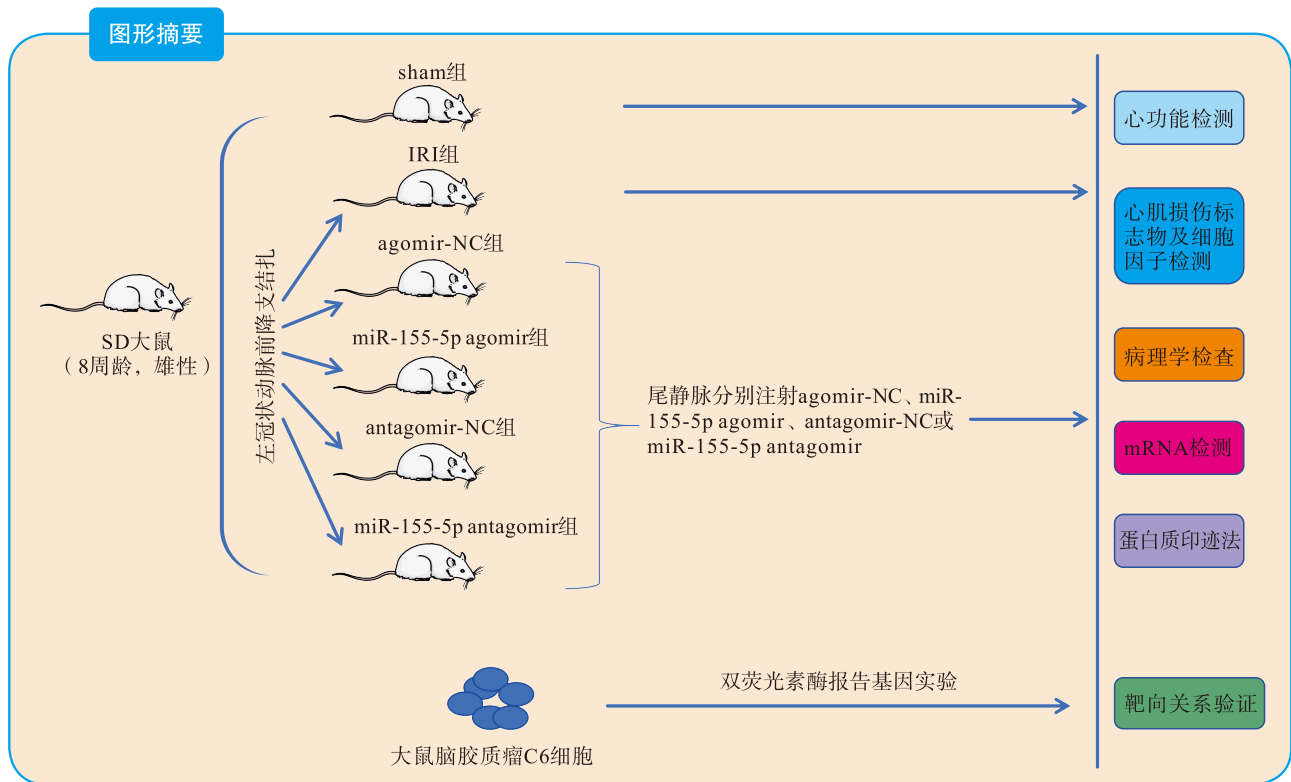


· 论著 ·

miR-155-5p 通过调控心肌细胞焦亡对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响及机制研究

卢秋玉 陈燕青 申庆荣 李鑫 夏冰雨 苏金妹



【摘要】 目的 探讨微小RNA (miR)-155-5p对心肌缺血-再灌注损伤 (IRI) 大鼠心肌细胞焦亡的影响及机制。方法 60只SD大鼠随机分为假手术 (sham) 组、IRI组、agomir-NC组、miR-155-5p agomir组、antagomir-NC组和miR-155-5p antagomir组, 每组10只。采用超声心动图仪测定大鼠左心室舒张末期内径 (LVEDD)、左心室收缩末期内径 (LVESD)、左心室射血分数 (LVEF) 和左心室短轴缩短率 (LVFS)。酶联免疫吸附试验检测大鼠血清肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 水平, 心肌组织白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、IL-18 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 水平; 苏木素-伊红染色观察大鼠心肌组织病理学变化; 实时荧光定量聚合酶链反应检测大鼠心肌组织 miR-155-5p 和沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 信使 RNA (mRNA) 表达水平; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-155-5p 与 SIRT1 的靶向关系; 蛋白质印迹法检测大鼠心肌组织

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024154

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2023GXNSFBA026095)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院药学部 (卢秋玉、申庆荣); 广西壮族自治区江滨医院药学部 (陈燕青); 广西中医药大学 (李鑫、夏冰雨); 广西国际壮医医院明秀分院药剂科 (苏金妹)

作者简介: 卢秋玉 (ORCID 0009-0001-0340-2721), 硕士, 副主任药师, 研究方向为心血管疾病机制研究, Email: luqiuyuyxb@163.com

通信作者: 苏金妹 (ORCID 0009-0006-3678-0100), 副主任药师, 研究方向为心血管疾病机制研究, Email: 116867776@qq.com

SIRT1、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 (Cleaved Caspase-1) 和 GSDMD 蛋白表达水平。**结果** 与 sham 组比较, IRI 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 升高, LVEF 和 LVFS 降低, 血清 CK-MB、LDH 和 cTnT 水平升高, 心肌组织 IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平升高, 心肌组织结构破坏严重, 心肌纤维排列紊乱, NLRP3、Cleaved Caspase-1 和 GSDMD 蛋白相对表达量升高, SIRT1 蛋白相对表达量降低 (均为 $P<0.05/5$)。与 IRI 组比较, miR-155-5p agomir 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 升高, LVEF 和 LVFS 降低, 血清 CK-MB、LDH 和 cTnT 水平升高, 心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平升高, 心肌组织病变程度加重, NLRP3、Cleaved Caspase-1 和 GSDMD 蛋白相对表达量升高, SIRT1 蛋白相对表达量降低; miR-155-5p antagomir 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 降低, LVEF 和 LVFS 升高, 血清 CK-MB、LDH 和 cTnT 水平降低, 心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平降低, 心肌组织病变程度减轻, NLRP3、Cleaved Caspase-1 和 GSDMD 蛋白相对表达量下降, SIRT1 蛋白相对表达量升高 (均为 $P<0.05/5$)。miR-155-5p 与 SIRT1 在大鼠心肌组织中的表达水平呈负相关, 且 SIRT1 是 miR-155-5p 的靶基因。**结论** miR-155-5p 可能通过靶向下调 SIRT1 促进 NLRP3 介导的心肌细胞焦亡参与调节大鼠心肌 IRI。

