

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.02.003

## miR-208b-3p 在右美托咪定减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用研究\*

杨冯睿, 易 汉, 汪 超, 杨 欢, 胡啸玲<sup>△</sup>

(南华大学附属第一医院麻醉科, 湖南衡阳 421001)

**[摘要]** **目的** 探讨 miR-208b-3p 在右美托咪定(DEX)减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)中的作用。**方法** 将成年雄性 Wister 大鼠 80 只分为假手术(Sham)组、缺血再灌注(I/R)组、DEX 组和 miR-208b-3p+DEX 组。Sham 组大鼠, 放置 6-0 缝合线不结扎, 其余 3 组均按 I/R 模型处理, 其中 DEX 组在缺血灌注前经股静脉注射 5 μg/kg 负荷剂量的 DEX, 然后以 5 μg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> 持续灌注 1 h, miR-208b-3p+DEX 组在 I/R 模型前 24 h 心肌内注射 miR-208b-3p 模拟物, 监测各组大鼠再灌注 120 min 后的心功能指标心率(HR)、左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张末期压(LVEDP)和左心室变化速率最大值(±dp/dtmax), 检测各组大鼠血清肌钙蛋白(cTn-I)、肌酸激酶(CK-MB)水平及心肌细胞凋亡率(AI), 检测氧化应激相关指标水平并采用 Western blot 检测心肌组织凋亡蛋白水平。**结果** 与 Sham 组相比, I/R 组的心功能降低, cTn-I、CK-MB、AI、丙二醛(MDA)、Bax 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)水平均升高( $P<0.05$ ); 与 I/R 组相比, DEX 组的以上指标改善( $P<0.05$ ); 与 DEX 组相比, miR-208b-3p+DEX 组的以上指标恶化( $P<0.05$ )。**结论** 过表达 miR-208b-3p 可消除 DEX 对 MIRI 的保护作用。

**[关键词]** 心肌再灌注损伤; miR-208b-3p; 右美托咪定**[中图分类号]** R614.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)02-0153-03

## Study on role of miR-208b-3p in dexmedetomidine alleviating rat myocardial ischemia-reperfusion injury\*

YANG Fengrui, YI Han, WANG Chao, YANG Huan, HU Xiaoling<sup>△</sup>

(Department of Anesthesia, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of miR-208b-3p in dexmedetomidine(DEX) alleviating rat myocardial ischemia reperfusion injury(MIRI). **Methods** Eighty adult male Wister rats were divided into the sham operation(Sham) group, I/R group, DEX group and miR-208b-3p+DEX group. In the Sham group, a 6-0 silk suture was only placed without ligation, and other 3 groups were treated by I/R model. Before ischemia reperfusion, the DEX group received a loading dose of DEX(5 μg/kg) via the femoral vein followed by a continuous infusion of 5 μg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> for 1 h. In the miR-208b-3p+DEX group, rats received intramuscular injection of miR-208b-3p analogue at 24 h before ischemia reperfusion. The cardiac function indexes were monitored at 120 min after reperfusion, including heart rate(HR), left ventricular systolic blood pressure(LVSP), left ventricular end diastolic pressure(LVEDP) and left ventricular rate maximum(dp/dtmax). The serum levels of cTn-I and CK-MB were detected and the apoptosis rate(AI) was measured by in situ apoptosis assay. The levels of oxidative stress related indicators were detected and Western blot was used to detect the level of myocardial apoptosis protein. **Results** Compared with the Sham group, the cardiac function in the I/R group was decreased, but the levels of cTn-I, CK-MB, AI, MDA, Bax and Caspase-3 were increased( $P<0.05$ ); compared with the I/R group, the above indexes in the DEX group were improved( $P<0.05$ ); compared with the DEX group, the above indexes in the miR-208b-3p+DEX group were deteriorated( $P<0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of miR-208b-3p can eliminate the protective effect of DEX on MIRI.

