

盛静宇,朱海根,王丽. miR-433-3p 通过调控 MAPK8 蛋白在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞损伤中发挥保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 63-70.

Sheng JY, Zhu HG, Wang L. miRNA-433-3p protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury to cardiac myocytes by targeting MAPK8 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 63-70.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 009

# miR-433-3p 通过调控 MAPK8 蛋白在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞损伤中发挥保护作用

盛静宇<sup>1,2</sup>, 朱海根<sup>2\*</sup>, 王 丽<sup>3</sup>

(1. 江苏大学附属武进医院 徐州医科大学武进临床学院心电学科, 江苏 常州 213000;  
2. 江苏大学附属武进医院 徐州医科大学武进临床学院全科医学科, 江苏 常州 213000;  
3. 常州德安医院院感科, 江苏 常州 213000)

**【摘要】 目的** 探究 miR-433-3p 在过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 诱导的大鼠心肌细胞(H9c2) 损伤中的作用及具体机制的研究。**方法** 构建氧化应激损伤模型, 以 H9c2 心肌细胞为研究对象, 通过转染 miR-433-3p 模拟物(miR-433-3p mimics)、miRNA 阴性对照(miR-NC)、阴性对照(pcDNA-NC) 和 MAPK8 过表达质粒(pcDNA-MAPK8) 至 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 细胞中, 将细胞分为对照组(Control)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miRNA 阴性对照组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p 模拟物组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p 模拟物 + pcDNA 阴性对照组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics + pcDNA-NC) 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p 模拟物 + MAPK8 过表达组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics + pcDNA-MAPK8)。采用 qRT-PCR 法检测 miR-433-3p 和 MAPK8 在 H9c2 细胞中的 mRNA 表达水平。MTT 法和 ELISA 试剂盒分别检测细胞活性和乳酸脱氢酶(LDH) 释放量。Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、MAPK8 和 GAPDH 的蛋白表达水平。双荧光素酶报告实验检测 miR-433-3p 与 MAPK8 之间的靶向关系。**结果** 与对照组相比, miR-433-3p 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 中低表达。相比较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组, miR-433-3p 过表达可以显著降低 LDH 释放量并增强细胞活力。此外, 相比较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组, miR-433-3p 过表达可以显著降低促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase-3 的表达水平, 而促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平。双荧光素酶报告实验显示 miR-433-3p 可以靶向结合 MAPK8 并负调控 MAPK8 的表达。过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 细胞活性损伤和细胞凋亡的抑制作用。**结论** miR-433-3p 通过负靶向调控 MAPK8 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞损伤中发挥保护作用。

**【关键词】** miR-433-3p; H9c2 心肌细胞; MAPK8

**【中图分类号】** R-33      **【文献标识码】** A      **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0063-08

## miRNA-433-3p protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury to cardiac myocytes by targeting MAPK8

SHENG Jingyu<sup>1,2</sup>, ZHU Haigen<sup>2\*</sup>, WANG Li<sup>3</sup>

(1. Department of Electrophysiology, Wujin Clinical College of Xuzhou Medical University, Wujin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Changzhou 213000, China. 2. Department of General Medicine, Wujin Clinical College of Xuzhou Medical University, Wujin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Changzhou 213000.  
3. Department of Hospital-acquired Infection Control, Changzhou De'an Hospital, Changzhou 213000)

**【基金项目】** 常州市科技应用基础研究计划资助项目(CJ20160001)。

**【作者简介】** 盛静宇(1979—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 心血管疾病。E-mail: shengjingyu@163.com

**【通信作者】** 朱海根(1972—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 全科医学。E-mail: zhg801@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the role and underlying mechanisms of miR-433-3p in hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )-induced injury to H9c2 cardiomyocytes. **Methods** An oxidative stress injury model of H9c2 cardiomyocytes was established. H9c2 cardiomyocytes were transfected with miR-433-3p mimics, miRNA mimic negative control (miR-NC), pcDNA-NC, and a MAPK8 overexpression plasmid (pcDNA-MAPK8) and treated with  $H_2O_2$ . H9c2 cells were divided into Control,  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  + miR-NC,  $H_2O_2$  + miR-433-3p mimic,  $H_2O_2$  + miR-433-3p mimic + pcDNA-NC, and  $H_2O_2$  + miR-433-3p mimic + pcDNA-MAPK8 groups. The mRNA expressions of miR-433-3p and MAPK8 in H9c2 cells were detected by qRT-PCR assay. Cell viability and the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released were detected by MTT assay and ELISA kits, respectively. Cell apoptotic-related protein expressions of Bax, Bcl-2, caspase-3, and cleaved caspase-3 were measured by Western blot analysis. The luciferase reporter assay was performed for testing the targeting relationship between miR-433-3p and MAPK8. **Results** Compared with the control group, the expression of miR-433-3p was lower in  $H_2O_2$ -induced H9c2 cardiomyocytes. Compared with the  $H_2O_2$  + miR-NC group, miR-433-3p overexpression significantly reduced the amount of LDH released and enhanced cell viability. In addition, compared with the  $H_2O_2$  + miR-NC group, miR-433-3p overexpression significantly decreased the expressions of the pro-apoptotic proteins Bax and cleaved caspase-3, but increased the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. The luciferase reporter assay showed that miR-433-3p directly targeted MAPK8 and negatively regulated the expression of MAPK8. Overexpression of MAPK8 reversed the inhibitory effects of miR-433-3p overexpression in  $H_2O_2$ -induced H9c2 cell injury and apoptosis. **Conclusions** miR-433-3p has a protective role in cardiomyocyte injury induced by  $H_2O_2$  through the negative regulation of MAPK8.

