

· 实验研究 ·

lncRNA-MALAT1/miRNA-145 在舒芬太尼预处理减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤中的作用

赵智慧 白香花 何金玲 段伟琴 丁辰颖 夏中元

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)肺腺癌转录子 1(MALAT1)在舒芬太尼预处理减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤(MIRI)中的作用。方法 SPF 级大鼠 36 只,体重 180~200 g,随机分为三组:假手术组(Sham 组),缺血-再灌注损伤组(IR 组),缺血-再灌注损伤+舒芬太尼组(SUF 组),每组 12 只。IR 组和 SUF 组建立大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型,SUF 组于再灌注前 10 min 尾静脉注射舒芬太尼 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,Sham 组和 IR 组注射等体积生理盐水。再灌注后 2 h 检测大鼠血清中肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)、心肌肌钙蛋白 T(cTnT)和乳酸脱氢酶(LDH)活性,同时检测大鼠心肌梗死面积;检测心肌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 和 Caspase-3 含量;检测大鼠心肌组织中 lncRNA-MALAT1 和 miRNA-145 的相对表达量。结果 与 Sham 组比较,IR 组和 SUF 组 CK-MB 和 cTnT 浓度明显升高,LDH 活性明显增强,心肌梗死面积明显增大,心肌组织中 Bax/Bcl-2 比值明显降低,Cleaved-caspase-3 蛋白含量明显升高,lncRNA-MALAT1 相对表达量明显升高,而 miRNA-145 相对表达量明显降低($P<0.05$)。与 IR 组比较,SUF 组 CK-MB 和 cTnT 浓度明显降低,LDH 活性明显减弱,心肌梗死面积明显减小,Bax/Bcl-2 比值明显升高,Cleaved-caspase-3 蛋白含量明显降低,lncRNA-MALAT1 相对表达量明显降低,miRNA-145 相对表达量明显增加($P<0.05$)。结论 舒芬太尼预处理能减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤程度,其机制可能与抑制 lncRNA-MALAT1、升高 miRNA-145 表达有关。

【关键词】 舒芬太尼;心肌缺血-再灌注损伤;肺腺癌转录子 1;miRNA-145

Effects of lncRNA-MALAT1/miRNA-145 on sufentanil pretreatment alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury in rats ZHAO Zhihui, BAI Xianghua, HE Jinling, DUAN Weiqin, DING Chenying, XIA Zhongyuan. Department of Anesthesiology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China

Corresponding author: ZHAO Zhihui, Email: zzh19880101@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of sufentanil pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats, and to explore its mechanism of action from lncRNA-MALAT1/miRNA-145. **Methods** Thirty-six SPF rats of 180–200 g were randomly divided into three groups: sham operation group (group Sham), ischemia-reperfusion injury group (group IR), and ischemia-reperfusion injury + sufentanil group (group SUF), $n = 12$ in each group. Group IR and group SUF established a rat model of MIRI. In group SUF, sufentanil 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was injected into the tail vein at 10 min before reperfusion, whereas the other two groups were injected with an equal volume of saline. The serum concentration of creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB) activity, cardiac troponin T (cTnT) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected at 2 h after reperfusion. The area of myocardial infarction (MI) was detected. The expression of cardiomyocyte apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Cleaved-caspase-3 and Caspase-3 were detected using Western blot. Relative expression of lncRNA-MALAT1 and miRNA-145 in myocardial tissue of rats were investigated by RT-PCR. **Results** Compared with group Sham, the concentrations of CK-MB and cTnT, the area of MI and LDH activity were increased significantly, Bax/Bcl-2 ratio was significantly decreased and Cleaved-caspase-3 protein expression was significantly increased, the relative expression of lncRNA-MALAT1 was up-regulated, whereas miRNA-145 expression was down-regulated in group IR and group SUF ($P < 0.05$). Compared with group IR, the concentrations of CK-MB and cTnT, the area of MI and LDH activity were decreased, Bax/Bcl-2 ratio was increased and Cleaved-caspase-3 protein expression was signif-