**[Key words]** myocardial reperfusion injury; miR-208b-3p; dexmedetomidine

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)在心肺复苏、心肌梗死溶栓、介入治疗及心脏移植中时有发生,由此引发的心律失常、心力衰竭和再梗死等并发症不仅影响了治疗效果,也给患者生命造成了严重威胁<sup>[1]</sup>。因此探索防治 MIRI 的药物及靶点具有重要意义。研究发现右美托咪定(dexmedetomidine, DEX)具有改善缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的作用<sup>[2-3]</sup>,但具体机制尚不清楚。研究发现木犀草素可通过下调 miR-208b-3p 水平来抑制大鼠的 MIRI,而过表达 miR-208b-3p 水平可加重 MIRI 症状,提示 miR-208b-3p 在 MIRI 发生、发展中发挥促进作用<sup>[4]</sup>。本研究拟观察 miR-208b-3p 是否影响 DEX 对 MIRI 的改善作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** DEX 购自江苏恒瑞医药股份有限公司, miR-208b-3p 模拟物(miR-208b-3p mimics, miRNA mimics 是针对 miRNA 的成熟体设计并合成的小片段双链 miRNA,作用与 miRNA 的成熟体一样,可以上调细胞内相应 miRNA 的含量)购自百奥迈科生物技术有限公司,肌钙蛋白(cTn-I)、肌酸激酶(CK-MB)检测试剂盒购自碧云天生物科技公司,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化能力(T-AOC)及超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程公司, Bax、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)和 Bcl-2 一抗购自美国 Santa Cruz 公司。

## 1.2 方法

表 1 各组大鼠的心功能指标比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	HR (bpm)	LVSP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	+dp/dtmax (mm Hg/s)	-dp/dtmax (mm Hg/s)
Sham 组	379.2±17.9	143.5±13.7	10.6±1.9	4 875.6±289.4	2 871.6±193.8
I/R 组	381.5±21.3	106.8±15.3 <sup>a</sup>	16.2±2.3 <sup>a</sup>	2 766.3±306.2 <sup>a</sup>	2 011.3±274.3 <sup>a</sup>
DEX 组	369.2±20.8	133.7±14.2 <sup>ab</sup>	12.5±2.0 <sup>ab</sup>	3 874.0±275.9 <sup>ab</sup>	2 547.6±206.1 <sup>ab</sup>
miR-208b-3p+DEX 组	372.4±18.4	102.1±15.6 <sup>ac</sup>	16.9±1.7 <sup>ac</sup>	4 056.7±204.8 <sup>ac</sup>	2 103.9±257.6 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与 Sham 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与 I/R 组比较;<sup>c</sup>: $P<0.05$ ,与 DEX 组比较

**1.2.1 分组** 将成年雄性 Wister 大鼠(体质量为 280~320 g)80 只分为假手术(Sham)组、I/R 组、DEX 组和 miR-208b-3p+DEX 组( $n=20$ )。Sham 组:冠状动脉左前降支只穿线,不结扎;I/R 组:结扎冠状动脉左前降支 45 min,再灌注 120 min,再灌注前 10 min 由股静脉缓慢注入生理盐水(1 mL/100 g);DEX 组在 I/R 前经股静脉注射 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  负荷剂量的 DEX,然后以 5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  持续输注 1 h,miR-208b-3p+DEX 组在 I/R 前 24 h 心肌内注射 miR-208b-3p 模拟物(miR-208b-3p mimics,  $1\times 10^3$  mol/L),DEX 用法同 DEX 组。本实验所用大鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于无特定病原体(SPF)级实验动物房中,湿度控制在 60%~70%,室温为(22±1)°C,照明昼夜明暗交替时间为 12 h:12 h。

**1.2.2 血流动力学指标测定** I/R 120 min 后经右侧颈总动脉插管至左心室,连接至八导生理记录仪,记录心率(heart rate, HR)、左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张末期压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左心室变化速率最大值( $\pm\text{dp}/\text{dtmax}$ )。