**【Keywords】** miR-433-3p; H9c2 cardiomyocytes; MAPK8

心血管疾病作为全球发病率和死亡率最高的疾病给患者健康带来了严重的挑战<sup>[1]</sup>。据目前研究所知,心血管疾病潜在的病理变化主要包括心脏衰竭、心肌梗死、心房颤动、动脉粥样硬化和缺血再灌注<sup>[2]</sup>。值得注意的是,心肌梗死是威胁人类健康和导致心肌细胞死亡的主要因素之一<sup>[3]</sup>。研究发现,在心肌梗死的过程中,心肌细胞会在相当长的一段时间内遭受缺血缺氧导致的不可逆转的细胞死亡或心功能不全<sup>[4]</sup>。减少心肌细胞凋亡和损伤可以明显改善心功能和心脏重构。因此,保护心肌细胞凋亡在抑制心血管疾病的发展过程中发挥着极其关键的作用。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类长度约为 18~24 个核苷酸的内源性非编码 RNA 分子,可以通过靶向结合含有部分互补序列的 mRNA 的 3' 非编码区 (3' UTR) 端而对 mRNA 进行转录后水平调控,进而影响细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移等生物学功能<sup>[5-7]</sup>。越来越多的研究表明 miRNAs 在多种心脏疾病中发挥重要作用<sup>[8-10]</sup>。miR-433-3p 是位于 12 号染色体上的抑癌基因,可以抑制多种肿瘤细胞的增殖、侵袭和耐药<sup>[11-12]</sup>。除肿瘤细胞外,心肌中 miR-433-3p 可以通过靶向调节有丝分裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8) 影响心肌纤维化的进程<sup>[13]</sup>。但 miR-433-4p 是否能够通过 MAPK8 调控在心血管疾病中发挥作用还尚未报道。在本研究中,我们将心肌细胞

H9c2 暴露于过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 刺激中以模拟氧化应激引起的心肌损伤,并探讨 miR-433-3p 在  $H_2O_2$  诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 损伤中的作用及潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

大鼠心肌细胞 H9c2 购买于中科院上海细胞库。

### 1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基 (批号: A4192101)、胎牛血清 FBS (批号: 15140163)、青霉素和链霉素 (批号: 15140-122) (美国 Gibco 公司); MTT 检测试剂盒 (批号: ST316)、乳酸脱氢酶 ELISA 活性检测试剂盒 (批号: C0016); 全蛋白提取试剂盒 (批号: P0033)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (批号: P0012S) (上海碧云天生物公司); miR-433-3p 模拟物 miR-433-3p mimics、miRNA 阴性对照 miR-NC、MAPK8 过表达载体 pcDNA-MAPK8、阴性对照 pcDNA-NC (上海吉玛制药有限公司); Bcl-2 抗体 (批号: 2875)、Bax 抗体 (批号: 14796)、Caspase-3 抗体 (批号: 9662)、Cealve Caspase-3 抗体 (批号: 9661)、MAPK8 抗体 (批号: 9255)、GAPDH 抗体 (批号: 5174)、羊抗兔二抗 (批号: 2985S) (美国 Cell Signaling Technology 公司); SYBR Green qPCR 试剂盒 (批号: RR420A) (大连 TaKaRa 公司); 转

染试剂脂质体 Lipofectamine 2000 (批号: 11668027) (美国 Invitrogen 公司); 双荧光素酶检测试剂盒 (批号: C8304) (美国 Promega 公司); 酶标仪 (批号: MB16-414) (上海皓庄仪器公司); 倒置相差显微镜 (批号: STM7) (日本奥林巴斯公司); 蛋白凝胶成像仪 (批号: Bio6000) (中晶有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和处理

将 H9c2 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中。细胞在 37℃、95% 空气和 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育。每 48 h 更换一次培养基。当细胞融合度达到 90% 以上时进行传代培养。取对数生长期细胞进行后续实验。将对数生长期的 H9c2 细胞按照每毫升 3×10<sup>3</sup> 个的密度接种于 96 孔板 24 h 后, 分别加入 0、25、50、100、200 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 继续培养 24 h。采用 MTT 法检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对心肌细胞 H9c2 活力的影响并筛选出最合适的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度。

