

# miR-22 对脂多糖诱导的心肌损伤的研究

姚 瑞 李亚彭 梁 翠 肖莉丽 张彦周 高 路

**摘要 目的** 探讨 miR-22 对脂多糖(LPS)诱导的心肌细胞损伤的保护作用及可能机制。**方法** 采用 LPS 刺激 H9c2 大鼠心肌细胞诱导心肌细胞损伤模型。采用 miR-22 模拟物转染心肌细胞,将细胞随机分为 4 组,即对照组、LPS 组、miR-22 + LPS 组和 miR-NC + LPS 组。RT-PCR 法检测细胞中 miR-22 表达;MTT 法检测细胞活性;TUNEL 染色检测细胞凋亡;免疫印迹法检测相关蛋白的表达;通过双荧光素酶报告基因实验证实 miR-22 对靶基因的调控作用。**结果** miR-22 的表达在 LPS 组显著低于对照组;MTT 试验结果显示 LPS 组细胞活性明显低于对照组,miR-22 + LPS 组细胞活性高于 LPS 组;TUNEL 染色显示 LPS 组细胞凋亡数量明显高于对照组,miR-22 + LPS 组细胞凋亡数量低于 LPS 组。与对照组比较,LPS 组 Bcl-2/Bax 比值显著下降;与 LPS 组比较,miR-22 + LPS 组 Bcl-2/Bax 比值明显升高。RT-PCR 和 Western blot 法检测结果表明,上调 miR-22 表达后,HMGB1 蛋白表达和 mRNA 水平明显降低。双荧光素酶报告实验显示 miR-22 靶向调控 HMGB1 的 mRNA 的 3'非编码区(3'UTR)。**结论** miR-22 可能通过负向调控 HMGB1 的表达减轻 LPS 诱导的心肌细胞损伤。

**关键词** miR-22 脂多糖 心肌细胞 凋亡 HMGB1

**中图分类号** R542.2

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.01.007

**Effects of miR-22 on Lipopolysaccharide Induced Myocardial Cell Damage.** YAO Rui, LI Yapeng, LIANG Cui, et al. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan 450052, China

**Abstract Objective** To investigate the effect and the mechanism of miR-22 on cardiomyocytes damage induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The damage model of cardiomyocytes was established by stimulating H9c2 cells with LPS. Cardiac myocytes were randomly divided into four groups: control group, LPS group, miR-22 + LPS group and miR-NC + LPS group. The expression of miR-22 was detected by RT-PCR, cell viability and apoptosis were detected by MTT and TUNEL staining, HMGB1 and apoptosis-related protein (Bax, Bcl-2) were detected by Western blot. Target Scan prediction and dual luciferase reporter assay were performed to confirm the interaction between miR-22 and HMGB1. **Results** The expression of miR-22 was significantly decreased in LPS-induced H9c2 cells. Overexpression of miR-22 can significantly promote cell viability and inhibit cell apoptosis. The expression of apoptosis-related proteins in the miR-22 + LPS group decreased significantly compared to LPS group. Dual luciferase reporter assay and western blot experiment showed that HMGB1 was a direct target of miR-22. **Conclusion** miR-22 may inhibit LPS-induced cardiomyocyte damage through negatively regulating HMGB1 expression.

**Key words** miR-22; Lipopolysaccharide; Cardiomyocytes; Apoptosis; HMGB1

脓毒症是重症患者的常见死因,如果得不到及时有效的控制,脓毒症会迅速发展成全身炎症反应综合征,最终导致多器官功能障碍<sup>[1]</sup>。脓毒症心肌病(sepsis-induced cardiomyopathy, SIC)是脓毒症多器官功能障碍的主要并发症之一,一旦发生,病死率高达 70%~90%<sup>[2,3]</sup>。由于缺乏对其机制的深入理解,目前临床上对 SIC 的治疗仍缺乏特效药。内毒素引起的心肌细胞损伤和心肌细胞凋亡在多种心血管疾