【关键词】 心肌; 缺血-再灌注损伤; 微小 RNA; 沉默信息调节因子 1; NOD 样受体蛋白 3; 细胞焦亡; 炎症因子; 炎症小体

【中图分类号】 R617, R654.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2024) 06-0009-09

Effect and mechanism of miR-155-5p on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by regulating myocardial pyroptosis

Lu Qiuyu*, Chen Yanqing, Shen Qingrong, Li Xin, Xia Bingyu, Su Jinmei. *Department of Pharmacy, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

Corresponding author: Su Jinmei, Email: 116867776@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of microRNA (miR)-155-5p on myocardial pyroptosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury (IRI). **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into sham group, IRI group, agomir-NC group, miR-155-5p agomir group, antagomir-NC group, and miR-155-5p antagomir group, with 10 rats in each group. Echocardiography was used to measure the left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), left ventricular ejection fraction (LVEF), and left ventricular fractional shortening (LVFS) of rats. Enzyme-linked immune absorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), and cardiac troponin T (cTnT) in serum, as well as the levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-18, and tumor necrosis factor (TNF)- α in myocardial tissue of rats. Hematoxylin-eosin staining was used to observe pathological changes in rat myocardial tissue. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression levels of miR-155-5p and silent information regulator 1 (SIRT1) messenger RNA (mRNA) in myocardial tissue of rats. Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-155-5p and SIRT1. Western blot was used to detect the expression levels of SIRT1, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), cleaved cysteine aspartate specific proteinase-1 (Cleaved Caspase-1), and gasdermin D (GSDMD) proteins in myocardial tissue of rats. **Results** Compared with the sham group, the LVEDD and LVESD of rats in the IRI group were increased, LVEF and LVFS were decreased, serum levels of CK-MB, LDH, and cTnT were increased, IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α levels in myocardial tissue were increased, myocardial tissue structure was severely damaged, myocardial fibers were disordered, relative expression of NLRP3, Cleaved Caspase-1, and GSDMD proteins were increased, and the relative expression of SIRT1 protein was decreased (all $P<0.05/5$). Compared with the IRI group, the rats in the miR-155-5p agomir group had increased LVEDD and LVESD, decreased LVEF and LVFS, increased serum levels of CK-MB, LDH, and cTnT, increased myocardial tissue levels of IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , aggravated myocardial tissue lesions, increased relative expression of NLRP3, Cleaved Caspase-1, and GSDMD proteins, and decreased relative expression of SIRT1 protein, and the rats in the miR-155-5p antagomir group had decreased LVEDD and LVESD, increased LVEF and LVFS, decreased serum levels of CK-MB, LDH, and cTnT, decreased myocardial tissue levels of IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , reduced myocardial tissue lesions, decreased relative expression of NLRP3, Cleaved Caspase-1, and GSDMD proteins, and increased relative expression of SIRT1 protein (all $P<0.05/5$).

miR-155-5p was negatively correlated with the expression levels of SIRT1 in rat myocardial tissue, and SIRT1 was a target gene of miR-155-5p. **Conclusions** miR-155-5p may participate in the regulation of myocardial IRI in rats by targeting the downregulation of SIRT1 and promoting NLRP3-mediated myocardial pyroptosis.

【 Key words 】 Myocardium; Ischemia-reperfusion injury; Micro RNA; Silent information regulator 1; NOD-like receptor protein 3; Pyroptosis; Inflammatory factor; Inflammasome

心肌缺血-再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是指心肌缺血后血流快速恢复对心肌结构和功能造成的损伤^[1], 常发生于急性心肌梗死后以及心脏移植、冠状动脉搭桥术、冠状动脉血管成形术等心脏手术中^[2-6]。其病理机制复杂, 包括氧化应激、线粒体功能障碍、能量代谢紊乱、炎症反应、内质网应激、细胞焦亡等^[7-11]。细胞焦亡是一种新发现的细胞死亡形式, 越来越多的研究发现抑制心肌细胞焦亡可减轻心肌 IRI^[12-14]。微小 RNA (micro RNA, miRNA, miR) 通常通过结合和沉默其靶基因参与调节心肌 IRI^[15]。研究报道, miR-155 在心肌 IRI 动物及细胞模型中表达水平升高, 抑制 miR-155 可减少心肌梗死面积, 改善心肌细胞凋亡, 从而减轻 IRI^[16-17]。但抑制 miR-155 表达是否可通过调控心肌细胞焦亡发挥抗心肌 IRI, 目前尚不明确。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 是一种组蛋白去乙酰化酶, 被认为是 miR-155-5p 的直接靶点。有研究发现在缺氧缺血性脑损伤中 miR-155 可通过靶向作用于 SIRT1 发挥促进细胞凋亡和炎症反应的作用^[18]。然而在 IRI 心肌细胞焦亡方面, miR-155-5p 靶向作用于 SIRT1 的影响尚不清楚。本文通过建立大鼠心肌 IRI 模型, 探讨 miR-155-5p 对心肌细胞焦亡的影响及作用机制, 旨在为心肌 IRI 的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60 只雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量 220~240 g, 由广西医科大学动物实验中心提供 [许可证: SCXK (桂) 2020-0003]。所有大鼠在无特定病原体级动物房中饲养, 适应性喂养 1 周后进行实验。本研究获广西壮族自治区人民医院伦理委员会批准 (批号: KY-KJT-2023-118 号)。

1.2 实验试剂和仪器

大鼠脑胶质瘤细胞 C6 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。miR-155-5p agomir、miR-155-5p antagomir、miR-155-5p mimics 及阴性对照

agomir-NC、antagomir-NC 和 mimics-NC 均购自广州锐博生物技术有限公司; 肌酸激酶同工酶 (creatinase kinase isoenzyme MB, CK-MB)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-18 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 苏木素-伊红 (haematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Trizol、RIPA 裂解液、ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; SIRT1、NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、Gasdermin D (GSDMD)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体均购自英国 Abcam 公司; 剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-1, Cleaved Caspase-1) 抗体购自美国 CST 公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 动物分组与处理

