

• 论 著 •

miR-486-5P 对缺氧/复氧诱导 H9c2 心肌细胞铁死亡的影响及其机制*

李广妹,徐文婷,赵佳叶,周泽宇,王思铭,孙启玉[△]

承德医学院附属医院检验科(河北省泛血管重点实验室),河北承德 067000

摘要:目的 探讨 miR-486-5P 对缺氧/复氧(H/R)后 H9c2 心肌细胞铁死亡的影响,并分析其作用机制。
方法 以 H9c2 心肌细胞为研究对象,用氯化钴(CoCl₂)及新鲜培养基建立 H/R 损伤模型。将细胞分为对照组、H/R 组、H/R+miR-486-5P mimic NC 组、H/R+miR-486-5P mimic 组、H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组和 H/R+miR-486-5P inhibitor 组。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞 miR-486-5P 相对表达水平,CCK-8 法检测细胞活力,比色法检测细胞乳酸脱氢酶(LDH)活性、谷胱甘肽(GSH)、Fe²⁺ 和 丙二醛(MDA)水平,2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法测定细胞活性氧(ROS)水平,JC-1 法检测细胞线粒体膜电位(MMP),Western blot 检测 Akt/mTOR 信号通路蛋白和铁死亡相关蛋白溶质载体 家 7 成员 11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)和酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(ACSL4)水平。
结果 与对照组相比,H/R 组 miR-486-5P 水平明显下降($P<0.05$),细胞活力显著下降($P<0.05$),LDH 活 性、MDA、Fe²⁺ 水平和 ROS 水平及 ACSL4 蛋白水平明显升高($P<0.05$),GSH 水平、MMP、SLC7A11 和 GPX4 水平及 P-Akt/Akt 和 P-mTOR/mTOR 明显下降($P<0.05$)。经过 H/R 处理后,与 H/R+miR-486-5P mimic NC 组相比,H/R+miR-486-5P mimic 组细胞活力显著上升($P<0.05$),LDH 活性、MDA、Fe²⁺ 水平、ROS 水平及 ACSL4 蛋白水平明显降低($P<0.05$),GSH 水平、MMP、SLC7A11 和 GPX4 水平及 P-Akt/Akt 和 P-mTOR/mTOR 明显升高($P<0.05$);与 H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组相比,H/R+miR-486-5P in- hibitor 组上述指标趋势则与之相反。
结论 miR-486-5P 通过调控 Akt/mTOR 信号通路缓解 H/R 诱导的 H9c2 细胞铁死亡,从而减轻 H/R 导致的心肌细胞损伤。

关键词:微小 RNA; 缺氧/复氧; 铁死亡; Akt/mTOR 信号通路
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.18.007 **中图法分类号:**R542.2
文章编号:1673-4130(2025)18-2212-07 **文献标志码:**A

Effect and mechanism of miR-486-5P on hypoxia/reoxygenation induced ferroptosis in H9c2 cardiomyocytes*

LI Guangmei,XU Wenting,ZHAO Jiaye,ZHOU Zeyu,WANG Siming,SUN Qiyu[△]

Department of Clinical Laboratory,Affiliated Hospital of Chengde Medical University
(Hebei Key Laboratory of Panvascular Diseases),Chengde,Hebei 067000,China

Abstract: Objective To investigate the effect of miR-486-5P on ferroptosis in H9c2 cardiomyocytes after hypoxia/reoxygenation (H/R),and to analyze its mechanism. **Methods** Using H9c2 cardiomyocytes as the research object,a H/R injury model was established using cobalt chloride (CoCl₂) and fresh culture medium. The cells were divided into control group,H/R group,H/R+miR-486-5P mimic NC group,H/R+miR-486-5P mimic group,H/R+miR-486-5P inhibitor NC group and H/R+miR-486-5P inhibitor group. The relative expression level of miR-486-5P was detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The cell viability was detected by CCK-8 method. The activities or levels of lactate dehydrogenase (LDH),glutathione (GSH),Fe²⁺ and malondialdehyde (MDA) were detected by colorimetric method. The levels of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) were detected by DCFH-DA fluorescent probe and JC-1 assay,respectively. Western blot was used to detect the levels of Akt/mTOR signaling pathway proteins and ferroptosis related protein solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11),glutathione peroxidase 4(GPX4) and acyl-coa synthetase long chain family member 4(ACSL4). **Results** Compared with the control group,the level of miR-486-5P and cell viability in the H/R group de-