病的发病过程中具有重要作用,该机制会增加脓毒症患者的病死率<sup>[3-5]</sup>。研究特异性针对心肌细胞损伤与凋亡的药物可能用于靶向治疗 SIC。微小 RNA(miRNA)是一类单链非编码小分子 RNA,其长度约为 22 个核苷酸,可以与 mRNA 的 3'非编码区(3'UTR)结合,降解目的 mRNA,抑制翻译,进而调控靶基因的表达。大量研究已经证实 miRNA 在心血管疾病发生、发展中意义重大<sup>[5,6]</sup>。miR-22 最初被认为是一个肿瘤抑制因子,近年来研究证实,miR-22 参与心肌缺血再灌注、心肌肥厚等多种心血管疾病的发生、发展<sup>[7-9]</sup>。但是,目前涉及 miR-22 与 SIC 之间的研究甚少。本研究通过探讨 miR-22 在 LPS 诱导的心肌细胞损伤中的作用和机制,旨在为脓毒症心

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81970201);河南省优秀青年科学基金资助项目(212300410076)

作者单位:450052 郑州大学第一附属医院心血管内科

通信作者:高路,博士,副主任医师,电子信箱:gaomei1215@163.com

com

肌病的治疗提供实验依据。

### 材料与方 法

1. 主要试剂:所有细胞培养试剂均购自美国 Gibco 公司,免疫印迹所用一抗抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,LPS 购自美国 Sigma 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司,miR-22 模拟序列(miR-22 mimics)、阴性对照序列(scramble control miRNA)由上海吉玛制药技术有限公司构建完成。

2. 细胞培养:大鼠 H9c2 心肌细胞购自中科院上海细胞库。采用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)培养 H9c2 心肌细胞,当细胞汇合率至 80% 以上时进行传代。取第 3~8 代细胞用于实验。

3. 细胞分组:对照组:给予相同体积的 PBS 处理 24h;LPS 组:细胞采用 1 $\mu$ g/ml LPS 培养 24h;miR-22 模拟物 + LPS(miR-22 + LPS)组:采用 Fugene HD 转染试剂盒将 miR-22 模拟物(miR-22 mimic)转染细胞,6h 后更换为不含血清的 DMEM 培养基培养 8h,再加入 1 $\mu$ g/ml LPS 培养 24h;miR-22 阴性对照 + LPS(miR-NC + LPS)组:采用 Fugene HD 转染试剂盒将 miR-22 阴性对照序列转染细胞,6h 后更换为不含血清的 DMEM 培养基培养 8h,再加入 1 $\mu$ g/ml LPS 培养 24h。

4. MTT 检测心肌细胞活性:将细胞接种于 96 孔板中,经处理后,吸出培养基,PBS 清洗后,每孔加入 10 $\mu$ l MTT 溶液,孵育 4h 后加入二甲基亚砜,10min 后用酶标仪检测各孔在 490nm 处的吸光度。每组细胞活性(%) =  $(A_{处理} - A_{对照}) / A_{对照} \times 100\%$ 。

5. TUNEL 细胞凋亡分析:将细胞接种于 24 孔板中,经处理后采用 4% 多聚甲醛固定 10min,再用 TritonX-100 通透 10min,PBS 漂洗后按 TUNEL 操作说明书,在常温下孵育 TUNEL 染色液 1h,采用 DAPI 染色细胞核,细胞封片后在荧光显微镜下拍照。

6. 双荧光素酶报告基因实验:将含有 miR-22 结合位点的 HMGB1 3'UTR 序列及其突变体插入 pCMV-Promoter 载体荧光素酶报告基因下游,分别得到含野生型 HMGB1 3'UTR 的载体命名为 HMGB1-WT,含突变型 HMGB1 3'UTR 的载体命名为 HMGB1-MUT,将构建好的质粒分别与 miR-22 mimics、miR-NC 共转染 293T 细胞,继续培养 24h 后,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测细胞荧光素酶活性。

7. 实时荧光定量 PCR(RT-PCR):细胞接种于 6 孔板,经处理后每孔加入 1ml Trizol 裂解细胞提取总

RNA。采用 TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,并使用 TaKaRa 荧光定量试剂盒配制反应体系进行 PCR 扩增。以 U6 为 miR-22 的内参,GAPDH 为 HMGB1 的内参。采用  $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 的相对表达量分析。

8. Western blot 法检测:将各组细胞接种于 10cm 大皿,经上述处理后每孔加入 RIPA 裂解液裂解提取总蛋白。采用 BCA 法测定细胞蛋白浓度,行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转膜封闭后加入 HMGB1、Bax、Bcl-2 对应一抗孵育,采用 HRP 标记的二抗孵育。洗膜后 ECL 试剂盒显影,用 Image Lab 软件对条带进行分析。

9. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间数据比较用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. miR-22 和 HMGB1 在各组细胞中的表达:miR-22 在 LPS 组的表达明显低于对照组;与 LPS 组比较,miR-22 + LPS 组 miR-22 表达显著升高。HMGB1 的 mRNA 和蛋白水平在 LPS 组都明显高于对照组;与 LPS 组比较,miR-22 + LPS 组 HMGB1 的 mRNA 和蛋白水平显著下降,详见图 1、表 1。

表 1 miR-22 和 HMGB1 在心肌细胞中的表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-22	HMGB1 mRNA	HMGB1 蛋白
对照组	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.02
LPS 组	0.53 $\pm$ 0.08 *	2.42 $\pm$ 0.14 *	0.41 $\pm$ 0.04 *
miR-22 + LPS 组	0.87 $\pm$ 0.05 ** #	1.51 $\pm$ 0.10 * #	0.22 $\pm$ 0.03 * #
miR-NC + LPS 组	0.60 $\pm$ 0.04 *	2.27 $\pm$ 0.16 *	0.39 $\pm$ 0.03 *

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与 LPS 组比较,# $P < 0.05$

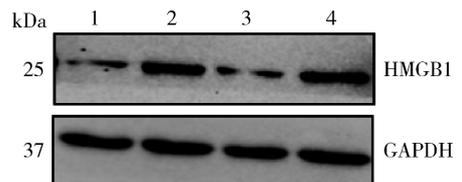


图 1 HMGB1 蛋白的表达

1. 对照组;2. LPS 组;3. miR-22 + LPS 组;4. miR-NC + LPS 组

2. miR-22 在 H9c2 中对细胞活性的影响:MTT 法检测结果显示,对照组、LPS 组、miR-22 + LPS 组、miR-NC + LPS 组细胞活性分别为 100.0%  $\pm$  7.1%、53.2%  $\pm$  3.1%、79.5%  $\pm$  4.9%、59.1%  $\pm$  2.6%。LPS 组、miR-22 + LPS 组及 miR-NC + LPS 组 H9c2

的细胞活性显著低于对照组 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 与 LPS 组比较, miR - 22 + LPS 组 H9c2 细胞活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。

3. miR - 22 在 H9c2 中对细胞凋亡的影响: TUNEL 染色结果显示, 对照组、LPS 组、miR - 22 + LPS 组和 miR - NC + LPS 组凋亡率分别为  $2.9\% \pm 1.1\%$ 、 $23.2\% \pm 3.5\%$ 、 $8.0\% \pm 1.6\%$  和  $23.4\% \pm 4.2\%$  ( $P < 0.05$ )。LPS 组、miR - 22 + LPS 组和

miR - NC + LPS 组细胞凋亡率明显高于对照组 ( $P$  均  $< 0.05$ ); miR - 22 + LPS 组细胞凋亡率较 LPS 组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 详见图 2。

4. miR - 22 对凋亡相关蛋白表达的影响: Western blot 法检测结果显示, 与对照组比较, LPS 组 Bax 表达显著上调, Bcl - 2 表达明显下降; 与 LPS 组比较, miR - 22 + LPS 组 Bax 表达显著下调, Bcl - 2 表达显著升高, 详见图 3、表 2。

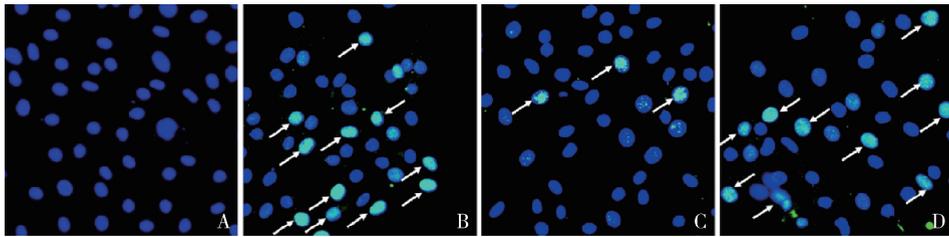


图 2 miR - 22 对 LPS 诱导下 H9c2 细胞凋亡的影响 ( $\times 400$ )

