

微小 RNA-1 介导的 AMPK 通路在高糖培养大鼠心肌成纤维细胞致纤维化中的作用

仇佳 王安 许映娜 乔世刚 安建中 李华 王琛

215004 江苏苏州, 苏州大学附属第二医院麻醉科(仇佳、王安); 215006 江苏苏州, 苏州大学(许映娜); 215153 江苏苏州, 苏州科技城医院临床医学研究所(乔世刚、安建中); 215153 江苏苏州, 南京医科大学附属苏州医院麻醉及围术期医学科(李华、王琛)

通讯作者: 王琛, Email: wangchen1791@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.02.010

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-1(miR-1)在高糖培养所致大鼠心肌纤维化中的作用途径。**方法** 取 1~3 日龄 SD 大鼠心尖组织培养原代心肌成纤维细胞, 传代至 3~4 代细胞后被随机分为正常糖空病毒组(CON+Lv-Vehicle 组)、正常糖 miR-1 沉默组(CON+Lv-miR1 组)、高糖空病毒组(HG+Lv-Vehicle 组)、高糖 miR-1 沉默组(HG+Lv-miR1 组)、高糖空病毒抑制剂组(HG+Lv-Vehicle+CC 组)、高糖 miR-1 沉默抑制剂组(HG+Lv-miR1+CC 组)。将细胞分别置于葡萄糖 5.5 mmol/L(正常糖)和 25.0 mmol/L(高糖)的 DMEM 培养基中, 接种含 miR-1 沉默序列的慢病毒载体或慢病毒; 抑制剂组于取样前 12 h 加入 20 μ mol/L 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂 Compound C。采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测磷酸化 AMPK(p-AMPK)、胶原蛋白 I 和 III、基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-9)、自噬流相关蛋白〔微管相关蛋白 1 轻链 3B-II(LC3B-II)、死骨片重组蛋白 1(p62/SQSTM1)〕的蛋白表达。**结果** 体外培养大鼠心肌成纤维细胞的纯度达 97%。与 CON+Lv-Vehicle 组比较, CON+Lv-miR1 组 p-AMPK 表达无明显变化, HG+Lv-Vehicle 组 p-AMPK 表达明显降低(p-AMPK/t-AMPK: 44.72 $\pm$ 3.29 比 100.00 $\pm$ 7.77, $P<0.01$); HG+Lv-miR1 组 p-AMPK 表达较 HG+Lv-Vehicle 组明显增高(p-AMPK/t-AMPK: 60.52 $\pm$ 5.16 比 44.72 $\pm$ 3.29, $P<0.05$)。与 HG+Lv-Vehicle 组比较, HG+Lv-miR1 组胶原蛋白、MMP、LC3B-II 和 p62/SQSTM1 表达均明显降低; 给予 AMPK 抑制剂后胶原蛋白、MMP、LC3B-II、p62/SQSTM1 表达均明显增高(HG+Lv-Vehicle+CC 组与 HG+Lv-Vehicle 组比较: 胶原蛋白 I/ β -actin 为 158.74 $\pm$ 13.21 比 100.00 $\pm$ 7.64, 胶原蛋白 III/ β -actin 为 177.38 $\pm$ 17.31 比 100.00 $\pm$ 5.18, MMP-2/ β -actin 为 130.09 $\pm$ 14.31 比 100.00 $\pm$ 10.47, MMP-9/ β -actin 为 215.54 $\pm$ 20.92 比 100.00 $\pm$ 11.28, LC3B-II/ β -actin 为 159.34 $\pm$ 13.83 比 100.00 $\pm$ 6.44, p62/SQSTM1/ β -actin 为 201.01 $\pm$ 24.02 比 100.00 $\pm$ 8.62; HG+Lv-miR1+CC 组与 HG+Lv-miR1 组比较: 胶原蛋白 I/ β -actin 为 108.69 $\pm$ 9.93 比 80.83 $\pm$ 7.24, 胶原蛋白 III/ β -actin 为 127.68 $\pm$ 10.46 比 81.56 $\pm$ 9.97, MMP-2/ β -actin 为 106.66 $\pm$ 10.21 比 74.80 $\pm$ 7.43, MMP-9/ β -actin 为 145.65 $\pm$ 11.56 比 74.63 $\pm$ 10.55, LC3B-II/ β -actin 为 150.15 $\pm$ 13.28 比 22.98 $\pm$ 2.87, p62/SQSTM1/ β -actin 为 130.48 $\pm$ 10.74 比 49.90 $\pm$ 2.27, 均 $P<0.05$)。**结论** miR-1 基因沉默对高糖培养致大鼠心肌成纤维细胞纤维化具有抑制作用, 其机制可能与上调 AMPK 磷酸化表达、恢复成纤维细胞自噬流有关。

【关键词】 腺苷酸活化蛋白激酶; 心肌成纤维细胞; 自噬; 微小 RNA; 纤维化

基金项目: 国家自然科学基金(81703501); 江苏省自然科学基金(BK20141187); 江苏省青年医学人才项目(QNRC2016219); 江苏省苏州市科技计划项目(SS201756, SS201613, SYS201473)

Role of microRNA-1-mediated AMP-activated protein kinase pathway in cardiac fibroblasts induced by high glucose in rats Qiu Jia, Wang An, Xu Yingna, Qiao Shigang, An Jianzhong, Li Hua, Wang Chen

Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China (Qiu J, Wang A); Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China (Xu YN); Institute of Clinical Medicine Research, Suzhou Science and Technology Town Hospital, Suzhou 215153, Jiangsu, China (Qiao SG, An JZ); Department of Anesthesiology and Perioperative Medicine, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215153, Jiangsu, China (Li H, Wang C)

Corresponding author: Wang Chen, Email: wangchen1791@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of microRNA-1(miR-1) in cardiac fibroblasts induced by high glucose in rats. **Methods** The primary fibroblasts were cultured from the apical tissue of 1-3 day-old Sprague-Dawley (SD) rats. The cells which were passaged to generation 3 or 4, were randomly divided into normal glucose+lentivector-vehicle group (CON+Lv-Vehicle group), normal glucose+lentivector-miR-1 group (CON+Lv-miR1 group), high glucose+lentivector-vehicle group (HG+Lv-Vehicle group), high glucose+lentivector-miR-1 group (HG+Lv-miR1 group), high glucose+Lv-Vehicle+inhibitor group (HG+Lv-Vehicle+CC group), and high glucose+lentivector-miR-1+inhibitor group (HG+Lv-miR1+CC group). The myocardial fibroblasts were cultured in the concentration of

5.5 mmol/L glucose (normal glucose) or 25.0 mmol/L (high glucose) DMEM medium. Then lentiviral vector containing miR-1 silent sequence or the same volume of lentiviral vector was inoculated into the cells. The AMP activated protein kinase (AMPK) inhibitor Compound C (20 μ mol/L) was added to the medium at 12 hours before sampling in inhibitor groups. The expression of phosphorylation of AMPK (p-AMPK), collagen I and III, matrix metalloproteinase (MMP-2, MMP-9), and autophagy flux related protein LC3B- II and p62/SQSTM1 were measured by Western Blot.

Results The purity of rat myocardial fibroblasts *in vitro* was 97%. Compared with CON+Lv-Vehicle group, there was no significant difference in the expression of p-AMPK in CON+Lv-miR1 group, the expression of p-AMPK in HG+Lv-Vehicle group was significantly decreased (p-AMPK/t-AMPK: 44.72 ± 3.29 vs. 100.00 ± 7.77 , $P < 0.01$). The expression of p-AMPK in HG+Lv-miR1 group was higher than that in HG+Lv-Vehicle group (p-AMPK/t-AMPK: 60.52 ± 5.16 vs. 44.72 ± 3.29 , $P < 0.05$). Compared with HG+Lv-Vehicle group, the expressions of collagen, MMP, LC3B- II and p62/SQSTM1 in HG+Lv-miR1 group were significantly decreased; after the treatment with AMPK inhibitor, the expressions of collagen, MMP, LC3B- II, p62/SQSTM1 were significantly increased (HG+Lv-Vehicle+CC group vs. HG+Lv-Vehicle group: collagen I/ β -actin: 158.74 ± 13.21 vs. 100.00 ± 7.64 , collagen III/ β -actin: 177.38 ± 17.31 vs. 100.00 ± 5.18 , MMP-2/ β -actin: 130.09 ± 14.31 vs. 100.00 ± 10.47 , MMP-9/ β -actin: 215.54 ± 20.92 vs. 100.00 ± 11.28 , LC3B- II/ β -actin: 159.34 ± 13.83 vs. 100.00 ± 6.44 , p62/SQSTM1/ β -actin: 201.01 ± 24.02 vs. 100.00 ± 8.62 ; HG+Lv-miR1+CC group vs. HG+Lv-miR1 group: collagen I/ β -actin: 108.69 ± 9.93 vs. 80.83 ± 7.24 , collagen III/ β -actin: 127.68 ± 10.46 vs. 81.56 ± 9.97 , MMP-2/ β -actin: 106.66 ± 10.21 vs. 74.80 ± 7.43 , MMP-9/ β -actin: 145.65 ± 11.56 vs. 74.63 ± 10.55 , LC3B- II/ β -actin: 150.15 ± 13.28 vs. 22.98 ± 2.87 , p62/SQSTM1/ β -actin: 130.48 ± 10.74 vs. 49.90 ± 2.27 , all $P < 0.05$).

Conclusion miR-1 gene silencing inhibits myocardial fibrosis induced by high glucose, its mechanism may be related to the up-regulation of p-AMPK, which can recover autophagy flux.

【Key words】 AMP-activated protein kinase; Myocardial fibroblasts; Autophagy; MicroRNA; Fibrosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81703501); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20141187); Jiangsu Key Talent Youth Awards in Medicine (QNR2016219); Suzhou City Science and Technology Development Plan of Jiangsu Province (SS201756, SS201613, SYS201473)