**1.2.3 血清 CK-MB 和 cTn-I 水平测定** I/R 120 min 后收集右颈总动脉血 4 mL,4 °C 3 000 r/min 离心 10 min,分离出血清,分别用全自动生化分析仪和 ELISA 法测血清 CK-MB 活性和 cTn-I 水平。具体操作按试剂盒说明书进行。

**1.2.4 心肌凋亡细胞原位测定** 严格按照 TUNEL 凋亡测试试剂盒说明书操作。光镜下正常心肌细胞核呈蓝色,棕色为 TUNEL 染色阳性细胞,每张切片随机选取 10 个视野( $\times 400$  倍),计数凋亡阳性细胞,以凋亡细胞个数/所有细胞个数作为凋亡指数(apoptotic index, AI),AI 反映各组心肌细胞凋亡的情况。

**1.2.5 心肌氧化相关指标检测** I/R 120 min 后取大鼠左心室结扎线以下心尖部缺血区心肌组织,每 20 mg 组织加入 150  $\mu\text{L}$  裂解液,与生理盐水混合后研磨匀浆,4 °C 15 000 r/min 离心 5 min,取上清液;硫代巴比妥酸法测定 MDA 水平,试剂盒法检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化能力(T-AOC)及超氧化物歧化酶(SOD)活性。

**1.2.6 心肌凋亡相关蛋白的表达情况** I/R 120 min 后取大鼠左心室结扎线以下心尖部缺血区心肌组织,于液氮中迅速冷冻后研磨,制备匀浆后检测蛋白含量,采用 10%十二烷基硫酸

钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转膜至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭后,给予 Bax、Bcl-2 和半胱氨酸蛋白酶(Caspase-3)的一抗孵育, TBST 洗膜后孵育二抗,经曝光显影后进行数据分析,最终结果表示为目的蛋白与内参光密度的比值。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠的心功能指标比较** 与 Sham 组比较,I/R 组 LVSP、-dp/dtmax 和 +dp/dtmax 降低,LVEDP 升高( $P<0.05$ );与 I/R 组比较,DEX 组的 LVSP、-dp/dtmax 和 +dp/dtmax 均升高,LVEDP 降低( $P<0.05$ );miR-208b-3p mimics 可降低 DEX 对 I/R 大鼠心功能的改善效果,见表 1。

**2.2 各组大鼠血清 cTn-I、CK-MB 水平及 AI 比较** 与 Sham 组比较,I/R 组的 cTn-I、CK-MB 水平及 AI 均升高( $P<0.05$ );与 I/R 组比较,DEX 组的 cTn-I、CK-MB 水平及 AI 均降低( $P<0.05$ );与 DEX 组比较,miR-208b-3p+DEX 组 cTn-I、CK-MB 水平及 AI 均升高,见表 2。

表 2 各组大鼠血清 cTn-I、CK-MB 水平及 AI 比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	cTn-I(ng/mL)	CK-MB(U/L)	AI(%)
Sham 组	0.26±0.06	365.2±57.8	2.4±1.2
I/R 组	1.74±0.25 <sup>a</sup>	846.3±86.2 <sup>a</sup>	36.1±4.3 <sup>a</sup>
DEX 组	0.54±0.09 <sup>ab</sup>	465.2±67.1 <sup>ab</sup>	9.7±1.9 <sup>ab</sup>
miR-208b-3p+DEX 组	0.86±0.13 <sup>ac</sup>	736.8±41.4 <sup>ac</sup>	21.3±2.2 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与 Sham 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与 I/R 组比较;<sup>c</sup>: $P<0.05$ ,与 DEX 组比较

**2.3 各组大鼠心肌组织中的氧化应激相关指标比较** 与 Sham 组比较,I/R 组的 GSH-Px、T-AOC 及 SOD 活性均降低,MDA 水平升高( $P<0.05$ );与 I/R 组比较,DEX 组的 GSH-Px、T-AOC 及 SOD 活性均升高,MDA 水平降低( $P<0.05$ );miR-208b-3p mimics 可降低 DEX 对 I/R 大鼠心肌氧化应激指标的改善效果,见表 3。