DOI:10.12089/jca.2020.04.016

基金项目:内蒙古自治区科技计划项目(201702118);内蒙古自治区人民医院院内基金(2016014)

作者单位:010017 呼和浩特市,内蒙古自治区人民医院麻醉科(赵智慧、白香花、何金玲、段伟琴、丁辰颖);武汉大学人民医院麻醉科(夏中元)

通信作者:赵智慧,Email: zzh19880101@126.com

icantly decreased, the relative expression of lncRNA-MALAT1 was down-regulated, whereas miRNA-145 expression was up-regulated significantly in group SUF ($P < 0.05$). **Conclusion** Sufentanil pretreatment can alleviate the degree of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats, and its mechanism may be related to the regulation of lncRNA-MALAT1/miRNA-145 expression.

【Key words】 Sufentanil; Myocardial ischemia-reperfusion injury; MALAT1; miRNA-145

舒芬太尼作为阿片受体激动药,对心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)具有保护作用,但其作用机制尚不明确^[1]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在调控细胞分子功能方面越来越受到关注,已经成为心血管疾病治疗的潜在靶点^[2]。有研究表明,miRNA-145 在心血管系统疾病发生发展过程中具有一定的调节作用^[3]。因此,本研究建立大鼠 MIRI 模型,观察 lncRNA-MALAT1 与 miRNA-145 表达在舒芬太尼预处理对大鼠 MIRI 的影响。

材料与方 法

实验动物与分组 SPF 级 SD 大鼠 36 只,雌雄各半,体重 180~200 g,购于辽宁长生生物有限公司[SCXK(辽):2013-0001],动物分笼饲养,自由进食和饮水,室温维持在 20~25 ℃,每日光照 12 h。在适应性饲养 1 周后用于实验。将大鼠随机分为三组:假手术组(Sham 组),缺血-再灌注损伤组(IR 组)和缺血-再灌注损伤+舒芬太尼组(SUF 组),每组 12 只。

大鼠 MIRI 模型制备 参照文献[4]和[5]的方法制备大鼠 MIRI 模型。三组大鼠给予 4%水合氯醛腹腔注射麻醉,随后四肢插入电极针记录 II 导联心电图,气管切开后接呼吸机。股静脉留置导管用于术中补充生理盐水。开胸后用无损伤线在距离左冠状动脉前降支(LAD)根部 4 mm 处结扎,持续 30 min,心电图可见 ST 段弓背向上抬高,为心肌缺血成功,解开无损伤线,再灌注维持 120 min,造成再灌注;Sham 组只开胸不进行结扎。SUF 组于再灌注前 10 min 尾静脉注射舒芬太尼 1 μg/kg,Sham 组和 IR 组注射等体积的生理盐水^[6-7]。所有大鼠在完成再灌注 2 h 后处死。

心肌损伤病理学检查 于动脉采血后处死大鼠,快速摘取心脏,用 4%多聚甲醛中固定肺组织,脱水、透明、石蜡包埋随后切片,厚度在 5 μm 左右,置 40 ℃恒温烤箱中烤干后使用。HE 染色,中性树脂胶封片。每组大鼠选取 8 张切片标本,显微镜下观察组织学改变。

心肌损伤指标检测 大鼠处死前腹主动脉采

血,4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min。取上清,ELISA 试剂盒检测血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌钙蛋白 T(cTnT)和 LDH 活性。

心肌梗死面积测定 大鼠心脏取出后-80 ℃冷冻 2 h,沿心脏纵轴垂直切成 2 mm 薄片,置于 1% TTC 溶液中 37 ℃水浴箱避光染色 20 min,再放于 4%多聚甲醛溶液中固定。用 Image J 软件测量相关区域面积,非梗死区为深红色,梗死区为灰白色,计算梗死面积百分比并取平均值。

