

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.11.001

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240508.1009.002\(2024-05-08\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240508.1009.002(2024-05-08))内皮祖细胞微粒 miR-126 调控线粒体改善心肌
细胞 OGD/R 损伤的机制研究*马艺萍¹, 阿卜拉江·艾合麦提¹, 帕丽达·玉山江¹, 刘 柯²,卡迪尔亚·依布拉克¹, 麦迪乃姆·阿卜力孜¹, 穆叶赛·尼加提^{2△}

(1. 新疆医科大学研究生院, 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆维吾尔自治区

人民医院急救中心, 乌鲁木齐 830001)

[摘要] **目的** 研究微小 RNA-126(miR-126)-内皮祖细胞(EPC)-微粒(MPs)改善心肌细胞氧糖剥夺/复氧(OGD/R)损伤的分子机制。**方法** 采用心肌细胞建立对照(control)和 OGD/R 损伤模型,并分别给予 EPC-MPs 和 miR-126 mimic EPC-MPs 处理。通过透射电子显微镜评估心肌细胞细胞器的结构变化。采用 ELISA 检测心肌细胞中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的表达水平。采用 Western blot 和实时荧光定量 PCR(qPCR)检测不同处理后心肌细胞中血管紧张素 II(Ang II)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-6(caspase-6)、一氧化氮合酶(eNOS)、叉头框蛋白 O1(FOXO1)、髓过氧化物酶(MPO)、核因子- κ B(NF- κ B)、细胞外信号调节激酶 1(ERK1)、肝激酶 B1(LKB1)、沉默信息调节因子 2 相关酶 1(SIRT1)、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、130 $\times 10^3$ 高尔基体基质蛋白(GM130)和过氧化物酶体增生物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)的蛋白和 mRNA 表达水平。**结果** OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组部分心肌细胞线粒体结构完整,部分线粒体大小增大,内质网表面核糖体较少,高尔基体部分囊泡聚集。与 OGD/R+EPC-MPs 组比较,OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组 IL-6、TNF- α 和 HMGB-1 的表达水平下调。与 OGD/R+EPC-MPs 组比较,OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组 Ang II、caspase-6、p-ERK1/2 和 GRP78 的蛋白表达水平下调,p-LKB1、GM130 和 PGC-1 α 的蛋白表达水平上调。qPCR 结果显示,与 OGD/R+EPC-MPs 组比较,OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组 Ang II、MPO 和 GRP78 的 mRNA 表达水平下调,eNOS、GM130 和 PGC-1 α 的 mRNA 表达水平上调。**结论** 当心肌细胞发生 OGD/R 损伤时,miR-126 mimic EPC-MPs 调节 PGC-1 α /GM130 表达,抑制 Ang II 诱导的应激损伤反应,减少心肌细胞的 OGD/R 损伤。

[关键词] 内皮祖细胞;微粒;miR-126;线粒体;急性心肌梗死;心肌细胞;缺血再灌注损伤

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2024)11-1601-09

Study on mechanism of endothelial progenitor cell particle miR-126 in regulating
mitochondria to improve OGD/R damage in cardiomyocytes*MA Yiping¹, Abulajiang Aihemaiti¹, Palida Yushanjiang¹, LIU Ke²,Kadierya Yibulayin¹, Maidinaimu Abulizi¹, Muyesai Nijiat^{2△}

(1. Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830017, China;

2. Emergency Center of Xinjiang Uygur Autonomous Region People's

Hospital, Urumqi, Xinjiang 830001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular mechanism of miR-126-EPC-MPs in ameliorating oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) injury in cardiomyocytes. **Methods** The cardiomyocytes were used to establish the control and OGD/R injury models, and EPC-MPs and miR-126 mimic EPC-MPs treatments were administered respectively. The structural changes in cardiomyocyte organelles were assessed by transmission electron microscopy. ELISA was used to detect the expression levels of IL-6, TNF- α and HMGB-1 in cardiomyocytes. The protein and mRNA expression levels of Ang II, caspase-6, eNOS, FOXO1, MPO, NF- κ B, ERK1, LKB1, SIRT1, GRP78, GM130 and PGC-1 α in cardiomyocytes after different treatments were detected by Western blot and quantitative PCR. **Results** The mitochondria structure in some cardiomyo-

* 基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(82060076,82360068);新疆维吾尔自治区研究生创新项目(XJ2023G202)。△ 通信作者,

E-mail: muyassar11@aliyun.com。

cytes of the OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs group was complete,the size of some mitochondria was increased,the surface of the endoplasmic reticulum had fewer ribosomes ,and some of the Golgi vesicles gathered.Compared with the OGD/R+EPC-MPs group,the expression levels of IL-6,TNF- α and HMGB-1 in the OGD/R+ miR-126 mimic EPC-MPs group were down-regulated. Compared with the OGD/R + EPC-MPs group,the expression levels of Ang II ,caspase-6,p-ERK1/2 and GRP78 protein in the OGD/R+ miR-126 mimic EPC-MPs group were down-regulated,and the expression levels of p-LKB1,GM130 and PGC-1 α protein in the OGD/R+ miR-126 mimic EPC-MPs group were up-regulated. The quantitative PCR (qPCR) results showed that compared with the OGD/R+EPC-MPs group,the expression levels of Ang II ,MPO and GRP78 in the OGD/R+ miR-126 mimic EPC-MPs group were down-regulated,and the expression levels of eNOS, GM130 and PGC-1 α were up-regulated. **Conclusion** When OGD/R injury occurs in cardiomyocytes,miR-126 mimic EPC-MPs regulates PGC-1 α /GM130 expression and inhibits Ang II-induced stress injury response, thereby reduces the OGD/R damage in cardiomyocytes.

[Key words] endothelial progenitor cells; microparticles; miR-126; mitochondria; acute myocardial infarction;cardiomyocytes;ischemia-reperfusion injury

心血管疾病 (cardiovascular disease,CVD) 的发病率和致死率较高,是全球性的健康问题^[1]。虽然再灌注治疗开创了急性心肌梗死 (acute myocardial infarction,AMI) 治疗的新方向,但再灌注治疗引起的心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury,MIRI) 增加了心肌梗死的面积^[2-3]。微粒 (microparticles,MPs) 是由各种类型的活化和凋亡细胞产生的直径为 100~1 000 nm 的小膜囊泡^[4]。内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell,EPC) 是具有分化为内皮细胞 (endothelial cells,ECs) 潜力的多功能干细胞^[5]。为应对组织缺血或损伤,EPC 从骨髓动员到外周血,并显示出促进组织和器官再生及恢复缺血相关器官功能的前景^[6]。ALEXANDRU 等^[7]发现,EPC 衍生的 MPs 可以将微小 RNA (microRNA,miR) 转移到 EPC 和 ECs 上,修复 CVD 中的组织损伤。此外,既往研究显示 miR-126 调节 ECs 的生物学功能,可能为 AMI 的治疗提供新的可能性^[8]。线粒体功能障碍是 AMI 后心肌损伤的主要原因^[9],维持线粒体钙离子 (Ca²⁺) 稳态可以改善败血症心肌病的心肌功能^[10-11]。当高尔基体受到刺激进行氧化应激时,130 $\times$ 10³ 高尔基体基质蛋白 (130 kDa cis Golgi matrix protein,GM130) 表达迅速降低,高尔基体的带状结构崩解,导致细胞凋亡^[12-13]。因此,研究心肌细胞氧糖剥夺/复氧 (oxygen glucose deprivation/reoxygenation,OGD/R) 损伤后心肌细胞中细胞器的变化和相关蛋白的表达可能更好地揭示 MIRI 的发病机制。基于此,作者认为 miR-126-EPC-MPs 可能通过调节应激损伤反应,并采用 miR-126-EPC-MPs 与心肌细胞共培养,观察细胞器结构变化。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