将 SD 大鼠随机分为 6 组: 假手术 (sham) 组、IRI 组、agomir-NC 组、miR-155-5p agomir 组、antagomir-NC 组和 miR-155-5p antagomir 组, 每组 10 只。术前 3 d 经尾静脉按照分组注射 miR-155-5p agomir、miR-155-5p antagomir、agomir-NC 或 antagomir-NC, 剂量为 80 mg/(kg·d), 每日 1 次, 连续 3 d。除假手术组外的其他 5 组参考文献 [19], 采用左冠状动脉前降支结扎法建立心肌 IRI 模型, 观察到心电图 ST 段抬高, T 波高耸表明心肌缺血成功。缺血 30 min 后解除结扎, 心电图 ST 段下降, T 波恢复表明再灌注成功。再灌注 120 min 后, 对大鼠进行心功能测定。假手术组只穿线不结扎。随后采集大鼠腹主动脉血, 颈椎脱臼处死大鼠后, 迅速分离大鼠心肌组织, 部分置

于 4% 多聚甲醛中固定, 剩余心肌组织放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中冻存备用。

1.4 研究内容与方法

1.4.1 心功能测定 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠并连接小动物超声心动图仪, 测定大鼠左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD)、左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 和左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS)。

1.4.2 ELISA 取大鼠腹主动脉血, 离心取上层血清冷冻保存。将大鼠心肌组织剪碎、研磨, 离心取上清液冷冻保存。按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测大鼠血清中 CK-MB、LDH 和 cTnT 水平以及心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 含量。

1.4.3 病理学检查 取固定后大鼠心肌组织, 制备成石蜡切片。切片脱蜡至水后, 苏木素染色 3 min, 伊红染色 2 min。乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察大鼠心肌组织病理学变化。

1.4.4 RT-qPCR 收集大鼠心肌组织, Trizol 试剂提取总 RNA。采用逆转录试剂盒合成互补 DNA (complementary DNA, cDNA), 再进行 RT-qPCR 检测 miR-155-5p 和 SIRT1 信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分别以 U6 和 GAPDH 为内参, 计算 miR-155-5p 和 SIRT1 mRNA 相对表达量。

1.4.5 蛋白质印迹法 取大鼠心肌组织, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白。采用 BCA 法进行蛋白定量, 以 25 μg 蛋白上样量进行 SDS-PAGE, 湿转法转膜后将 PVDF 膜置于封闭液中室温封闭 2 h。加入一抗 (SIRT1、NLRP3 抗体 1 : 1 000, Cleaved Caspase-1、GSDMD 抗体 1 : 2 000, GAPDH 抗体 1 : 10 000)

于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入二抗室温孵育 1 h, 加入 ECL 化学发光试剂反应 2 min, 曝光成像, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。

1.4.6 双荧光素酶报告基因实验 构建野生型荧光素酶报告基因质粒 (SIRT1-WT, 含有结合位点) 和突变型荧光素酶报告基因质粒 (SIRT1-MUT, 含有突变位点)。取对数生长期的大鼠脑胶质瘤 C6 细胞接种于 12 孔细胞培养板上, 每孔 1×10^5 个细胞, 加入 SIRT1-WT、SIRT1-MUT 与 miR-155-5p mimics 或 mimics-NC 共转染至 C6 细胞。转染 48 h 后, 按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书操作, 计算萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性比值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验 (数据满足方差齐性) 和 Dunnett T3 检验 (数据不满足方差齐性)。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

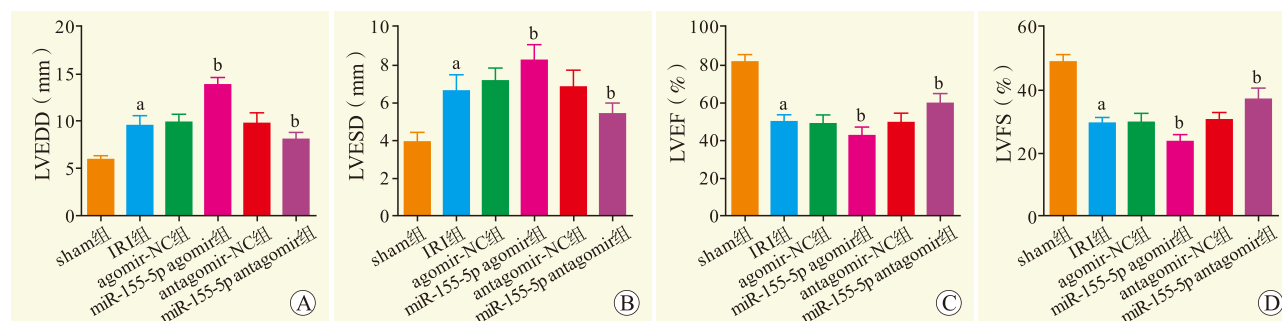
2 结果

2.1 各组大鼠心功能情况

与 sham 组比较, IRI 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 升高, LVEF 和 LVFS 降低; 与 IRI 组比较, miR-155-5p agomir 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 升高, LVEF 和 LVFS 降低, miR-155-5p antagonomir 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 降低, LVEF 和 LVFS 升高 (均为 $P<0.05/5$)。与 IRI 组比较, agomir-NC 组、antagonomir-NC 组大鼠心功能差异无统计学意义 (均为 $P>0.05/5$, 图 1)。

2.2 各组大鼠血清心肌损伤标志物水平

与 sham 组比较, IRI 组大鼠血清 CK-MB、



注: A 图为 LVEDD; B 图为 LVESD; C 图为 LVEF; D 图为 LVFS。与 sham 组比较, ^a $P<0.05/5$; 与 IRI 组比较, ^b $P<0.05/5$ 。

图 1 各组大鼠心功能比较

Figure 1 Comparison of cardiac function of rats among each group

LDH 和 cTnT 水平升高; 与 IRI 组比较, miR-155-5p agomir 组大鼠血清 CK-MB、LDH 和 cTnT 水平升高, miR-155-5p antagomir 组大鼠血清 CK-MB、LDH 和 cTnT 水平降低 (均为 $P<0.05/5$)。与 IRI 组比较, agomir-NC 组和 antagomir-NC 组大鼠血清中心肌损伤标志物水平差异均无统计学意义 (均为 $P>0.05/5$, 图 2)。