凋亡相关蛋白检测 采用 Western blot 法检测凋亡相关蛋白含量。将心肌组织剪碎,置于含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中,进行匀浆,4 ℃,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液后,使用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,使用 PVDF 膜转膜 2 h,5%脱脂奶粉封闭液封闭 1.5 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,分别加入 Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase-3 及 β-actin 一抗(1:1 000),TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 HRP 标记二抗(1:1 000)稀释浓度为 1:1 000,室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,ECL 发光试剂盒发光,凝胶成像系统成像,Image J 软件计算灰度值,采用目的条带与内参蛋白条带光密度比值作为蛋白含量。

lncRNA-MALAT1 和 miRNA-145 检测 取大鼠心肌组织,Trizol 法提取各组细胞总 RNA,按照试剂盒说明书合成 cDNA。取 2 μl cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 说明书进行体外扩增并计算基因相对表达量。

统计分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

心肌损伤病理学 Sham 组心肌细胞横纹及闰盘清晰,心肌显微结构清楚,排列完整紧密,染色均匀,细胞核与胞浆完好,无细胞坏死现象;IR 组心肌细胞排列紊乱,坏死细胞多件,细胞核溶解和皱缩明显,心肌纤维撕裂,细胞核深染;SUF 组心肌细胞排列较为完整,坏死细胞减少(图 1)。

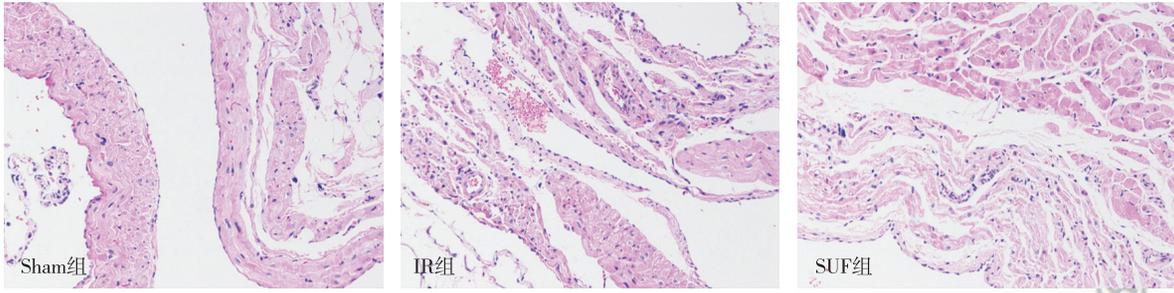


图 1 三组大鼠心肌组织 HE 染色图 (×400)

心肌损伤指标 与 Sham 组比较, IR 组和 SUF 组 CK-MB、cTnT 和 LDH 活性明显增强 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, SUF 组 CK-MB、cTnT 和 LDH 活性明显减弱 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 三组大鼠血清中 CK-MB、cTnT 和 LDH 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	CK-MB (ng/ml)	cTnT (ng/L)	LDH (U/L)
Sham 组	6	1.0±0.1	43.3±10.2	275.5±43.2
IR 组	6	5.8±0.4 ^a	134.5±25.7 ^a	2 875.5±132.4 ^a
SUF 组	6	3.0±0.2 ^{ab}	101.8±26.2 ^{ab}	1 675.7±93.4 ^{ab}

注:与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

心肌梗死面积 与 Sham 组比较, IR 组和 SUF 组心肌梗死面积明显增大 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, SUF 组心肌梗死面积明显减小 ($P < 0.05$) (表 2)。