* 基金项目:河北省自然科学基金项目(H2022406047)。
作者简介:李广妹,女,技师,主要从事心血管疾病预防机制方向的研究。 [△] 通信作者,E-mail:sunmeng57@sina.com。

creased significantly ($P<0.05$), while LDH activity, MDA, Fe^{2+} level, ROS level and ACSL4 protein level increased significantly ($P<0.05$). The GSH, MMP, SLC7A11 and GPX4 levels and p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR ratios were significantly decreased ($P<0.05$). After H/R treatment, compared with the H/R+miR-486-5P mimic NC group, the cell viability of the H/R+miR-486-5P mimic group was significantly increased ($P<0.05$). The LDH activity, MDA, Fe^{2+} level, ROS level and ACSL4 protein level were significantly decreased ($P<0.05$), while GSH, MMP, SLC7A11 and GPX4 levels and p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR ratios were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the H/R+miR-486-5P inhibitor NC group, the trend of the above indicators in the H/R+miR-486-5P inhibitor group was opposite. **Conclusion** miR-486-5P alleviates hypoxia/reoxygenation-induced ferroptosis in H9c2 cells by regulating Akt/mTOR signaling pathway, and thus alleviates hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte injury.

Key words: microRNAs; hypoxia/reoxygenation; ferroptosis; Akt/mTOR signaling pathway

缺血性心脏病是全世界死亡的主要原因^[1-2]。临床上,及时再灌注对于挽救缺血心肌组织、缩小梗死面积、维持左心室收缩功能及预防心力衰竭的发生至关重要。然而,缺血组织的恢复可能会引起心肌损伤并影响心功能,这种现象被称为心肌缺血再灌注损伤(MIRI)^[3]。MIRI 涉及一系列复杂的病理机制,包括氧化应激、炎症反应、心功能障碍、钙泵功能障碍、心肌细胞坏死和凋亡^[4]。随着研究的进展,铁死亡已被确定作为一种细胞死亡的形式,且与氧化应激密切相关。因此,有必要探索 MIRI 的机制以开发新的治疗策略来保护心肌。

作为最近发现的一种不同于细胞凋亡、坏死和自噬的细胞死亡模式,铁死亡依赖于铁并可导致细胞内脂质过氧化物的积聚,被认为是 MIRI 的主要机制^[5-7]。MIRI 期间,铁的积累导致活性氧过度生成,导致脂质过氧化和铁死亡。因此,选择性减少铁死亡是减轻心肌损伤的一种有前景的策略。Akt/mTOR 信号通路的活化在心肌梗死患者的心脏保护中起着至关重要的作用,被认为是一条经典的对心脏有利的通路^[8]。有研究表明,微小 RNA(miR)-486-5P 在脑缺血-再灌注(I/R)心肌细胞和组织中表达下调,且 miR-486-5P 的过表达可通过激活 Akt/mTOR 信号通路来减少心肌细胞凋亡并改善心功能^[9]。但是,miR-486-5P 是否通过调节 Akt/mTOR 信号通路维持心肌细胞内铁死亡的水平从而减轻心肌细胞损伤尚未确定。因此,本研究利用 H9c2 心肌细胞建立体外培养的缺氧/复氧(H/R)模型,探讨 miR-486-5P 通过 Akt/mTOR 信号通路抑制铁死亡减轻 H/R 对 H9c2 心肌细胞的影响,旨在为 MIRI 的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 H9c2 大鼠心肌细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 实验仪器 细胞培养箱(美国 Thermo 公司),光学显微镜(日本 OlymPus 公司),高速低温离

心机(德国 EPPendorf 公司),细胞计数仪(美国 Invitrogen 公司),酶联免疫检测仪(美国 Thermo 公司),正倒置一体荧光显微镜(美国 ECHO 公司),垂直电泳仪(中国北京六一生物科技有限公司),显影仪(美国 Azure Biosystems 公司),干式恒温金属浴(杭州瑞诚仪器有限公司),Cobasz 480(瑞士 Roche 公司),雪花制冰机(中国宁波新芝生物科技公司)。