1.3.2 细胞转染及分组

当 H9c2 细胞生长密度达到 80% 时用胰蛋白酶消化细胞, 并按照每毫升 2×10<sup>5</sup> 个的密度将细胞接种到 6 孔板中。待细胞生长密度达到 70% 时, 用 200 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h。随后采用 Lipofectamine 2000 将 miR-NC (miRNA 阴性对照组), miR-433-3p mimics (miR-433-3p 模拟物组), miR-433-3p mimics 与 pcDNA-NC (miR-433-3p 模拟物+pcDNA 阴性对照组), miR-433-3p mimics 与 pcDNA-MAPK8 (miR-433-3p 模拟物+MAPK8 过表达组) 转染至细胞。转染 6 h 后更换完全培养基并继续培养 48 h, 以备后续实验。

1.3.3 MTT 法检测细胞活力

取转染 48 h 后的 H9c2 细胞按照每毫升 1×10<sup>4</sup> 个的密度接种于 96 孔板中。常规培养 24、48、72 h 后。每孔加入终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 孵育 4 h 后倒掉上清, 加入 150 μL 的二甲基亚砜室温孵育 10 min。采用全自动酶标仪在 570 nm 时检测各孔的 OD 值。

1.3.4 ELISA 检测 LDH 水平

根据 1.3.2 的方法对细胞进行分组后, 严格按照 ELISA 试剂盒的操作说明检测 H9c2 细胞培养液

中的 LDH 水平。

1.3.5 qRT-PCR 检测 miR-433-3p 和 MAPK8 的表达水平

收集各组细胞, 用 PBS 清洗细胞后, 采用 TRIzol 溶液提取 RNA 后逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板严格按照 SYBR Green qPCR 试剂盒标准说明书分别进行目的基因的荧光定量 PCR 扩增。反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 共计 45 个循环。以 GAPDH 或 U6 作为内参并采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 miR-433-3p 和 MAPK8 的相对表达量。其中所使用的引物详见表 1。

1.3.6 Western blot 法检测相关蛋白表达水平

收集各组细胞, 用 PBS 清洗细胞后, 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。采用 BCA 浓度检测试剂盒对蛋白提取物进行定量。每孔 20 μg 上样量, 通过 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 将蛋白印迹转移到 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶封膜 2 h, 加入标记一抗 4℃ 孵育过夜, PBS 清洗 PVDF 膜后在加入标记二抗孵育 1 h。加 ECL 显影液进行显影。以 GAPDH 作为内参。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验

采用 miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) 网站预测 miR-433-3p 和 MAPK8 的靶向作用位点。构建野生型和突变型的 MAPK8 3' UTR 区域的重组质粒, 分别与 miR-433-3p 或 miR-NC 共转染至 H9c2 细胞。48 h 后严格按照双荧光素酶检测试剂盒检测细胞中荧光素酶的活性。

1.4 统计学方法

采用统计学分析软件 SPSS 18.0 分析实验结果。所有实验数据均采用平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组之间比较采用 *t* 检验, 多组之间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 被认为差异显著, 具有统计学意义。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

| 名称<br>Name | 序列(5'→3')<br>Sequence  |
|------------|------------------------|
| miR-433-3p | F:TCGGCAATCATGATGGGC   |
| miR-433-3p | R:CTCAACTGCTGTCGTGG    |
| U6         | F:CTCGCTTCGGCAG        |
| U6         | R:AACGCTTCACGAATTTG    |
| MAPK8      | F:TCCCAGCTGACTCAGAGCAT |
| MAPK8      | R:GCTTCATCTACGAGATCCTT |
| GAPDH      | F:GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA |
| GAPDH      | R:TTGAGCTCAATGAAGGGCTC |

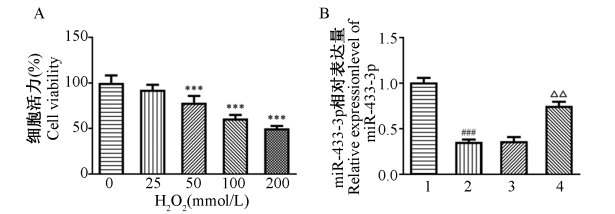
2 结果

2.1 miR-433-3p 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 中低表达

采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 构建心肌细胞氧化应激损伤模型。0、25、50、100、200 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 H9c2 细胞 48 h 后, MTT 检测结果显示, 相对比对照组, 随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增加, H9c2 细胞活力逐渐减少, 且有显著性差异 ( $P < 0.001$ , 图 1A)。在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 200 μmol/L 时, 细胞活力下降为初始值的 50%。因此选择该浓度作为后续实验研究的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导剂量。接下来, 我们采用 qRT-PCR 法检测 miR-433-3p 在 H9c2 细胞中的 mRNA 表达水平, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 miR-433-3p 表达水平比对照组显著减少; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组相比, 转染了 miR-433-3p mimics 的细胞中 miR-433-3p 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ , 图 1B)。表明 miR-433-3p 过表达质粒构建成功。