EPC 购于武汉普诺赛生命科技有限公司,异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate,FITC)-CD34

(eBioscience,11-0349-42) 购于美国 eBioscience 公司,内皮细胞生长培养基 (Promocell,C22121)、胎牛血清 (Wisent,086-150) 及青链霉素 (Wisent,450-201-EL) 均购于北京毕特博生物技术有限责任公司,心肌细胞购于广州吉妮欧生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 EPC 的培养

将细胞浓度调节至 1.25 $\times$ 10⁷ 个/mL,并将 4 mL 细胞接种在预涂有纤连蛋白 (Biorbyt,orb81121) 的 6 孔板中。将细胞在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。当细胞达到 80%~90% 汇合度时,除去培养基,加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline,PBS) 并洗涤细胞 1~2 次。除去 PBS 后,加入 1 mL 胰蛋白酶并孵育 1~3 min,将消化的细胞转移到 15 mL 离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min。

1.2.2 EPC 的特性及鉴定

CD34 早期在骨髓来源的 EPC 中表达,是其特征分子标志物^[14]。将 1% 牛血清白蛋白的 PBS 添加到重悬细胞中,并添加 CD34。将抗体按 1:50 的比例稀释,加入同型对照抗体至空白对照细胞中,冰上孵育 30 min。将细胞与 400 μ L PBS 混合,以 1 000 r/min 离心。取出上清液,用 PBS 洗涤 3 次。将细胞重悬于 500 μ L PBS 中,采用流式细胞术检测。显微镜下观察细胞形态,梭形细胞鉴定为 EPC。

1.2.3 EPC 荧光染色

EPC 用含 10% 胎牛血清的内皮细胞生长培养基培养,将贴壁的细胞与乙酰化低密度脂蛋白 (Invitrogen,L3484) 染料在 37℃ 孵育 4 h,然后用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。采用 FITC-BS1-凝集素 (Sigma,L9381) 在 25℃ 孵育细胞 1 h,然后加入 100 ng/mL 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI,Sigma,D9542) 溶液,在 25℃ 避光孵育 10 min,最后用 PBS 洗涤,去除染料。加入抗荧光淬灭液,4℃ 避光放置,用激光共

聚焦荧光显微镜(Zeiss,LSM710)拍照。

1.2.4 miR-126 处理 EPC

通过 miRbase 数据库获得成熟 has-miR-126 (miR 登录:MI0000471)和前体 has-miR-126 的序列分别为:CAU UAU UAC UUU UGG UAC GCG, CGC UGG CGA CGG GAC AUU AUA UUA CUU UGG UAC GCG CUG UGA CAC UUC AAA CUC GUA CCG UAC CGU GAG UAA UAA UGC GCC GUC CAC GGC A。根据 DNA 重组要求,设计引物构建 miR-126 过表达的重组慢性病毒载体。EPC 用 miR-126 mimic 转染,以 MOI=1:100 加入培养基,将培养基充分混合,并将细胞在培养箱中孵育 6 h。最后,测定 miR-126 在 EPC 中的表达。根据治疗情况将 EPC 分为两个实验组:EPC 组和 miR-126 mimic EPC 组。

1.2.5 EPC-MPs 提取

收集细胞培养物,在 4℃、300×g 离心 15 min。将上清液转移到新的 15 mL 离心管中。4℃、2 000×g 离心 20 min 后,将上清液置于 20 mL 高速离心管中。4℃、20 000×g 高速离心 70 min 后,轻轻倒出上清液,去除残留上清液,加入 100 μL PBS 重悬沉淀。将重悬液转移到 1.5 mL EP 管中,得到的重悬液为 MPs。将 CD34 抗体及其同型对照抗体按 1:100 的比例加入混合细胞中,用流式细胞术检测。将 MPs 分为两个实验组:EPC-MPs 组和 miR-126 mimic EPC-MPs 组。

1.2.6 人心肌细胞培养

AC16 细胞系(Jennio-bio)是一种人心肌细胞系,置于 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素培养基,37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。将细胞(1×10⁶)接种在 6 孔板中。心肌细胞分为对照组(control 组)和 OGD/R 组。葡萄糖脱氧条件为 1% O₂、5% CO₂、94% N₂,复氧条件为 21% O₂、5% CO₂、74% N₂。细胞培养 6 h 后,用正常 DMEM 代替培养基,加入 EPC-MPs 和 miR-126 mimic EPC-MPs,再孵育 6 h。此时,根据不同心肌细胞加入的不同 MPs,分为 control+EPC-MPs 组、control+miR-126 mimic EPC-MPs 组、OGD/R+EPC-MPs 组和 OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组。通过流式细胞术分析心肌细胞凋亡,噻唑蓝检测评估细胞存活率。

1.2.7 透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)检测

将培养的细胞用胰蛋白酶消化,以 2 000 r/min 离心 5 min。收集的细胞加入戊二醛稀释后固定备用。然后,将 5~10 μL 细胞悬液加入 Formvar-Carbon 负载铜网中。将铜网置于 50 μL 1%戊二醛液滴上 5 min。经过一系列超纯水洗涤后,将铜网置于 50

μL 二氧草酸铀液滴(pH 7.0)上 5 min。将铜网置于 50 μL 甲基纤维素液滴上 10 min,并在冰上操作。在空气中干燥 5~10 min 后,将铜网置于标本盒中,用 TEM 观察细胞器。

1.2.8 ELISA 检测

经反复冻融两次破坏细胞膜后,将组织匀浆以 5 000 r/min 离心 5 min,测定蛋白浓度。将 10 μL 抗体加入 990 μL 抗体稀释液中,轻轻混合。取出涂有的 96 孔板,加入标准品和标本,并贴上密封膜。在酶标仪上以 450 nm 的波长测量吸光度。ELISA 法检测心肌细胞中白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)和高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)的蛋白表达水平。