1.2.2 实验试剂 DMEM 培养基(货号: C11995500BT-1)购自美国 Gibico 公司; CoCl_2 (货号: A46890)购自中国伊诺凯公司;胎牛血清(货号: C04001-050)购自德国 Vivacell 公司;细胞增殖与毒性(CCK8)检测试剂盒(货号: RP-RC3028)购自中国瑞帕特公司; Fe^{2+} 水平检测试剂盒(货号: BC5415)、乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒(货号: BC0685)、谷胱甘肽(GSH)水平检测试剂盒(货号: BC1175)、丙二醛(MDA)水平检测试剂盒(货号: BC0025)和活性氧(ROS)检测试剂盒(货号: CA1410)均购自中国索莱宝公司; Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; miRNA 逆转录试剂盒、miR-486-5P 模拟物(miR-486-5P mimic)、miR-486-5P 模拟物阴性对照(miR-486-5P mimic NC)、miR-486-5P 抑制物(miR-486-5P inhibitor)、miR-486-5P 抑制物阴性对照(miR-486-5P inhibitor NC)均购自中国山东金百奥生物科技有限公司; GAPDH 抗体(货号: ab9845)购自美国 Abcam 公司; HRP 结合的山羊抗兔 IgG 抗体(货号: AS014)和 mTOR 抗体(货号: A11355)购自中国武汉爱博泰克生物科技有限公司; GPX4(货号: ET1706-45)、SLC7A11(货号: HA721868)和 ACSL4(货号: ET7111-43)抗体均购自中国华安生物公司; Akt 抗体获赠自中国华安生物公司; P-Akt(货号: 2965)抗体购自美国 CST 公司; P-mTOR(货号: 67778-1-Ig)抗体购自中国武汉三鹰公司; 超敏 ECL 显影液(货号 BL520B)购自中国白鲨公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与造膜 将 H9c2 心肌细胞放在含有完全培养基(高糖 DMEM+10%胎牛血清)的 T25

培养瓶中置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱培养,每 3 天换液 1 次,当细胞达到 80%~90%融合时传代、铺板,进行后续一系列实验。经预实验确定选用 CoCl₂ 溶液(600 μmol/L)模拟化学缺氧环境,新鲜培养基复氧。PBS 清洗 2 次,CoCl₂ 处理 16 h 后,换液(使用不含 CoCl₂ 的培养基),放入培养箱中培养 4 h。

1.3.2 细胞转染与分组 取对数期的细胞 2×10^5 接种于 6 孔板中并孵育 24 h。将 miR-486-5P mimic NC、miR-486-5P mimic、miR-486-5P inhibitor NC 和 miR-486-5P inhibitor 按照 LiPofecta mine™3000 试剂制造商的方案进行转染,24 h 后进行 H/R 处理,分别记为 H/R + miR-486-5P mimic NC 组、H/R + miR-486-5P mimic 组、H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组、H/R + miR-486-5P inhibitor 组。在 DMEM 中正常培养的细胞作为对照组,细胞 H/R 处理作为 H/R 组。

1.3.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-486-5P 表达 加入 1 mL Trizol 溶液提取心肌细胞中的 RNA,12 000 r/min 离心 5 min,转移上清液,加入 200 μL 氯仿剧烈振荡 15 s,室温放置 5 min 后,12 000 r/min 离心 15 min,转移上清液,加入异丙醇混匀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 75%的无水乙醇进行洗涤,真空干燥后进行逆转录,加入对应的引物和样品,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达水平。引物序列如下,miR-486-5P 正向引物 5'-GCGGCGGTCCTGTACTGAGCTGC-3',反向引物 5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3';U6 正向引物 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3',反向引物 5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCATC-3'。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞活力 在 96 孔板上接种处于对数生长阶段的细胞,其密度为 1×10^4 每孔,培养 24 h 后按照 1.3.2 分组方法进行处理。处理结束后,弃去旧培养基,用 PBS 清洗两次,然后每孔加入 100 μL CCK-8 工作液,在 37 ℃培养箱避光培养 2 h 后,使用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度值来量化细胞活力,并计算细胞存活率。

1.3.5 LDH 活性测定 将 H9c2 细胞以 2×10^4 个/孔密度铺板于 6 孔板,细胞密度达到 70%后,根据 1.3.2 分组处理细胞。处理结束后收取细胞上清,使用 LDH 活性检测试剂盒,按照说明书添加试剂并进行相应操作后,用酶标仪测定各孔吸光度值,检测波长 450 nm。根据吸光度值计算 LDH 活性。

1.3.6 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法检测各组细胞内 ROS 水平 取处在对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,细胞密度达到 70%后,按照 1.3.2 进行分组处理。弃去旧培养基,用 DMEM 清洗 3 遍,每孔加入用 DMEM 按照 1:1 000 比例稀释的 DCFH-DA 探针 1 mL,37 ℃培养箱孵育 20 min,孵育结束后再用 DMEM 将细胞清洗 3 遍,在

荧光显微镜下观察并拍照。利用 Image J 软件分析其绿色荧光强度,用绿色荧光强度评价细胞中 ROS 水平,绿色荧光强度越大,则表示细胞中 ROS 水平越高。

1.3.7 试剂盒检测细胞中 MDA、GSH、Fe²⁺ 水平 取处在对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,细胞密度达到 70%后,按照 1.3.2 进行分组处理。处理结束后收集细胞,按照相应试剂盒说明书进行实验操作,分别测定细胞中 MDA、GSH、Fe²⁺ 水平。

