

基于 miR - 93 - 5p/PTEN 轴利拉鲁肽对 MI/R 大鼠心肌细胞氧化应激的影响

刘 娜 刘 斌 曹广林

摘要 目的 探讨利拉鲁肽(LIR)通过 miR - 93 - 5p/磷酸酶张力蛋白同源物基因(PTEN)轴对心肌缺血再灌注(MI/R)大鼠心肌损伤的影响。**方法** 60 只大鼠随机分为 sham 组、MI/R 组、LIR 组、anti - miR - 93 - 5p 组和 anti - miR - 93 - 5p + LIR 组, 每组 12 只。比较各组大鼠超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH), 肌酸激酶同工酶(CK - MB), 心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、心肌细胞凋亡指数(AI)、miR - 93 - 5p 以及 PTEN、磷脂酰肌醇 - 3 激酶(PI₃K)、磷酸化蛋白丝氨酸苏氨酸激酶(p - Akt)蛋白表达情况。**结果** MI/R 大鼠心肌严重损伤、心肌氧化应激水平升高、心肌细胞凋亡增多、miR - 93 - 5p 表达下调; LIR 治疗后心肌损伤减轻、心肌氧化应激水平降低、心肌细胞凋亡减少、miR - 93 - 5p 表达上调; miR - 93 - 5p 靶向作用于 PTEN, 抑制 miR - 93 - 5p 的表达可促进 PTEN 蛋白表达、降低 PI₃K 和 p - Akt 蛋白表达。**结论** LIR 改善 MI/R 大鼠心肌损伤, 可能通过调节 miR - 93 - 5p/PTEN 轴降低氧化应激水平发挥作用。

关键词 心肌缺血再灌注 利拉鲁肽 氧化应激 miR - 93 - 5p 磷酸酶张力蛋白同源物基因

中图分类号 R542.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.10.018

Effects of miR - 93 - 5p/PTEN LIRaglutide on Oxidative Stress in Myocardial Cells of Ischemia/Reperfusion Rats. Liu Na, Liu Bin, Cao Guanglin. Department of Cardiology, Cangzhou People's Hospital, Hebei 061000, China

Abstract Objective To investigate the effect of Liraglutide on myocardial injury after ischemia reperfusion in rats by regulating oxidative stress level through miR - 93 - 5p/ phosphatase tension protein homologue gene (PTEN) axis. **Methods** Totally 60 rats were randomly divided into sham group, MI/R group, LIR group, anti - miR - 93 - 5p group, and anti - miR - 93 - 5p + LIR group, with 12 rats in each group. Rats in LIR group and anti - miR - 93 - 5p + LIR group were subcutaneously injected with Liraglutide 70 μg/kg, once a day, for consecutive 8 days. On the 5th day, anti - miR - 93 - 5p group and anti - miR - 93 - 5p + LIR group were injected 200 μl anti - miR - 93 - 5p into the myocardium of rats. On the 8th day, 2h after administration, MI/R model was established in other groups except sham group. Comparison between groups of rats SOD, MDA, LDH, CK - MB, cTnI, AI, miR - 93 - 5p and PTEN, PI₃K, p - Akt protein expression. **Results** MI/R rats suffered severe myocardial injury, increased myocardial oxidative stress level, increased myocardial apoptosis, and down - regulated miR - 93 - 5p expression. After LIR treatment, myocardial injury was alleviated, myocardial oxidative stress level was decreased, myocardial apoptosis was decreased, and miR - 93 - 5p expression was up - regulated. MiR - 93 - 5p targeted PTEN and inhibited the expression of miR - 93 - 5p could promote the expression of PTEN protein and reduce the expression of PI₃K and p - Akt protein. **Conclusion** Liraglutide can improve myocardial injury in MI/R rats, and may play a regulatory role by regulating miR - 93 - 5p/PTEN axis to reduce oxidative stress level.