2.3 各组大鼠心肌组织炎症因子水平

与 sham 组比较, IRI 组大鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 水平升高; 与 IRI 组比较, miR-155-5p agomir 组 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 水平升高, miR-155-5p antagomir 组大鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 水平降低 (均为 $P<0.05/5$)。与 IRI 组比较, agomir-NC 组和 antagomir-NC 组大鼠心肌组织炎症因子水平差异均无统计学意义 (均为 $P>0.05/5$, 图 3)。

2.4 各组大鼠心肌组织病理学变化

sham 组大鼠心肌纤维排列整齐, 细胞形态正常; IRI 组大鼠心肌纤维排列疏松, 部分心肌纤维断裂, 细胞核浓缩, 大量炎症细胞浸润; agomir-NC 组

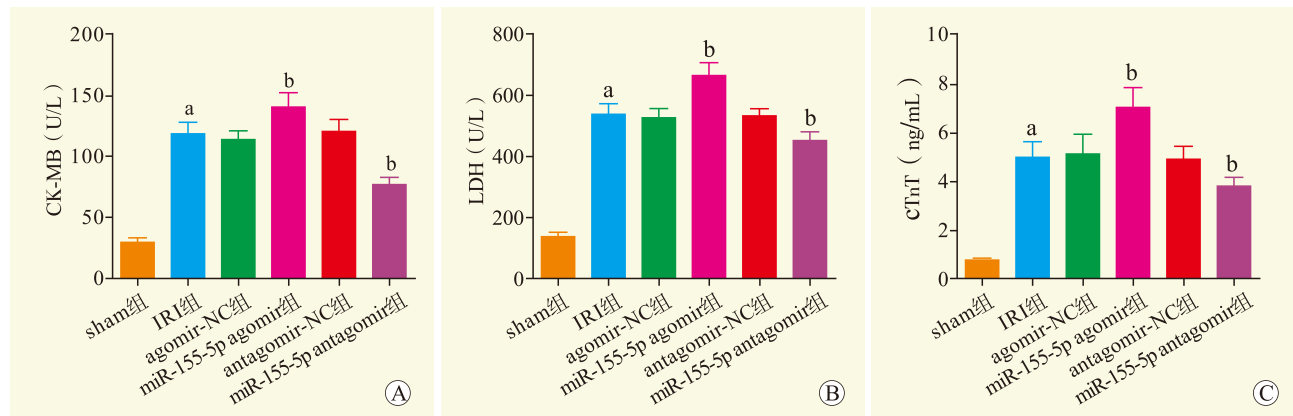
和 antagomir-NC 组大鼠心肌组织病理形态与 IRI 组相似; miR-155-5p agomir 组大鼠心肌组织病变程度加重; miR-155-5p antagomir 组大鼠心肌组织病变程度减轻 (图 4)。

2.5 各组大鼠心肌组织细胞焦亡相关蛋白表达情况

与 sham 组比较, IRI 组大鼠 SIRT1 蛋白相对表达量降低, NLRP3、Cleaved Caspase-1 和 GSDMD 蛋白相对表达量升高; 与 IRI 组比较, miR-155-5p agomir 组大鼠心肌组织中 SIRT1 蛋白相对表达量降低, NLRP3、Cleaved Caspase-1 和 GSDMD 蛋白相对表达量升高, miR-155-5p antagomir 组大鼠 SIRT1 蛋白相对表达量升高, NLRP3、Cleaved Caspase-1 和 GSDMD 蛋白相对表达量降低 (均为 $P<0.05/5$)。IRI 组、agomir-NC 组、antagomir-NC 组大鼠心肌组织中细胞焦亡相关蛋白表达水平差异无统计学意义 (均为 $P>0.05/5$, 图 5)。

2.6 miR-155-5p 靶向调控 SIRT1

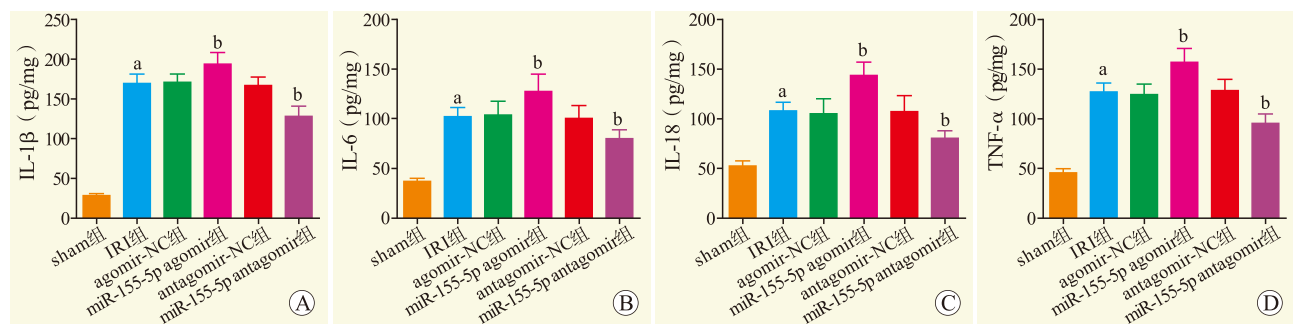
与 sham 组比较, IRI 组大鼠心肌组织中 miR-



注: A 图为 CK-MB; B 图为 LDH; C 图为 cTnT。与 sham 组比较, ^a $P<0.05/5$; 与 IRI 组比较, ^b $P<0.05/5$ 。