表 3 各组大鼠心肌组织中的氧化应激相关指标比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	GSH-Px(U/mg)	MDA(mmol/mg)	T-AOC(U/mg)	SOD(U/mg)
Sham 组	47.48±3.07	2.36±0.64	21.36±2.75	35.29±3.10
I/R 组	19.72±1.43 <sup>a</sup>	13.46±1.79 <sup>a</sup>	9.73±1.35 <sup>a</sup>	17.55±2.26 <sup>a</sup>
DEX 组	41.53±2.39 <sup>ab</sup>	4.58±1.21 <sup>ab</sup>	20.62±1.88 <sup>ab</sup>	35.34±1.82 <sup>ab</sup>
miR-208b-3p+DEX 组	20.24±2.66 <sup>ac</sup>	15.20±0.75 <sup>ac</sup>	7.25±2.47 <sup>ac</sup>	16.69±2.53 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与 Sham 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与 I/R 组比较;<sup>c</sup>: $P<0.05$ ,与 DEX 组比较

**2.4 各组大鼠肌凋亡相关基因表达的比较** 与 Sham 组比较,I/R 组的 Bax、Caspase-3 水平均升高,Bcl-2 水平降低( $P<$

0.05);与 I/R 组比较,DEX 组的 Bax、Caspase-3 水平均降低,Bcl-2 水平升高( $P<0.05$ );miR-208b-3p mimics 可降低 DEX

对 I/R 大鼠心肌 Bax、Caspase-3 和 Bcl-2 的改善效果。见表 4。

表 4 各组大鼠心肌凋亡相关基因的表达情况( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	Bax	Bcl-2	Caspase-3
Sham 组	0.08±0.02	0.46±0.05	0.16±0.07
I/R 组	0.52±0.04 <sup>a</sup>	0.11±0.03 <sup>a</sup>	0.73±0.06 <sup>a</sup>
DEX 组	0.13±0.03 <sup>ab</sup>	0.38±0.06 <sup>ab</sup>	0.21±0.08 <sup>ab</sup>
miR-208b-3p+DEX 组	0.64±0.06 <sup>ac</sup>	0.09±0.05 <sup>ac</sup>	0.65±0.05 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 Sham 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 DEX 组比较

### 3 讨 论

MIRI 是指在心肌缺血基础上恢复血流后组织细胞功能代谢障碍及结构功能破坏反而加重,甚至发生不可逆性损伤的现象<sup>[5]</sup>。近年来,MIRI 的发生机制已得到深入研究。目前公认的是细胞凋亡与 MIRI 及 I/R 过程密切相关<sup>[6]</sup>。大量证据显示,在许多器官和组织中抗凋亡的调节与许多基因的调节有关,包括 Bcl-2 家族、Caspase 家族、p53 和核因子- $\kappa$ B。心肌细胞的凋亡是 MIRI 的关键细胞事件<sup>[7-8]</sup>,越来越多的研究都集中在如何减轻心肌细胞凋亡。

多项研究的结果表明,给予 DEX 处理对发生 I/R 损伤的心肌细胞有较好的保护作用。秦智刚等<sup>[9]</sup>发现 DEX 能在一定程度上减轻体外循环下的 MIRI,其机制可能与其抗氧化应激作用有关。吴志林等<sup>[10]</sup>发现 DEX 定可通过抗氧化应激,降低炎症反应而减轻大鼠 MIRI。但 DEX 改善 MIRI 的机制目前尚不清楚。

microRNAs 对发生 IRI 心肌细胞的凋亡有较好的调控作用。其中 miR-208b-3p 具有促凋亡作用<sup>[4]</sup>,且研究发现下调其水平可减轻 IRI。本研究发现 I/R 组出现心功能异常,而给予 DEX 处理后以上指标获改善,以上结果表明 I/R 模型制备成功,且 DEX 具有较好的心肌 I/R 损伤保护作用。