糖尿病是心血管疾病发生的独立危险因素^[1]。糖尿病心肌病作为无明显冠状动脉(冠脉)病变时的一种心脏病变,显著特征之一是心肌纤维化,即基质胶原纤维过量积聚^[2],其可导致慢性心力衰竭、恶性心律失常等心血管事件^[3]。微小 RNA(miRNA)是一种非编码小 RNA 分子,可以通过促进 mRNA 降解等途径调控基因表达^[4];它参与了糖尿病心肌病的很多病理生理过程,包括心肌细胞肥大及心肌纤维化等^[5-7]。有研究表明,miR-1 作为心肌损伤的早期标志物之一,在心脏功能障碍时其表达明显增加^[8]。本课题组前期研究结果显示,抑制 miR-1 表达可减轻高糖所致的心肌纤维化程度^[9]。但目前 miR-1 参与心肌纤维化的具体机制尚不清楚,有研究显示,miRNA 可调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)表达,激活 AMPK 通路可抑制肝脏和肾脏的纤维化^[10-11]。本研究旨在 miR-1 沉默的基础上,进一步探讨 AMPK 抑制剂抑制 miR-1 表达从而减轻心肌纤维化的具体机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂: 1~3 日龄 SPF 级 SD 大鼠,雌雄不限,体重 8.2~8.8 g,由苏州大学实验动物中心提供,动物许可证号:SYXK(苏)2012-0045。胎牛血清(美国 ImmunoWay 公司),胰蛋白酶(上海碧云天生物技术有限公司),DMEM 培养基(上海立

菲生物技术有限公司);AMPK 抑制剂 Compound C(CC,美国 Selleck 公司);一抗胶原蛋白 I 和 III、一抗基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-9)、一抗波形蛋白(Vimentin)均为英国 Abcam 公司产品,一抗微管相关蛋白 1 轻链 3B- II(LC3B- II)、一抗 AMPK 和磷酸化 AMPK(p-AMPK)均为美国 Cell Signaling 公司产品,一抗死骨片重组蛋白 1(p62/SQSTM1,中国 Abnova 公司), β -肌动蛋白(β -actin,美国 Sigma 公司)。

1.2 体外培养心肌成纤维细胞: 无菌条件下迅速开胸取大鼠心脏,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,0.1% 胶原酶 II 消化直至大多组织块消失不见,收集上清至含有 10% 胎牛血清的培养基中,离心弃上清,加入培养基吹打制成细胞悬液,200 目滤网过滤,差速贴壁法去除心肌细胞,收集至无菌培养皿中培养,待细胞单层铺满皿底时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代至 3~4 代用于实验。成纤维细胞达 90% 以上,即为抗 Vimentin 多抗免疫组化染色阳性。

1.3 实验分组及处理: 将细胞分为正常糖空病毒组(CON+Lv-Vehicle 组)、正常糖 miR-1 沉默组(CON+Lv-miR1 组)、高糖空病毒组(HG+Lv-Vehicle 组)、高糖 miR-1 沉默组(HG+Lv-miR1 组)、高糖空病毒抑制剂组(HG+Lv-Vehicle+CC 组)、高糖 miR-1 沉默抑制剂组(HG+Lv-miR1+CC 组)。分别

用 5.5 mmol/L 和 25.0 mmol/L 的 DMEM 培养基培养细胞制备正常糖和高糖细胞模型;慢病毒载体加入空病毒组,病毒 miR-1 反义寡聚核苷酸 AMO-1 加入 miR-1 沉默组;抑制剂组于收取样本前 12 h 加入 20 μ mol/L 的 Compound C。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 慢病毒转染:取第 3 代成纤维细胞铺于 6 孔板,密度为 $(3 \sim 5) \times 10^7$ /L,慢病毒以感染指数(MOI 值)50 感染成纤维细胞,12 h 后更换新培养基,3 d 后观察慢病毒转染率,绿色荧光蛋白阳性细胞数占总细胞数 90% 为转染成功。miR-1 成熟区的翻译核酸序列由中国比昂生物公司构建,慢病毒滴度为 1×10^{12} TU/L。

1.4.2 免疫荧光法测定成纤维细胞纯度:第 3 代成纤维细胞铺于带玻片的 24 孔板,甲醛溶液固定细胞 10 min 后,用 0.1% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton)打孔,避光 15 min,1% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h,加入一抗 Vimentin (1:250),于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。用 PBS 洗涤 3 次后,加入相应二抗室温孵育 1 h,加入 Hoechst 33258 染色剂(1:5 000)孵育 20 min,洗涤后以荧光封片液封片,放入暗盒。正置显微镜下观察成纤维细胞,若绿色荧光蛋白(Vimentin)阳性细胞数占总细胞数 90%,表示成纤维细胞培养成功。

1.4.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定蛋白表达:取上清液,采用 BCA 法测定蛋白含量,取样 50 μ g,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转印法至硝酸纤维素膜(NC 膜)或聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)上,用 5% BSA 对膜上非特异性抗原封闭 1 h,分别加入一抗胶原蛋白 I (1:500)、一抗胶原蛋白 III (1:100)、一抗 MMP-2 (1:1 000)、一抗 MMP-9 (1:1 000)、一抗 LC3B-II (1:500)、一抗 p62/SQSTM1 (1:1 000)、抗 β -actin (1:5 000)、一抗 AMPK (1:1 000) 和一抗 p-AMPK (1:1 000),于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜;用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗涤 3 次,加入相应二抗后室温孵育 1 h。使用奥德赛显影仪显影,Image J 软件对图像进行采集分析,测定各条带灰度值。

1.5 统计学处理:使用 SPSS 20.0 软件分析数据,Graph Pad Prism 7 软件处理数据,所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成纤维细胞鉴定(图 1):抗 Vimentin 免疫荧光染色显示,心肌成纤维细胞数占总细胞数的 97%,结果为阳性,表明大鼠心肌成纤维细胞培养成功。