Key words Myocardial ischemia reperfusion; Liraglutide; Oxidative stress; miR - 93 - 5p; Phosphatase tension protein homologue gene

心肌缺血再灌注(myocardial ischemia reperfusion, MI/R)损伤造成的氧化应激、炎性反应等, 可导致心肌细胞凋亡、心肌纤维化, 引起心功能障碍^[1,2]。利拉鲁肽(liraglutide, LIR)是一种人胰高糖素样肽-1类似物,LIR 可降低氧化应激水平,抑制高糖诱导的

髓核细胞凋亡,还可抑制内皮细胞炎性反应,改善内皮功能障碍^[3,4]。在 MI/R 中 LIR 具有抑制心肌细胞凋亡、改善心功能障碍的作用^[5]。miR - 93 是一种微小核糖核酸(microRNA, miRNA),在心肌梗死模型中具有促进血管再生、抑制心肌细胞凋亡和心肌纤维化、改善心功能障碍的作用^[6]。但 LIR 能否通过 miR - 93 发挥心脏保护作用仍需进一步研究,本研究建立 MI/R 大鼠模型,探讨 LIR 抗心肌损伤作用,为临床治疗提供参考。

基金项目:河北省 2020 年度医学科学研究课题计划项目(20200283)

作者单位:061000 沧州市人民医院心血管内二科(刘娜、刘斌),心血管内一科(曹广林)

材料与方法

1. 实验动物和细胞系: SPF 级雄性 SD 大鼠, 60 只, 8 周龄, 体质量 180~200g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SYXK(京)2017-0033; H9C2 心肌细胞系购自美国 ATCC 公司。

2. 试剂和仪器: LIR(丹麦诺和诺德制药公司); anti-miR-93-5p 和 miR-93-5p mimic(美国 Ribobio 公司); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所); 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH), 肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB), 心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)试剂盒(英国朗道公司); 兔抗大鼠第 10 号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源物基因(phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN), 磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI₃K), 蛋白丝/苏氨酸激酶(serine/threonine protein kinase B, Akt)、p-Akt 抗体(英国 Abcam 公司); 小动物呼吸机(中国瑞沃德生命科技有限公司)。

3. 分组与给药: 60 只大鼠随机分 sham 组、MI/R 组、LIR 组、anti-miR-93-5p 组和 anti-miR-93-5p + LIR 组, 每组 12 只。LIR 组和 anti-miR-93-5p + LIR 组皮下注射 LIR 70 μg/kg, 1 次/天, 连续 8 天, sham 组、MI/R 组和 anti-miR-93-5p 组皮下注射 0.9% 氯化钠注射液; 第 5 天, anti-miR-93-5p 组和 anti-miR-93-5p + LIR 组心肌内注射 anti-miR-93-5p 200 μl, sham 组、MI/R 组和 LIR 组大鼠注射 0.9% 氯化钠溶液。第 8 天给药后 2h, 除 sham 组外, 其余大鼠结扎左冠状动脉前降支, 以 ST 段抬高、左心室前壁变苍白为结扎成功, 60min 后松开结扎线灌注 4h。sham 组大鼠仅在左冠状动脉前降支相同部位挂线, 但不结扎, 其余操作同上。

4. ELISA 法检测心肌损伤指标: 分别在冠状动脉结扎前、结扎 60min 后、灌注 4h 后 3 个时间点检测心肌损伤指标, 结扎前及结扎 60min 后两个时间点采取内眦静脉血, 灌注 4h 后主动脉采血, 3000r/min, 离心 15min, 收集上清。根据 ELISA 试剂盒说明书进行上样、孵育、洗涤、显色, 加入终止液后将 96 孔板置于酶标仪上, 450nm 波长处读取吸光度(A)值, 根据标准品制作标准曲线, 计算血清中 LDH、CK-MB、cTnI 含量。

5. TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡: 采血完毕, 取部分心肌组织, 4% 多聚甲醛固定 24h, 脱水、包埋、切片, 二甲苯透明, 脱水, 蛋白酶 K 室温孵育 20min, 3% H₂O₂ 孵育 10min, TUNEL 混合液 37℃ 孵育 1h。50 μl POD 标记的抗荧光素抗体 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色、苏木精复染, 脱水、透明、封片后光学显微镜下观察。随机选取 6 个视野, 计算心肌细胞凋亡指数(apoptotic index, AI), AI(%) = (阳性细胞数/细胞总数) × 100%。

6. 氧化应激指标测定: 取部分心肌组织, 剪碎, 加入抑肽酶后煮沸 10min, 4℃ 3000r/min 离心 15min, 收集上清液。黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力, 硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量, 均按照试剂盒说明书进行。于波长 550nm 处测定 A 值并计算 SOD 活力, 波长 532nm 处测定 A 值并计算 MDA 含量。