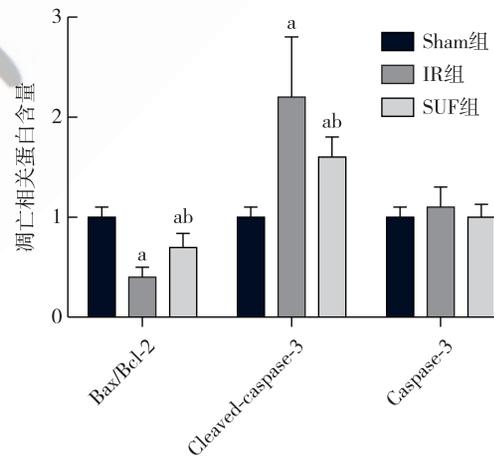
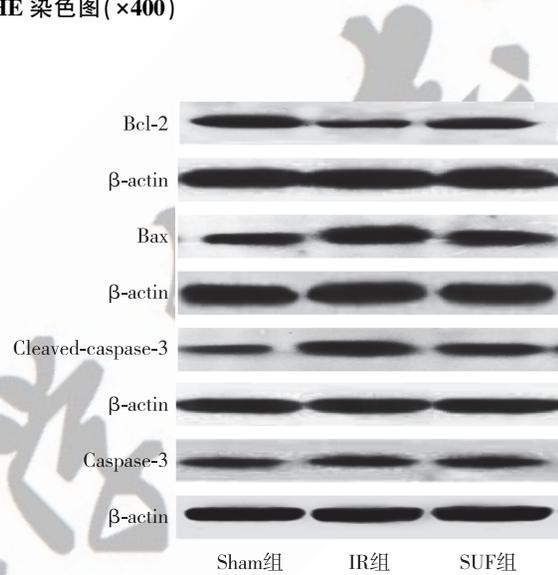
表 2 三组大鼠心肌梗死面积的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	心肌梗死面积 (%)
Sham 组	6	0.0±0.0
IR 组	6	42.3±6.7 ^a
SUF 组	6	28.5±5.2 ^{ab}

注:与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

凋亡相关蛋白 与 Sham 组比较, IR 组和 SUF 组心肌组织中 Bax/Bcl-2 比值明显降低, Cleaved-caspase-3 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, SUF 组 Bax/Bcl-2 比值明显升高, Cleaved-caspase-3 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$)。三组 Caspase-3 蛋白含量差异无统计学意义 (图 2)。

lncRNA-MALAT1 及 miRNA-145 表达量 与 Sham 组比较, IR 组和 SUF 组心肌组织中 lncRNA-



注:与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

图 2 三组大鼠心肌组织中凋亡蛋白含量的比较

MALAT1 相对表达量明显升高, 而 miRNA-145 相对表达量明显降低 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, SUF 组心肌组织中 lncRNA-MALAT1 相对表达量明显降低, miRNA-145 相对表达量明显升高 ($P < 0.05$) (表 3)。

讨 论

舒芬太尼为阿片受体激动药, 对心肌组织具有保护作用, 但其作用机制尚不明确。本研究结果表

表 3 三组大鼠心肌组织中 lncRNA-MALAT1 和 miRNA-145 相对表达量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	lncRNA-MALAT1	miRNA-145
Sham 组	6	1.0±0.2	1.0±0.1
IR 组	6	2.5±0.4 ^a	0.5±0.4 ^a
SUF 组	6	1.8±0.5 ^{ab}	0.9±0.1 ^{ab}

注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 IR 组比较,^b $P<0.05$

明,在再灌注前给予舒芬太尼 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 能够有效减小再灌注造成的心肌缺血梗死范围,并减轻心肌病理损伤,发挥心肌保护作用。本研究主要目的是探讨舒芬太尼保护 MIRI 模型大鼠的作用机制,因此只选择了一个有效浓度,而舒芬太尼的保护作用是否成剂量依赖性,尚需进一步验证。

