

过表达 miR-486-5p 的骨髓间充质干细胞通过外泌体来保护缺氧损伤心肌细胞

姚思雨¹ 张婷婷² 安松涛¹

(1. 郑州大学华中阜外医院, 河南 郑州 450003; 2. 河南省人民医院临床单细胞生物医学中心, 河南 郑州 450003)

【摘要】目的 探讨过表达 miR-486-5p 小鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)来源外泌体(Exo)对缺氧损伤心肌细胞的影响及机制。**方法** 通过慢病毒转染来构建过表达 miR-486-5p 的小鼠 BMSC。提取转染成功的 BMSC 所分泌的 Exo, 包括空载体 BMSC 分泌的 Exo(Exo-NC)、miR-486-5p 过表达 BMSC 分泌的 Exo(Exo-miR-486)及未处理 BMSC 分泌的 Exo(Exo-Control)。取 12~18 d 胎鼠原代心肌细胞, 将其分为常氧培养组(Normoxia 组)、缺氧培养组(Hypoxia 组)、Hypoxia + Exo-NC 组及 Hypoxia + Exo-miR-486 组, 并给予不同时间的缺氧处理来模拟心肌细胞缺氧状态, 检测细胞增殖状态、凋亡率, 以及活性氧(ROS)、核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3(NLRP3)和裂解的胱天蛋白酶-1(cleaved caspase-1)的表达水平。**结果** Hypoxia 组心肌细胞增殖能力低于 Normoxia 组, 而凋亡率及 ROS、NLRP3 和 cleaved caspase-1 的表达水平均高于 Normoxia 组($P < 0.05$); Hypoxia + Exo-NC 组心肌细胞增殖能力高于 Hypoxia 组, 凋亡率及 ROS、NLRP3 和 cleaved caspase-1 的表达水平低于 Hypoxia 组($P < 0.05$); Hypoxia + Exo-miR-486 组心肌细胞增殖能力高于 Hypoxia + Exo-NC 组, 凋亡率及 ROS、NLRP3 和 cleaved caspase-1 表达水平低于 Hypoxia + Exo-NC 组($P < 0.05$)。**结论** 来自 miR-486-5p 过表达 BMSC 的 Exo 能减少缺氧导致的 ROS 的产生及其引起的心肌细胞凋亡, 并改善缺氧引起的心肌细胞增殖缓慢的问题。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 外泌体; 心肌缺氧; miR-486-5p; 凋亡

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.09.019

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Overexpressing miR-486-5p Protect Hypoxic-Injured Cardiomyocytes via Exosomes

YAO Siyu¹, ZHANG Tingting², AN Songtao¹

(1. Central China Fuwai Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China; 2. Center for Clinical Single-Cell Biomedicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China)

【Abstract】Objective To investigate the effects and mechanisms of exosomes (Exo) derived from bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) in mice overexpressing miR-486-5p on hypoxic-injured cardiomyocytes. **Methods** Mouse BMSC overexpressing miR-486-5p was constructed by lentivirus transfection. Exo secreted by successfully transfected BMSC were extracted, including Exo secreted by empty carrier BMSC (Exo-NC), Exo secreted by BMSC overexpressing miR-486-5p (Exo-miR-486), and Exo secreted by untreated BMSC (Exo-Control). Primary cardiomyocytes from 12~18 d fetal rats were divided into normal oxygen culture group (Normoxia group), hypoxia culture group (Hypoxia group), Hypoxia + Exo-NC group and Hypoxia + Exo-miR-486 group, and were given hypoxia treatments for different times to stimulate the hypoxic state of cardiomyocytes. Cell proliferation, apoptosis rate, and the expression levels of reactive oxygen species (ROS), nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3), and cleaved caspase-1 were examined. **Results** The proliferation of cardiomyocytes in Hypoxia group was lower than that in Normoxia group, while the apoptosis rate and the expression levels of ROS, NLRP3 and cleaved caspase-1 in Hypoxia group were higher than those in Normoxia group ($P < 0.05$); Myocardial cell proliferation capacity in Hypoxia + Exo-NC group was higher than that in Hypoxia group, the apoptosis rate and the expression levels of ROS, NLRP3 and cleaved caspase-1 were lower than those in Hypoxia group ($P < 0.05$); The proliferation ability of myocardial cells in Hypoxia + Exo-miR-486 group was higher than that in Hypoxia + Exo-NC group, and the apoptosis rate and the expression levels of ROS, NLRP3 and cleaved caspase-1 were lower than those in Hypoxia + Exo-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** Exo from BMSC overexpressing with miR-486-5p can reduce hypoxic-induced ROS production and apoptosis of cardiomyocytes, and ameliorate hypoxic-induced slow proliferation of cardiomyocytes.