7. RT-PCR 检测 miR-93-5p 水平: 取部分心尖组织, 液氮研磨。Trizol 法提取总 RNA, 测定 RNA 浓度和纯度, 反转录 cDNA, 反应体系: Taq 酶 10 μl, 上下游引物各 0.8 μl, 以 cDNA 为模板 2 μl 进行 qPCR, 反应条件: 95℃ 5min, 95℃ 15s, 60℃ 1min, 40 个循环。以 U6 为内参, 实验数据采用 2^{-ΔΔCT} 法。引物序列详见表 1。

表 1 PCR 反应引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')
miR-93-5p	上游引物: ATCTGCCGTTGATGCTGA 下游引物: CTGGCTATCATCGCGTC
U6	上游引物: CTGACCTAGCGTGAGCTA 下游引物: CGATGGACCAGTAGCGCT

8. 双荧光素酶报告基因测定 PTEN 和 miR-93-5p 的靶向关系: 分析预测 miR-93-5p 的靶基因及两者结合位点, 扩增 miR-93-5p 和 PTEN 的结合片段, 并将该片段插入 pcDNA 中, 构建野生(wt)型和突变(mut)型质粒 PTEN 质粒, 与 miR-93-5p mimic、NC 共转染 H9C2 心肌细胞。按照 Luciferase 报告基因试剂盒说明书检测各组荧光素酶活性。

9. 蛋白印迹法检测心肌组织中 PTEN、PI₃K、p-Akt 蛋白表达: 取 40mg 左右心肌组织, 匀浆, RIPA 裂解。4℃ 12000r/min 离心 10min, 离心半径为 10cm, 收集上清。BCA 法测定蛋白浓度, 加入溴酚蓝后煮沸使蛋白变性。120V 恒压电泳 1.5h, 每孔上样 20 μl, TBST 洗膜 3 次, 每次 5min, 封闭 2h, PTEN、PI₃K、Akt、p-Akt 一抗(1:1000)4℃ 孵育过夜, TBST

洗膜 3 次,每次 5 min,二抗(1:5000)室温孵育 2 h 后,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,ECL 显色法显色。Image J 软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值,作为目的蛋白相对表达水平。

10. 统计学方法:采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. LIR 减轻 MI/R 大鼠心肌损伤:冠状动脉结扎

表 2 冠状动脉结扎前、结扎 60min 后和灌注 4h 后血清 CK-MB、LDH、cTnI 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	结扎前			结扎 60min 后			灌注 4h 后		
		CK-MB (ng/ml)	LDH (U/L)	cTnI (ng/ml)	CK-MB (ng/ml)	LDH (U/L)	cTnI (ng/ml)	CK-MB (ng/ml)	LDH (U/L)	cTnI (ng/ml)
sham 组	12	196.27 ± 25.60	120.66 ± 15.79	86.79 ± 10.54	187.43 ± 12.55	118.45 ± 10.23	95.62 ± 9.54	220.76 ± 54.28	122.34 ± 35.71	98.47 ± 25.19
MI/R 组	11	184.58 ± 30.23	123.74 ± 14.38	90.18 ± 11.23	432.62 ± 18.73 *	405.62 ± 11.27 *	235.54 ± 12.63 *	567.19 ± 57.17 *	423.29 ± 58.10 *	276.20 ± 31.22 *
LIR 组	12	190.62 ± 22.56	119.57 ± 11.42	88.64 ± 10.79	256.44 ± 17.62 *#	210.83 ± 9.48 *#	146.27 ± 10.89 *#	343.58 ± 46.23 *#	217.30 ± 34.63 *#	157.41 ± 23.67 *#
anti-miR-93-5p 组	10	204.73 ± 32.83	122.67 ± 15.93	95.20 ± 12.77	556.18 ± 15.38 *#Δ	493.05 ± 12.64 *#Δ	303.80 ± 11.75 *#Δ	664.20 ± 57.69 *#Δ	521.47 ± 45.69 *#Δ	382.67 ± 30.42 *#Δ
anti-miR-93-5p + LIR 组	10	200.17 ± 27.58	117.56 ± 13.78	93.62 ± 13.80	363.84 ± 16.90 *#Δ▲	332.66 ± 10.82 *#Δ▲	197.74 ± 10.28 *#Δ▲	455.43 ± 48.72 *#Δ▲	351.74 ± 48.21 *#Δ▲	213.57 ± 24.17 *#Δ▲

与 sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 MI/R 组比较, # $P < 0.05$; 与 LIR 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 anti-miR-93-5p 组比较, ▲ $P < 0.05$

