

[文章编号] 1671-587X(2026)01-0135-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20260114

## miR-378对缺氧/复氧引发心肌细胞损伤的保护作用及其机制

赵 亮, 陈 云, 谢 伟

(新疆生产建设兵团医院心脏中心, 新疆 乌鲁木齐 830002)

**[摘 要]** **目的:** 探讨微小RNA (miR)-378在心肌缺血再灌注 (I/R) 引起的心肌细胞损伤中的作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 培养人心肌细胞 AC16 和人单核巨噬细胞 THP-1, 首先将 miR-378 模拟物 (mimics) 及其阴性对照 (miR-NC) 分别转染至 THP-1 细胞中, 分为对照组、miR-NC 组和 miR-378 mimics 组, 对照组 THP-1 细胞正常培养, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测转染后各组 THP-1 细胞中 miR-378 表达水平以及 M1 型巨噬细胞分泌物 [诱导型一氧化氮合酶 (*iNOS*)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* )、白细胞介素 1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ) 和白细胞介素 6 (*IL-6*)] 和 M2 型巨噬细胞分泌物 [精氨酸酶 1 (*Arg-1*)、转化生长因子  $\beta$ 1 (*TGF- $\beta$ 1*)、白细胞介素 4 (*IL-4*) 和白细胞介素 10 (*IL-10*)] mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组 THP-1 细胞中 M1 型巨噬细胞表面标志蛋白分化簇 86 (CD86) 和 M2 型巨噬细胞表面标志蛋白分化簇 206 (CD206) 表达水平。AC16 细胞进行缺氧/复氧 (H/R) 处理模拟 I/R 心肌细胞损伤, 并与不同处理的 THP-1 细胞建立共培养体系, 分为对照组 (上室为 AC16 细胞, 下室为 THP-1 细胞)、H/R 组 (上室为 H/R 诱导的 AC16 细胞, 下室为 THP-1 细胞)、miR-NC+H/R 组 (上室为 H/R 诱导的 AC16 细胞, 下室为转染 miR-NC 的 THP-1 细胞) 和 miR-378 mimics+H/R 组 (上室为 H/R 诱导的 AC16 细胞, 下室为转染 miR-378 mimics 的 THP-1 细胞)。采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测各组 AC16 细胞活性, 试剂盒检测各组 AC16 细胞中丙二醛 (MDA) 和活性氧 (ROS) 水平及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性以及细胞上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。**结果:** RT-qPCR 法和 Western blotting 法, 与对照组和 miR-NC 组比较, miR-378 mimics 组 THP-1 细胞中 miR-378 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), THP-1 细胞中 *iNOS*、*TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$*  和 *IL-6* mRNA 表达水平和 CD86 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), THP-1 细胞中 *Arg-1*、*TGF- $\beta$ 1*、*IL-4* 和 *IL-10* mRNA 表达水平以及 CD206 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); CCK-8 法和试剂盒法, 与对照组比较, H/R 组 AC16 细胞活性明显降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞中 MDA 和 ROS 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞上清液中 LDH 活性明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 H/R 组比较, miR-378 mimics+H/R 组 AC16 细胞活性明显升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞中 MDA 和 ROS 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞上清液中 LDH 活性明显降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** miR-378 可减轻 H/R 所致的心肌细胞损伤, 其作用机制可能与调节巨噬细胞向 M2 型极化有关。

