芍药内酯苷可以提高 I/R 小鼠模型 *miR-219a-5p* 表达。此外,*miR-219a-5p* 过表达可增强 H/R 诱导的心肌细胞抗氧化和抗凋亡能力,而敲低其表达可逆转芍药内酯苷对 H/R 诱导的心肌细胞损伤的抑制作用。提示芍药内酯苷促进 *miR-219a-5p* 表达而抑制 H/R 诱导的心肌细胞损伤。miRNA 作为长度为 18~24 个核苷酸的非编码内源性 RNA 分子,可在翻译调控和抑制特定 mRNA 方面发挥重要作用。一些文献已经表明了 *miR-219a-5p* 可以通过调控靶基因如 *Pde4d*^[21] 和 *TP53BP2*^[8],来改善脑缺血/再灌注损伤和肝脏缺血/再灌注损伤。因此在未来的研究中,将进一步探讨是否存在 *miR-219a-5p* 的靶基因来参与介导芍药内酯苷对 H/R 诱导的心肌细胞损伤的保护作用。此外,本研究也因样本量较小、实验周期较短等存在一定的局限性。

综上,本研究发现芍药内酯苷上调 *miR-219a-5p* 表达,进而抑制 H/R 诱导的心肌细胞氧化应激及凋亡。*miR-219a-5p* 可能作为芍药内酯苷治疗心肌缺血再灌注损伤的潜在靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu Y, Li L, Wang Z, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury; Molecular mechanisms and prevention [J]. *Microvasc Res*, 2023, 149: 104565.
- [2] Wang L P, Qiu S W, Li X, et al. Myocardial-targeting tannic cerium nanocatalyst attenuates ischemia/reperfusion injury [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62(39): e202305576.
- [3] Wang M, Li L X, Tang S, et al. Qilong capsule prevents myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting platelet activation via the platelet CD36 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 330: 118211.
- [4] Zhao X P, Yang F, Wu H, et al. Zhilong Huoxue Tongyu Capsule improves myocardial ischemia/reperfusion injury via the PI3K/AKT/Nrf2 axis [J]. *PLoS One*, 2024, 19(4): e0302650.
- [5] Gao Y, Chen Y M, Wang N, et al. Albiflorin ameliorates neuroinflammation and exerts neuroprotective effects in Parkinson's disease models [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2025, 47(2): 201-212.
- [6] Lu C W, Lin T Y, Chang Y Y, et al. Albiflorin decreases glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) through depressing P/Q-type calcium

- channels and protein kinase A activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(16): 8846.
- [7] Li H T, Zeng X P, Sun D J, *et al.* Albiflorin alleviates severe acute pancreatitis-associated liver injury by inactivating P38MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biochem Genet*, 2024, 62(6): 4987-5003.
- [8] Xiao Y, Zhang S H, Li Q, *et al.* miR-219a-5p ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury via impairing TP53BP2 [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(8): 2177-2186.
- [9] Xie T, Li K, Gong X, *et al.* Paeoniflorin protects against liver ischemia/reperfusion injury in mice via inhibiting HMGB1-TLR4 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(11): 2247-2255.
- [10] Chai R N, Ye Z L, Xue W J, *et al.* Tanshinone IIA inhibits cardiomyocyte pyroptosis through TLR4/NF- κ B p65 pathway after acute myocardial infarction [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1252942.
- [11] Qu Z Z, Pang X C, Mei Z T, *et al.* The positive feedback loop of the NAT10/Mybbp1a/p53 axis promotes cardiomyocyte ferroptosis to exacerbate cardiac I/R injury [J]. *Redox Biol*, 2024, 72: 103145.
- [12] Liu Z X, Han X, You Y, *et al.* Shuangshen Ningxin Formula attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury through improving mitochondrial function [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 323: 117690.
- [13] Wei Y R, Hou Y L, Yin Y J, *et al.* Tongxinluo activates PI3K/AKT signaling pathway to inhibit endothelial mesenchymal transition and attenuate myocardial fibrosis after ischemia-reperfusion in mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2024, 30(7): 608-615.
- [14] Wang L Y, Liu J, Wang Z R, *et al.* Dexmedetomidine abates myocardial ischemia reperfusion injury through inhibition of pyroptosis via regulation of miR-665/MEF2D/Nrf2 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115255.
- [15] Xu T D, Zhang Y Y, Liao G G, *et al.* Luteolin pretreatment ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by lncRNA-JPX/miR-146b axis [J]. *Anal Cell Pathol*, 2023, 2023: 4500810.
- [16] Ou Z J, Li P Y, Wu L L, *et al.* Albiflorin alleviates neuroinflammation of rats after MCAO via PGK1/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 137: 112439.
- [17] 王秋艳, 王世新, 隋方宇, 等. 白芍活性成分、药理作用及成分变化的影响因素研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(5): 1817-1829.
- [18] Zhang L Y, Xu J, Yin S, *et al.* Albiflorin attenuates neuroinflammation and improves functional recovery after spinal cord injury through regulating LSD1-mediated microglial activation and ferroptosis [J]. *Inflammation*, 2024, 47(4): 1313-1327.
- [19] Zhu X, Wu Y B, Zhang X G, *et al.* Stachydrine ameliorates hypoxia reoxygenation injury of cardiomyocyte via enhancing SIRT1-Nrf2 pathway [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2023, 18(1): 265.
- [20] Su Y, Zhao L L, Lei D L, *et al.* Inhibition of circ_0073932 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via miR-493-3p/FAF1/JNK [J]. *Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2024, 60(6): 628-643.
- [21] Lu M Y, Wu J R, Liang R B, *et al.* Upregulation of miR-219a-5p decreases cerebral ischemia/reperfusion injury *in vitro* by targeting Pde4d [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(6): 104801.
- [22] Fu R, Zhou J J, Wang R W, *et al.* Protocatechuic acid-mediated miR-219a-5p activation inhibits the p66shc oxidant pathway to alleviate alcoholic liver injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3527809.
- [23] Shi Y, Dai S L, Qiu C Y, *et al.* microRNA-219a-5p suppresses intestinal inflammation through inhibiting Th1/Th17-mediated immune responses in inflammatory bowel disease [J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 13(2): 303-312.

[责任编辑 李亚楠]