2. LIR 降低 MI/R 大鼠心肌细胞 AI: 冠状动脉左前降支结扎 60 min 再灌注 4 h 后, TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡情况。与 sham 组比较, MI/R 组心肌细胞 AI 升高($P < 0.05$); 与 MI/R 组比较, LIR 组心肌细胞 AI 降低, anti-miR-93-5p 组心肌细胞 AI 升高($P < 0.05$); 与 LIR 组比较, anti-miR-93-5p + LIR 组心肌细胞 AI 升高($P < 0.05$); 与 anti-miR-93-5p 组比较, anti-miR-93-5p + LIR 组心肌细胞 AI 降低($P < 0.05$, 表 3)。

表 3 心肌细胞 AI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AI(%)
sham 组	12	3.50 ± 0.71
MI/R 组	11	20.47 ± 1.25 *
LIR 组	12	10.96 ± 1.04 *#
anti-miR-93-5p 组	10	30.53 ± 1.36 *#Δ
anti-miR-93-5p + LIR 组	10	16.67 ± 1.13 *#Δ▲

与 sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 MI/R 组比较, # $P < 0.05$; 与 LIR 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 anti-miR-93-5p 组比较, ▲ $P < 0.05$

前、结扎 60 min 后及再灌注 4 h 后, ELISA 法检测血清中心肌损伤指标的含量。冠状动脉结扎前 CK-MB、LDH、cTnI 组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结扎 60 min 后及再灌注 4 h 后, 与 sham 组比较, MI/R 组 CK-MB、LDH、cTnI 均升高($P < 0.05$); 与 MI/R 组比较, LIR 组 CK-MB、LDH、cTnI 均降低, anti-miR-93-5p 组 CK-MB、LDH、cTnI 均升高($P < 0.05$); 与 LIR 组比较, anti-miR-93-5p + LIR 组 CK-MB、LDH、cTnI 均升高($P < 0.05$); 与 anti-miR-93-5p 组比较, anti-miR-93-5p + LIR 组 CK-MB、LDH、cTnI 均降低($P < 0.05$, 表 2)。

3. LIR 降低 MI/R 大鼠心肌组织氧化应激水平: 冠状动脉左前降支结扎 60 min 再灌注 4 h 后, 检测心肌组织中氧化应激指标。与 sham 组比较, MI/R 组 MDA 含量升高, SOD 活性降低($P < 0.05$); 与 MI/R 组比较, LIR 组 MDA 含量降低, SOD 活性升高, anti-miR-93-5p 组 MDA 含量升高, SOD 活性降低($P < 0.05$); 与 LIR 组比较, anti-miR-93-5p + LIR 组 MDA 含量升高, SOD 活性降低($P < 0.05$); 与 anti-miR-93-5p 组比较, anti-miR-93-5p + LIR 组 MDA 含量降低, SOD 活性升高($P < 0.05$, 表 4)。

表 4 心肌组织中 MDA 含量和 SOD 活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
sham 组	12	1.43 ± 0.52	25.14 ± 3.19
MI/R 组	11	5.08 ± 0.64 *	15.23 ± 2.05 *
LIR 组	12	3.61 ± 0.44 *#	21.69 ± 3.04 *#
anti-miR-93-5p 组	10	6.52 ± 0.66 *#Δ	11.90 ± 2.48 *#Δ
anti-miR-93-5p + LIR 组	10	4.24 ± 0.51 *#Δ▲	18.06 ± 2.88 *#Δ▲

与 sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 MI/R 组比较, # $P < 0.05$; 与 LIR 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 anti-miR-93-5p 组比较, ▲ $P < 0.05$

4. LIR 提高 MI/R 大鼠 miR - 93 - 5p 表达:冠状动脉左前降支结扎 60min 再灌注 4h 后, PCR 法检测心肌组织中 miR - 93 - 5p 的表达。与 sham 组比较, MI/R 组 miR - 93 - 5p 表达降低 ($P < 0.05$) ;与 MI/R 组比较,LIR 组 miR - 93 - 5p 表达升高, anti - miR - 93 - 5p 组 miR - 93 - 5p 表达降低 ($P < 0.05$) ;与 LIR 组比较,anti - miR - 93 - 5p + LIR 组 miR - 93 - 5p 表达降低 ($P < 0.05$) ;与 anti - miR - 93 - 5p 组比较,anti - miR - 93 - 5p + LIR 组 miR - 93 - 5p 表达升高 ($P < 0.05$, 表 5)。