**[关键词]** 心肌缺血再灌注; 微小RNA-378; 心肌细胞; 巨噬细胞; 缺氧/复氧

**[中图分类号]** R543 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2025-03-03 **[录用日期]** 2025-04-14

**[基金项目]** 新疆生产建设兵团科技局科技计划项目 (2023AB018-07)

**[作者简介]** 赵 亮 (1981—), 男, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人, 副主任医师, 主要从事冠心病和心律失常介入诊疗方面的研究。

**[通信作者]** 谢 伟, 主任医师 (E-mail: xieweixinyu@sina.com)

© 《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

## Protective effect of *miR-378* on myocardial cell injury induced by hypoxia/reoxygenation and its mechanism

ZHAO Liang, CHEN Yun, XIE Wei

(Heart Center, Xinjiang Production and Construction Corps Hospital, Urumqi 830002, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the role of microRNA (miR)-378 in cardiomyocyte injury induced by myocardial ischemia reperfusion (I/R), and to clarify its mechanism. **Methods:** The human cardiomyocytes AC16 and human monocyte macrophages THP-1 were cultured. Firstly, miR-378 mimics and its negative control (miR-NC) were transfected into the THP-1 cells respectively. The cells were divided into control group, miR-NC group and miR-378 mimics group, the THP-1 cells in control group were cultured normally. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression level of miR-378 and the expression levels of M1 macrophage secreted factors [inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6)] and M2 macrophage secreted factors [arginase-1 (Arg-1), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10)] in the THP-1 cells after transfected; Western blotting method was used to detect the expression levels of M1 macrophage surface marker protein cluster of differentiation 86 (CD86) and M2 macrophage surface marker protein cluster of differentiation 206 (CD206). The AC16 cells underwent hypoxia/reoxygenation (H/R) treatment to simulate I/R cardiomyocyte injury, and were co-cultured with differently treated THP-1 cells. The cells were divided into control group (upper chamber containing AC16 cells, lower chamber containing THP-1 cells), H/R group (upper chamber containing H/R-induced AC16 cells, lower chamber containing THP-1 cells), miR-NC+H/R group (upper chamber containing H/R-induced AC16 cells, lower chamber containing THP-1 cells transfected with miR-NC) and miR-378 mimics+H/R group (upper chamber containing H/R-induced AC16 cells, lower chamber containing THP-1 cells transfected with miR-378 mimics). Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the activities of the AC16 cells in various groups; kits were used to detect the levels of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in the AC16 cells in various groups as well as the lactate dehydrogenase (LDH) activity in the cell supernatant. **Results:** The RT-qPCR method and Western blotting method results showed that compared with control group and miR-NC group, the expression level of *miR-378* in the THP-1 cells in miR-378 mimics group was significantly increased ( $P < 0.05$ ); the expression levels of iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 mRNA and the expression level of CD86 protein in the THP-1 cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ); the expression levels of Arg-1, TGF- $\beta$ 1, IL-4, and IL-10 mRNA and the expression level of CD206 protein in the THP-1 cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The CCK-8 method and kit method results showed that compared with control group, the activity of the AC16 cells in H/R group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the levels of MDA and ROS in the cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the activity of SOD was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the LDH activity in the cell supernatant was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with H/R group, the activity of the AC16 cells in miR-378 mimics+H/R group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), the levels of MDA and ROS in the cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the activity of SOD was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the LDH activity in the cell supernatant was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miR-378 can alleviate H/R-induced cardiomyocyte injury, and its mechanism may be related to regulating macrophage polarization towards the M2 phenotype.

**KEYWORDS** Myocardial ischemia-reperfusion; MicroRNA-378; Cardiomyocytes; Macrophages; Hypoxia/reoxygenation

随着现代生活方式和饮食习惯的显著变化, 冠状动脉疾病逐渐成为全球范围内危害人类健康的主要疾病之一。冠状动脉的严重狭窄或急性闭塞可能导致心肌缺血甚至心肌坏死, 因此, 尽早实施心肌缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 治疗以恢复心肌血供, 是目前最有效的干预措施<sup>[1]</sup>。然而, 在I/R治疗过程中, 缺血心肌血供的快速恢复并不会改善已受损的组织, 反而可能加重并延长心肌细胞的损伤, 这种现象被称为I/R损伤<sup>[2-3]</sup>。目前尚缺乏有效的治疗方法来减轻心肌I/R损伤。微小RNA (microRNA, miRNA) 是一大类在转录后水平调控靶基因表达的短链非编码RNA分子, 长度为21~24个核苷酸。miRNA广泛存在于不同类型的细胞中, 并在多种人类疾病中发挥重要作用。近年来, 研究<sup>[4]</sup>表明: miRNA在心肌I/R损伤中发挥关键作用, 部分miRNA可能作为临床治疗的新靶点。研究<sup>[5]</sup>显示: 在过氧化氢诱导的心肌细胞损伤中 *miR-378* 表达水平降低, 提高其表达水平可通过抑制含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase) 3/9 活性, 减少过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡和炎症细胞因子释放。在结扎小鼠左前降支冠状动脉建立的心肌I/R损伤模型中, 过表达 *miR-378* 能够减轻心肌损伤并抑制炎症浸润<sup>[6]</sup>。然而, *miR-378* 在心肌I/R损伤中的具体作用机制仍未完全阐明。因此, 本研究探讨 *miR-378* 在体外缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 诱导的心肌细胞I/R损伤中的作用, 并初步阐明其作用机制, 为临床治疗心肌I/R损伤提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 人心肌细胞AC16购自上海匹拓生物科技有限公司, 人单核细胞白血病细胞 THP-1 购自武汉尚恩生物技术有限公司。胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司, 1%青-链霉素双抗液、RPMI-1640培养基和DMEM培养基购自美国HyClone公司, Lipofectamine RNAiMAX购自美国Invitrogen公司, TRIzol和反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司, miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒和二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质定量试剂盒购自