2.2 miR-433-3p 过表达减轻了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 活性损伤

与对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 H9c2 细胞中的 LDH 释放量显著升高; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics 组 H9c2 细胞中的 LDH 释放量



注:A:MTT 检测不同剂量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 H9c2 细胞活力的影响;B:qRT-PCR 检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理下的 H9c2 细胞中 miR-433-3p 表达水平的变化。1:对照组;2:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组;3:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组;4:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics 组。与 0 μmol/L 组比, \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与对照组比较, ###  $P < 0.001$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

**图 1** miR-433-3p 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 中低表达

Note. A, Cell viabilities of H9c2 cells exposed to different doses of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were determined with MTT assay. B, Level of miR-433-3p in H9c2 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were detected by qRT-PCR. 1, Control group. 2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC group. 4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics group. Compared with 0 μmol/L group, \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with control group, ###  $P < 0.001$ . Compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC group,  $\Delta\Delta P < 0.01$ .

**Figure 1** Level of miR-433-3p was downregulated in H9c2 cardiomyocytes treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

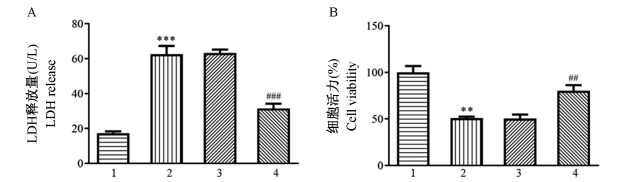
显著降低 (均  $P < 0.001$ , 图 2A)。与对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组的 H9c2 细胞活性显著降低; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics 组的 H9c2 细胞活性显著升高 (均  $P < 0.01$ , 图 2B)。以上实验结果表明在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞中 miR-433-3p 过表达可以明显减轻细胞活性损伤。

2.3 miR-433-3p 过表达抑制了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡

与对照组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 H9c2 细胞中促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase-3 表达水平显著升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著降低; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics 组 H9c2 细胞中 Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低, Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ , 图 3)。以上实验结果表明 miR-433-3p 过表达抑制了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡。

2.4 miR-433-3p 负靶向调控 MAPK8 的表达

通过 miRDB 在线生物信息网站分析, miR-433-3p 可以与 MAPK8 的 3' UTR 相结合。双荧光素酶报告基因实验表明在 MAPK8 野生型表达的 H9c2 细胞中, 与 miR-NC 组相比, miR-433-3p mimics 组的



注:A:ELISA 检测 miR-433-3p 过表达对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导下的 H9c2 细胞内 LDH 释放量的影响;B:MTT 检测 miR-433-3p 过表达对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导下的 H9c2 细胞活性的影响。1:对照组;2:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组;3:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组;4:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics 组。与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC 组比较, ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ 。

**图 2** miR-433-3p 过表达减轻了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 活性损伤

Note. A, Effect of miR-433-3p overexpression on the release of LDH in H9c2 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was analyzed by ELISA assay. B, Effect of miR-433-3p overexpression on the viability of H9c2 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was examined by MTT assay. 1, Control group. 2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC group. 4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-433-3p mimics group. Compared with control group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + miR-NC group, ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ .

**Figure 2** miR-433-3p overexpression attenuated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced activity damage in H9c2 cardiomyocytes



荧光素酶活性显著下降( $P<0.001$ ,图 4A)。与 miR-NC 组相比,miR-433-3p 过表达能显著抑制 MAPK8 的 mRNA 表达水平( $P<0.001$ ,图 4B)。与 miR-NC 组相比,miR-433-3p 过表达能显著抑制 MAPK8 的蛋白表达水平( $P<0.001$ ,图 4C)。

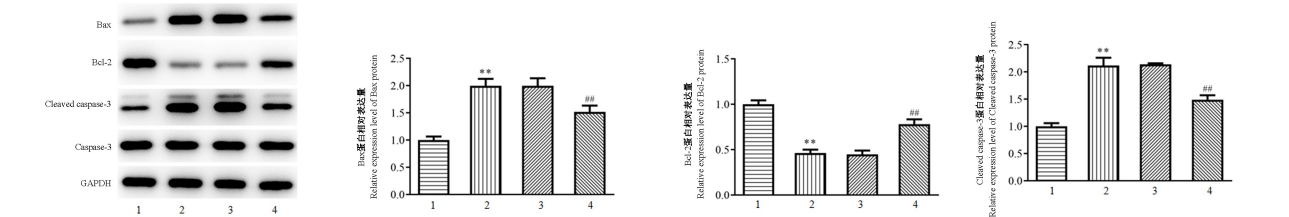
2.5 过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 活性损伤的保护作用

在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 细胞中过表达 MAPK8,与对照组相比,过表达 MAPK8 组中 MAPK8 蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ,图 5A)。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组中的 LDH 释放量显著升高( $P<0.01$ ,图 5B)。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-433-3p mimics+pcDNA-

NC 组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组中的细胞活性显著下降( $P<0.01$ ,图 5C)。这些实验结果表明过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 损伤的保护作用。