表 5 心肌组织中 miR - 93 - 5p 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR - 93 - 5p
sham 组	12	5.57 ± 0.26
MI/R 组	11	2.14 ± 0.29 *#
LIR 组	12	3.78 ± 0.24 **#
anti - miR - 93 - 5p 组	10	1.06 ± 0.23 *#Δ
anti - miR - 93 - 5p + LIR 组	10	2.95 ± 0.24 *#Δ▲

与 sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 MI/R 组比较, # $P < 0.05$; 与 LIR 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 anti - miR - 93 - 5p 组比较, ▲ $P < 0.05$

5. miR - 93 - 5p 靶向作用于 PTEN: 将 miR - 93 - 5p mimic、NC、PTEN mut 或 PTEN wt 转染 H9C2 细胞后, 双荧光素酶报告基因检测荧光素酶相对活性。结果显示, 转染 miR - 93 - 5p mimic 后 PTEN wt 的荧光素酶活性降低, 而对 PTEN mut 的荧光素酶活性无影响(图 1, 表 6)。

PTEN 5'...UCAUGGUUAAGAAGAGCACUUUA ...
||||| | | | |

miR-93-5p 3'...GAUGGACGUGCUUGUCGUGAAAC ...

PTEN mut 5'...UCAUGGUUAAGAAGGUCCUGAUAC ...

图 1 PTEN 和 miR - 93 - 5p 结合位点

表 6 荧光素酶相对活性比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	荧光素酶相对活性
PTEN wt + NC 组	1.00 ± 0.20
PTEN wt + miR - 93 - 5p mimic 组	0.42 ± 0.30
PTEN mut + NC 组	1.00 ± 0.20
PTEN mut + miR - 93 - 5p mimic 组	0.98 ± 0.30

6. LIR 对心肌组织中 PTEN、p - Akt、PI₃K 蛋白的影响: 冠状动脉左前降支结扎 60min 再灌注 4h 后, 蛋白印迹法检测心肌组织中蛋白表达。与 sham 组比较, MI/R 组 PTEN 蛋白表达升高, p - Akt、PI₃K 蛋白表达降低 ($P < 0.05$) ;与 MI/R 组比较, LIR 组 PTEN 蛋白表达降低, p - Akt、PI₃K 蛋白表达升高 ($P < 0.05$) , anti - miR - 93 - 5p 组 PTEN 蛋白表达升高, p - Akt、PI₃K 蛋白表达降低 ($P < 0.05$) ;与 LIR 组比较, anti - miR - 93 - 5p + LIR 组 PTEN 蛋白表达升高, p - Akt、PI₃K 蛋白表达降低 ($P < 0.05$) ;与 anti - miR - 93 - 5p 组比较, anti - miR - 93 - 5p + LIR 组 PTEN 蛋白表达降低, p - Akt、PI₃K 蛋白表达升高 ($P < 0.05$) 。Akt 组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 7, 图 2)。

表 7 心肌组织中 PTEN、p - Akt、PI₃K 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PTEN	PI ₃ K	p - Akt	Akt
sham 组	12	0.31 ± 0.04	1.10 ± 0.03	0.86 ± 0.05	1.23 ± 0.03
MI/R 组	11	1.02 ± 0.02 *	0.44 ± 0.02 *	0.34 ± 0.03 *	1.20 ± 0.04
LIR 组	12	0.57 ± 0.03 *#	0.82 ± 0.03 *#	0.77 ± 0.04 *#	1.23 ± 0.05
anti - miR - 93 - 5p 组	10	1.26 ± 0.05 *#Δ	0.11 ± 0.02 *#Δ	0.21 ± 0.03 *#Δ	1.22 ± 0.06
anti - miR - 93 - 5p + LIR 组	10	0.84 ± 0.04 *#Δ▲	0.68 ± 0.04 *#Δ▲	0.57 ± 0.04 *#Δ▲	1.19 ± 0.06

与 sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 MI/R 组比较, # $P < 0.05$; 与 LIR 组比较, Δ $P < 0.05$; 与 anti - miR - 93 - 5p 组比较, ▲ $P < 0.05$