北京天根生化科技有限公司, PowerUp SYBR Green Master试剂盒购自美国ABI公司, 快速蛋白裂解液购自上海圻明生物科技有限公司, Transwell细胞共培养室购自上海睿安生物科技有限公司, 细胞计数试剂盒8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂购自上海贝博生物科技有限公司, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒购自上海吉至生化科技有限公司, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒购自上海优利科生命科学有限公司, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒购自北京伊塔生物科技有限公司, 兔抗分化簇86 (cluster of differentiation 86, CD86) 多克隆抗体、兔抗分化簇206 (cluster of differentiation 206, CD206) 多克隆抗体和兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体购自英国Abcam公司。基因引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, *miR-378* 模拟物 (mimics) 及其阴性对照 (miR-NC) 由上海吉凯基因有限公司设计并合成。BSC-180C型细胞培养箱购自广州科文生物技术有限公司, THZ-24-S型摇床购自江苏新春兰科学仪器有限公司, AU680型酶标仪购自美国Beckman Coulter公司, CFX96型实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 系统购自美国Bio-Rad公司, EPS-200型电转仪购自北京尤尼普实验仪器有限公司。

**1.2 AC16细胞和THP-1细胞培养** AC16细胞培养于含有10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗液的DMEM培养基中。THP-1细胞培养于含有10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗液的RPMI-1640培养基中, 上述2种细胞均于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中静置培养, 当细胞生长至对数生长期时, 取细胞进行后续实验研究。

**1.3 THP-1细胞转染*miR-378*模拟物 (*miR-378* mimics)** 将培养的巨噬细胞接种于6孔细胞培养板, 密度为每孔5×10<sup>4</sup>个细胞, 转染时细胞融合度为80%, 分3组进行转染: 对照组、miR-NC组和miR-378 mimics组。采用Lipofectamine RNAiMAX试剂进行转染, 将Opti-MEM分别与miR-NC和

*miR-378* mimics 混合, 再将混合物添加到 THP-1 细胞中, 分别记为 miR-NC 组和 miR-378 mimics 组, 以未经转染、正常培养的 THP-1 细胞作为对照组。将培养板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 4 h 后更换为新鲜培养基继续培养, 48 h 后收集细胞, 进行后续实验。

**1.4 RT-qPCR 法检测各组 THP-1 细胞中 *miR-378* 和巨噬细胞分泌物 mRNA 表达水平** 收集转染后的各组 THP-1 细胞, 采用 TRIzol 法从细胞中分离总 RNA, 再将其逆转录为 cDNA, 保存于 -20 °C 冰箱中。采用 RT-qPCR 实验扩增目的基因, 检测 *miR-378* 以及诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric

oxide synthase, *iNOS*)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , *TNF- $\alpha$* )、白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , *IL-1 $\beta$* )、白细胞介素 6 (interleukin-6, *IL-6*)、精氨酸酶 1 (arginase-1, *Arg-1*)、转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, *TGF- $\beta$ 1*)、白细胞介素 4 (interleukin-4, *IL-4*) 和白细胞介素 10 (interleukin-10, *IL-10*) mRNA 表达水平, 以 *U6* 作为 *miR-378* 内参, 用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒进行检测; 以 *GAPDH* 作为其余基因的内参, 用 PowerUp SYBR Green Master 试剂盒进行检测。反应结束后, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup>  法计算各目的基因 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列  
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Forword 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>MiR-378</i>	CTGAGACTGGACTTGGAGTC	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>U6</i>	TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC	CCAGTGCAGGGTCCGAGGT
<i>iNOS</i>	GGACTAGCACAGACACACGGA	CTTCAGAGGAGCAGCACCAGA
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCAGATT
<i>IL-6</i>	ATCTGGATTCAATGAGGAGA	TCTGGCTTGTTCTCCTCACTAC
<i>Arg-1</i>	TCATCTGGGTGGATGCTCACAC	GAGAATCCTGGCACATCGGGAA
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	ATGGACCAGTATAAGGCAAGC	GCTCTGGATGAGCCTATATTG
<i>IL-4</i>	AAAACCTTTGAACAGCCTACAG	GGTTTCCTTCTCAGTTGTGTTC
<i>IL-10</i>	GTTGTTAAAGGAGTCCTTGCTG	TTCACAGGGAAGAAATCGATGA
<i>GAPDH</i>	CCACTCCTCCACCTTTGAC	ACCCTGTTGCTGTAGCCA

**1.5 Western blotting 法检测各组 THP-1 细胞中 M1 型巨噬细胞表面标志蛋白 CD86 和 M2 型巨噬细胞表面标志蛋白 CD206 表达水平** 使用蛋白裂解液提取转染后的各组 THP-1 细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将等量蛋白上样至凝胶孔, 在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上进行电泳, 分离后的蛋白电转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 依次加入稀释后的兔抗 CD86 多克隆抗体 (1:1 000)、兔抗 CD206 多克隆抗体 (1:1 000), 以兔抗 GAPDH 多克隆抗体 (1:1 000) 作为内参, 置于 4 °C 摇床, 将抗体与膜共孵育。次日, 加入稀释的二抗 (1:5 000), 置于室温下孵育 1 h。结束后, 采用增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 技术显色, 凝胶系统成像拍照, Image J 软

件分析蛋白条带灰度值, 并计算 CD86 和 CD206 蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参 GAPDH 蛋白条带灰度值。

**1.6 共培养体系的构建、分组和处理** 使用 Transwell 细胞共培养室进行 THP-1 细胞与 AC16 细胞的共培养, 将 AC16 细胞以每孔 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 个的密度接种到共培养室的上室, 将 THP-1 细胞以每孔 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个的密度接种到共培养室的下室, 中间有 0.4  $\mu$ m 微孔膜, 确保培养液及可溶性分析可以透过。实验分为 4 组, 具体分组及处理方法如下: ①对照组, 上室为 AC16 细胞, 下室为 THP-1 细胞; ②H/R 组, 上室为 H/R 诱导的 AC16 细胞, 下室为 THP-1 细胞; ③miR-NC+H/R 组, 上室为 H/R 诱导的 AC16 细胞, 下室为转染 *miR-NC* 的 THP-1 细胞; ④miR-378 mimics+H/R 组, 上室为 H/R 诱导的 AC16 细胞, 下室为转染 *miR-378* mimics 的 THP-1 细胞, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱

中共培养 24 h。在共培养前, 参考文献 [7] 方法对 AC16 细胞进行 H/R 处理模拟 I/R 心肌细胞损伤: 将不含糖和血清的 DMEM 培养基经过 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气体平衡 2 h, 作为饱和缺氧液, 除对照组外的其余 3 组 AC16 细胞均换用此饱和缺氧液, 置于 37 °C、95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的缺氧培养箱中培养 8 h, 进行缺氧处理; 再换用含糖和血清的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的正常培养箱中培养 8 h, 进行复氧处理。

**1.7 CCK-8 法检测各组 AC16 细胞活性** 收集“1.2”处理后的 AC16 细胞, 调整细胞以每孔 5 × 10<sup>4</sup> 个的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 常规过夜培养后, 向每孔细胞中加入 10 μL CCK-8 试剂, 再将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中静置孵育 2 h。采用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞活性。细胞活性 = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) × 100%。

**1.8 采用试剂盒检测各组 AC16 细胞中 MDA 和 ROS 水平及 SOD 活性以及细胞上清液中 LDH 活性** AC16 细胞按照“1.2”分组处理后, 分别收集细胞和细胞培养基上清液, 按照 MDA、ROS、SOD 和 LDH 检测试剂盒说明书操作, 测定各组细胞中 MDA 和 ROS 水平及 SOD 活性以及细胞上清液中 LDH 活性。