2.6 过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡的抑制作用

与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组 H9c2 细胞中促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase3 的表达水平显著升高,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平显著降低( $P<0.01$ ,图 6)。这些实验结果表明过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡的抑制作用。

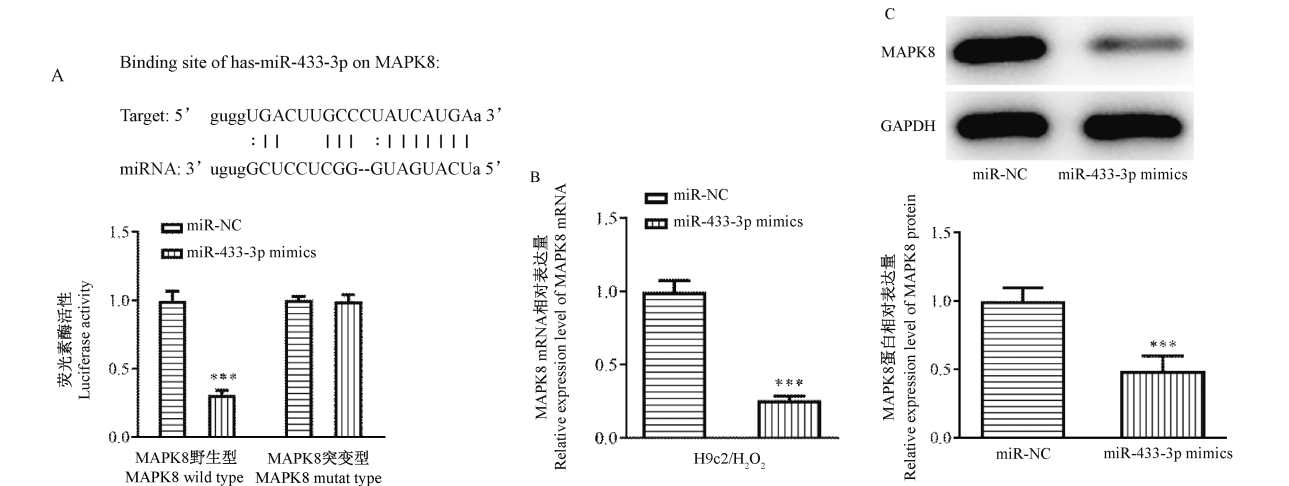


注:1:对照组;2:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组;3:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-NC 组;4:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-433-3p mimics 组。与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-NC 组比较,## $P<0.01$ 。

图 3 miR-433-3p 过表达抑制了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡

Note. 1, Control group. 2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-NC group. 4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-433-3p mimics group. Compared with control group, \*\* $P<0.01$ . Compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+miR-NC group, ## $P<0.01$ .

Figure 3 miR-433-3p overexpression inhibited the apoptosis of H9c2 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

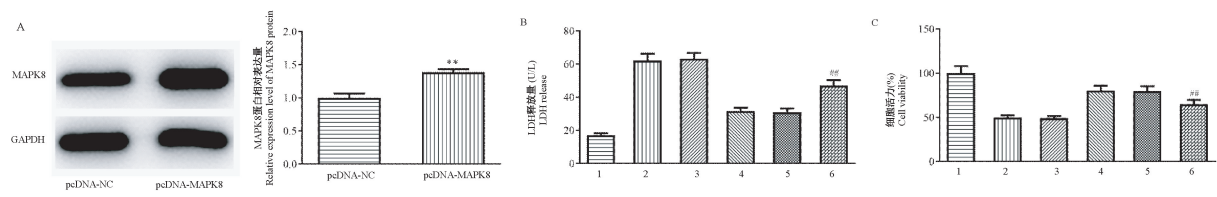


注:A:双荧光素酶报告基因检测 miR-433-3p 和 MAPK8 之间的关系;B:qRT-PCR 检测 miR-433-3p 过表达对 MAPK8 蛋白水平的影响;C:Western blot 检测 miR-433-3p 过表达对于 MAPK8 mRNA 水平的影响。与 miR-NC 组比较,\*\*\* $P<0.001$ 。

图 4 miR-433-3p 负靶向调控 MAPK8 的表达

Note. A, Relationship between miR-433-3p and MAPK8 was detected by luciferase reporter assay. B, Effect of miR-433-3p overexpression on MAPK8 protein level was examined by qRT-PCR. C, Effect of miR-433-3p overexpression on MAPK8 mRNA level was observed by Western blot. Compared with miR-NC group, \*\*\* $P<0.001$ .