1.3.8 JC-1 法检测各组细胞内线粒体膜电位(MMP) 取处在对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,细胞密度达到 70%后,按照 1.3.2 进行分组处理。弃去旧培养基,用 PBS 清洗 1 次,每孔加入 1 mL 完全培养基和 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀,37 ℃培养箱孵育 20 min。孵育结束后,吸除上清,用 JC-1 染色缓冲液(1×)洗涤 2 次,再加入 2 mL 完全培养基,在荧光显微镜下观察并拍照。利用 Image J 软件分析红色和绿色荧光强度,并以红色与绿色荧光强度的比值评价 MMP,比值越大,则表示细胞 MMP 越高。

1.3.9 Western blot 检测铁死亡及通路相关蛋白 取处在对数生长期的细胞接种于 10 cm 培养皿中,密度为 2×10^5 每培养皿,细胞密度达到 70%后,按照 1.3.2 处理细胞。弃去旧培养基,用 PBS 清洗 2 次,吸水纸吸干水分后加入细胞裂解液,用细胞刮刀充分裂解后超声,超声后在 4 ℃下 12 000×g 离心 10 min,取上清,按 BCA 说明书进行蛋白浓度定量,95 ℃沸水中煮沸蛋白变性 10 min。SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,湿转到 PVDF 膜上,用 TBST 洗 3 次再用快速封闭液封闭 5 min,直接加入稀释后的一抗:GPX4(1:10 000)、ACSL4(1:5 000)、SLC7A11(1:1 000)、Akt(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、P-Akt(1:2 000)、P-mTOR(1:3 000)、GAPDH(1:10 000),4 ℃孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的二抗 IgG(1:10 000)于室温孵育 1 h。使用增强化学发光显影,在化学发光成像系统下曝光,保存蛋白条带用 Image J 软件计算各条带的灰度值。以 P-Akt 与 Akt、P-mTOR 与 mTOR 灰度值比值分别表示 Akt、mTOR 的磷酸化水平;以 SLC7A11、GPX4 和 ACSL4 与内参 GAPDH 灰度值比值分别表示其水平。

1.4 统计学处理 采用 GraPhPad Prism8.0 统计软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 miR-486-5P 相对表达水平比较 对照组和 H/R 组 miR-486-5P 相对表达水平分别为 0.98 ± 0.05 、 0.42 ± 0.01 ;与对照组相比,H/R 组 miR-486-

5P 相对表达水平显著下降($P<0.05$)。

2.2 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞活力的影响 与对照组比较, H/R 组细胞活力明显降低($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组相比, H/R + miR-486-5P mimic 组细胞活力明显升高($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组相比, H/R + miR-486-5P inhibitor 组细胞活力显著降低($P<0.05$)。见表 1。

表 1 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞活力的影响($\bar{x}\pm s, \%$)		
组别	<i>n</i>	细胞活力
对照组	6	100.00±0.00
H/R 组	6	43.05±1.01 ^a
H/R+miR-486-5P mimic NC 组	6	42.13±1.22 ^a
H/R+miR-486-5P mimic 组	6	78.22±1.58 ^b
H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组	6	35.55±1.17 ^a
H/R+miR-486-5P inhibitor 组	6	12.62±0.08 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组比较,^b $P<0.05$;与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.3 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞 LDH 活性的影响 与对照组比较, H/R 组 LDH 活性明显升高($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组相比, H/R + miR-486-5P mimic 组 LDH 活性明显降低($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组相比, H/R + miR-486-5P inhibitor 组 LDH 活性显著升高($P<0.05$)。见表 2。

2.4 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞 ROS 水平的影响 与对照组比较, H/R 组 ROS 水平明显升高($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组相比, H/R + miR-486-5P mimic 组 ROS 水平明显降低($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组相比, H/R + miR-486-5P inhibitor 组 ROS 水平显著升高($P<0.05$)。见表 3。

2.5 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞 MDA、GSH、Fe²⁺ 水平的影响 与对照组比较, H/R 组 MDA、Fe²⁺ 水平明显升高($P<0.05$), GSH 水平降低

($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组相比, H/R + miR-486-5P mimic 组 MDA、Fe²⁺ 水平明显降低($P<0.05$), GSH 水平升高($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组相比, H/R + miR-486-5P inhibitor 组 MDA、Fe²⁺ 水平显著升高($P<0.05$), GSH 水平降低($P<0.05$)。见表 4。

2.6 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞 MMP 的影响 与对照组比较, H/R 组 MMP 明显下降($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组相比, H/R + miR-486-5P mimic 组 MMP 明显升高($P<0.05$); 与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组相比, H/R + miR-486-5P inhibitor 组 MMP 明显降低($P<0.05$)。见表 5。