图 2 各组大鼠心肌损伤标志物水平比较

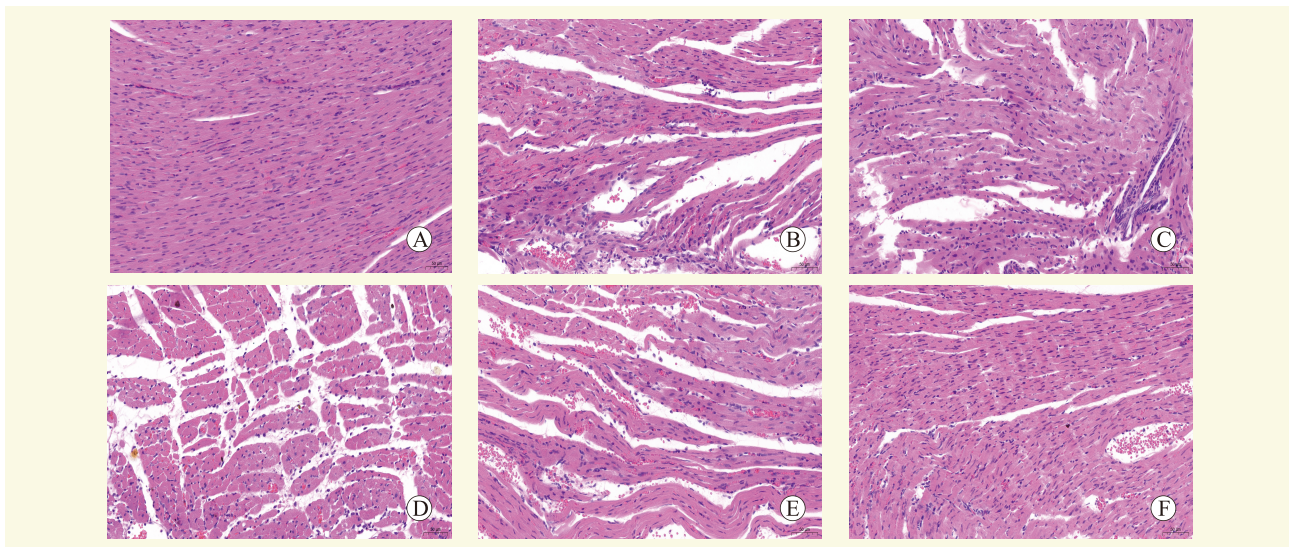
Figure 2 Comparison of levels of myocardial injury markers of rats among each group



注: A 图为 IL-1 β ; B 图为 IL-6; C 图为 IL-18; D 图为 TNF- α 。与 sham 组比较, ^a $P<0.05/5$; 与 IRI 组比较, ^b $P<0.05/5$ 。

图 3 各组大鼠心肌组织炎症因子水平比较

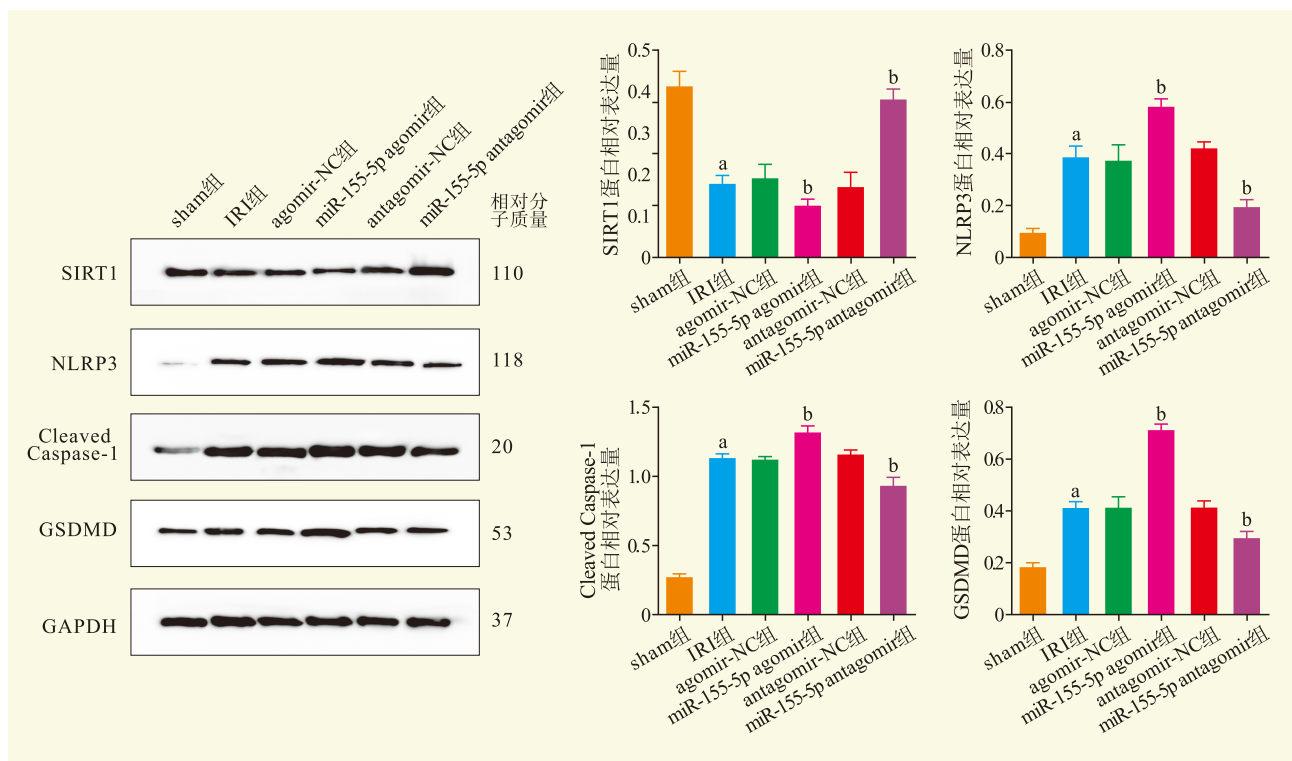
Figure 3 Comparison of inflammatory cytokine levels in myocardial tissue of rats among each group



注：A 图为 sham 组；B 图为 IRI 组；C 图为 agomir-NC 组；D 图为 miR-155-5p agomir 组；E 图为 antagomir-NC 组；F 图为 miR-155-5p antagomir 组。

图 4 各组大鼠心肌组织病理学变化 (HE, ×200)

Figure 4 Pathological changes in myocardial tissue of rats in each group



注：与 sham 组比较，^a $P < 0.05/5$ ；与 IRI 组比较，^b $P < 0.05/5$ 。

图 5 各组大鼠心肌组织细胞焦亡相关蛋白表达水平比较

Figure 5 Comparison of expression levels of pyroptosis related proteins in myocardial tissue of rats among each group