Figure 4 Expression of MAPK8 was negatively regulated by miR-433-3p

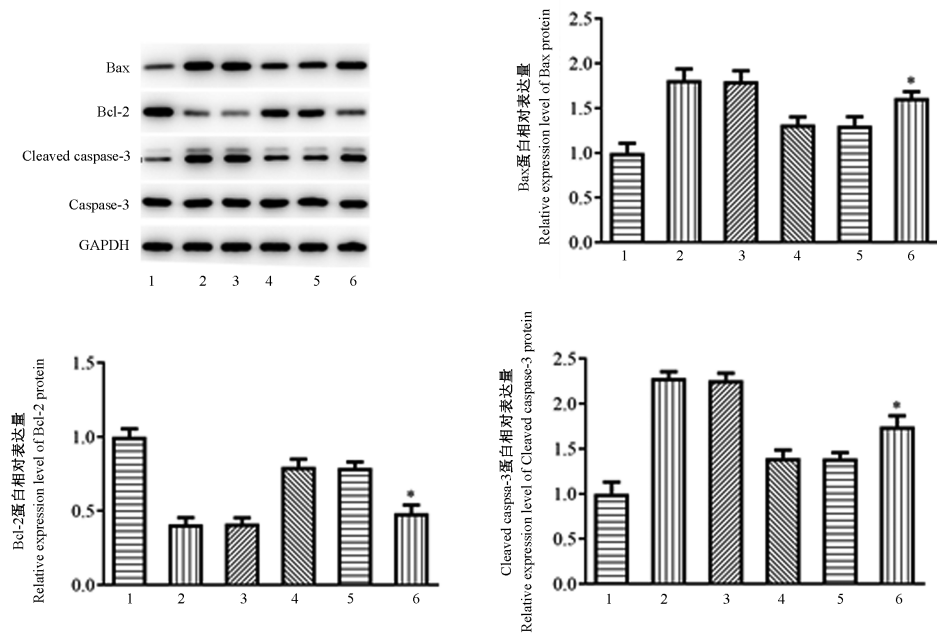


注:A;Western blot 检测 MAPK8 过表达质粒转染效率;B;ELISA 检测过表达 MAPK8 对  $H_2O_2$  诱导下的 H9c2 细胞内 LDH 释放量的影响;C:MTT 检测过表达 MAPK8 对  $H_2O_2$  诱导下的 H9c2 细胞活性的影响。1:对照组;2; $H_2O_2$  组;3; $H_2O_2$  +miR-NC 组;4; $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics 组;5; $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics+pcDNA-NC 组;6; $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组。与 pcDNA-NC 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与  $H_2O_2$  + miR-433-3p mimics + pcDNA-NC 组比较, ##  $P < 0.01$ 。

图 5 过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞 H9c2 活性损伤的保护作用

Note. A, Transfection efficiency of MAPK8 overexpression plasmid was detected by western blot analysis. B, Effect of overexpression of MAPK8 on the release of LDH in H9c2 cells treated with  $H_2O_2$  was analyzed by ELISA assay. C, Effect of overexpression of MAPK8 on the viability of H9c2 cells treated with  $H_2O_2$  was examined by MTT assay. 1, Control group. 2,  $H_2O_2$  group. 3,  $H_2O_2$  +miR-NC group. 4,  $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics group. 5,  $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics+pcDNA-NC group. 6,  $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 group. Compared with pcDNA-NC group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with  $H_2O_2$  + miR-433-3p mimics + pcDNA-NC group, ##  $P < 0.01$ .

Figure 5 Overexpression of MAPK8 reversed the protective effect of miR-433-3p overexpression on the activity damage of H9c2 cells treated with  $H_2O_2$



注:1:对照组;2; $H_2O_2$  组;3; $H_2O_2$  +miR-NC 组;4; $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics 组;5; $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics +pcDNA-NC 组;6; $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 组。与  $H_2O_2$  + miR-433-3p mimics + pcDNA-NC 组比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 6 过表达 MAPK8 可逆转 miR-433-3p 过表达对  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡的抑制作用

Note. 1, Control group. 2,  $H_2O_2$  group. 3,  $H_2O_2$  +miR-NC group. 4,  $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics group. 5,  $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics+pcDNA-NC group. 6,  $H_2O_2$  +miR-433-3p mimics+pcDNA-MAPK8 group. Compared with  $H_2O_2$  + miR-433-3p mimics + pcDNA-NC group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 6 Overexpression of MAPK8 reversed the protective effect of miR-433-3p overexpression on apoptosis of H9c2 cells treated with  $H_2O_2$