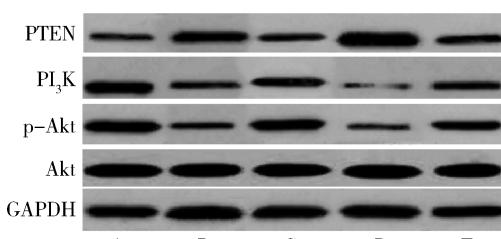


图 2 心脏组织中各蛋白检测

A. sham 组; B. MI/R 组; C. LIR 组; D. anti - miR - 93 - 5p 组;
E. anti - miR - 93 - 5p + LIR 组

讨 论

MI/R 时由于线粒体功能受损, 氧化应激水平升高, 进一步加重心肌损伤, 导致心肌细胞凋亡, 心脏收缩和舒张功能障碍^[7,8]。miRNA 参与调节细胞凋亡、细胞自噬、DNA 修复等多种生理过程。LIR 可降低糖尿病小鼠心肌细胞氧化应激水平、减轻高血压小鼠心肌纤维化、抑制心肌细胞凋亡, 改善心功能障碍^[9,10]。LIR 调节 JAK/STAT 信号通路在 1 型糖尿病中发挥抗炎作用, 而且 LIR 通过下调 miR - 124a 减轻非酒精

性脂肪性肝病^[11,12]。本研究通过建立 MI/R 大鼠模型,探讨 LIR 是否作用于 miR - 93 - 5p,降低氧化应激水平,改善心肌损伤。

CK - MB、LDH、cTnI 作为心肌损伤的标志物,已经成为临幊上评估心肌损伤的金标准。本研究中冠状动脉结扎前大鼠心肌损伤指标比较差异无统计学意义,冠状动脉结扎 60min 后及再灌注 4h 后大鼠 CK - MB、LDH、cTnI、AI 均升高,LIR 预处理降低血清中 CK - MB、LDH、cTnI 的含量及 AI,表明 LIR 可改善 MI/R 大鼠心肌损伤。研究表明,细胞氧化应激水平升高常表现为 MDA 含量升高,SOD 活性降低^[13,14]。本研究 MI/R 时 MDA 含量升高,SOD 活性降低,LIR 可降低 MDA 含量,增强 SOD 活性,提示 LIR 降低 MI/R 大鼠心脏组织氧化应激水平。

miR - 93 具有促细胞再生、抗细胞凋亡的作用^[15,16]。本研究 MI/R 大鼠心肌组织中 miR - 93 - 5p 水平降低,应用 LIR 后 miR - 93 - 5p 水平升高,说明 LIR 可能通过上调 miR - 93 - 5p,发挥心肌保护作用。研究发现,PTEN/PI₃K/Akt 信号通路激活具有抑制 MI/R 大鼠心肌细胞凋亡、减轻四氯化碳诱导的肝脏纤维化、改善心肌缺血造成的心功能障碍^[17~19]。本研究结果显示,MI/R 大鼠心肌组织中 PTEN/PI₃K/Akt 信号通路蛋白表达异常,LIR 对该通路具有调节作用,为进一步了解 LIR 是否通过 miR - 93 - 5p 调节 PTEN/PI₃K/Akt 信号通路减轻 MI/R 大鼠心肌损伤,MI/R 大鼠心肌内注射 anti - miR - 93 - 5p 后皮下注射 LIR,双荧光素酶报告基因法证明 miR - 93 - 5p 与 PTEN 具有直接靶向关系,蛋白印迹法证明 MI/R 大鼠心肌组织中 miR - 93 - 5p 表达下调时,PTEN 蛋白表达降低,PI₃K、p - Akt 蛋白表达升高,给予 LIR 后逆转 miR - 93 - 5p 下调对 PTEN、PI₃K、p - Akt 蛋白表达的影响,提示 miR - 93 - 5p 可能参与 LIR 对 PTEN/PI₃K/Akt 信号通路的调节。

综上所述,LIR 通过上调 miR - 93 - 5p,靶向调节 PTEN,发挥抗氧化应激作用,从而改善 MI/R 大鼠心肌损伤,为临床治疗 MI/R 提供实验依据。