1.2.9 Western blot 检测

收集培养的细胞,加入 200 μL 放射免疫沉淀法裂解液,冰上裂解 30 min。在裂解后,将裂解产物转移到预冷的 1.5 mL 离心管(冰上)中,并在 4℃下以 12 000 r/min 离心 10 min。将离心后的上清液转移至 1.5 mL 离心管中,-20℃保存。二喹啉甲酸法检测总蛋白浓度;用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。浓缩胶黏剂层的电压为 80 V,电泳时间为 30 min。标本进入分离胶黏剂后,在 120 V 下电泳 90 min,然后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。在脱脂乳中封闭后,将膜与一抗在 4℃孵育过夜。根据一抗,将膜与二抗在 25℃孵育 2 h。使用化学发光成像分析仪(Tanon,5200)进行扫描成像。

1.2.10 实时荧光定量 PCR(qPCR)

采用 ΔCt 法计算不同处理后心肌细胞中血管紧张素 II(angiotensin,Ang II)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-6(caspase-6)、一氧化氮合酶(eNOS)、叉头框蛋白 O1(forkhead box O1,FOXO1)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)、核因子-κB(nuclear factor kappa-B,NF-κB)、细胞外信号调节激酶 1(extracellular signal-regulated kinase,ERK1)、肝激酶 B1(liver kinase B1,LKB1)、沉默信息调节因子 2 相关酶 1(silent information regulator factor 2-related enzyme 1,SIRT1)、葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein78,GRP78)、GM130 和过氧化物酶体增生物激活受体 γ 共激活因子-1α(peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α,PGC-1α)的表达水平,见表 1。

表 1 qPCR 检测引物

项目	方向	引物序列(5'-3')
GAPDH	正向	GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT
	反向	GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG
Ang II	正向	CCC CAG TCT GAG ATG GCT C

续表 1 qPCR 检测引物		
项目	方向	引物序列(5'-3')
caspase-6	反向	GAC GAG GTG GAA GGG GTG TA
	正向	ATG GCG AAG GCA ATC ACA TTT
eNOS	反向	GTG CTG GTT TCC CCG ACA T
	正向	TGA TGG CGA AGC GAG TGA AG
FOXO1	反向	ACT CAT CCA TAC AGG ACC C
	正向	TCG TCA TAA TCT GTC CCT ACA CA
MPO	反向	CGG CTT CGG CTC TTA GCA AA
	正向	TGC TGC CCT TTG ACA ACC TG
NF-κB	反向	TGC TCC CGA AGT AAG AGG GT
	正向	AAC AGA GAG GAT TTC GTT TCC G
ERK1	反向	TTT GAC CTG AGG GTA AGA CTT CT
	正向	CTA CAC GCA GTT GCA GTA CAT
LKB1	反向	CAG CAG GAT CTG GAT CTC CC
	正向	TGT CGG TGG GTG GAT GGA CAC
SIRT1	反向	CCT TGC CGT AAG AGC CTT CC
	正向	TAG CCT TGT CAG ATA AGG AAG GA
GRP78	反向	ACA GCT TCA CAG TCA ACT TTG T
	正向	CAT CAC GCC GTC CTA TGT CG
GM130	反向	CGT CAA AGA CCG TGT TCT CG
	正向	CCC GCG ATG TCG GAA GAA A
PGC-1α	反向	GCA TTG TCC TTG GGT GTA TCC T
	正向	TCT GAG TCT GTA TGG AGT GAC AT
	反向	CCA AGT CGT TCA CAT CTA GTT CA
	正向	

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 统计学软件进行数据处理。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,单因素方差分析(ANOVA)进行多组间比较。计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

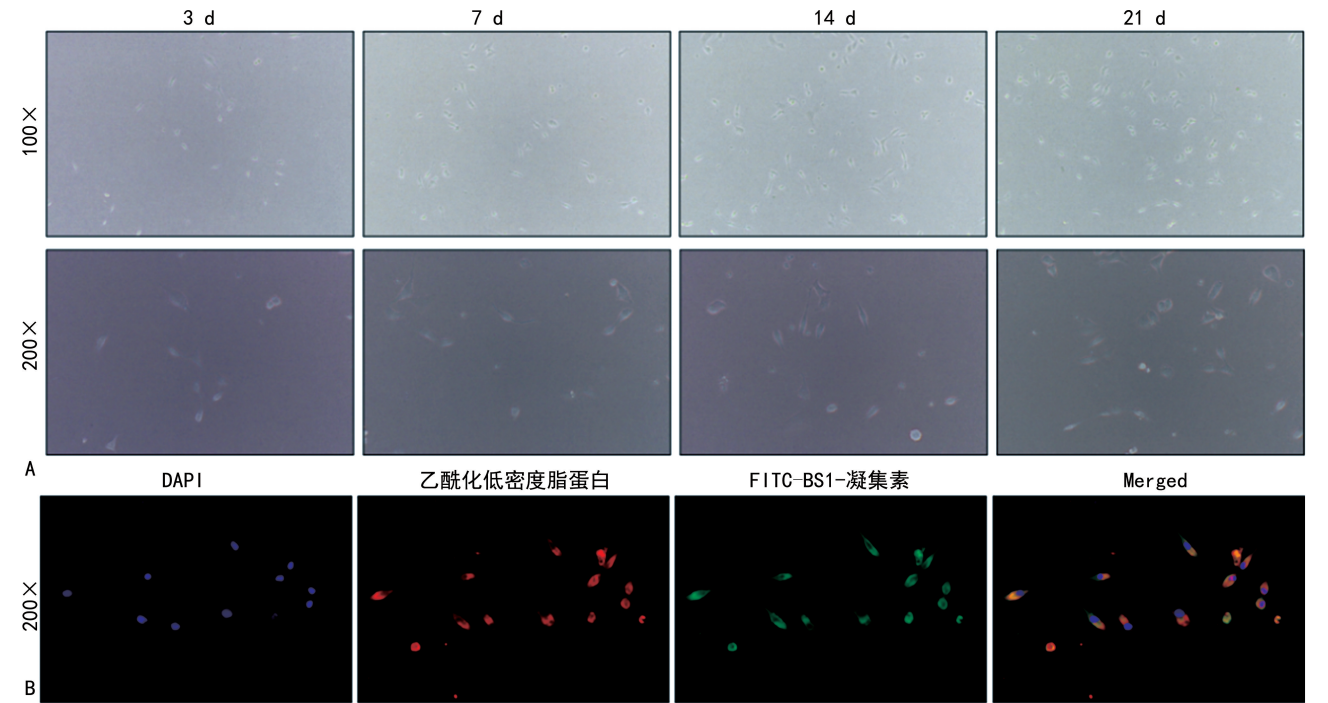
2 结 果

2.1 EPC 鉴定及 EPC-MPs 提取

通过显微镜观察 EPC 的典型形态,验证 EPC 培养成功。EPC 培养 3、7、14、21 d,随着培养时间的延长,细胞数量逐渐增加(图 1A),EPC 的乙酰化低密度脂蛋白和 FITC-BS1-凝集素双阳性(图 1B)。流式细胞术检测分离细胞中的 $CD34^+$ 细胞群($CD34$ 为 EPC 的特征分子标记),见图 2。将 EPC 离心,获得 MPs,称为 EPC-MPs。建立 miR-126 过表达 EPC 模型。结果显示,miR-126 mimic EPC 中 miR-126 的含量(41.89 ± 8.86)较 EPC(0.94 ± 0.05)明显增加($t = 8.007, P < 0.001$)。进一步离心获得 miR-126 mimic EPC-MPs。通过流式细胞术鉴定 EPC-MPs(图 3)。