### 3 讨论

研究表明  $H_2O_2$  诱导的多个基因的表达变化与心肌细胞损伤密切相关<sup>[14-16]</sup>。但  $H_2O_2$  诱导心肌细胞损伤过程中的基因调控目前还尚不清楚。MicroRNA 是一种内源性的小编码 RNA, 可以通过与靶基因的 3' UTR 相结合, 在转录后调节靶基因的表达进而导致翻译抑制或靶基因的降解<sup>[17-18]</sup>。心血管系统疾病是人类发病率和死亡率的主要原因且预后较差, 目前由于心肌损伤诊断仅局限在常规心电图、血清特异性敏感因子(如心肌酶、心肌肌钙蛋白等)等有限手段, 因此发现新的心肌损伤生物标志物和治疗手段显得尤为重要。一些研究表明, miRNAs 不仅在心血管发育中发挥重要作用, 而且在心脏肥厚、心力衰竭、缺血性心脏病等心血管疾病中也发挥重要作用<sup>[19-22]</sup>。MiR-433-3p 通常作为抑癌基因在人类肿瘤的发生和发展中发挥着不同功能<sup>[12, 23-24]</sup>。据报道, miR-433-3p 在胃癌<sup>[25]</sup>、非酒精性脂肪肝患者内脏脂肪组织<sup>[26]</sup>和乙型肝炎病毒相关肝细胞癌中表达下调<sup>[27]</sup>。此外, miR-433 能够负靶向调节宫颈癌 HeLa 细胞中负责 5-氟尿嘧啶敏感性的胸苷酸合成酶<sup>[28]</sup>。在心肌中 miR-433-3p 通过靶向调节 MAPK8 从而影响心肌纤维化的过程<sup>[13]</sup>。然而, miR-433-3p 在心血管疾病中的研究尚未有过相关报道。在本研究中, 我们发现在  $H_2O_2$  处理心肌细胞 24 h 后, 细胞活性呈剂量依赖性的下降。且相比较对照组, miR-433-3p 的表达水平在  $H_2O_2$  处理的心肌细胞 H9c2 中显著下降。预示了 miR-433-3p 可能参与  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞损伤过程。但 miR-433-3p 在  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞损伤中的具体作用和机制还有待研究。

心肌缺血后, 心肌细胞膜外出现大量损伤标志物的外漏。其中乳酸脱氢酶 (LDH) 被认为是最能反映出心肌损伤程度的重要分子, 通过 LDH 水平的检测可以有效反映出心肌损伤的程度<sup>[29]</sup>。此外, 由于  $H_2O_2$  被广泛用于诱导不同细胞类型的凋亡反应, 而心肌细胞 H9c2 也常被用于研究心肌细胞凋亡<sup>[30]</sup>。也有相关研究显示氧化应激和细胞凋亡与心血管疾病密切相关。例如, miR-1 会影响 H9c2 心肌细胞的抗氧化应激和抗凋亡能力<sup>[31]</sup>。因此我们继续探讨了 miR-433-3p 对  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡的作用。在本研究中, 我们发现  $H_2O_2$  能显著增强 H9c2 细胞中的 LDH 的水平, 并诱导促凋

亡蛋白 Bax 和 Cleaved Caspase-3 表达水平的升高和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平的下降进而促进细胞凋亡。而 miR-433-3p 过表达可以抑制由  $H_2O_2$  诱导的 LDH 水平上升和细胞凋亡, 有效改善心肌细胞 H9c2 的损伤。

有丝分裂原活化蛋白激酶 8 (mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8) 是一类在多种细胞中扮演着重要调控作用的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。它在影响细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、细胞死亡和炎症等病理过程中发挥着重要的生物学作用<sup>[32-33]</sup>。在心肌损伤中, miR-190 可以通过调节 MAPK8/ERK 信号通路保护心肌细胞 H9c2 免受  $H_2O_2$  诱导的凋亡<sup>[34]</sup>。此外, miR-433-3p 可以通过靶向调节 MAPK8 影响心肌纤维化的进程<sup>[13]</sup>。因此, 我们推测 miR-433-3p 可能通过靶向 MAPK8 影响心肌细胞的损伤和凋亡。在本研究, 我们发现 miR-433-3p 可以负靶向调控 MAPK8。过表达 MAPK8 可以逆转 miR-433-3p 过表达对  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞活性损伤和凋亡的保护作用。总之, 在  $H_2O_2$  诱导的 H9c2 细胞活性损伤和凋亡中 miR-433-3p 可以通过靶向调控 MAPK8 发挥保护作用。

综上所述, miR-433-3p 在  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞 H9c2 中低表达, 并能通过直接靶向 MAPK8 减轻由  $H_2O_2$  诱导的氧化应激和细胞凋亡。这一研究成果将有助于阐明治疗缺血性心肌损伤的信靶点。

### 参考文献:

- [1] Poole-Wilson P. The prevention of cardiovascular disease worldwide; whose task and WHO's task? [J]. Clin Med (Lond), 2005, 5(4): 379-384.
- [2] Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling [J]. Pharmacol Ther, 2009, 123(2): 255-278.
- [3] Qiu H, Liu JY, Wei D, et al. Cardiac-generated prostanoids mediate cardiac myocyte apoptosis after myocardial ischaemia [J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(3): 336-345.
- [4] Katz AM, Messineo FC. Lipid-membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium [J]. Circ Res, 1981, 48(1): 1-16.
- [5] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610.
- [6] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. Nature, 2010, 466(7308): 835-840.
- [7] Baek D, Villén J, Shin C, et al. The impact of microRNAs on protein output [J]. Nature, 2008, 455(7209): 64-71.