表 2 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞 LDH 活性的影响($\bar{x}\pm s, U/mL$)		
组别	<i>n</i>	LDH 活性
对照组	3	97.60±1.27
H/R 组	3	232.50±2.44 ^a
H/R+miR-486-5P mimic NC 组	3	224.60±3.46 ^a
H/R+miR-486-5P mimic 组	3	161.70±12.08 ^b
H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组	3	232.20±2.02 ^a
H/R+miR-486-5P inhibitor 组	3	308.50±13.83 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组比较,^b $P<0.05$;与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组比较,^c $P<0.05$ 。

表 3 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞 ROS 水平的影响($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	ROS
对照组	3	14.13±1.18
H/R 组	3	51.81±3.32 ^a
H/R+miR-486-5P mimic NC 组	3	53.05±1.70 ^a
H/R+miR-486-5P mimic 组	3	28.33±2.93 ^b
H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组	3	58.57±2.97 ^a
H/R+miR-486-5P inhibitor 组	3	78.59±7.00 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组比较,^b $P<0.05$;与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组比较,^c $P<0.05$ 。

表 4 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞 MDA、GSH、Fe²⁺ 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

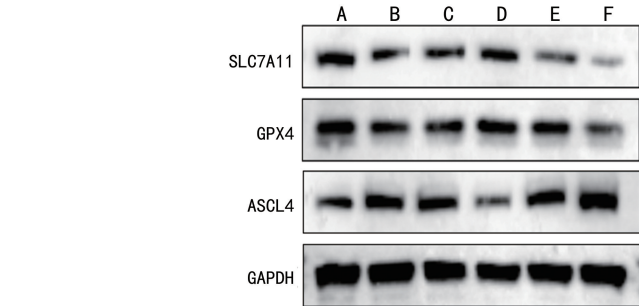
组别	<i>n</i>	MDA(nmol/10 ⁶ cell)	GSH(μg/10 ⁶ cell)	Fe ²⁺ (μmol/10 ⁶ cell)
对照组	3	0.75±0.12	13.15±0.14	0.25±0.12
H/R 组	3	1.45±0.20 ^a	8.11±0.60 ^a	0.93±0.17 ^a
H/R+miR-486-5P mimic NC 组	3	1.41±0.18 ^a	8.19±0.63 ^a	0.87±0.14 ^a
H/R+miR-486-5P mimic 组	3	0.61±0.13 ^b	10.73±0.39 ^b	0.21±0.15 ^b
H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组	3	1.44±0.08 ^a	7.93±0.45 ^a	0.89±0.16 ^a
H/R+miR-486-5P inhibitor 组	3	2.06±0.21 ^c	6.05±0.60 ^c	1.44±1.21 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组比较,^b $P<0.05$;与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组比较,^c $P<0.05$ 。

表 5 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞 MMP 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP
对照组	3	3.39±0.02
H/R 组	3	0.45±0.01 ^a
H/R+miR-486-5P mimic NC 组	3	0.46±0.03 ^a
H/R+miR-486-5P mimic 组	3	3.06±0.36 ^b
H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组	3	0.47±0.01 ^a
H/R+miR-486-5P inhibitor 组	3	0.05±0.01 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与 H/R+miR-486-5P mimic NC 组比较,^b $P<0.05$;与 H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组比较,^c $P<0.05$ 。



注:A 为对照组,B 为 H/R 组,C 为 H/R+miR-486-5P mimic NC 组,D 为 H/R+miR-486-5P mimic 组,E 为 H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组,F 为 H/R+miR-486-5P inhibitor 组。

图 1 Western blot 检测铁死亡及通路相关蛋白表达

表 6 miR-486-5P 对 H/R 损伤 H9c2 细胞铁死亡及通路相关蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$)

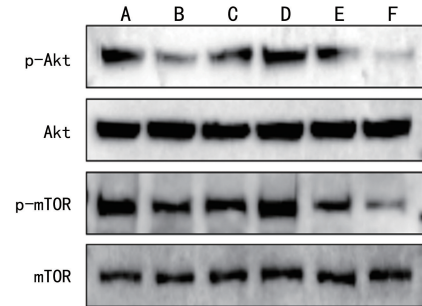
组别	n	SLC7A11/ GAPDH	GPX4/ GAPDH	ACSL4/ GAPDH	p-Akt/ Akt	p-mTOR/ mTOR
对照组	3	0.86±0.04	0.78±0.04	0.44±0.03	1.23±0.07	0.83±0.01
H/R 组	3	0.45±0.08 ^a	0.58±0.02 ^a	0.66±0.08 ^a	0.56±0.06 ^a	0.67±0.04 ^a
H/R+miR-486-5P mimic NC 组	3	0.51±0.03 ^a	0.64±0.02 ^a	0.62±0.02 ^a	0.68±0.19 ^a	0.65±0.04 ^a
H/R+miR-486-5P mimic 组	3	0.70±0.02 ^b	0.80±0.04 ^b	0.31±0.09 ^b	1.04±0.10 ^b	0.81±0.06 ^b
H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组	3	0.42±0.06 ^a	0.57±0.06 ^a	0.70±0.04 ^a	0.79±0.05 ^a	0.68±0.03 ^a
H/R+miR-486-5P inhibitor 组	3	0.25±0.01 ^c	0.42±0.04 ^c	0.89±0.08 ^c	0.32±0.09 ^c	0.51±0.07 ^c