2.2 心肌细胞 OGD/R 损伤模型心肌细胞凋亡和增殖情况

与 control + EPC-MPs 组比较,OGD/R + EPC-MPs 组心肌细胞凋亡增加($t = 15.860, P < 0.05$),心肌细胞增殖降低($t = 11.130, P < 0.05$);与 OGD/R + EPC-MPs 组比较,OGD/R + miR-126 mimic EPC-MPs 组心肌细胞凋亡降低($t = 6.993, P < 0.05$),心肌细胞增殖增加($t = 7.725, P < 0.05$),见图 4。



A:不同时间点 EPC 显微镜鉴定结果;B:激光共聚焦荧光显微镜下 EPC 鉴定结果。

图 1 显微镜下 EPC 典型形态

2.3 TEM 观察不同治疗后心肌细胞的结构变化

control+EPC-MPs 组和 control+miR-126 mimic EPC-MPs 组细胞内线粒体结构完整,形态正常,嵴、高尔基体和内质网结构完整,内质网表面核糖体较多; OGD/R+EPC-MPs 组线粒体结构疏松,结构增大,

嵴结构疏松,内质网表面核糖体数量减少,高尔基体囊泡增大,疏松囊泡散布在整个细胞质中; OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组部分心肌细胞线粒体结构完整,但部分线粒体大小增大,内质网表面核糖体数量减少,高尔基体中的某些囊泡聚集,见图 5。