155-5p 表达水平升高，SIRT1 mRNA 相对表达量降低；与 IRI 组比较，miR-155-5p agomir 组大鼠心肌组织中 miR-155-5p 表达水平升高，SIRT1 mRNA 相对表达量降低，miR-155-5p antagomir 组大鼠心肌组织

中 miR-155-5p 表达水平降低，SIRT1 mRNA 相对表达量升高（均为 $P < 0.05/5$ ）。IRI 组、agomir-NC 组和 antagomir-NC 组大鼠心肌组织中 miR-155-5p 和 SIRT1 表达水平差异无统计学意义（均为 $P > 0.05/5$ ，图 6A）。

大鼠心肌组织中 miR-155-5p 与 SIRT1 表达水平呈负相关, miR-155-5p 表达水平越高, SIRT1 表达水平则越低 ($P < 0.001$, 图 6B)。

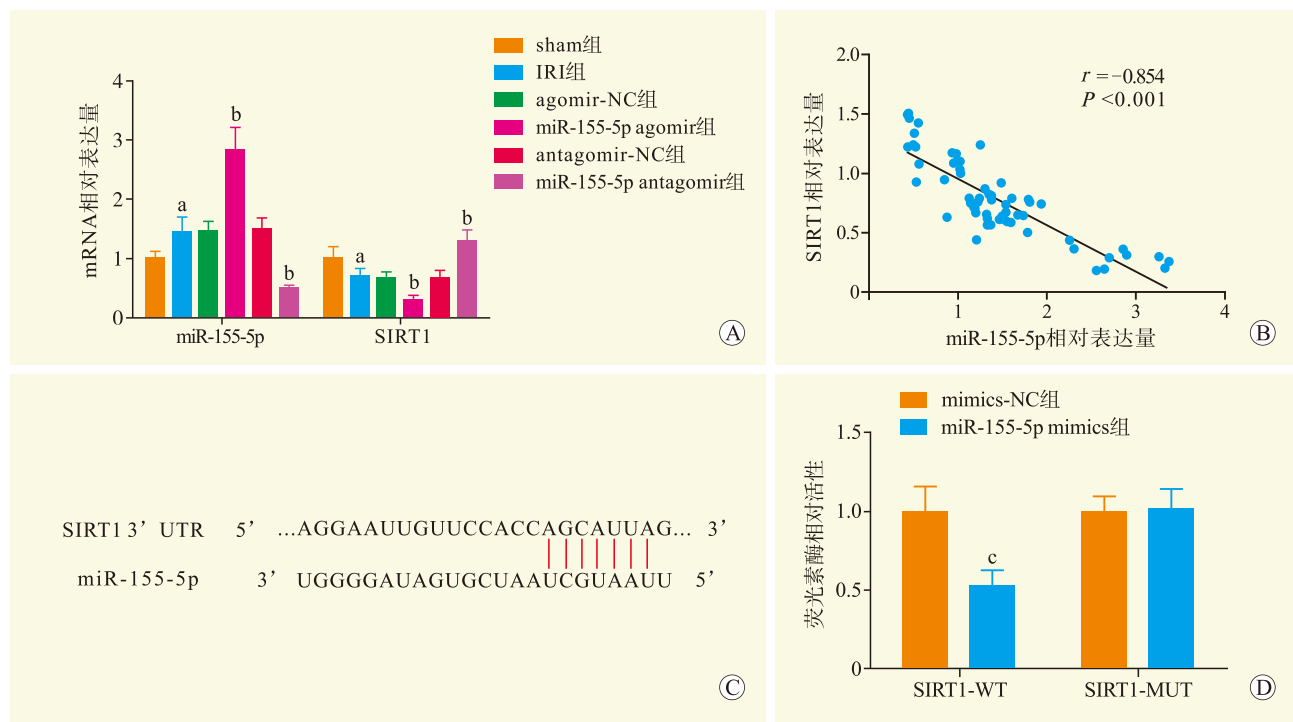
根据 TargetScan 在线数据库预测 miR-155-5p 与 SIRT1 存在结合位点 (图 6C)。与 mimics-NC 组比较, 携带有 SIRT1-WT 的 miR-155-5p mimics 组 C6 细胞中荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$), 携带有 SIRT1-MUT 的 miR-155-5p mimics 组 C6 细胞中荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 6D)。

3 讨论

心肌 IRI 是伴随心脏移植的常见不良事件, 是早期移植功能障碍的主要原因, 也是心脏移植长期生存的主要障碍^[4, 20-21]。然而, 目前还没有缓解心肌 IRI 的靶向治疗得到临床验证。miR-155 在心肌 IRI 中的作用已有研究, 抑制 miR-155 可能是改善心肌 IRI 的一种潜在治疗策略, 其作用机制涉及维持心肌细胞线粒体膜电位, 抑制心肌细胞凋亡和心肌组织炎症反应、氧化应激水平等^[16-18]。本研究结果显示 miR-155-5p 在 IRI 大鼠心肌组织中表达升高, 抑制

miR-155-5p 可改善大鼠心功能, 减轻心肌损伤, 而过表达 miR-155-5p 则加重心肌损伤。与既往研究不同之处在于本研究发现 miR-155-5p 可通过调控下游信号通路影响心肌细胞细胞焦亡。

细胞焦亡是一种由 GSDM 蛋白家族介导的程序性细胞死亡途径, 在识别外源和内源性信号后, 细胞经历炎症小体组装、GSDM 切割、促炎因子和其他细胞内容物的释放, 最终导致细胞死亡^[22-23]。有研究显示, NLRP3、GSDMD 等 20 个细胞焦亡相关基因在心肌梗死组织和正常心肌组织中差异表达, 其中 9 个基因可以对心肌梗死的危险性作出较为准确的预测^[24]。心肌 IRI 诱导的炎症反应会导致心肌进一步损伤, NLRP3 可以通过激活 Caspase-1 来感知心肌损伤并触发和放大炎症反应, 也可以使促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 前体发展为成熟形式, 并能诱导细胞焦亡^[25]。越来越多的研究结果显示, 抑制 NLRP3 炎症小体的激活有利于减轻炎症反应并维持心脏正常功能, 从而减轻心肌 IRI^[26-28]。GSDMD 介导的心肌细胞焦亡是心肌 IRI 的关键原因之一, 抑制 GSDMD 可显著降低心肌细胞焦亡和 IRI^[29-30]。关于 miR-155-5p 在细胞焦