注:与 H/R+miR-486-5P mimic NC 组比较,^b $P<0.05$;与 H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨 论

急性心肌梗死的主要治疗方法是通过及时实施溶栓治疗或经皮冠状动脉介入术来恢复血流灌注,从而减少心肌损伤并限制心肌梗死的范围^[10]。然而,再灌注治疗本身可能引发 MIRI,导致心肌细胞凋亡和坏死,诱发炎症及氧化应激反应,进而加重缺血组织或器官的功能障碍,最终可能导致更为严重的后果,如心律失常、心力衰竭及心室重塑等并发症^[11-12]。在心肌损伤过程中,常伴有细胞存活率和 LDH 释放量的改变,细胞存活率下降是心肌细胞损伤的典型表现,而 LDH 释放量与心肌细胞受损程度呈正相关。本实验用 CoCl₂ 和新鲜培养基来模拟心肌细胞 H/R

2.7 miR-486-5P 通过 Akt/mTOR 信号通路参与 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡 与对照组比较,H/R 组 ACSL4 蛋白水平明显升高($P<0.05$),GPX4、SLC7A11、P-AKT 和 P-mTOR 水平明显下降($P<0.05$)。经过 H/R 处理后,与 H/R+miR-486-5P mimic NC 组相比,H/R+miR-486-5P mimic 组 ACSL4 蛋白水平明显下降($P<0.05$),GPX4、SLC7A11、P-AKT、和 P-mTOR 水平明显升高($P<0.05$);与 H/R+miR-486-5P inhibitor NC 组相比 H/R+miR-486-5P inhibitor 组 ACSL4 蛋白水平明显升高($P<0.05$),GPX4、SLC7A11、P-AKT 和 P-mTOR 水平明显下降($P<0.05$)。结果见图 1、表 6。



损伤模型,通过 CCK-8 法和试剂盒分别检测细胞活力和 LDH 活性,结果表明,与对照组比较,H/R 组细胞活力降低,LDH 活性升高,证明本实验成功建立了体外心肌细胞 H/R 损伤模型。

铁死亡在肿瘤形成、肾脏疾病、神经退行性病变、脑卒中等多种疾病的病理生理过程中发挥重要作用,因此受到了广泛关注^[13]。铁死亡是一种调控性的细胞死亡形式,主要特征为铁代谢紊乱、GSH 的消耗和 ROS 的积聚^[14]。有研究表明,在 MIRI 发生时,心肌细胞内 Fe²⁺ 水平升高,产生大量 ROS,并与膜上多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,从而诱导心肌细胞发生铁死亡^[15]。GSH 是一种三肽,在维持细胞氧化

还原稳态中发挥着至关重要的作用,通过清除 ROS 并直接减少脂质氢过氧化物而充当关键的抗氧化剂。在铁死亡过程中,过度氧化应激导致的 GSH 消耗被认为是典型标志^[16]。MDA 能反映机体氧化损伤程度。长期缺血缺氧使 MMP 降低,从而导致进一步破坏缺血细胞。ACSL4 作为铁死亡的特异性敏感因子,能够介导脂质过氧化底物生成调控铁死亡^[17]。SLC7A11 是胱氨酸-谷氨酸逆向转运蛋白的关键成分,阻止胱氨酸进入细胞并减少脂质 ROS 的产生^[18]。GPX4 是一种含硒类的过氧化物还原酶,它能分解脂质过氧化物为没有毒性的羟基脂质,是拮抗铁死亡的核心蛋白酶^[19]。因此 MDA、GSH、Fe²⁺、ROS、MMP、ACSL4、GPX4、SLC7A11 均可作为反映细胞铁死亡的重要指标。本研究结果显示,在心肌细胞 H/R 损伤过程中 MDA、Fe²⁺、ROS 及 ACSL4 水平明显上升,GSH、MMP、GPX4 和 SLC7A11 水平明显下降,说明在心肌细胞 H/R 发生过程中有铁死亡的发生。