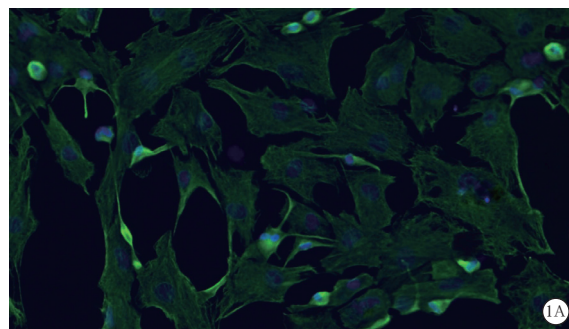
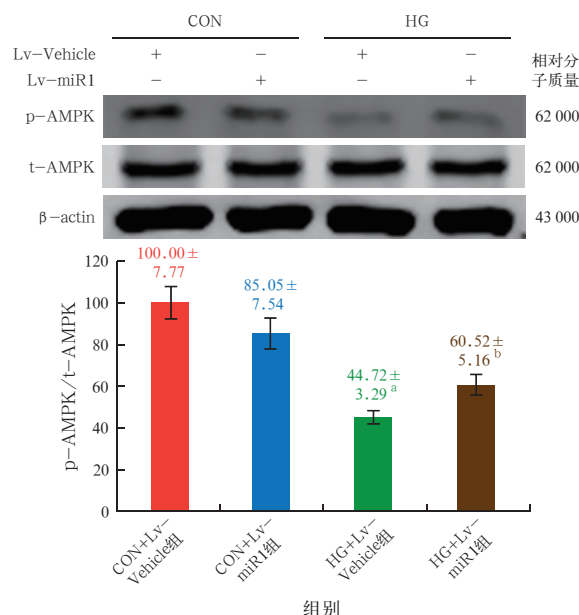


图 1 显微镜下观察大鼠心肌成纤维细胞体外培养纯度达 97% 免疫组化染色 低倍放大

2.2 成纤维细胞 p-AMPK 蛋白表达(图 2):与 CON+Lv-Vehicle 组比较,CON+Lv-miR1 组 p-AMPK 表达略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而 HG+Lv-Vehicle 组 p-AMPK 表达明显降低($P < 0.01$);HG+Lv-miR1 组 p-AMPK 表达较 HG+Lv-Vehicle 组明显升高($P < 0.05$)。

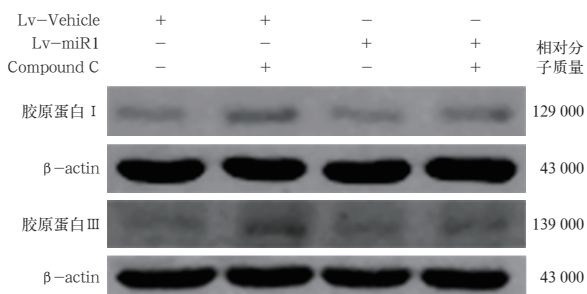


CON+Lv-Vehicle 组为正常糖空病毒组,CON+Lv-miR1 组为正常糖 miR-1 沉默组,HG+Lv-Vehicle 组为高糖空病毒组,HG+Lv-miR1 组为高糖 miR-1 沉默组;t-AMPK 为 AMPK 总量, β -actin 为 β -肌动蛋白;与 CON+Lv-Vehicle 组比较,^a $P < 0.01$;与 HG+Lv-Vehicle 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 高糖处理及微小 RNA-1(miR-1)沉默后体外培养大鼠心肌成纤维细胞磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)表达

2.3 miR-1 基因沉默和 AMPK 抑制剂对高糖成纤维细胞胶原蛋白表达的影响(图 3;表 1):与 HG+Lv-Vehicle 组比较,HG+Lv-miR1 组胶原蛋白 I 和 III 表达明显降低(均 $P < 0.05$)。HG+Lv-Vehicle+CC

组较 HG+Lv-Vehicle 组, 以及 HG+Lv-miR1+CC 组较 HG+Lv-miR1 组胶原蛋白 I 和 III 表达均明显升高 (均 $P<0.05$)。



Lv-Vehicle 为空病毒, Lv-miR1 为 miR-1 沉默, Compound C 为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 抑制剂, β -actin 为 β -肌动蛋白

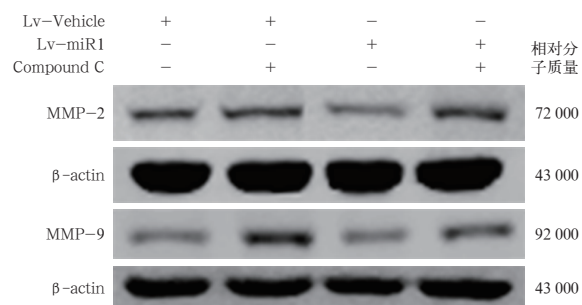
图 3 微小 RNA-1 (miR-1) 沉默及 AMPK 抑制剂处理后高糖体外培养大鼠心肌成纤维细胞胶原蛋白表达