A. 对照组; B. LPS 组; C. miR - 22 + LPS 组; D. miR - NC + LPS 组

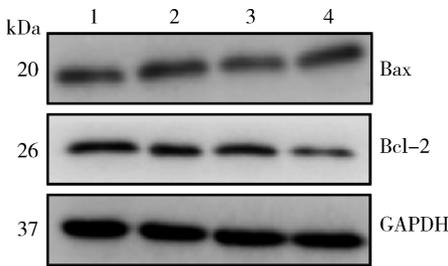


图 3 各组细胞中凋亡相关蛋白的表达

1. 对照组; 2. LPS 组; 3. miR - 22 + LPS 组; 4. miR - NC + LPS 组

表 2 各组细胞中凋亡相关蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Bax 蛋白	Bcl - 2 蛋白
对照组	$0.22 \pm 0.03$	$0.46 \pm 0.06$
LPS 组	$0.73 \pm 0.04^*$	$0.21 \pm 0.03^*$
miR - 22 + LPS 组	$0.41 \pm 0.03^{* \#}$	$0.35 \pm 0.02^{* \#}$
miR - NC + LPS 组	$0.72 \pm 0.03^*$	$0.20 \pm 0.02^*$

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 LPS 组比较, #  $P < 0.05$

5. miR - 22 调控 HMGB1 的表达: Target Scan 预测结果表明 HMGB1 的 3'UTR 上存在 miR - 22 的结合位点(图 4)。将 miR - NC mimics 和 miR - 22 mimics 分别与 HMGB1 - WT 共转染后, 荧光素酶活性分别为  $1.04 \pm 0.07$ 、 $0.42 \pm 0.03$ , miR - 22 组 HMGB1 - WT 活性显著低于 miR - NC 组 ( $P < 0.05$ ); 而 miR - NC mimics 和 miR - 22 mimics 分别与 HMGB1 - MUT 质粒共转染后, 荧光素酶活性分别为  $1.03 \pm 0.08$ 、 $0.97 \pm 0.06$ , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

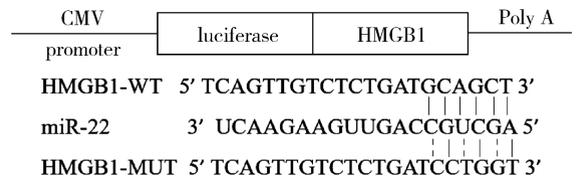


图 4 HMGB1 的 3'UTR 中含有与 miR - 22 互补的核苷酸序列

## 讨 论

SIC 是重症监护病房脓毒症患者最常见的死亡原因之一。LPS 是革兰阴性细菌的主要结构组成部分, 可诱发脓毒症, 其中心肌功能障碍是公认的主要表现之一, 本研究以 LPS 刺激心肌细胞诱导心肌细胞损伤模型以模拟 SIC<sup>[2]</sup>。在 LPS 诱导的心肌损伤中, 细胞坏死和凋亡是细胞损伤的主要过程。在心肌损伤早期细胞损伤多以细胞凋亡的形式开始, 因此早期抑制细胞凋亡有助于及时阻止细胞损伤、减少细胞数量的丢失, 恢复心脏功能<sup>[3,4]</sup>。

miR - 22 是位于人 17 号染色体上的非编码短链小 RNA, 由 22 个核苷酸组成, 在心肌细胞中高表达<sup>[10]</sup>。miR - 22 参与细胞增殖分化、凋亡、自噬、纤维化等多种生物学功能的调控<sup>[11]</sup>。miR - 22 在心血管疾病中发挥重要作用。在缺血心肌中, miR - 22 通过减少炎症反应发挥保护作用<sup>[12]</sup>; 在糖尿病心肌病中, miR - 22 通过调控 Sirt1 的表达减少心肌氧化应激损伤<sup>[13]</sup>。另外有研究发现, 在内皮细胞中, miR - 22 通过抑制 NLRP3 的表达减轻炎症反应<sup>[14]</sup>。本研

究采用 H9c2 心肌细胞,以 LPS 刺激诱导细胞损伤,通过 MTT 分析研究 miR-22 对 LPS 诱导的心肌细胞毒性的保护作用,结果显示用 LPS 处理后细胞活力减低,但是,当采用 miR-22 mimics 在心肌细胞内过表达 miR-22,结果显示细胞过表达 miR-22 可以大大降低细胞活力的损失。Western blot 法检测结果显示 LPS 处理心肌细胞后,Bcl-2/Bax 比值显著下降,而 miR-22 + LPS 组 Bcl-2/Bax 比值显著升高,心肌细胞凋亡显著改善。这些结果表明,miR-22 在心肌细胞中可能有增强细胞活力和抗凋亡的作用,上调 miR-22 表达可能有利于心肌细胞生存。