注: A 图为各组大鼠心肌组织中 miR-155-5p 和 SIRT1 mRNA 相对表达量, 与 sham 组比较, ^a $P < 0.05/5$, 与 IRI 组比较, ^b $P < 0.05/5$; B 图为 miR-155-5p 与 SIRT1 表达水平相关性分析; C 图为 miR-155-5p 和 SIRT1 3' UTR 结合位点; D 图为双荧光素酶报告基因实验验证 miR-155-5p 和 SIRT1 之间的靶向关系, 与 mimics-NC 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

图 6 miR-155-5p 靶向调控 SIRT1 的作用机制

Figure 6 The mechanism of miR-155-5p targeted regulation of SIRT1

亡中的作用尚存在争议, 其不同病理生理环境中对细胞焦亡的影响并不一致, 有研究发现 miR-155-5p 可通过靶向下游基因激活 NLRP3 炎症小体, 从而介导大鼠肠上皮细胞焦亡^[31]; 也有学者认为 miR-155-5p 是通过调控下游靶基因下调 NLRP3/Caspase-1 通路, 从而减轻 IRI 小鼠肾脏细胞焦亡相关的炎症反应^[32]。本研究结果显示, IRI 大鼠心肌组织中 NLRP3 及细胞焦亡标志蛋白 Cleaved Caspase-1 和 GSDMD 表达上调, 细胞焦亡相关的炎症反应增强; 经 miR-155-5p agomir 预处理的 IRI 大鼠心肌组织中 NLRP3 介导的细胞焦亡和炎症反应被放大, 而 miR-155-5p antagomir 预处理则抑制 IRI 大鼠心肌组织细胞焦亡水平, 提示抑制 miR-155-5p 可减轻 NLRP3 炎症小体激活介导的心肌细胞焦亡。

有研究显示, SIRT1 可调节心脏代谢, 从而抑制 IRI 时的炎症反应, 其作用机制可能为 SIRT1 通过调节葡萄糖氧化代谢抑制 NLRP3 炎症小体的激活^[33]。Wang 等^[34] 实验结果也显示, SIRT1 抑制剂可促进心肌 IRI 小鼠 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达, 并激活 NLRP3 炎症小体, 加重小鼠心脏结构损伤和功能障碍。还有研究显示, SIRT1 过表达可减少 NLRP3 的积累, 从而逆转细胞焦亡的发生^[35]。SIRT1 是 miR-155 的靶基因, 在多种病理机制中得到验证^[36-38]。李世勋等^[39] 研究显示, 在缺氧/复氧心肌细胞中 miR-155 靶向调控 SIRT1, 发挥促炎、促氧化的作用。本研究中, miR-155-5p 和 SIRT1 在 IRI 组心肌组织中表达水平呈负相关, 且双荧光素酶报告基因实验验证 miR-155-5p 靶向调控 SIRT1。因此, 推测 miR-155-5p 可能通过靶向 SIRT1 影响 NLRP3 炎症小体介导的心肌细胞焦亡, 从而参与大鼠心肌 IRI。

综上所述, miR-155-5p 可促进心肌 IRI 大鼠心肌细胞焦亡, 放大炎症反应, 加重 IRI, 其作用机制可能与靶向作用于 SIRT1 促进 NLRP3 炎症小体激活有关。本研究后续将从细胞水平实验进行深入探讨, 进一步验证此作用机制, 为心肌 IRI 的靶向治疗提供更多参考。

参考文献:

- [1] ZHAO G, JI Z, DUAN Y, et al. A novel anti-inflammatory strategy for myocardial ischemia-reperfusion in rats with cinnamamide derivative compound 7[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 136: 112370. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112370.
- [2] PENG H, CHEN L, DENG Y, et al. Ginsenoside Rh2 mitigates myocardial damage in acute myocardial infarction by regulating pyroptosis of cardiomyocytes[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2023, 45(1): 2229536. DOI: 10.1080/10641963.2023.2229536.
- [3] ZHAO T, WU W, SUI L, et al. Reactive oxygen species-based nanomaterials for the treatment of myocardial ischemia reperfusion injuries[J]. *Bioact Mater*, 2022, 7: 47-72. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.06.006.
- [4] YUAN S, CHE Y, WANG Z, et al. Mitochondrion-targeted carboxymethyl chitosan hybrid nanoparticles loaded with coenzyme Q10 protect cardiac grafts against cold ischaemia-reperfusion injury in heart transplantation[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 925. DOI: 10.1186/s12967-023-04763-7.
- [5] SAKATA T, KOHNO H, INUI T, et al. Cardioprotective effect of interleukin-11 against warm ischemia-reperfusion injury in a rat heart donor model[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 961: 176145. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.176145.
- [6] 王丽, 王少微, 贾彤, 等. 右美托咪定对冠状动脉搭桥术患者心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(36): 4061-4065. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2021.36.015.
- [7] WANG L, WANG SW, JIA T, et al. Effect of dexmedetomidine on myocardial ischemia-reperfusion injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2021, 30(36): 4061-4065. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2021.36.015.
- [7] 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. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155649.
- [8] ZHU K, FAN R, CAO Y, et al. Glycyrrhizin attenuates myocardial ischemia reperfusion injury by suppressing inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via the HMGB1-TLR4-GPX4 pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2024, 435(1): 113912. DOI: 10.1016/j.yexcr.2024.113912.
- [9] WU Q, XU R, ZHANG K, et al. Characterization of early myocardial inflammation in ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1081719. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1081719.
- [10] CHEN W, MA M, SONG Y, et al. Exercise attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating endoplasmic reticulum stress and mitophagy through M2 acetylcholine receptor[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2024, 40(4/5/6): 209-221. DOI: 10.1089/ars.2022.0168.
- [11] YE X, LIN ZJ, HONG GH, et al. Pyroptosis inhibitors MCC950 and VX-765 mitigate myocardial injury by alleviating oxidative stress, inflammation, and apoptosis in acute myocardial hypoxia[J]. *Exp Cell Res*, 2024, 438(2): 114061. DOI: 10.1016/j.yexcr.2024.114061.
- [12] JIANG Q, DONG X, HU D, et al. Aquaporin 4 inhibition alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by restraining cardiomyocyte pyroptosis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 9021-9030. DOI: 10.1080/21655979.2021.1992332.
- [13] WANG L, LIU J, WANG Z, et al. Dexmedetomidine abates myocardial ischemia reperfusion injury through inhibition of pyroptosis via regulation of miR-665/MEF2D/Nrf2 axis[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2023, 165: 115255. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115255.
- [14] CHAI R, YE Z, XUE W, 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. DOI: 10.3389/fcell.2023.1252942.