表 1 微小 RNA-1 (miR-1) 沉默及 AMPK 抑制剂处理对高糖体外培养大鼠心肌成纤维细胞胶原蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	胶原蛋白 I / β -actin	胶原蛋白 III / β -actin
HG+Lv-Vehicle 组	3	100.00 $\pm$ 7.64	100.00 $\pm$ 5.18
HG+Lv-Vehicle+CC 组	3	158.74 $\pm$ 13.21 ^a	177.38 $\pm$ 17.31 ^a
HG+Lv-miR1 组	3	80.83 $\pm$ 7.24 ^b	81.56 $\pm$ 9.97 ^b
HG+Lv-miR1+CC 组	3	108.69 $\pm$ 9.93 ^c	127.68 $\pm$ 10.46 ^d

注: HG+Lv-Vehicle 组为高糖空病毒组, HG+Lv-Vehicle+CC 组为高糖空病毒抑制剂组, HG+Lv-miR1 组为高糖 miR-1 沉默组, HG+Lv-miR1+CC 组高糖 miR-1 沉默抑制剂组; AMPK 为腺苷酸活化蛋白激酶, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与 HG+Lv-Vehicle 组比较, ^a $P<0.01$, ^b $P<0.05$; 与 HG+Lv-miR1 组比较, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$

2.4 miR-1 基因沉默和 AMPK 抑制剂对高糖成纤维细胞 MMP 表达的影响 (图 4; 表 2): HG+Lv-miR1 组 MMP-2、MMP-9 表达均较 HG+Lv-Vehicle 组明显降低 (均 $P<0.05$)。HG+Lv-Vehicle+CC 组较 HG+Lv-Vehicle 组, 以及 HG+Lv-miR1+CC 组较 HG+Lv-miR1 组 MMP-2、MMP-9 表达均明显升高 (均 $P<0.05$)。



Lv-Vehicle 为空病毒, Lv-miR1 为 miR-1 沉默, Compound C 为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 抑制剂, β -actin 为 β -肌动蛋白

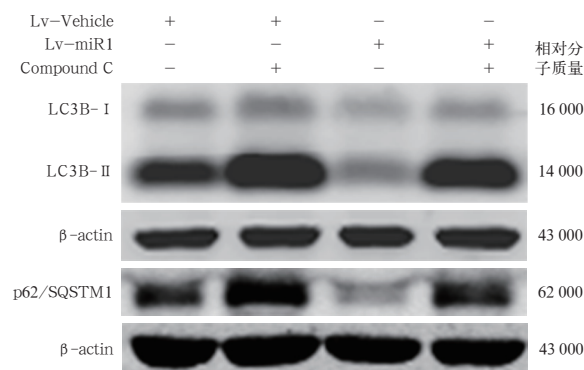
图 4 微小 RNA-1 (miR-1) 沉默及 Compound C 处理后高糖体外培养大鼠心肌成纤维细胞基质金属蛋白酶 (MMP) 表达

表 2 微小 RNA-1 (miR-1) 沉默及 AMPK 抑制剂处理对高糖体外培养大鼠心肌成纤维细胞基质金属蛋白酶 (MMP) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	MMP-2 / β -actin	MMP-9 / β -actin
HG+Lv-Vehicle 组	3	100.00 $\pm$ 10.47	100.00 $\pm$ 11.28
HG+Lv-Vehicle+CC 组	3	130.09 $\pm$ 14.31 ^a	215.54 $\pm$ 20.92 ^b
HG+Lv-miR1 组	3	74.80 $\pm$ 7.43 ^a	74.63 $\pm$ 10.55 ^a
HG+Lv-miR1+CC 组	3	106.66 $\pm$ 10.21 ^c	145.65 $\pm$ 11.56 ^d

注: HG+Lv-Vehicle 组为高糖空病毒组, HG+Lv-Vehicle+CC 组为高糖空病毒抑制剂组, HG+Lv-miR1 组为高糖 miR-1 沉默组, HG+Lv-miR1+CC 组高糖 miR-1 沉默抑制剂组; AMPK 为腺苷酸活化蛋白激酶, β -actin 为 β -肌动蛋白; 与 HG+Lv-Vehicle 组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与 HG+Lv-miR1 组比较, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$

2.5 miR-1 基因沉默和 AMPK 抑制剂对高糖成纤维细胞自噬流相关蛋白表达的影响 (图 5; 表 3): HG+Lv-miR1 组成纤维细胞 LC3B- II、p62/SQSTM1 表达均较 HG+Lv-Vehicle 组明显降低 (均 $P<0.01$)。HG+Lv-Vehicle+CC 组较 HG+Lv-Vehicle 组, 以及 HG+Lv-miR1+CC 组较 HG+Lv-miR1 组 LC3B- II、p62/SQSTM1 表达均明显升高 (均 $P<0.01$)。



Lv-Vehicle 为空病毒, Lv-miR1 为 miR-1 沉默, Compound C 为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 抑制剂, LC3B 为微管相关蛋白 1 轻链 3B, β -actin 为 β -肌动蛋白, p62/SQSTM1 为死骨片重组蛋白