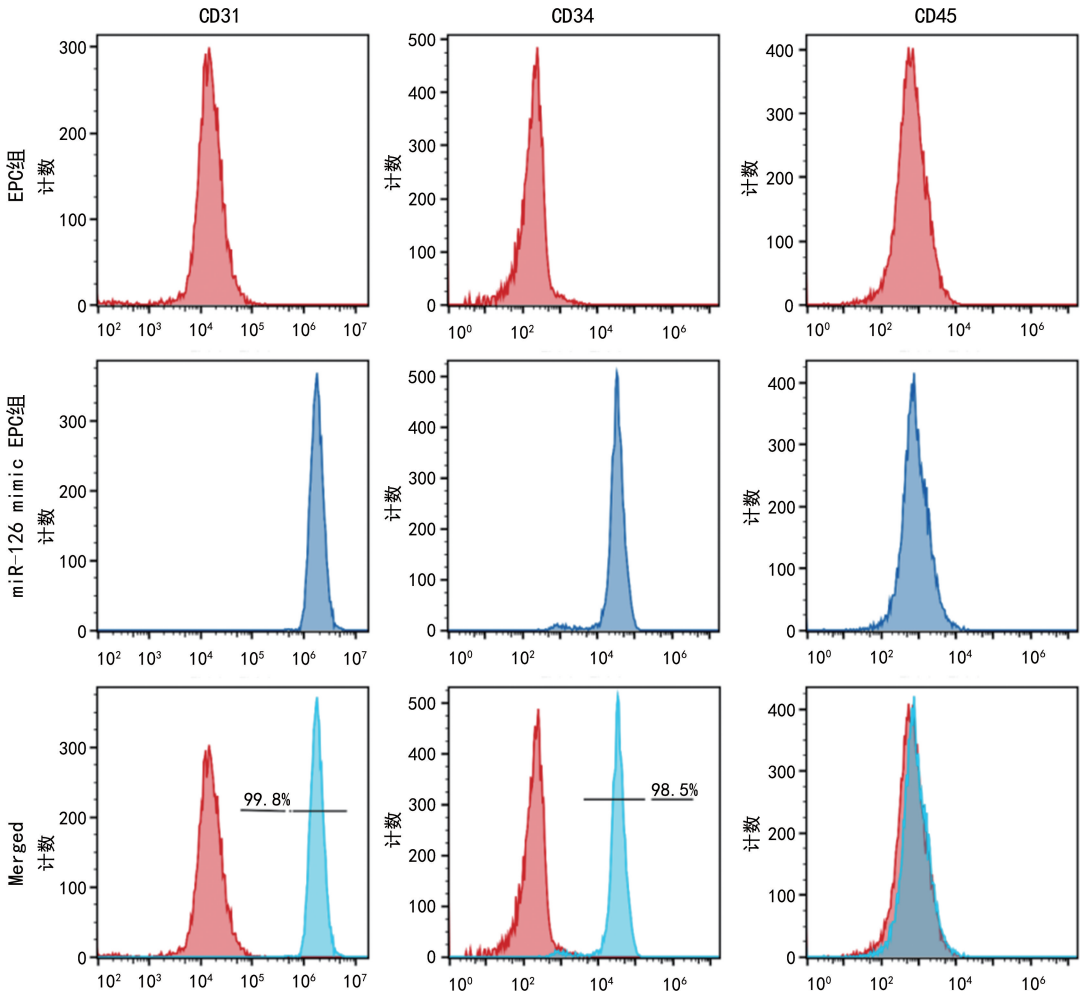


图 2 流式细胞术鉴定 EPC

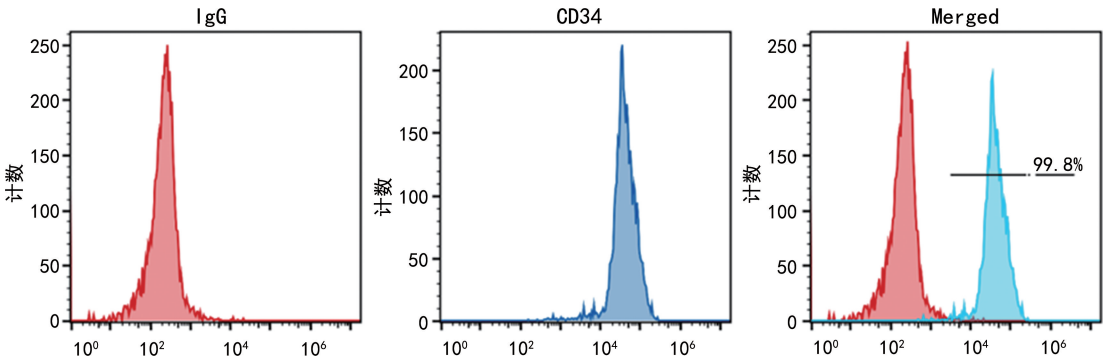
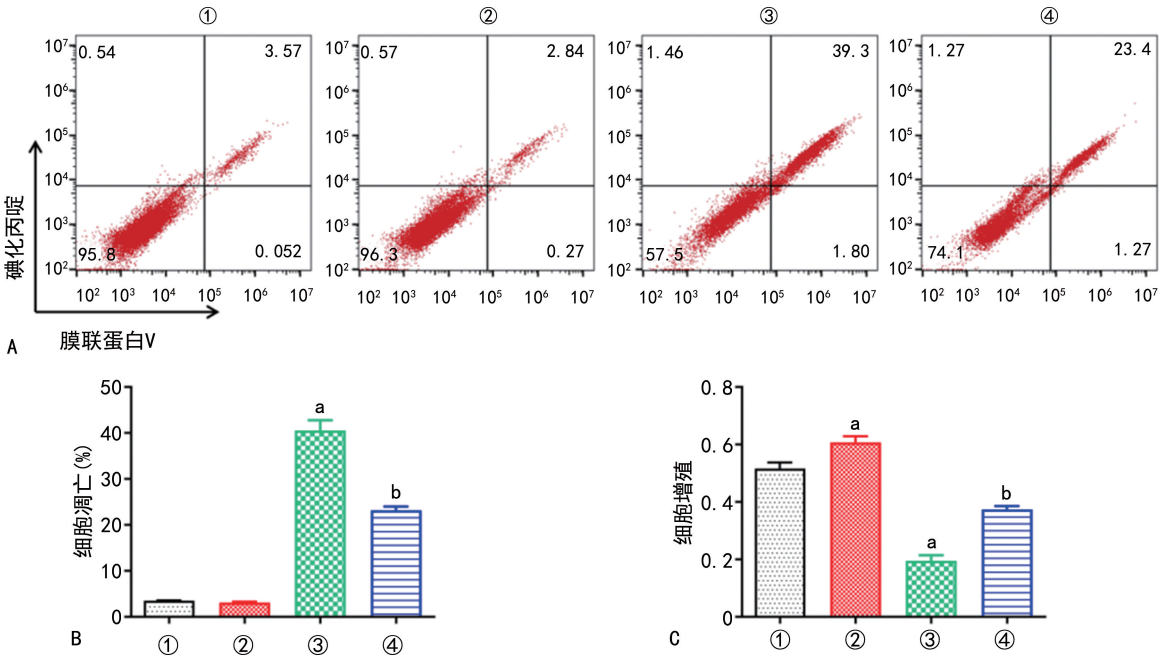


图 3 流式细胞术鉴定 EPC-MPs 检测结果

2.4 ELISA 检测心肌细胞中 IL-6、TNF- α 、HMGB-1 的表达情况

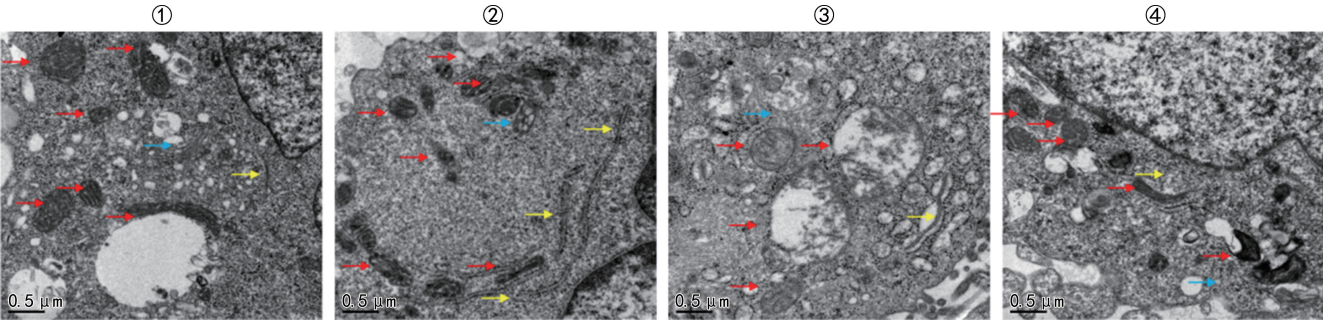
control + EPC-MPs 组和 control + miR-126 mimic EPC-MPs 组 IL-6、TNF- α 、HMGB-1 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 control+EPC-MPs

组比较, OGD/R + EPC-MPs 组 IL-6、TNF- α 和 HMGB-1 表达水平上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 OGD/R+EPC-MPs 组比较, OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组 IL-6、TNF- α 和 HMGB-1 表达水平下调,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。



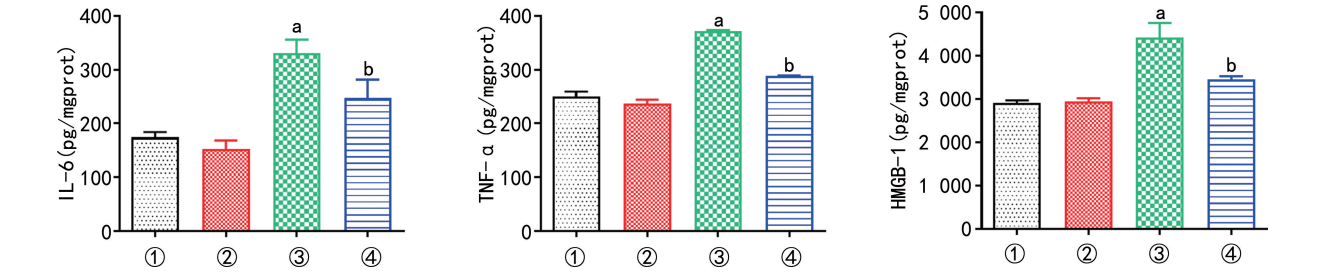
A: 各组心肌细胞凋亡交叉散点图, 左上象限显示死细胞, 左下象限显示正常活细胞, 右下象限显示早期凋亡细胞, 右上象限显示晚期凋亡细胞; B: 各组心肌细胞的凋亡情况比较; C: 各组心肌细胞增殖情况比较; ①: control+EPC-MPs 组; ②: control+miR-126 mimic EPC-MPs 组; ③: OGD/R+EPC-MPs 组; ④: OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组; ^a: $P<0.05$, 与 control+EPC-MPs 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 OGD/R+EPC-MPs 组比较。

图 4 心肌细胞 OGD/R 损伤模型心肌细胞凋亡和增殖情况



①: control+EPC-MPs 组; ②: control+miR-126 mimic EPC-MPs 组; ③: OGD/R+EPC-MPs 组; ④: OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组; 红色箭头表示线粒体, 黄色箭头表示内质网, 蓝色箭头表示高尔基体。