通过生物信息学预测 HMGB1 是 miR-22 潜在靶基因,双光素酶报告实验表明 HMGB1 是 miR-22 的直接靶基因。HMGB1 蛋白是一种非组蛋白核蛋白,具有稳定核小体结构、DNA 修复、调节胆固醇等作用。大量研究已经证实,HMGB1 在多种心血管疾病特别是心肌梗死、心肌肥厚和心肌炎等疾病过程中发挥重要调控作用<sup>[15, 16]</sup>。既往研究表明,靶向沉默 HMGB1 可以抑制细胞凋亡,促进细胞存活<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,在 LPS 处理的 H9c2 细胞中,过表达 miR-22 抑制了 HMGB1 的蛋白表达,同时下调了 HMGB1 的 mRNA 水平。因此,推测 miR-22 通过负性调控 HMGB1 的转录抑制 HMGB1 的释放,从而减少心肌细胞对 LPS 的损伤反应。

综上所述,本研究利用 LPS 诱导建立 H9c2 心肌细胞损伤模型,结果显示 miR-22 在 LPS 诱导的心肌细胞损伤模型中表达降低,并且证实高表达的 miR-22 能够下调 HMGB1 的表达,抑制 LPS 诱导的心肌细胞损伤,使得细胞活力显著升高,降低细胞凋亡,表明 miR-22 对 LPS 造成的心肌细胞损伤具有保护作用。本研究为探索 miR-22 的具体作用机制提供了实验依据,同时也为预防并干预脓毒症和 SIC 提供了新思路。

#### 参考文献

- Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives[J]. *Immunity*, 2014, 40(4): 463-475
- Liu YC, Yu MM, Shou ST, et al. Sepsis-induced cardiomyopathy: mechanisms and treatments[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1021
- Wang Y, Wang Y, Yang D, et al. Beta(1)-adrenoceptor stimulation promotes LPS-induced cardiomyocyte apoptosis through activa-

- ting PKA and enhancing CaMKII and IkappaBalpha phosphorylation [J]. *Crit Care*, 2015, 19: 76
- Li N, Zhou H, Wu H, et al. STING - IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3 [J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101215
- van Rooij E, Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(11): 860-872
- Duygu B, de Windt LJ, da Costa Martins PA. Targeting microRNAs in heart failure [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2016, 26(2): 99-110
- Xu D, Takeshita F, Hino Y, et al. MiR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence [J]. *J Cell Biol*, 2011, 193(2): 409-424
- Jazbutyte V, Fiedler J, Kneitz S, et al. MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart [J]. *Age (Dordr)*, 2013, 35(3): 747-762
- Huang ZP, Chen J, Seok HY, et al. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress [J]. *Circ Res*, 2013, 112(9): 1234-1243
- Yang F, Chen Q, He S, et al. miR-22 is a novel mediator of vascular smooth muscle cell phenotypic modulation and neointima formation [J]. *Circulation*, 2018, 137(17): 1824-1841
- Xiong J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(3): 247-258
- Yang J, Chen L, Ding J, et al. Cardioprotective effect of miRNA-22 on hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte injury in neonatal rats [J]. *Gene*, 2016, 579(1): 17-22
- Tang Q, Len Q, Liu Z, et al. Overexpression of miR-22 attenuates oxidative stress injury in diabetic cardiomyopathy via Sirt [J]. *Cardiovasc Ther*, 2018, 36(2), Doi: 10.1111/1755-5922.2318
- Huang WQ, Wei P, Lin RQ, et al. Protective effects of microRNA-22 against endothelial cell injury by targeting nlrp3 through suppression of the inflammasome signaling pathway in a rat model of coronary heart disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(4): 1346-1358
- Pellegrini L, Foglio E, Pontemuzzo E, et al. HMGB1 and repair: focus on the heart [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 196: 160-182
- Rauci A, Di Maggio S, Scavallo F, et al. The Janus face of HMGB1 in heart disease: a necessary update [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(2): 211-229
- Alduais S, Alduais Y, Wu X, et al. HMGB1 knock-down promoting tumor cells viability and arrest pro-apoptotic proteins via Stat3/NFkappaB in HepG2 cells [J]. *Biofactors*, 2018, 44(6): 570-576

(收稿日期: 2021-07-29)

(修回日期: 2021-08-15)