图 5 微小 RNA-1 (miR-1) 沉默及 AMPK 抑制剂处理后高糖体外培养大鼠心肌成纤维细胞自噬流相关蛋白表达

表 3 微小 RNA-1 (miR-1) 沉默以及 AMPK 抑制剂处理对自噬流相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	LC3B- II / β -actin	P62/SQSTM1 / β -actin
HG+Lv-Vehicle 组	3	100.00 $\pm$ 6.44	100.00 $\pm$ 8.62
HG+Lv-Vehicle+CC 组	3	159.34 $\pm$ 13.83 ^a	201.01 $\pm$ 24.02 ^a
HG+Lv-miR1 组	3	22.98 $\pm$ 2.87 ^a	49.90 $\pm$ 2.27 ^a
HG+Lv-miR1+CC 组	3	150.15 $\pm$ 13.28 ^b	130.48 $\pm$ 10.74 ^b

注: HG+Lv-Vehicle 组为高糖空病毒组, HG+Lv-Vehicle+CC 组为高糖空病毒抑制剂组, HG+Lv-miR1 组为高糖 miR-1 沉默组, HG+Lv-miR1+CC 组高糖 miR-1 沉默抑制剂组; AMPK 为腺苷酸活化蛋白激酶, β -actin 为 β -肌动蛋白, LC3B-II 为微管相关蛋白 1 轻链 3B-II, p62/SQSTM1 为死骨片重组蛋白; 与 HG+Lv-Vehicle 组比较, ^a $P<0.01$; 与 HG+Lv-miR1 组比较, ^b $P<0.01$

3 讨论

考虑到 25.0 mmol/L 的葡萄糖浓度会使细胞渗透压升高,本课题组前期实验已通过设立甘露醇对照组证实,在制备高糖损伤模型时,可以排除细胞渗透压对实验结果的影响^[9]。

糖尿病心肌病的显著特征包括心肌纤维化和心肌肥大。其中,心肌纤维化是心脏成纤维细胞异常表达使细胞外基质胶原纤维过量生成并聚集,从而导致包括心肌僵硬、心脏舒张/收缩功能障碍、心律失常等的的心脏功能异常^[12-13]。miRNA 参与了心脏功能障碍的诸多病理生理进程,如参与调节细胞生长、分化和凋亡。有研究显示,miR-24 可以在心肌梗死后减少梗死边缘区的心肌纤维化^[14];miR-150 可以改善心肌梗死后的心肌纤维化^[15];miR-133a 过表达可以通过抑制细胞外蛋白调节激酶 1/2 (ERK1/2) 和 Smad2 的磷酸化来减轻糖尿病所致的心肌纤维化^[7];miR-155 可以通过转化生长因子- β (TGF- β)-Smad2 信号通路调节高糖所致的心肌纤维化^[16];miR-206 表达在心肌梗死时明显升高,而 miR-1 在心肌肥大时显著升高,并且 miR-1 对急性心肌梗死的早期预测价值优于肌酸激酶同工酶 (CK-MB)^[17-18];糖尿病发生时 miR-1 表达增高,同时它还参与了糖尿病心肌病心肌细胞的凋亡,但其与糖尿病心肌病心肌纤维化的关系并不明确;miR-135b-5p 可通过激活 AMPK 来抑制脂多糖 (LPS) 诱导的炎症反应^[19];miR-19a 在 D-氨基半乳糖/LPS 诱导的肝细胞中可负调节 AMPK 的表达^[20]。前期实验结果已证实,miR-1 沉默可减轻高糖培养的心肌纤维化程度,但具体机制还未明确,猜测可能是通过 AMPK 信号通路发挥作用的^[9]。

AMPK 作为真核细胞能量状态的传感器,通过磷酸化影响细胞进程,它主要依赖哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 途径进行调控^[21]。AMPK 活性增强时, mTOR 活性降低,促进自噬形成, LC3B-II 生成增多;AMPK 活性受到抑制时, mTOR 活性增强,自噬生成受到抑制, LC3B-II 生成减少^[22-23]。已有研究表明,自噬与糖尿病、神经变性疾病以及免疫性疾病有关^[24];而自噬流是一项动态反映整个自噬过程的指标, LC3B-II 作为反映自噬体数量的标志性蛋白^[25], p62 作为可与 LC3B-II 结合后转移溶酶体降解的自噬特异性降解底物,它们的表达均可以反映自噬流的程度,当 LC3B-II、p62/SQSTM1

同时增加时,说明自噬小体清除障碍,自噬流受到抑制^[26-27]。已有研究表明,通过激活 AMPK 信号通路可以有效抑制肾脏和肝脏的纤维化,并且 AMPK/miR-30a 减轻肝脏纤维化的作用是通过调节自噬来实现的^[28-29]。

本研究显示, HG+Lv-miR1 组较 HG+Lv-Vehicle 组 AMPK 磷酸化程度增加; miR-1 基因沉默后,心肌纤维化程度减轻;而 HG+Lv-Vehicle+CC 组较 HG+Lv-Vehicle 组,以及 HG+Lv-miR1+CC 组较 HG+Lv-miR1 组胶原蛋白 I、胶原蛋白 III、MMP-2 和 MMP-9 表达均明显增高。表明给予 AMPK 抑制剂 Compound C 后,心肌纤维化程度增加, AMPK 抑制剂逆转了 miR-1 基因沉默使心肌纤维化程度减轻的作用。给予 AMPK 抑制剂处理后, LC3B-II、p62/SQSTM1 表达明显升高,说明此刻自噬流是不通畅的。总体来说,本研究从沉默 miR-1 使心肌纤维化减轻的作用可被 AMPK 抑制剂所逆转的角度,验证了沉默 miR-1 可能是通过 AMPK 通路影响自噬流来发挥心肌保护作用的。