- [15] NIE J, ZHOU W, YU S, et al. MiR-30c reduces myocardial ischemia/reperfusion injury by targeting SOX9 and suppressing pyroptosis[J]. *Exp Ther Med*, 2023, 25(4): 180. DOI: 10.3892/etm.2023.11879.
- [16] CHEN JG, XU XM, JI H, et al. Inhibiting miR-155 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via targeted regulation of HIF-1 α in rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019, 22(9): 1050-1058. DOI: 10.22038/ijbms.2019.34853.8270.
- [17] XI J, LI QQ, LI BQ, et al. MiR-155 inhibition represents a potential valuable regulator in mitigating myocardial hypoxia/reoxygenation injury through targeting BAG5 and MAPK/JNK signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(3): 1011-1020. DOI: 10.3892/mmr.2020.10924.
- [18] KE F, WANG H, GENG J, et al. MiR-155 promotes inflammation and apoptosis via targeting SIRT1 in hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Exp Neurol*, 2023, 362: 114317. DOI: 10.1016/j.expneurol.2023.114317.
- [19] 卢秋玉, 苏金妹, 唐爱存, 等. 木棉花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(6): 664-668. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.06.005.
LU QY, SU JM, TANG AC, et al. Protective effect of total flavonoids of gossampim flos on myocardial ischemia and reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2020, 37(6): 664-668. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.06.005.
- [20] LI X, LIU M, SUN R, et al. Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 3823-3829. DOI: 10.3892/etm.2016.3877.
- [21] FEI Q, LIU J, QIAO L, et al. Mst1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury following heterotopic heart transplantation in mice through regulating Keap1/Nrf2 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 644: 140-148. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.12.087.
- [22] YANG F, BETTADAPURA SN, SMELTZER MS, et al. Pyroptosis and pyroptosis-inducing cancer drugs[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(10): 2462-2473. DOI: 10.1038/s41401-022-00887-6.
- [23] IMRE G. Pyroptosis in health and disease[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2024, 326(3): C784-C794. DOI: 10.1152/ajpcell.00503.2023.
- [24] GUO K, ZHUO Z, CHEN P, et al. Construction of a pyroptosis-related classifier for risk prediction of acute myocardial infarction[J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2022, 23(2): 52. DOI: 10.31083/j.rcm2302052.
- [25] TOLDO S, MAURO AG, CUTTER Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): H1553-H1568. DOI: 10.1152/ajpheart.00158.2018.
- [26] YANG Y, ZHU Y, LIU C, et al. Taohong Siwu decoction reduces acute myocardial ischemia-reperfusion injury by promoting autophagy to inhibit pyroptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 321: 117515. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117515.
- [27] ZUO W, TIAN R, CHEN Q, et al. MiR-330-5p inhibits NLRP3 inflammasome-mediated myocardial ischaemia-reperfusion injury by targeting TIM3[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2021, 35(4): 691-705. DOI: 10.1007/s10557-020-07104-8.
- [28] ZHANG J, HUANG L, SHI X, et al. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Aging*, 2020, 12(23): 24270-24287. DOI: 10.18632/aging.202143.
- [29] SHI H, GAO Y, DONG Z, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury[J]. *Circ Res*, 2021, 129(3): 383-396. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.318629.
- [30] LIN J, LAI X, FAN X, et al. Oridonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting GSDMD-mediated pyroptosis[J]. *Genes*, 2022, 13(11): 2133. DOI: 10.3390/genes13112133.
- [31] SHAO Y, LI Y, JIANG Y, et al. Circulating exosomal miR-155-5p contributes to severe acute pancreatitis-associated intestinal barrier injury by targeting SOCS1 to activate NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. *FASEB J*, 2023, 37(6): e23003. DOI: 10.1096/fj.202300237R.
- [32] ZHANG Y, LV X, FAN Q, et al. miRNA155-5p participated in DDX3X targeted regulation of pyroptosis to attenuate renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Aging*, 2023, 15(9): 3586-3597. DOI: 10.18632/aging.204692.
- [33] HAN Y, SUN W, REN D, et al. SIRT1 agonism modulates cardiac NLRP3 inflammasome through pyruvate dehydrogenase during ischemia and reperfusion[J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101538. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101538.
- [34] WANG ZK, CHEN RR, LI JH, et al. Puerarin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting inflammation and the NLRP3 inflammasome: the role of the SIRT1/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt B): 107086. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107086.
- [35] LIU J, YAN Y, ZHENG D, et al. Inhibiting microRNA-200a-3p attenuates pyroptosis via targeting the SIRT1/NF- κ B/NLRP3 pathway in H₂O₂-induced HAEC[J]. *Aging*, 2023, 15(20): 11184-11200. DOI: 10.18632/aging.205121.
- [36] WANG Z, CHEN R, XU Z, et al. MiR-155-5p promotes renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy via inhibiting SIRT1 signaling pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(5): 466-475. DOI: 10.1080/10799893.2020.1825491.
- [37] YANG N, CHENG H, MO Q, et al. MiR-155-5p downregulation inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting SIRT1 in human nasal epithelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(5): 3695-3704. DOI: 10.3892/mmr.2020.11468.
- [38] WANG X, WANG B, ZHAO J, et al. MiR-155 is involved in major depression disorder and antidepressant treatment via targeting SIRT1[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20181139. DOI: 10.1042/BSR20181139.
- [39] 李世勋, 周凡, 王岩. MiR-155 靶向 SIRT1 调控缺氧/复氧心肌细胞的活力、凋亡和氧化应激[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(24): 6084-6090. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2019.24.058.
LI SX, ZHOU F, WANG Y. MiR-155 targets SIRT1 to regulate the viability, apoptosis and oxidative stress of hypoxic/reoxygenation cardiomyocytes[J]. *Chin J Gerontol*, 2019, 39(24): 6084-6090. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2019.24.058.

(收稿日期: 2024-06-25)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)