【Keywords】 Bone marrow mesenchymal stem cell; Exosome; Myocardial hypoxia; miR-486-5p; Apoptosis

基金项目: 国家自然科学基金(81970312)

通信作者: 安松涛, E-mail: ansongtao2010@zzu.edu.cn

冠状动脉性心脏病作为全球范围内高发病率和死亡率的主要疾病之一,迫切需创新的缺血后修复和再生的治疗药物。近年来,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)迅速成为一种广泛应用的实验模型,以 BMSC 为基础的治疗正在成为一种修复缺血性心肌损伤的新方法^[1]。尽管基于 BMSC 的研究已取得了一些进展,但该治疗方法尚无法使心脏功能完全恢复到正常水平^[2]。因此,进一步寻求提高 BMSC 治疗效果的手段十分必要。BMSC 参与缺血性心脏修复的部分机制可能是旁分泌效应。最近的研究^[3]表明, BMSC 可通过分泌外泌体(exosome, Exo)在体内和体外对心肌细胞产生抗凋亡作用,保护缺血缺氧诱发的心脏损伤。其中,微小 RNA(microRNA, miRNA)在心肌缺血性损伤中扮演着重要的调控作用^[4-8]。miR-486-5p 是一种显著富集于 BMSC-Exo 中的 miRNA 分子,可通过靶向调控血管生成、细胞的凋亡及炎症反应,从而对心血管疾病发挥着重要调控作用^[9]。然而,来自 BMSC-Exo 的 miR-486-5p 对心肌细胞的调控作用尚不清楚。因此,本研究构建了 miR-486-5p 慢病毒过表达载体转染 BMSC,收集其分泌的 Exo 并与缺氧损伤的原代心肌细胞共培养,以探讨 miR-486-5p 联合 BMSC 对缺血性心脏病的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

miR-486-5p 过表达慢病毒及其空载慢病毒均购自吉凯基因生物公司,miRNA 引物由上海生工生物工程公司合成。主要实验试剂和设备包括:TRIzol 试剂盒(诺唯赞 Q111-02/03)、CCK-8 试剂盒(碧云天 C0037)、细胞凋亡试剂盒(索莱宝 CA1030-20T)、胎牛血清(Gibco 12484028)、胰蛋白酶(索莱宝 T1350)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(索莱宝 PC0020-50T)、BMSC 培养基(STEM CELL Technologies 05514)、DMEM/F12 培养基(Gibco A4192001)、互补 DNA(complementary DNA, cDNA)合成试剂盒(诺唯赞 R312-01/02)、无血清培养基(中乔新舟 ZQ-1320)、 β -actin 一抗(碧云天 AF5003)、核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)一抗(碧云天 AF2155)、裂解的胱天蛋白酶-1(cleaved caspase-1)一抗(碧云天 AF1681),以及荧光显微镜(Olympus)。

1.2 实验动物

选取 8 周龄无特定病原体级成年雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只,雌性 C57BL/6J 孕鼠(孕 12~18 d)3 只,体重

(20 ± 3)g。小鼠均购于北京维通利华实验动物中心,分笼饲养于郑州大学实验动物中心,并经郑州大学动物伦理委员会审批通过(ZZU-LAC20200828[06])。