表 2 各组 THP-1 细胞中 M1 型巨噬细胞分泌物 *iNOS*、*TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-6* 以及 M2 型巨噬细胞分泌物 *Arg-1*、*TGF-β1*、*IL-4* 和 *IL-10* mRNA 表达水平

Tab. 2 Expression levels of *iNOS*, *TNF-α*, *IL-1β*, and *IL-6* mRNA secreted by M1 macrophages and *Arg-1*, *TGF-β1*, *IL-4* and *IL-10* mRNA secreted by M2 macrophages in THP-1 cells in various groups (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	<i>iNOS</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>	<i>Arg-1</i>	<i>TGF-β1</i>	<i>IL-4</i>	<i>IL-10</i>
Control	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10
MiR-NC	1.02 ± 0.09	0.98 ± 0.08	0.99 ± 0.10	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.09	1.02 ± 0.11	1.01 ± 0.10	0.99 ± 0.11
MiR-378 mimics	0.34 ± 0.04 <sup>△</sup>	0.45 ± 0.05 <sup>△</sup>	0.41 ± 0.05 <sup>△</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>△</sup>	2.46 ± 0.26 <sup>△</sup>	3.03 ± 0.32 <sup>△</sup>	3.48 ± 0.41 <sup>*△</sup>	2.32 ± 0.25 <sup>*△</sup>

\*P < 0.05 compared with control group; <sup>△</sup>P < 0.05 compared with miR-NC group.

**2.3 各组 THP-1 细胞中巨噬细胞表面标志蛋白 CD86 和 CD206 表达水平** Western blotting 法检测结果显示: miR-378 mimics 组 THP-1 细胞中 CD86 蛋白表达水平明显低于对照组和 miR-NC 组 (P < 0.05), 而 CD206 蛋白表达水平明显高于对照组和 miR-NC 组 (P < 0.05)。见图 1。

**2.4 各组 AC16 细胞活性** CCK-8 法检测结果显示: 与对照组 (100.00% ± 9.29%) 比较, H/R 组

**1.9 统计学分析** 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。各组 THP-1 细胞中 *miR-378* 表达水平, M1 型巨噬细胞分泌物 *iNOS*、*TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-6* mRNA 表达水平, M2 型巨噬细胞分泌物 *Arg-1*、*TGF-β1*、*IL-4* 和 *IL-10* mRNA 表达水平, 巨噬细胞表面标志蛋白 CD86 和 CD206 表达水平, 各组 AC16 细胞活性, AC16 细胞中 MDA 和 ROS 水平及 SOD 活性以及细胞上清液中 LDH 活性均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

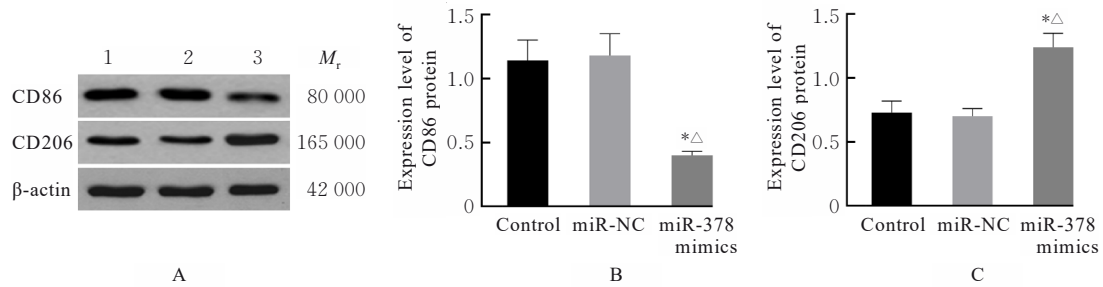
## 2 结果

**2.1 各组 THP-1 细胞中 *miR-378* 表达水平** THP-1 细胞转染后, RT-qPCR 法检测结果显示: 与对照组 (1.00 ± 0.04) 和 miR-NC 组 (1.02 ± 0.08) 比较, miR-378 mimics 组 THP-1 细胞中 *miR-378* 表达水平 (3.75 ± 0.39) 明显升高 (P < 0.05)。