图 5 各组心肌细胞的透射电镜表现



①: control+EPC-MPs 组; ②: control+miR-126 mimic EPC-MPs 组; ③: OGD/R+EPC-MPs 组; ④: OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组; ^a: $P<0.05$, 与 control+EPC-MPs 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 OGD/R+EPC-MPs 组比较; mgprot: 毫克蛋白数。

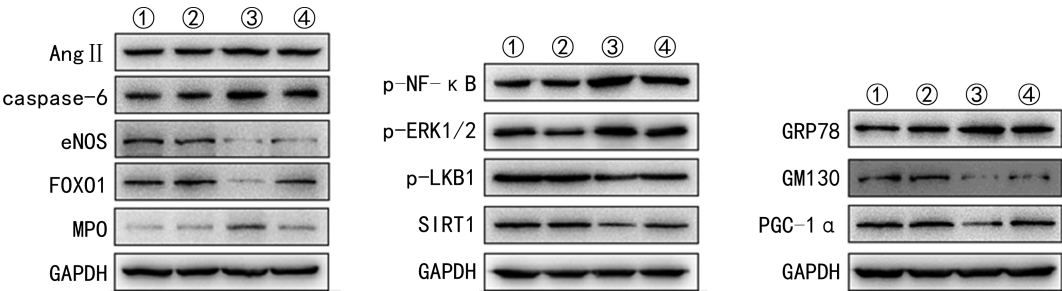
图 6 ELISA 检测心肌细胞中 IL-6、TNF-α、HMGB-1 的表达情况

2.5 各组中相关蛋白的表达情况比较

使用 Western blot 测量不同处理后心肌细胞中 Ang II、caspase-6、eNOS、FOXO1、MPO、p-NF-κB、p-ERK1/2、p-LKB1、SIRT1、GRP78、GM130 和 PGC-1α 的蛋白表达水平 (图 7)。control+EPC-MPs 组和 control+miR-126 mimic EPC-MPs 组各项蛋白表达

水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 control+EPC-MPs 组比较, OGD/R+EPC-MPs 组 Ang II、caspase-6、MPO、p-NF-κB、p-ERK1/2、GRP78 蛋白表达水平上调, eNOS、FOXO1、p-LKB1、GM130、PGC-1α 和 SIRT1 蛋白表达水平下调, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 OGD/R+EPC-MPs 组比较, OGD/

R+miR-126 mimic EPC-MPs 组 Ang II、caspase-6、p-ERK1/2 和 GRP78 表达水平下调,p-LKB1、GM130 和 PGC-1α 表达水平上调,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。



①:control+EPC-MPs 组;②:control+miR-126 mimic EPC-MPs 组;③:OGD/R+EPC-MPs 组;④:OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组。

图 7 Western blot 检测各组蛋白的表达情况

表 2 各组中相关蛋白的表达情况比较($\bar{x}\pm s$)

项目	control+EPC-MPs 组	control+miR-126 mimic EPC-MPs 组	OGD/R+EPC-MPs 组	OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组
Ang II /GAPDH	0.36±0.03	0.42±0.06	0.64±0.04 ^a	0.45±0.02 ^b
caspase-6/GAPDH	0.34±0.02	0.34±0.01	0.71±0.06 ^a	0.48±0.07 ^b
eNOS/GAPDH	0.20±0.01	0.20±0.03	0.07±0.02 ^a	0.11±0.01
FOXO1/GAPDH	0.30±0.05	0.30±0.04	0.10±0.00 ^a	0.19±0.03
MPO/GAPDH	0.13±0.01	0.13±0.03	0.25±0.07 ^a	0.15±0.03
p-NF-κB/GAPDH	0.42±0.09	0.42±0.09	0.83±0.12 ^a	0.68±0.13
p-ERK1/2/GAPDH	0.30±0.01	0.29±0.07	0.74±0.10 ^a	0.51±0.07 ^b
p-LKB1/GAPDH	0.63±0.04	0.67±0.01	0.28±0.01 ^a	0.42±0.03 ^b
SIRT1/GAPDH	0.35±0.04	0.37±0.06	0.13±0.04 ^a	0.22±0.03
GRP78/GAPDH	0.25±0.01	0.30±0.05	0.57±0.02 ^a	0.43±0.04 ^b
GM130/GAPDH	0.19±0.01	0.22±0.01	0.07±0.01 ^a	0.13±0.03 ^b
PGC-1α/GAPDH	0.39±0.01	0.40±0.01	0.17±0.02 ^a	0.26±0.02 ^b

^a: $P<0.05$,与 control+EPC-MPs 组比较;^b: $P<0.05$,与 OGD/R+EPC-MPs 组比较。

2.6 各组中相关基因 mRNA 的表达情况比较

control + EPC-MPs 组 和 control + miR-126 mimic EPC-MPs 组各项 mRNA 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与 control+EPC-MPs 组比较,OGD/R + EPC-MPs 组 Ang II、MPO 和 GRP78 的 mRNA 表达水平上调,eNOS、FOXO1、SIRT1、

GM130 和 PGC-1α 的 mRNA 表达水平下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 OGD/R+EPC-MPs 组比较,OGD/R + miR-126 mimic EPC-MPs 组 Ang II、MPO 和 GRP78 的 mRNA 表达水平下调,eNOS、GM130 和 PGC-1α 的 mRNA 表达水平上调,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组中相关基因 mRNA 的表达情况比较($\bar{x}\pm s$)

项目	control+EPC-MPs 组	control+miR-126 mimic EPC-MPs 组	OGD/R+EPC-MPs 组	OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组
Ang II	1.12±0.11	1.20±0.10	2.69±0.35 ^a	1.97±0.25 ^b
caspase-6	1.14±0.13	0.96±0.12	1.19±0.26	1.09±0.20
eNOS	1.14±0.19	1.14±0.04	0.31±0.04 ^a	0.74±0.08 ^b
FOXO1	1.08±0.13	1.04±0.02	0.70±0.04 ^a	0.87±0.02
MPO	0.97±0.07	1.18±0.07	2.86±0.33 ^a	1.87±0.25 ^b
NF-κB	0.99±0.01	1.13±0.07	1.10±0.18	1.17±0.20

续表 3 各组中相关基因 mRNA 的表达情况比较($\bar{x}\pm s$)

项目	control+ EPC-MPs 组	control+miR-126 mimic EPC-MPs 组	OGD/R+ EPC-MPs 组	OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组
ERK1	1.08±0.10	1.08±0.07	0.97±0.07	1.02±0.15
LKB1	1.02±0.03	1.02±0.19	0.94±0.17	0.98±0.09
SIRT1	1.09±0.17	1.06±0.10	0.50±0.02 ^a	0.74±0.08
GRP78	1.01±0.03	0.97±0.12	2.81±0.24 ^a	1.61±0.36 ^b
GM130	1.11±0.10	1.02±0.04	0.49±0.06 ^a	0.71±0.08 ^b
PGC-1α	1.07±0.06	1.06±0.08	0.38±0.05 ^a	0.78±0.12 ^b