1.3 BMSC 的分离培养与鉴定

无菌条件下脱颈处死小鼠,分离后肢皮肤肌肉,取出股骨。剔除股骨附着肌肉及筋膜,剪去两端干骺端,开放骨髓腔。200 μ L 枪头剪短后置于 1.5 mL 的 EP 管内,股骨放入枪头内,800 \times g 离心 5 min,得骨髓细胞沉淀。用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞沉淀,合适浓度种入六孔板内,放入培养箱内进行培养。细胞融合至 80% 以上进行传代,传代 3 次后的细胞用作转染实验。流式细胞术检测第 3 代 BMSC 细胞表面标志物(CD29、CD44、CD105 和 Sca-1)的表达。而后参照已发表的研究方法^[10],完成小鼠 BMSC 成脂、成骨和成软骨三系分化的检测。

1.4 慢病毒载体的构建

将构建成功的 miR-486-5p 基因插入慢病毒包裹质粒 GV492 中,元件顺序为 Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin,克隆位点为 BamHI/AgeI,对照编号为 CON335,病毒保存于 -80°C 冰箱。

1.5 慢病毒转染 BMSC

取生长状态良好的 BMSC 进行慢病毒转染。细胞分为未转染慢病毒的空白对照组(Control 组)、转染慢病毒空载体组(NC 组)和转染过表达 miR-486-5p 的慢病毒组(miR-486-5p 组)。在慢病毒转染 BMSC 16 h 后,更换正常培养基继续培养,至 72 h 后,荧光显微镜观察荧光表达情况。转染成功后用嘌呤霉素筛选稳定表达的细胞株。

1.6 Exo 分离鉴定

对稳定表达细胞株进行扩大培养,待细胞密度达 80% 以上时,更换为无血清培养基,培养 24 h 后搜集上清液用于 Exo 分离。采用常规超高速离心法分离 Exo:首先 2 000 \times g 10 min 离心 2 次去除死细胞和细胞碎片,然后 10 000 \times g 离心 10 min 去除细胞器,100 000 \times g 离心 60 min 得到 Exo。根据不同的细胞来源,Exo 分为空载体 BMSC 分泌的 Exo(Exo-NC)、miR-486-5p 过表达 BMSC 分泌的 Exo(Exo-miR486)及未处理 BMSC 分泌的 Exo(Exo-Control)。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定 Exo 蛋白浓度,透射电镜来观察 Exo 的形态,纳米颗粒跟踪分析技术检测 Exo 粒径。

1.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测 Exo 中 miR-486-5p 的表达水平

使用 TRIzol 试剂并按照说明书提取各组 BMSC 所释放 Exo 的总 RNA,并将总 RNA 逆转录为 cDNA,并

以 cDNA 为模版进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应扩增。以 U6 作为内参,通过相对标准曲线法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)来计算相对表达量。引物序列 miR-486-5p 正向引物 5'-GCCGCCGACGAGCGC-3',反向引物 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3',U6 正向引物 5'-CTCGCTTGGCACA-3',反向引物 5'-AACGCTTCACGAA TTTGCGT-3'。

1.8 心肌细胞分离与培养

从妊娠 12~18 d C57BL/6J 小鼠胚胎中取 20~30 颗胎鼠心脏,并用 0.06% 胰蛋白酶进行消化,加入相同体积培养基终止消化。消化后心脏匀浆通过 100 μm 的细胞滤网进行过滤。将过滤所得的液体放入离心瓶中,1 000 r/min 离心 5 min,离心完成后用 DMEM 培养基进行重悬,接种于细胞培养皿内,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育。30 min 后成纤维细胞贴壁生长,而心肌细胞不贴壁,吸出尚未贴壁细胞悬液并重新铺板。将合适浓度心肌细胞接种入 24 孔板中,处理组使用含有 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Exo 的培养基进行培养,24 h 后细胞贴壁密度达到 60%,置于缺氧小室内通气(95% N_2 + 5% CO_2)。