**2.2 各组 THP-1 细胞中巨噬细胞分泌物 mRNA 表达水平** RT-qPCR 法检测结果显示: 与对照组和 miR-NC 组比较, miR-378 mimics 组 THP-1 细胞中 M1 型巨噬细胞分泌物 *iNOS*、*TNF-α*、*IL-1β* 和 *IL-6* mRNA 表达水平明显降低 (P < 0.05), M2 型巨噬细胞分泌物 *Arg-1*、*TGF-β1*、*IL-4* 和 *IL-10* mRNA 表达水平明显升高 (P < 0.05)。见表 2。

AC16 细胞活性 (62.56% ± 6.70%) 明显降低 (P < 0.05); 与 H/R 组比较, miR-378 mimics + H/R 组 AC16 细胞活性 (83.95% ± 8.67%) 明显升高 (P < 0.05), miR-NC + H/R 组 AC16 细胞活性 (64.68% ± 6.68%) 未发生明显变化, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

**2.5 各组 AC16 细胞中 MDA 和 ROS 水平及 SOD 活性** 与对照组比较, H/R 组 AC16 细胞中 MDA



Lane 1: Control group; Lane 2: MiR-NC group; Lane 3: MiR-378 mimics group. \* $P < 0.05$  compared with control group;  $\Delta P < 0.05$  compared with miR-NC group.

图1 转染 miR-378 后 THP-1 细胞中 CD86 和 CD206 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B, C)

Fig.1 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of CD86 and CD206 proteins in THP-1 cells after transfected with miR-378

和 ROS 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 H/R 组比较, miR-378 mimics + H/R 组 AC16 细胞中 MDA 和 ROS 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 miR-NC + H/R 组 AC16 细胞中 MDA 和 ROS 水平及 SOD 活性均未发生明显变化, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

表3 各组 AC16 细胞中 MDA 和 ROS 水平及 SOD 活性  
Tab. 3 Levels of MDA and ROS and activities of SOD in AC16 cells in various groups ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	MDA [ $m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$ ]	ROS ( $\eta/\%$ )	SOD [ $\lambda_B/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ ]
Control	7.65 ± 0.77	8.45 ± 0.86	180.34 ± 19.46
H/R	16.67 ± 1.53*	36.73 ± 3.69*	114.56 ± 12.36*
MiR-NC + H/R	17.05 ± 1.86	35.86 ± 3.87	116.83 ± 13.62
MiR-378 mimics + H/R	10.86 ± 1.13 $\Delta$	22.59 ± 2.38 $\Delta$	143.80 ± 15.29 $\Delta$

\* $P < 0.05$  compared with control group;  $\Delta P < 0.05$  compared with H/R group.

**2.6 各组 AC16 细胞上清液中 LDH 活性** 各组 AC16 细胞上清液中 LDH 活性检测结果显示: H/R 组 AC16 细胞上清液中 LDH 活性 ( $185.56 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \pm 19.09 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 明显高于对照组 ( $32.57 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \pm 3.54 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ); 与 H/R 组比较, miR-378 mimics + H/R 组 AC16 细胞上清液中 LDH 活性 ( $97.14 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \pm 9.88 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 明显降低 ( $P < 0.05$ ), miR-NC + H/R 组 AC16 细胞上清液中 LDH 活性 ( $187.08 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \pm 19.21 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 未发生明显变化, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

尽管心肌 I/R 可有效减小冠状动脉闭塞所引起的心肌梗死范围, 改善患者的临床结局, 但恢复血流可能对心肌造成二次损害, 加剧心肌组织的功能障碍和结构损伤, 导致患者生存率下降<sup>[8]</sup>。心肌 I/R 损伤的发生机制复杂, 涉及多种基因的调控。因此, 识别 I/R 后心肌损伤的关键调节因子, 对于开发预防或逆转 I/R 后心肌损伤的治疗策略至关重要。近年来, 越来越多的研究<sup>[9-10]</sup>证实 miR-378 在心血管疾病中起重要作用。在血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导的 H9c2 细胞和小鼠模型中, miR-378 表达水平的降低与心肌细胞肥大的发生存在关联, 且提高其表达水平能够抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大, 减缓心力衰竭的进展<sup>[11]</sup>; 在压力超负荷心力衰竭大鼠模型中, 丹红注射液干预能提高心肌组织中 miR-378 表达水平, 从而改善心功能并减轻心肌纤维化<sup>[12]</sup>。上述研究发现为 miR-378 在心肌 I/R 损伤中作用的探讨提供了理论支持。