^a: $P<0.05$,与 control+EPC-MPs 组比较;^b: $P<0.05$,与 OGD/R+EPC-MPs 组比较。

3 讨 论

随着医疗技术的发展,越来越多的 AMI 患者愿意及时接受血管重建治疗。然而,再灌注治疗引起的 MIRI 会提高心律失常、心力衰竭和死亡的发生率,严重影响治疗效率。此外,越来越多的证据表明,氧化应激是导致 MIRI 的主要病理过程^[15]。因此,减少氧化应激是解决 OGD/R 损伤的策略,值得在未来进一步研究。

此前的研究表明,MPs 在 CVD 的发生和发展中发挥着极其重要的作用^[16]。本研究通过建立 OGD/R 诱导的心肌细胞损伤模型,并用 miR-126 mimic EPC-MPs 治疗心肌细胞,揭示了 MIRI 发病机制的潜在机制。因此,在这项研究中,miR-126 mimic EPC 衍生的 MPs 是一种新型治疗方法,最初用于心肌细胞 OGD/R 损伤模型,这可能为 MIRI 的治疗提供新的可能性。

MA 等^[17]证明,MIRI 后心肌组织中 SIRT1 表达受到抑制,其升高通过增强心肌细胞活力和减少铁死亡诱导的细胞死亡来降低 MIRI 的程度。此外,LI 等^[18]认为,miR-126 过表达通过促进 SIRT1/Nrf2 信号通路来缓解氧化应激和炎症反应,从而减弱人脐静脉内皮细胞中 OGD/R 诱导的神经毒性。本研究中,与 control+EPC-MPs 组比较,OGD/R+EPC-MPs 组 SIRT1、GM130 和 PGC-1α 蛋白水平降低;与 OGD/R+EPC-MPs 组比较,OGD/R+miR-126 mimic EPC-MPs 组 GM130 和 PGC-1α 蛋白水平升高。eNOS 是一种负责 NO 生成的酶,在 MIRI 中可能具有巨大的价值。这一结果表明,邻硝基苯基乙基咖啡酸酯通过 SIRT1/eNOS 通路抑制氧化应激、炎症反应和坏死细胞增多,从而改善了 MIRI^[19]。据报道,Ang II 诱导的心血管重塑与 SIRT1 的降低密切相关^[20]。Ang II 可诱导心肌细胞细胞质和线粒体中活性氧的产生。本研究结果显示,miR-126 mimic EPC-MPs 可能通过影响 PGC-1α/GM130 的表达来抑制 OGD/R 损伤模型中的心肌细胞死亡,并抑制 Ang II 诱导的继发于线粒体-高尔基体相互作用的应激损伤反应。

PGC-1α 是 SIRT1 的脱乙酰化底物,刺激 SIRT1 可以促进 PGC-1α 的活化,进而抑制氧化应激损伤。重要的是,SIRT1/PGC-1α 通路相关的人参皂苷 Rc 在心肌缺血再灌注的心脏和神经元模型中通过 SIRT1 修复减少 PGC-1α 的乙酰化来减少线粒体损伤和细胞凋亡^[21]。研究表明,高尔基体损伤在 EPC 损伤中发挥重要作用^[22],可能是调节 AMI 发病机制的关键^[23]。本研究结果显示,在 OGD/R 暴露和 miR-126 mimic EPC-MPs 治疗后,高尔基体中的某些囊泡聚集在一起。结合其他研究,可认为 PGC-1α/GM130 是维持线粒体-高尔基体稳定的关键蛋白,可能在抑制心肌细胞损伤中发挥关键作用。TAN 等^[24]发现灵宝护心丸可通过 SIRT1 介导的 FOXO1 和 NF-κB 通路抑制 AMI 大鼠模型的细胞凋亡和炎症。已有研究表明,MIRI 后心脏组织中的 MPO 活性增强^[25]。本研究发现,miR-126 mimic EPC-MPs 可能通过影响 OGD/R 暴露心肌细胞中 MPO 的活性来降低炎症反应,从而降低损伤反应。

综上所述,当心肌细胞发生 OGD/R 损伤时,miR-126 mimic EPC-MPs 调节 PGC-1α/GM130 表达,抑制 Ang II 诱导的应激损伤反应,从而减少心肌细胞的 OGD/R 损伤,这将为治疗 MIRI 提供新的治疗策略。

参考文献

[1] MERLO A C,BONA R D,AMERI P,et al. Type 2 myocardial infarction: a diagnostic and therapeutic challenge in contemporary cardiology [J]. Intern Emerg Med,2022,17(2):317-324.

[2] RAMACHANDRA C J A,HERNANDEZ-RESENDIZ S,CRESPO-AVILAN G E,et al. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection [J]. eBioMedicine, 2020, 57: 102884.

[3] WU X,IROEGBU C D,PENG J,et al. Cell death and exosomes regulation after myocardial in-