参考文献

- 1 Yu P, Ma S, Dai X, et al. Elabala alleviates myocardial ischemia reperfusion - induced apoptosis, fibrosis and mitochondrial dysfunction through PI₃K/AKT signaling [J]. Am J Transl Res, 2020, 12 (8): 4467 - 4477
- 2 宋艳玲,麦华德,林芸芸,等.山莨菪碱对心肌缺血再灌注大鼠氧化应激、心肌损伤及线粒体凋亡通路的影响[J].中国免疫学杂志,2019,35(24):2958-2963
- 3 Ming - Yan Y, Jing Z, Shu - Qin G, et al. Liraglutide inhibits the apoptosis of human nucleus pulposus cells induced by high glucose through PI₃K/Akt/caspase - 3 signaling pathway [J]. Biosci Rep, 2019, 39 (8): BSR20190109
- 4 Yue W, Li Y, Ou D, et al. The GLP - 1 receptor agonist liraglutide protects against oxidized LDL - induced endothelial inflammation and dysfunction via KLF2 [J]. IUBMB Life, 2019, 71 (9): 1347 - 1354
- 5 Wu J, Xie F, Qin Y, et al. Notch signaling is involved in the anti-apoptotic effects of liraglutide on rat H9c2 cardiomyocytes exposed to hypoxia followed by reoxygenation [J]. J Int Med Res, 2020, 48 (9): DOI: 10. 1177/0300060520948394
- 6 Tang B, Xuan L, Tang M, et al. miR - 93 - 3p alleviates lipopolysaccharide - induced inflammation and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by inhibiting toll - like receptor 4 [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214 (10): 1686 - 1693
- 7 Wang L, Niu H, Zhang J. Homocysteine induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in myocardial ischemia/reperfusion injury through stimulating ROS production and the ERK1/2 signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2020, 20 (2): 938 - 944
- 8 曹旭丹,任春梅,和田田,等.水飞蓟宾对心肌缺血再灌注性心律失常的影响及机制探索[J].医学研究杂志,2019,48(10):117-120,143
- 9 Zhang L, Li C, Zhu Q, et al. Liraglutide, a glucagon - like peptide - 1 analog, inhibits high glucose - induced oxidative stress and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes [J]. Exp Ther Med, 2019, 17 (5): 3734 - 3740
- 10 Chen P, Yang F, Wang W, et al. Liraglutide attenuates myocardial fibrosis via inhibition of AT1R - mediated ROS production in hypertensive mice [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2021, 26 (2): 179 - 188
- 11 Zhao Y, Xie Y, Li W. Liraglutide exerts potential anti - inflammatory effect in type 1 diabetes by inhibiting IFN - γ production via suppressing JAK - STAT pathway [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2019, 19 (5): 656 - 664
- 12 Fang QH, Shen QL, Li JJ, et al. Inhibition of microRNA - 124a attenuates non - alcoholic fatty liver disease through upregulation of adipose triglyceride lipase and the effect of LIRaglutide intervention [J]. Hepatol Res, 2019, 49 (7): 743 - 757
- 13 白文伟,杨华,刘小永,等.紫草素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J].中国免疫学杂志,2019,35(16):1944-1950
- 14 金领微,潘敏,叶瀛洋,等.二甲双胍通过调节氧化应激、内质网应激和自噬减轻大鼠肾缺血再灌注损伤的作用研究[J].医学研究杂志,2020,49(1):111-117
- 15 Ma C, Peng P, Zhou Y, et al. MicroRNA93 promotes angiogenesis and attenuates remodeling via inactivation of the Hippo/Yap pathway by targeting Lats2 after myocardial infarction [J]. Mol Med Rep, 2020, 22 (1): 483 - 493
- 16 史丹阳,刘美玲,刘翔,等.myocardin 通过激活 miR - 93 - 5p 促进人主动脉血管平滑肌细胞分化[J].天津科技大学学报,2019,34(2):19-24

(转第 78 页)

明显的优势^[19]。对于我国大多数医院现状而言,时间成本、人力成本相对紧张,区块分拣虽然在淋巴结检出总数上低于精细分拣,但其清扫数目能作为有效评估病情的指标,且区块分拣相对较为简便,易于在大多数基层医院推广^[20]。因此,胃癌根治术后淋巴结区块分拣法可作为提高淋巴结检出率的有效方法应用于临床。