在心肌 I/R 损伤后, 心脏重塑的关键阶段之一是炎症级联反应的启动。巨噬细胞是心脏中最大的免疫细胞亚群, 在各种病理条件下表现出显著的可塑性和异质性。根据功能和分泌细胞因子的不同, 巨噬细胞主要分为 M1 型和 M2 型。在心肌 I/R 损伤早期, M1 型巨噬细胞会迅速募集到心肌梗死区, 并释放 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促炎因子, 进而发挥促炎效应<sup>[13]</sup>。在损伤修复阶段, 巨噬细胞从 M1 型极化为 M2 型, 分泌 Arg-1、TGF- $\beta$ 1、IL-4 和 IL-10 等细胞因子, 促进组织修复和炎症消退<sup>[14]</sup>。因此, 促进巨噬细胞向 M2 型极化对于心肌

I/R损伤后防止过度炎症反应、促进组织修复、避免不良重塑和收缩功能障碍至关重要。miRNA在巨噬细胞极化过程中的调控作用已得到多项研究<sup>[15-16]</sup>的验证。研究<sup>[17]</sup>表明:miR-378a可促进巨噬细胞向M2型极化,并抑制巨噬细胞向M1型极化,上述研究为明确miR-378在抗炎及促进组织修复等方面的治疗作用奠定了基础。结合miR-378在心肌损伤中的作用,推测miR-378可能通过调节巨噬细胞极化来影响心肌I/R损伤。本研究将miR-378 mimics转染至THP-1细胞,结果显示:M1型巨噬细胞分泌物*iNOS*、*TNF- $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$* 和*IL-6* mRNA表达水平以及M1型表面标志蛋白CD86表达水平明显下调,M2型巨噬细胞分泌物*Arg-1*、*TGF- $\beta$ 1*、*IL-4*和*IL-10* mRNA表达水平以及M2型表面标志蛋白CD206表达水平明显上调,表明miR-378能够促进巨噬细胞向M2型极化并抑制其向M1型极化。当转染miR-378 mimics的THP-1细胞与H/R处理后的AC16细胞共培养时,相较于未转染的THP-1细胞,AC16细胞活性明显升高。上述研究结果表明:miR-378可通过促进巨噬细胞向M2型极化进而减少I/R诱导的心肌细胞损伤。

心肌I/R损伤的病理机制较为复杂,主要涉及氧化应激、钙超载、炎症反应、线粒体功能障碍和细胞凋亡等<sup>[18-19]</sup>。氧化应激在I/R后心肌损伤中发挥关键作用,通过多种途径引起心肌细胞凋亡、自噬和炎症等,从而引起不可逆的心肌细胞损伤和心功能不全。当缺血后进行再灌注时,氧气水平的骤增会诱导ROS大量产生,导致心肌细胞的脂质过氧化以及蛋白质和DNA损伤等,从而引发心肌细胞的不可逆损伤和功能障碍<sup>[20]</sup>。因此,减少氧化应激对心肌细胞的损伤是I/R损伤治疗的一个重要措施。LDH是一种广泛存在于各种生物体中稳定胞浆酶,正常情况下不能穿透细胞膜,当细胞受损伤或死亡时其可释放到细胞外,其活性可反映细胞损伤的程度<sup>[21]</sup>。本研究结果显示:经H/R诱导后,与未转染的THP-1细胞共培养的AC16细胞比较,转染miR-378 mimics的THP-1细胞共培养后,AC16细胞中MDA和ROS水平明显降低,SOD活性明显升高,细胞上清液中LDH活性明显降低。上述研究结果表明:miR-378通过促进巨噬细胞向M2型极化抑制了氧化应激,减少了LDH的释放,从而对I/R诱导的心肌细胞损伤发挥保护作用。