- farction and ischemia-reperfusion[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 673677.
- [4] WANG B, LI T, HAN X, et al. The level of circulating microparticles in patients with coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2020, 13(5): 702-712.
- [5] XING Z, ZHAO C, LIU H, et al. Endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles: a novel candidate for regenerative medicine and disease treatment [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(12): e2000255.
- [6] YE H J N, YANG R R, WALLACE C G, et al. Impact of one versus two consecutive doses of endothelial cell (EPC) and EPC-derived condition medium on protecting myocardium from acute ischemia: reperfusion injury in rat[J]. *Cell Transplant*, 2021, 30: 9636897211007049.
- [7] ALEXANDRU N, ANDREI E, SAFCIUC F, et al. Intravenous administration of allogenic cell-derived microvesicles of healthy origins defend against atherosclerotic cardiovascular disease development by a direct action on endothelial progenitor cells[J]. *Cells*, 2020, 9(2): 423.
- [8] WU Q, QI B, DUAN X, et al. MicroRNA-126 enhances the biological function of endothelial progenitor cells under oxidative stress via PI3K/Akt/GSK3 β and ERK1/2 signaling pathways[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2021, 21(1): 71-80.
- [9] LOTZ C, HERRMANN J, NOTZ Q, et al. Mitochondria and pharmacologic cardiac conditioning at the heart of ischemic injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3224.
- [10] TAN Y, ZHANG Y, HE J, et al. Dual specificity phosphatase 1 attenuates inflammation induced cardiomyopathy by improving mitophagy and mitochondrial metabolism[J]. *Mol Metab*, 2022, 64: 101567.
- [11] ZHOU H, DAI Z, LI J, et al. TMBIM6 prevents VDAC1 multimerization and improves mitochondrial quality control to reduce sepsis-related myocardial injury [J]. *Metabolism*, 2023, 140: 155383.
- [12] LI X, YU J, GONG L, et al. Heme oxygenase-1 (HO-1) regulates Golgi stress and attenuates endotoxin-induced acute lung injury through hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)/HO-1 signaling pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 165: 243-253.
- [13] ZHANG Y, WANG Y, READ E, et al. Golgi stress response, hydrogen sulfide metabolism, and intracellular calcium homeostasis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32(9): 583-601.
- [14] BACHELIER K, BERGHOLZ C, FRIEDRICH E B. Differentiation potential and functional properties of a CD34⁻CD133⁺ subpopulation of endothelial progenitor cells[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(1): 501-507.
- [15] SHEN Y, LIU X, SHI J, et al. Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 496-502.
- [16] YUAN Y, MAITUSONG M, MUYESAI N. Association of endothelial and red blood cell microparticles with acute myocardial infarction in Chinese: a retrospective study[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(4): 1564-1570.
- [17] MA S, SUN L, WU W, et al. USP22 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via the SIRT1-p53/SLC7A11-dependent inhibition of ferroptosis-induced cardiomyocyte death [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 551318.
- [18] LI J, YANG C, WANG Y. MiR-126 overexpression attenuates oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and inflammatory response via the activation of SIRT1/Nrf2 signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(2): 165.
- [19] LI D, WANG X, HUANG Q, et al. Cardioprotection of CAPE-oNO₂ against myocardial ischemia/reperfusion induced ROS generation via regulating the SIRT1/eNOS/NF- κ B pathway in vivo and in vitro[J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 62-73.
- [20] CHEN H J, PAN X X, DING L L, et al. Cardiac fibroblast-specific knockout of PGC-1 α accelerates Ang II-induced cardiac remodeling [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 664626.
- [21] HUANG Q, SU H, QI B, et al. A SIRT1 activator, ginsenoside Rc, promotes energy metabolism in cardiomyocytes and neurons[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(3): 1416-1427.
- [22] 马艺萍, 阿不都热合曼·米吉提, 袁玉娟, 等. 内皮祖细胞损伤来源微粒对内皮祖细胞的影响机制研究[J]. *重庆医学*, 2023, 52(23): 3538-3545.
- [23] MA Y, YUAN Y, AILI Z, et (下转第 1615 页)

perinatal outcomes following blastocyst and cleavage-stage embryo transfer; analysis of 10 years' data from a single centre[J]. *Reprod Biomed Online*,2019,38(6):967-978.

[11] ZHAO X, LANG J, LENG J, et al. Abdominal wall endometriomas[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2005,90(3):218-222.

[12] ZHANG P, SUN Y, ZHANG C, et al. Cesarean scar endometriosis: presentation of 198 cases and literature review[J]. *BMC Womens Health*, 2019, 19(1):14.

[13] BENEDETTO C, CACCOZZA D, DE SOUSA COSTA D, et al. Abdominal wall endometriosis: report of 83 cases[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2022,159(2):530-536.

[14] COCCO G, RICCI V, BOCCATONDA A, et al. Focused ultrasound for the diagnosis of non-palpable endometriotic lesions of the abdominal wall: a not-uncommon surgical complication [J]. *J Ultrasound*,2020,23(2):183-187.

[15] Expert Panel on Gastrointestinal Imaging,FOWLER K J,GARCIA E M, et al. ACR appropriateness criteria® palpable abdominal mass-suspected neoplasm [J]. *J Am Coll Radiol*, 2019, 16 (Suppl. 11):384-391.

[16] 黄坚,石一复. 不同部位子宫内膜异位症与血清CA125 水平的关系[J]. *现代妇产科进展*,2006, 15(1):39-41.

[17] NEAMTU R, DAHMA G, MOCANU A G, et al. Challenges in diagnosis and prevention of iatrogenic endometriosis as a long-term surgical complication after C-section[J]. *Int J Environ Res Public Health*,2022,19(5):2791.

[18] ANDOLF E, THORSELL M, KÄLLÉN K. Caesarean section and risk for endometriosis; a prospective cohort study of Swedish registries [J]. *BJOG*,2013,120(9):1061-1065.

[19] HORTON J D, DEZEE K J, AHNFELDT E P, et al. Abdominal wall endometriosis: a surgeon's perspective and review of 445 cases[J]. *Am J Surg*,2008,196(2):207-212.

[20] REATEGUI C, GRUBBS D. Abdominal wall endometriomas. Should the approach vary based on its relationship to the fascia? A case report and review of the literature[J]. *Int J Surg Case Rep*,2021,78:62-66.

[21] 邓姗,冷金花,郎景和,等. 腹壁子宫内膜异位症术前预测补片的可行性分析[J]. *国际妇产科学杂志*,2013,40(4):364-368.

[22] WU Y, DAI Y, ZHANG J, et al. The clinical features and long-term surgical outcomes of different types of abdominal wall endometriosis [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2023, 307(1):163-168.

[23] 杜琳瑶,孙永杰,任双颂,等. 超声引导下射频消融治疗腹壁子宫内膜异位症[J]. *中国介入影像与治疗学*,2022,19(9):548-551.

[24] 汪沙,段华. 高强度聚焦超声消融与手术切除治疗腹壁子宫内膜异位症的疗效对比研究[J]. *国际妇产科学杂志*,2023,50(3):261-265.

[25] DING Y, ZHU J. A retrospective review of abdominal wall endometriosis in Shanghai, China[J]. *Int J Gynaecol Obstet*,2013,121(1):41-44.

[26] 孙国栋,姜旖,袁琳,等. 巨大腹壁子宫内膜异位症恶变一例并文献复习[J]. *国际妇产科学杂志*, 2022,49(3):321-324.

[27] KARAPOLAT B, KUCUK H. A rare cause of abdominal pain: scar endometriosis[J]. *Emerg Med Int*,2019,2019:2584652.

(收稿日期:2023-09-21 修回日期:2024-03-10)
(编辑:冯 甜)

(上接第 1609 页)

al. Proteomics analysis of coronary blood microparticles in patients with acute myocardial infarction[J]. *Cardiol J*,2023,30(2):286-296.

[24] TAN Y, BIE Y L, CHEN L, et al. Lingbao Huxin Pill alleviates apoptosis and inflammation at infarct border zone through SIRT1-Mediated FOXO1 and NF-κB pathways in rat model of acute myocardial infarction [J]. *Chin J Integr Med*,2022,28(4):330-338.

[25] QUAN W, MA S, ZHU Y, et al. Apigenin-7-O-β-d-(6''-p-coumaroyl)-glucopyranoside reduces myocardial ischaemia/reperfusion injury in an experimental model via regulating the inflammation response[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 80-88.

(收稿日期:2023-12-30 修回日期:2024-04-22)
(编辑:张芃捷)