- [ 8 ] Chen C, Ponnusamy M, Liu C, et al. MicroRNA as a therapeutic target in cardiac remodeling [ J ]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 1278436.
- [ 9 ] Chen XP, Chen YG, Lan JY, et al. MicroRNA-370 suppresses proliferation and promotes endometrioid ovarian cancer chemosensitivity to cDDP by negatively regulating ENG [ J ]. Cancer Lett, 2014, 353(2): 201–210.
- [ 10 ] Feng Y, Sun T, Yu Y, et al. MicroRNA-370 inhibits the proliferation, invasion and EMT of gastric cancer cells by directly targeting PAQR4 [ J ]. J Pharmacol Sci, 2018, 138(2): 96–106.
- [ 11 ] Xue J, Chen LZ, Li ZZ, et al. MicroRNA-433 inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting p21 activated kinase (PAK4) [ J ]. Mol Cell Biochem, 2015, 399(1–2): 77–86.
- [ 12 ] Hu H, Jie HY, Zheng XX. Three circulating LncRNA predict early progress of esophageal squamous cell carcinoma [ J ]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(1–2): 117–125.
- [ 13 ] Tao L, Bei Y, Chen P, et al. Crucial role of miR-433 in regulating cardiac fibrosis [ J ]. Theranostics, 2016, 6(12): 2068–2083.
- [ 14 ] Seddon M, Looi YH, Shah A M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure [ J ]. Heart, 2007, 93(8): 903–907.
- [ 15 ] Berg K, Jynge P, Bjerve K, et al. Oxidative stress and inflammatory response during and following coronary interventions for acute myocardial infarction [ J ]. Free Radic Res, 2005, 39(6): 629–636.
- [ 16 ] Takano H, Zou Y, Hasegawa H, et al. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases [ J ]. Antioxid Redox Signal, 2003, 5(6): 789–794.
- [ 17 ] De Ronde MW, Ruijter JM, Moerland PD, et al. Study design and qPCR data analysis guidelines for reliable circulating miRNA biomarker experiments: a review [ J ]. Clin Chem, 2018, 64(9): 1308–1318.
- [ 18 ] Raitoharju E, Oksala N, Lehtimäki T. MicroRNAs in the atherosclerotic plaque [ J ]. Clin Chem, 2013, 59(12): 1708–1721.
- [ 19 ] Carè A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy [ J ]. Nat Med, 2007, 13(5): 613–618.
- [ 20 ] Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart; do they play a role in cardiac hypertrophy? [ J ]. Am J Pathol, 2007, 170(6): 1831–1840.
- [ 21 ] Sayed D, Hong C, Chen IY, et al. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy [ J ]. Circ Res, 2007, 100(3): 416–424.
- [ 22 ] Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(48): 18255–18260.
- [ 23 ] Tang X, Lin J, Wang G, et al. MicroRNA-433–3p promotes osteoblast differentiation through targeting DKK1 expression [ J ]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179860.
- [ 24 ] Shi Q, Wang Y, Mu Y, et al. miR-433-3p inhibits proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by targeting GRB2 [ J ]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(5): 2187–2196.
- [ 25 ] Luo H, Zhang H, Zhang Z, et al. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma [ J ]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28(1): 82.
- [ 26 ] Estep M, Armistead D, Hossain N, et al. Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non - alcoholic fatty liver disease [ J ]. Aliment Pharmacol Ther, 2010, 32(3): 487–497.
- [ 27 ] Wang W, Zhao LJ, Tan YX, et al. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [ J ]. World J Gastroenterol, 2012, 18(38): 5442–5453.
- [ 28 ] Gotanda K, Hirota T, Matsumoto N, et al. MicroRNA-433 negatively regulates the expression of thymidylate synthase (TYMS) responsible for 5-fluorouracil sensitivity in HeLa cells [ J ]. BMC cancer, 2013, 13(1): 369.
- [ 29 ] 陈坚, 丁振华, 刘坚. 艾拉莫德联合甲氨蝶呤对类风湿性关节炎患者血清炎症因子及骨代谢的影响 [ J ]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(7): 552–555.
- [ 30 ] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 等. 过氧化氢通过线粒体通路和死亡受体通路诱导心肌细胞凋亡 [ J ]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(3): 185–188.
- [ 31 ] Chen T, Ding G, Jin Z, et al. Insulin ameliorates miR-1-induced injury in H9c2 cells under oxidative stress via Akt activation [ J ]. Mol Cell Biochem, 2012, 369(1–2): 167–174.
- [ 32 ] Tiwari N, Meyer-Schaller N, Arnold P, et al. Klf4 is a transcriptional regulator of genes critical for EMT, including Jnk1 (Mapk8) [ J ]. PLoS One, 2013, 8(2): e57329.
- [ 33 ] He W, Wang Q, Xu J, et al. Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation [ J ]. Autophagy, 2012, 8(12): 1811–1821.
- [ 34 ] Zhai CL, Tang GM, Qian G, et al. miR-190 protects cardiomyocytes from apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through targeting MAPK8 and regulating MAPK8/ERK signal pathway [ J ]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(4): 2183–2192.