miR 是平均长度为 22 个核苷酸的单链非编码 RNA,通过与靶基因的 3' 非翻译区(UTR)结合来负向调节靶基因的表达^[20]。miR-486-5P 是一种多功能 miRNA,首次在造胎肝组织中被发现,有研究发现其参与调节细胞增殖、血管生成、细胞凋亡等病理生理过程,并通过调节关键蛋白的表达密切参与铁死亡的调节^[21]。本实验结果表明,与对照组相比,H/R 组 miR-486-5P 相对表达水平明显降低;与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组相比,H/R + miR-486-5P mimic 组细胞活力升高,LDH 活性、MDA、Fe²⁺、ROS 和 MMP 及 ACSL4 水平降低,GSH 及 GPX4 和 SLC7A11 水平增加;而与 H/R + miR-486-5P inhibitor NC 组相比,H/R + miR-486-5P inhibitor 组上述指标的趋势则相反。综上,过表达 miR-486-5P 可以逆转 H/R 诱导的 H9c2 细胞铁死亡引起的损伤,从而对心肌细胞起到保护作用,而抑制 miR-486-5P 的表达则会进一步加重 H/R 诱导的 H9c2 细胞铁死亡引起的损伤。

Akt/mTOR 信号通路是一条高度保守的通路,已被证明在细胞增殖、氧化应激、细胞存活和凋亡中发挥重要作用^[22]。一项研究报道,I/R 后心脏组织中的 p-Akt 和 p-mTOR 水平下降,这表明 MIRI 后 Akt/mTOR 通路失活^[23]。本研究结果显示,H/R 后 H9c2 细胞中 P-Akt 和 P-mTOR 水平均显著下降,使 Akt/mTOR 信号通路失活,与上述结果一致。更重要的是,本研究进一步发现,与 H/R + miR-486-5P mimic NC 组相比,过表达 miR-486-5P 可使在 H/R 诱导的 H9c2 细胞中 p-Akt 和 P-mTOR 水平均显著升高,从而激活 Akt/mTOR 通路;相反,抑制 miR-486-5P 的表达则使 H/R 诱导的 H9c2 细胞中 P-Akt

和 P-mTOR 水平进一步下降。这些结果表明,Akt/mTOR 信号通路参与了 miR-486-5P 对 H9c2 心肌细胞铁死亡的调节,miR-486-5P 可能通过抑制 Akt/mTOR 通路介导铁死亡,从而在 MIRI 中发挥保护作用。

综上所述,本研究揭示了 miR-486-5P 通过调控 Akt/mTOR 信号通路抑制铁死亡,从而减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤的作用机制。本研究结果为 miR-486-5P 和 Akt/mTOR 信号通路在 MIRI 的治疗中发挥的作用提供了重要理论依据。进一步研究 miR-486-5P 作为改善心肌细胞损伤的潜在治疗靶点,可为探索新的 MIRI 治疗策略提供研究方向。但本研究存在一定的局限性,未进行体内实验,且未分析 miR-486-5P 是否可直接作用于具体靶点抑制铁死亡,从而改善 H/R 诱导的心肌细胞损伤,后续将建立动物模型,行进一步验证。

参考文献

- [1] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics—2023 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2023,147(8):e93-e621.
- [2] GUMPPER-FEDUS K, PARK K H, MA H, et al. MG53 preserves mitochondrial integrity of cardiomyocytes during ischemia reperfusion-induced oxidative stress[J]. *Redox Biol*, 2022,54:102357.
- [3] HEUSCH G. Treatment of myocardial ischemia/reperfusion injury by ischemic and pharmacological postconditioning[J]. *Compr Physiol*, 2011,5(3):1123-1145.
- [4] HE J, LIU D, ZHAO L, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury: mechanisms of injury and implications for management[J]. *Exp Ther Med*, 2022,23(6):1-11.
- [5] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012,149(5):1060-1072.
- [6] FANG X, ARDEHALI H, MIN J, et al. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023,20(1):7-23.
- [7] LIU C, LI Z, LI B, et al. Relationship between ferroptosis and mitophagy in cardiac ischemia reperfusion injury: a mini-review[J]. *PeerJ*, 2023,11:e14952.
- [8] WEI Y X, DONG S M, WANG Y Y, et al. Autophagy participates in the protection role of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in acute myocardial infarction via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2021,45(2):394-403.
- [9] ZHU H, WANG X, SUN Y, et al. MicroRNA-486-5p targeting PTEN protects against coronary microembolization-induced cardiomyocyte apoptosis in rats by activating the PI3K/AKT pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019,855:244-251.