CK-MB 主要存在于心肌细胞中,在心肌缺血发生时,血清中 CK-MB 水平迅速升高,其升高的幅度直接反映心肌损伤程度。同时,当心肌细胞缺血缺氧时,游离型 cTnT 可首先迅速从细胞中释放入血,随后结合于心肌结构蛋白中的结合型 cTnT 逐渐分解,缓慢释放入循环血中,从而血中 cTnT 水平明显升高。当心肌受损时,心肌细胞内的 LDH 会出现外渗现象,导致血清中 LDH 活力明显升高,因此 LDH 也可以特异性地作为心肌损伤的标志物之一。本研究结果显示,舒芬太尼能显著降低大鼠血清中 CK-MB、cTnT 和 LDH 活力,说明舒芬太尼预处理可以减轻再灌注对心肌组织造成的损伤,发挥心肌保护作用。

心肌细胞凋亡是缺血-再灌注诱导心肌损伤的机制之一,Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 是细胞凋亡经典的标志物^[8]。Bcl-2 是细胞内一种重要的抗凋亡蛋白,对凋亡的调控过程起着非常重要的作用,凋亡发生过程中,Bcl-2 表达降低。Bax 是一种促凋亡蛋白,在凋亡发生时,Bax 表达升高。Caspase-3 的激活形成 Cleaved-caspase-3 剪切体形式也是细胞凋亡的关键环节,激活细胞凋亡级联反应,诱导细胞凋亡。本研究结果表明,舒芬太尼预处理能有效抑制 Bax 及 Cleaved-caspase-3 蛋白表达,同时增加 Bcl-2 蛋白表达,提示舒芬太尼有助于减少心肌细胞的凋亡,发挥心肌保护作用。

在人类所有基因中,约有 90% 的基因能够发生转录,但只有 1% 的基因能够翻译编码成为蛋白质,

称为编码 RNA,其余统称为非编码 RNA,包括长度 20~25 bp 的 microRNA(miRNA)和长度超过 200 bp 的长链非编码 RNA(lncRNA)。lncRNA 作为一个调控分子,在多种病理刺激下其表达发生变化,通过上调或下调下游 miRNA 的水平,进而影响 miRNA 靶向基因的表达,从而参与调节病理发生发展过程^[9]。研究表明,lncRNA 和 miRNA 参与机体多种生理病理功能,如肿瘤、神经系统疾病和心血管系统疾病^[10]。随着对 lncRNA 的研究不断深入,发现 miRNA 可以作为 lncRNA 的响应分子。lncRNA 作为一个调控信号,在多种病理刺激下发生表达变化,能够上调或下调 miRNA 的水平。lnc-MALAT1 广泛地表达于哺乳动物的正常组织及器官,对多种疾病具有调控作用,包括心肌损伤性疾病。lncRNA-MALAT1 在糖尿病引发的心肌病发生过程中起重要的调控作用,降低 MALAT1 表达可以减少心肌细胞凋亡,改善心肌功能^[11]。miRNA-145 大量表达于动脉血管壁平滑肌细胞中,急性心肌梗死患者血清中 miRNA-145 水平明显低于正常人,并且与血清 CK-MB 水平呈负相关,因此上调 miRNA-145 水平可能有利于心肌功能的恢复^[12]。有研究表明,凋亡相关蛋白 Bax 及 Bcl-2 是 miRNA-145 的下游靶标,因此,调控 miRNA-145 的表达水平对于抑制心肌细胞的凋亡具有关键作用^[13]。本研究结果表明,舒芬太尼预处理能显著降低大鼠心肌组织中 lncRNA-MALAT1 的表达,并且增加 miRNA-145 表达,提示舒芬太尼预处理发挥心肌保护作用、减少细胞凋亡。