本研究进一步采用过表达 miR-208b-3p 发现 DEX 对 MIRI 的改善效果被逆转,表明 DEX 可通过下调 miR-208b-3p 水平来发挥对 MIRI 的保护作用。miR-208b-3p 是一种促凋亡蛋白,本研究发现过表达 miR-208b-3p 处理后导致 Bax 和 Caspase-3 水平升高,Bcl-2 水平降低,提示 miR-208b-3p 可能通过促进凋亡相关蛋白表达来逆转 DEX 对 MIRI 的改善效果。多项研究指出氧化应激也是导致 MIRI 的原因之一<sup>[11-12]</sup>,本研究发现过表达 miR-208b-3p 后可导致 GSH-Px、T-AOC 及 SOD 活性均降低,MDA 水平升高,表明 miR-208b-3p 可影响 DEX 对氧化应激的改善效果。

综上所述,过表达 miR-208b-3p 可消除 DEX 对心肌 I/R 损伤的保护作用,提示 miR-208b-3p 可能参与了 I/R 损伤的发生、发展。

### 参考文献

[1] OKADA H, KURITA T, MOCHIZUKI T, et al. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischemia in isolated rat heartsick[J]. Resuscitation, 2007, 74

(3):538-545.

[2] GENCER B, KARACA T, TUFAN H A, et al. The protective effects of dexmedetomidine against apoptosis in retinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Cutan Ocul Toxicol, 2014, 33(4):283-288.

[3] WANG H, ZHANG S, XU S, et al. The efficacy and mechanism of dexmedetomidine in myocardial apoptosis via the renin-angiotensin-aldosterone system[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2015, 16(4):1274-80.

[4] BIAN C, XU T D, ZHU H, et al. Luteolin inhibits ischemia/Reperfusion-Induced myocardial injury in rats via downregulation of microRNA-208b-3p[J]. PLoS One, 2015, 10(12):e0144877.

[5] MIMURO S, KATOH T, SUZUKI A, et al. Deterioration of myocardial injury due to dexmedetomidine administration after myocardial ischaemia[J]. Resuscitation, 2010, 81(12):1714-1717.

[6] TAKYAR S, VASAVADA H, ZHANG J G, et al. VEGF controls lung Th2 inflammation via the miR-1-Mpl(myeloproliferative leukemia virus oncogene)-P-selectin axis[J]. J Exp Med, 2013, 210(10):1993-2010.

[7] WEI G, SRINIVASAN R, CANTEMIR-STONE C Z, et al. Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis[J]. Blood, 2009, 114(5):1123-1130.

[8] LI M Y, ZHU M, FENG F, et al. Long interspersed nucleotide acid element-1 ORF-1 protein promotes proliferation and invasion of human colorectal cancer LoVo cells through enhancing ETS-1 activity[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3):6981-6994.

[9] 秦智刚, 艾玲, 罗爱林, 等. 右美托咪定对体外循环下心肌缺血再灌注损伤的保护效应[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2013, 42(5):551-554.

[10] 吴志林, 褚淑娟, 姚尚龙, 等. 不同剂量右美托咪定预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤以及炎症反应的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2015, 44(4):445-447.

[11] LV P, ZHOU M X, HE J, et al. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4):5774-5788.

[12] JAYAWARDENA T M, EGEMNAZAROV B, FINCH E A, et al. MicroRNA-Mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2012, 110(11):1465-1473.

(收稿日期:2017-06-18 修回日期:2017-08-26)

(上接第 152 页)

[13] WANG J, CHEN J, ZHANG K L, et al. TGF- $\beta$ 1 regulates the invasive and metastatic potential of mucoepidermoid carcinoma cells[J]. J Oral Pathol Med, 2011, 40(10):762-768.

[14] GONZALEZ-ZUBELDIA I, DOTOR J, REDRADO M, et

al. Co-migration of colon cancer cells and CAFs induced by TGF $\beta$  enhances liver metastasis[J]. Cell Tissue Res, 2015, 359(3):829-839.

(收稿日期:2017-07-10 修回日期:2017-09-16)