[10] ZHENG J, CHEN P, ZHONG J, et al. HIF 1 α in myocardial ischemia reperfusion injury[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5):1-9.

[11] HAUSENLOY D J, YELLON D M. Myocardial ischemia-reperfusion injury; a neglected therapeutic target[J]. J Clin Invest, 2013, 123(1):92-100.

[12] YELLON D M, HAUSENLOY D J. Myocardial reperfusion injury[J]. New Engl J Med, 2007, 357(11):1121-1135.

[13] ANGELI J P F, SHAH R, PRATT D A, et al. Ferroptosis inhibition: mechanisms and opportunities[J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38(5):489-498.

[14] CHEN X, LI J, KANG R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. Autophagy, 2021, 17(9):2054-2081.

[15] GAO X, HU W, QIAN D, et al. The mechanisms of ferroptosis under hypoxia[J]. Cell Mol Neurobiol, 2023, 43(7):3329-3341.

[16] DANG R, WANG M, LI X, et al. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway[J]. J Neuroinflamm, 2022, 19(1):41.

[17] ZHANG H L, HU B X, LI Z L, et al. PKC β II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(1):88-98.

[18] DIXON S J, PATEL D N, WELSCH M, et al. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis[J]. Elife, 2014, 3:e02523.

[19] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. Cell, 2014, 156(1):317-331.

[20] HO P T B, CLARK I M, LE L T T. MicroRNA-based diagnosis and therapy[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13):7167.

[21] NAVON R, WANG H, STEINFELD I, et al. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types[J]. PLoS One, 2009, 4(11):e8003.

[22] WIESE W, BARCZUK J, RACINSKA O, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in blood malignancies: new therapeutic possibilities[J]. Cancers, 2023, 15(21):5297.

[23] TONG Z, LI G, SU C, et al. L-Borneol 7-O-[β -D-Apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-Glucopyranoside alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and hypoxic/reoxygenated injured myocardial cells via regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. J Immunol Res, 2022, 2022(1):5758303.

(收稿日期:2024-09-26 修回日期:2025-03-10)

(上接第 2211 页)

[9] KHWAJA A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury[J]. Nephron Clin Pract, 2012, 120(4):c179-c184.

[10] WOODWARD C W, LAMBERT J, ORTIZ-SORIANO V, et al. Fluid overload associates with major adverse kidney events in critically ill patients with acute kidney injury requiring continuous renal replacement therapy[J]. Crit Care Med, 2019, 47(9):e753-e760.

[11] KUMAWAT A K, PARAMEL G V, DEMIREL K J, et al. Human renal fibroblasts, but not renal epithelial cells, induce IL-1 β release during a uropathogenic escherichia coli infection in vitro[J]. Cells, 2021, 10(12):128-135.

[12] LIU Y N, FENG L Z, HOU G, et al. Curcumin elevates microRNA-183-5p via cathepsinB-mediated phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway to strengthen lipopolysaccharide-stimulated immune function of sepsis mice[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2022, 22(3):621-634.

[13] SONG X B, LIU G, LIU F, et al. Autophagy blockade and lysosomal membrane permeabilization contribute to lead-induced nephrotoxicity in primary rat proximal tubular cells[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6):e2863.

[14] AL-SALAM S, JAGADEESH G S, SUDHADEVI M, et al. Galectin-3 possesses anti-necroptotic and anti-apoptotic effects in cisplatin-induced acute tubular necrosis[J]. Cell Physiol Biochem, 2021, 55(3):344-363.

[15] WANG Y T, XI W J, ZHANG X Y, et al. CTSB promotes sepsis-induced acute kidney injury through activating mitochondrial apoptosis pathway[J]. Front Immunol, 2022, 13(5):105-114.

[16] JEONG B Y, PARK S R, CHO S, et al. TGF- β -mediated NADPH oxidase 4-dependent oxidative stress promotes colistin-induced acute kidney injury[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(4):962-972.

[17] YAO Y, HU X, FENG X, et al. Dexmedetomidine alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting the NLRP3 inflammasome activation via regulating the TLR4/NOX4/NF- κ B pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):18509-18523.

[18] FENG R K, XIONG Y F, LEI Y R, et al. Lysine-specific demethylase 1 aggravated oxidative stress and ferroptosis induced by renal ischemia and reperfusion injury through activation of TLR4/NOX4 pathway in mice[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(15):4254-4267.

[19] SURESHBABU A, PATINO E, MA K C, et al. RIPK3 promotes sepsis-induced acute kidney injury via mitochondrial dysfunction[J]. JCI Insight, 2018, 3(11):75-86.

(收稿日期:2025-01-03 修回日期:2025-04-10)