综上所述,miR-378可通过促进巨噬细胞向

M2型极化,进而提高H/R诱导下的心肌细胞活性,抑制氧化应激,减少LDH的释放。本研究为临床治疗I/R诱导的心肌损伤及相关心血管疾病提供了重要靶点。然而,miR-378在心肌I/R损伤中的具体分子机制仍需进一步探讨,本研究是在体外细胞模型中进行的验证,后续还需在动物体内进一步验证。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

赵亮参与研究设计和论文撰写,陈云参与数据收集和统计学分析,谢伟参与研究指导和论文审核。

#### [参考文献]

- [1] RIOS-NAVARRO C, DAGHBOUCHE-RUBIO N, GAVARA J, et al. Ischemia-reperfusion injury to coronary arteries: Comprehensive microscopic study after reperfused myocardial infarction [J]. *Ann Anat Anat Anz*, 2021, 238:151785.
- [2] XIANG Q, YI X, ZHU X H, et al. Regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(3):219-234.
- [3] HEUSCH G. Myocardial ischemia/reperfusion: Translational pathophysiology of ischemic heart disease[J]. *Med*, 2024, 5(1):10-31.
- [4] GE T, NING B, WU Y Q, et al. microRNA-specific therapeutic targets and biomarkers of apoptosis following myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Cell Biochem*, 2024, 479(10):2499-2521.
- [5] XU C R, JIA Z W, CAO X F, et al. Hsa\_circ\_0007059 promotes apoptosis and inflammation in cardiomyocytes during ischemia by targeting microRNA-378 and microRNA-383[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(10):1003-1019.
- [6] ZHOU R, JIA Y P, WANG Y, et al. Elevating miR-378 strengthens the isoflurane-mediated effects on myocardial ischemia-reperfusion injury in mice via suppression of MAPK1[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(4):2350-2364.
- [7] 徐佩尔, 颜雪芸, 周乐, 等. 血塞通(三七皂苷)对缺氧/复氧诱导的H9c2心肌细胞氧化损伤的抑制作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(2):113-117.
- [8] ALGOET M, JANSSENS S, HIMMELREICH U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33(6):357-366.

- [9] SUN F, ZHUANG Y T, ZHU H X, et al. LncRNA PCFL promotes cardiac fibrosis via miR-378/GRB2 pathway following myocardial infarction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133:188-198.
- [10] WANG H, SHI J J, WANG J C, et al. microRNA-378: an important player in cardiovascular diseases (Review) [J]. *Mol Med Rep*, 2023, 28(3):172.
- [11] WANG G L, FENG L L, LIU C X, et al. miR-378 inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting AKT2[J]. *Int Heart J*, 2024, 65(3):528-536.
- [12] 熊霞军, 胡思远, 钟森杰, 等. 基于miR-378探讨丹红注射液干预压力超负荷心力衰竭大鼠心肌纤维化机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(3): 383-390.
- [13] CHEN H, HOU Y X, ZHAI Y L, et al. Peli1 deletion in macrophages attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing M1 polarization[J]. *J Leukoc Biol*, 2023, 113(2):95-108.
- [14] ZUO W J, SUN R H, JI Z J, et al. Macrophage-driven cardiac inflammation and healing: insights from homeostasis and myocardial infarction [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1):81.
- [15] YU W, WANG S, WANG Y Y, et al. microRNA: role in macrophage polarization and the pathogenesis of the liver fibrosis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1147710.
- [16] KISHORE A, PETREK M. Roles of macrophage polarization and macrophage-derived miRNAs in pulmonary fibrosis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 678457.
- [17] 杨泉, 何惠宇, 王思凡, 等. 过表达miR-378a促进巨噬细胞向M2极化且抑制巨噬细胞向M1极化[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(13): 2036-2041.
- [18] ZHANG S, YAN F, LUAN F, et al. The pathological mechanisms and potential therapeutic drugs for myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129:155649.
- [19] ZHOU M L, YU Y F, LUO X X, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutics from a mitochondria-centric perspective[J]. *Cardiology*, 2021, 146(6):781-792.
- [20] GONG G, WAN W H, ZHANG X H, et al. Management of ROS and regulatory cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Biotechnol*, 2025, 67(5):1765-1783.
- [21] KHAN A A, ALLEMAILEM K S, ALHUMAYDHIF A, et al. The biochemical and clinical perspectives of lactate dehydrogenase: an enzyme of active metabolism [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2020, 20(6): 855-868.