综上所述,舒芬太尼可能是通过抑制 lncRNA-MALAT1 表达、升高 miRNA-145 表达,改善再灌注造成的心肌损伤,但 lncRNA-MALAT1 与 miRNA-145 之间的具体调控机制仍需要进一步深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Tire Y, Sarkilar G, Esen H, et al. The effect of intrathecal sufentanil preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Bratisl Lek Listy*, 2018, 119(4): 240-244.
- [2] 陈凤惟, 张成, 董慧, 等. 慢性间歇低氧上调心肌 lncRNA MALAT1 及相关分子的表达. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2018, 17(4): 377-382.
- [3] 沈凤, 陶晓静, 欧和生. miRNA-145 对血管平滑肌细胞功能调节与心血管疾病研究进展. *生理科学进展*, 2017, 48(5): 357-361.
- [4] Zhao B, Gao WW, Liu YJ, et al. The role of glycogen synthase kinase 3 beta in brain injury induced by myocardial ischemia/

- reperfusion injury in a rat model of diabetes mellitus. *Neural Regen Res*, 2017, 12(10): 1632-1639.
- [5] Ma M, Hui J, Zhang QY, et al. Long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1 inhibition blunts myocardial ischemia reperfusion injury via autophagic flux arrest and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Atherosclerosis*, 2018, 277: 113-122.
- [6] 刘祥, 景桂霞, 白娟, 等. 舒芬太尼预处理对大鼠心肌缺血再灌注时 PI3K/Akt 的影响. *南方医科大学学报*, 2014, 34(3): 335-340.
- [7] Chen QL, Gu EW, Zhang L, et al. Diabetes mellitus abrogates the cardioprotection of sufentanil against ischaemia/reperfusion injury by altering glycogen synthase kinase-3 β . *Acta Anaesthesiol Scand*, 2013, 57(2): 236-242.
- [8] Umbarkar P, Singh S, Arkat S, et al. Monoamine oxidase-A is an important source of oxidative stress and promotes cardiac dysfunction, apoptosis, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med*, 2015, 87: 263-273.
- [9] Geng H, Bu HF, Liu F, et al. In inflamed intestinal tissues and epithelial cells, interleukin 22 signaling increases expression of H19 long noncoding RNA, which promotes mucosal regeneration. *Gastroenterology*, 2018, 155(1): 144-155.
- [10] Kong F, Jin J, Lv X, et al. Long noncoding RNA RMRP upregulation aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by sponging miR-206 to target ATG3 expression. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 716-725.
- [11] Zhang M, Gu H, Xu W, et al. Down-regulation of lncRNA MALAT1 reduces cardiomyocyte apoptosis and improves left ventricular function in diabetic rats. *Int J Cardiol*, 2015, 203: 214-216.
- [12] Zhang M, Cheng YJ, Sara JD, et al. Circulating microRNA-145 is associated with acute myocardial infarction and heart failure. *Chin Med J*, 2017, 130(1): 51-56.
- [13] 黄金沐. 格列美脲抑制人乳腺癌细胞增殖/促进凋亡的作用及对 miRNA-145 介导的机制研究. *中国药师*, 2019, 22(7): 1211-1214.

(收稿日期:2019-05-20)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》中英文摘要撰写规范

论著文章须有中、英文摘要,内容必须包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)四个部分,目的主要是回答为什么进行此项研究,说明提出问题的理由,表明研究的范围和重要性。方法中应简要说明研究课题的基本设计,所用的原理,条件,对象,材料,设备,如何分组对照,研究范围精确度,观察的指标等。结果部分应写出本研究的主要数据,被确定的关系,观察结果,得到的效果,有何新发现。结论是结果内容的升华,是由结果推论而出,是结果的分析,研究的比较,评价,应用,假设,启发,建议及预测等。摘要应具有独立性,即不阅读全文就能获得必要的信息,采用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等主语,不加评论和解释,摘要中首次出现的缩略语、代号等,非公认公知者,须注明全称。考虑篇幅的限制,中文摘要可简略些,一般 300~500 字,英文摘要与中文摘要原则上相对应,考虑到国外读者的需要,可更详细,一般 500 个实词左右。英文摘要尚应包括文题(仅第一个字母大写)、所有作者姓名(姓在前,名在后;姓全大写,名字仅首字母大写)、第一作者单位名称和科室、所在城市名、邮政编码及国名。