综上,沉默 miR-1 可激活 AMPK 通路,促进自噬流通畅,从而减轻高糖所致心肌纤维化的程度,但 miRNA、AMPK 通路和自噬流三者与心肌纤维化之间的联系尚未明确。本实验只在细胞上进行了高糖模拟,并未在体内进行操作,是否在体结果与体外实验一致,还有待进一步实验证实。

参考文献

- [1] 符显昭, 黄月凤, 王清礼, 等. 降糖舒心方对糖尿病合并慢性心力衰竭的影响: 一项前瞻性随机对照研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2017, 24 (2): 123-128. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.02.004.
- [2] Fu XZ, Huang YF, Wang QL, et al. Effect of Jiangtang Shuxin decoction on diabetic patients with chronic heart failure: a prospective randomized controlled study [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2017, 24 (2): 123-128. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.02.004.
- [3] Liu X, Liu S. Role of microRNAs in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy [J]. Biomed Rep, 2017, 6 (2): 140-145. DOI: 10.3892/br.2017.841.
- [4] 赵辉, 张其同, 刘彤. 糖尿病心房重构的研究进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (3): 334-336. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.03.028.
- [5] Zhao H, Zhang QT, Liu T. Advances in the study of atrial remodeling in diabetes [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (3): 334-336. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.03.028.
- [6] Mishra PK, Tyagi N, Kumar M, et al. MicroRNAs as a therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13 (4): 778-789. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00744.x.
- [7] 谢丽莉. MicroRNA 在糖尿病并发症中的研究进展 [J]. 实用检验医师杂志, 2015, 7 (1): 44-46. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.013.
- [8] Xie LL. The advances in the study of microRNA in diabetes complications [J]. Chin J Chin Pathol, 2015, 7 (1): 44-46. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.013.
- [9] Chavali V, Tyagi SC, Mishra PK. MicroRNA-133a regulates DNA methylation in diabetic cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res