当然,本研究仍存在一定局限性:①纳入研究的患者样本量不够大;②本研究术中清扫淋巴结是否彻底是由外科医生根据血管脉络化程度判断,未采用淋巴结示踪剂等验证,可能会存在些许的偏差;③因纳入本研究的患者随访时间较短,所获得的生存数据不够全面,故未将生存分析作为研究目标。因此,需开展深入研究予以进一步证实。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209–249
- 2 王宁, 刘硕, 杨雷, 等. 2018 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, 5(1): 87–97
- 3 Smith DD, Schwarz RR, Schwarz RE. Impact of total lymph node count on staging and survival after gastrectomy for gastric cancer: data from a large US – population database [J]. J Clin Oncol, 2005, 23 (28): 7114–7124
- 4 Yasuhiro K, Kazumasa F, Norimasa F, et al. Surgical resection of hepatic metastasis from gastric cancer: a review and new recommendation in the Japanese gastric cancer treatment guidelines [J]. Gastric Cancer, 2014, 17(2): 206–212
- 5 Li Z, Zhang Q, Teng L, et al. Comparable rates of lymph node metastasis and survival between diffuse type and intestinal type early gastric cancer patients: a large population – based study [J]. Gastroint Endoscopy, 2019, 90(1): 84–95
- 6 邓靖宇. 胃癌根治术标本规范淋巴结送检及操作中国专家共识(2019 版)[J]. 中国实用外科杂志, 2019, 39(9): 881–889
- 7 Fang C, Wang W, Deng JY, et al. Proposal and validation of a modified staging system to improve the prognosis predictive performance of the 8th AJCC/UICC pTNM staging system for gastric adenocarcinoma: a multicenter study with external validation [J]. Cancer Commun (Lond), 2018, 38(1): 67
- 8 梁寒. 局部进展期胃癌合理淋巴结清扫范围再探讨[J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(1): 11–14
- 9 Deng J, Liu J, Wang W, et al. Validation of clinical significance of examined lymph node count for accurate prognostic evaluation of gastric cancer for the eighth edition of the american joint committee on cancer (AJCC) TNM staging system [J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(5): 477–491
- 10 Sano T, Coit DG, Kim HH, et al. Proposal of a new stage grouping of gastric cancer for TNM classification: international gastric cancer association staging project [J]. Gastric Cancer, 2017, 20(2): 217–225
- 11 季加孚, 李浙民, 薛侃, 等. 大数据与精准医疗时代胃癌诊治策略[J]. 中国实用外科杂志, 2015, 35(10): 1033–1036
- 12 张楠楠, 邓靖宇, 何文婷, 等. 727 例胃癌根治术标本淋巴结精细分拣的临床价值探讨[J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(1): 22–27
- 13 潘四维, 王鹏亮, 邢亚楠, 等. 胃癌不同解剖部位的淋巴结清扫:建议最佳数量、与其他淋巴结分期比较及其对预后的影响[J]. 癌症, 2020, 39(1): 32–44
- 14 Taeil SM, Woo JHM, Joong HLM, et al. Clinical implication of an insufficient number of examined lymph nodes after curative resection for gastric cancer [J]. Cancer, 2012, 118(19): 4687–4693
- 15 Deng J, Yamashita H, Seto Y, et al. Increasing the number of examined lymph nodes is a prerequisite for improvement in the accurate evaluation of overall survival of node – negative gastric cancer patients [J]. Annals Surg Oncol, 2017, 24(3): 745–753
- 16 中国抗癌协会胃癌专业委员会. 胃癌诊治难点中国专家共识(2020 版)[J]. 中国实用外科杂志, 2020, 40(8): 869–904
- 17 李忠武. 胃癌规范化病理诊断流程及相关问题[J]. 中国实用外科杂志, 2014, 34(7): 600–604
- 18 曾丽霞, 黄俊淇, 马韵, 等. 标本离体后不同时段固定对胃癌 HER2 检测的影响[J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(7): 468–472
- 19 黄丽花, 李维嫣, 吴家园, 等. 卫生经济学评价方法在临床医学研究中的应用概况[J]. 中国医药指南, 2019, 17(14): 58–60
- 20 陈明亮. 公立医院人力成本管理与控制的思考[J]. 中国管理信息化, 2020, 23(8): 18–19

(收稿日期: 2021-04-17)

(修回日期: 2021-05-17)

(接第 87 页)

- 17 Xing X, Guo S, Zhang G, et al. miR – 26a – 5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the PTEN/PI₃K/AKT signaling pathway [J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53 (2): e9106
- 18 Zhu L, Mou Q, Wang Y, et al. Resveratrol contributes to the inhibition of liver fibrosis by inducing autophagy via the microRNA – 20a –

mediated activation of the PTEN/PI₃K/AKT signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2020, 46(6): 2035–2046

- 19 Yin Y, Yang C. miRNA – 30 – 3p improves myocardial ischemia via the PTEN/PI₃K/AKT signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10): 17326–17336

(收稿日期: 2021-03-23)

(修回日期: 2021-05-07)