- Commun, 2012, 425 (3): 668–672. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.105.
- [7] Chen S, Puthanveetil P, Feng B, et al. Cardiac miR-133a overexpression prevents early cardiac fibrosis in diabetes [J]. J Cell Mol Med, 2014, 18 (3): 415–421. DOI: 10.1111/jcmm.12218.
- [8] Feldman A, Moreira DAR, Gun C, et al. Analysis of Circulating miR-1, miR-23a, and miR-26a in Atrial Fibrillation Patients Undergoing Coronary Bypass Artery Grafting Surgery [J]. Ann Hum Genet, 2017, 81 (3): 99–105. DOI: 10.1111/ahg.12188.
- [9] 王安, 孙波, 仇佳, 等. 微小 RNA-1 在高糖培养下心肌成纤维细胞致纤维化中的调控作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (12): 1113–1117. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.12.010.
- Wang A, Sun B, Qiu J, et al. Role of microRNA-1 on fibrosis induced by high glucose cultured cardiac fibroblasts [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (12): 1113–1117. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.12.010.
- [10] Ruan CC, Li Y, Ma Y, et al. Yia 03-02 adiponectin-mediated epithelial autophagy attenuates hypertensive renal fibrosis [J]. J Hypertens, 2016, 34 Suppl 1: e204. DOI: 10.1097/01.hjh.0000500441.69095.01.
- [11] Lee HS, Shin HS, Choi J, et al. AMP-activated protein kinase activator, HL156A reduces thioacetamide-induced liver fibrosis in mice and inhibits the activation of cultured hepatic stellate cells and macrophages [J]. Int J Oncol, 2016, 49 (4): 1407–1414. DOI: 10.3892/ijo.2016.3627.
- [12] 杜志鹏, 张楠, 张冬颖. MiRNAs 与心肌纤维化的研究进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3 (18): 3725–3726.
- Du ZP, Zhang N, Zhang DY. Research progress of MiRNAs and myocardial fibrosis [J]. J Clin Med Literature (Electronic Edition), 2016, 3 (18): 3725–3726.
- [13] 蔡辉, 常文静, 赵凌杰, 等. 丹参酮 II A 通过 RhoA/ROCK 信号通路对压力负荷增加大鼠心肌纤维化的影响 [J]. 实用医学杂志, 2014, 30 (3): 367–370. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2014.03.010.
- Cai H, Chang WJ, Zhao LJ, et al. Effects of Tanshinone II A on myocardial fibrosis in rats with increased pressure through RhoA/ROCK signaling pathway [J]. J Pract Med, 2014, 30 (3): 367–370. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2014.03.010.
- [14] 赵明明, 王海蓉. microRNAs 与组织纤维化关系的研究进展 [J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31 (11): 1238–1241. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1439.2015.11.025.
- Zhao MM, Wang HR. Progress of microRNAs and tissue fibrosis [J]. J Clin Cardiol, 2015, 31 (11): 1238–1241. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1439.2015.11.025.
- [15] 周小翠, 汪涛, 李恩. miR-150 通过靶基因 c-Myb 改善心肌梗死后心肌纤维化 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33 (7): 1078–1082. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.07.016.
- Zhou XC, Wang T, Li E. miR-150 improves cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting c-Myb [J]. J Pract Med, 2017, 33 (7): 1078–1082. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.07.016.
- [16] Zhang D, Cui Y, Li B, et al. miR-155 regulates high glucose-induced cardiac fibrosis via the TGF- β signaling pathway [J]. Mol Biosyst, 2016, 13 (1): 215–224. DOI: 10.1039/c6mb00649c.
- [17] 刘洁婷, 李洪志, 吴丹, 等. 糖尿病心脏病与 miR-1/miR-206 和胰岛素样生长因子表达的关系 [J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33 (4): 389–391.
- Liu JT, Li HZ, Wu D, et al. The relationship between miR-1/miR-206, IGF-1 and diabetic cardiomyopathy [J]. Chin J Biological Pharms, 2012, 33 (4): 389–391.
- [18] 苏彤, 张晓璞, 韩志君, 等. 循环微小 RNA-1 对胸痛患者发生急性心肌梗死的早期诊断价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (7): 607–611. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.07.007.
- Su T, Zhang XP, Han ZJ, et al. Early diagnostic value of circulating microRNA-1 on acute myocardial infarction in patients with chest pain [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (7): 607–611. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.07.007.
- [19] Li P, Fan JB, Gao Y, et al. miR-135b-5p inhibits LPS-induced TNF α production via silencing AMPK phosphatase Ppm1e [J]. Oncotarget, 2016, 7 (47): 77978–77986. DOI: 10.18632/oncotarget.12866.
- [20] Liu YM, Ma JH, Zeng QL, et al. MiR-19a Affects Hepatocyte Autophagy via Regulating lncRNA NBR2 and AMPK/PPAR α in D-GalN/Lipopolysaccharide-Stimulated Hepatocytes [J]. J Cell Biochem, 2018, 119 (1): 358–365. DOI: 10.1002/jcb.26188.
- [21] Kogut MH, Genovese KJ, He H, et al. AMPK and mTOR: sensors and regulators of immunometabolic changes during Salmonella infection in the chicken [J]. Poult Sci, 2016, 95 (2): 345–353. DOI: 10.3382/ps/pev349.
- [22] Cetrullo S, D'Adamo S, Tantini B, et al. mTOR, AMPK, and Sirt1: Key Players in Metabolic Stress Management [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2015, 25 (1): 59–75. DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2015012975.
- [23] Fritzen AM, Frøsig C, Jeppesen J, et al. Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle [J]. Cell Signal, 2016, 28 (6): 663–674. DOI: 10.1016/j.cellsig.2016.03.005.
- [24] 王绕绕, 宋红丽. 自噬在器官移植免疫耐受研究中的进展 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4 (1): 57–60. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.013.
- Wang RR, Song HL. Progress of autophagy in the study of immune tolerance in organ transplantation [J/CD]. Prac J Organ Transplant (Electronic Version), 2016, 4 (1): 57–60. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.013.
- [25] 王盛标, 殷爽, 李云峰, 等. 细胞自噬对脂多糖介导血管通透性增加的作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (8): 673–677. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.08.001.
- Wang SB, Yin S, Li YF, et al. Effects of autophagy on lipopolysaccharide-induced vascular hyper-permeability [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (8): 673–677. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.08.001.
- [26] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. Autophagy, 2012, 8 (4): 445–544. DOI: 10.4161/auto.19496.
- [27] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (33): 24131–24145. DOI: 10.1074/jbc.M702824200.
- [28] Chen M, Liu J, Yang L, et al. AMP-activated protein kinase regulates lipid metabolism and the fibrotic phenotype of hepatic stellate cells through inhibition of autophagy [J]. FEBS Open Bio, 2017, 7 (6): 811–820. DOI: 10.1002/2211-5463.12221.
- [29] Chen J, Yu Y, Li S, et al. MicroRNA-30a ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting Beclin1-mediated autophagy [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21 (12): 3679–3692. DOI: 10.1111/jcmm.13278.

(收稿日期: 2017-11-22)

• 科研新闻速递 •

严重钩端螺旋体病患者的病死率：一项回顾性研究

钩端螺旋体病可引起多器官功能衰竭, 严重者可导致死亡。最近有学者进行了一项回顾性研究, 旨在了解重症加强治疗病房 (ICU) 中钩端螺旋体病患者的病死率。研究对象为 2004 年 1 月至 2015 年 1 月收住于留尼汪岛 (印度洋) 一家教学医院 ICU 的钩端螺旋体病患者。结果显示: 共收治了 134 例钩端螺旋体病患者, 中位年龄为 40 (30, 52) 岁, 中位简易急性生理学评分 II 为 38 (27, 50) 分, 中位序贯器官衰竭评分为 10 (8, 12) 分。有 41 例患者 (31%) 需要机械通气, 有 76 例患者 (56%) 需要肾脏替代治疗, 有 5 例患者需要体外膜肺氧合治疗。总体病死率为 6.0% (95% 可信区间为 2.6% ~ 11.4%)。与其他脓毒症患者相比, 钩端螺旋体病患者的标准化死亡比相当低, 为 0.40 (95% 可信区间为 0.17 ~ 0.79)。研究人员据此得出结论: 严重钩端螺旋体病患者的病死率远低于其他细菌感染患者。

罗红敏, 编译自《Critical Care Medicine》, 2018, 46 (1): 93–99