1.9 心肌细胞实验分组

对不同处理心肌细胞进行分组,包括常氧培养组(Normoxia 组)、缺氧培养组(Hypoxia 组)、缺氧 + 空载体 BMSC 分泌的 Exo 组(Hypoxia + Exo-NC 组)及缺氧 + miR-486-5p 过表达 BMSC 分泌的 Exo 组(Hypoxia + Exo-miR-486 组)。

1.10 CCK-8 与 Ki67 染色检测细胞增殖

将 2×10^3 个/孔接种在 96 孔板的心肌细胞分组后培养箱培养 24 h,分别在不同时间点(0、24、48 和 72 h)向不同组别的心肌细胞中加入 100 μL CCK-8 溶液处理 2 h,并使用酶标仪在 450 nm 波长处测量吸光度。将培养至合适密度的心肌细胞用 4% 多聚甲醛进行固定,1% Triton X-100 行细胞膜渗透,1 \times 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 3 次,每次 5 min,用含 5% 的牛血清白蛋白溶液室温下封闭 30 min, Ki67 抗体孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 洗涤以除去未结合抗体。加入免疫荧光二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBS 冲洗,细胞核染色剂进行核染色,最后荧光显微镜进行观察。

1.11 流式细胞术检测心肌细胞凋亡

取不同组别的心肌细胞用胰酶消化处理后,收集细胞沉淀并用 PBS 洗涤,190 μL 细胞悬液中加入 5 μL 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V,在异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V 结合缓冲液中重悬,细胞悬液中

加入 5 μL 碘化丙啶溶液。将细胞在室温下避光孵育 15 min,然后使用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.12 活性氧检测

使用无血清培养基稀释 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA),使最终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。将稀释好的 DCFH-DA 加入培养皿中,37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 30 min。孵育完成后 PBS 进行洗涤,然后用细胞核染色剂染色细胞核,荧光显微镜进行观察。

1.13 蛋白表达量的检测

取各组心肌细胞,使用组织蛋白裂解液进行细胞裂解,并提取细胞总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳使不同分子量的蛋白质分离。分离完成后进行转膜,脱脂奶粉封闭、而后进行 β -actin、NLRP3 和 cleaved caspase-1 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。一抗孵育完成,二抗孵育 1 h。最后使用凝胶成像系统进行拍照,对蛋白质表达水平进行定量分析。

1.14 统计学方法

所有数据采用 SPSS 24.0 统计软件包进行统计学分析,均进行正态性检验和方差齐性检验,各组间总的趋势比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验法,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSC 的分离与鉴定

倒置显微镜观察 BMSC 形态发现,BMSC 贴壁生长,细胞大小均匀,呈鱼群状生长(图 1A)。流式细胞术检测结果表明,几乎所有的细胞均表达 CD29、CD44、CD105 和 Sca-1,但几乎没有细胞表达 CD34、CD45 和 CD11b(图 1B)。多向分化结果表明,BMSC 具有成骨、成脂和成软骨的分化能力(图 1C)。

2.2 miR-486-5p 过表达慢病毒转染效率验证

与 Control 组相比,NC 组和 miR-486-5p 组出现明显绿色荧光,表明转染成功(图 2)。

2.3 BMSC 上清液 Exo 鉴定

从 BMSC 培养的上清液中分离 Exo,并通过透射电镜观察到,Exo 以圆形颗粒的形式均匀地分布于视野中,并呈双层囊泡结构,见图 3A。纳米颗粒跟踪分析了 Exo 的直径大小为 50~100 nm,符合 Exo 特征,表明上清液 Exo 提取成功,见图 3B。通过实时荧光定量逆转录聚合酶链反应来验证 Exo 内 miR-486-5p 表达情况,结果发现,与 Exo-Control 和 Exo-NC 组相比,Exo-miR-486-5p 组中 miR-486-5p 表达显著升高($P < 0.05$),表明 miR-486-5p 过表达模型构建成功,见图 3C。

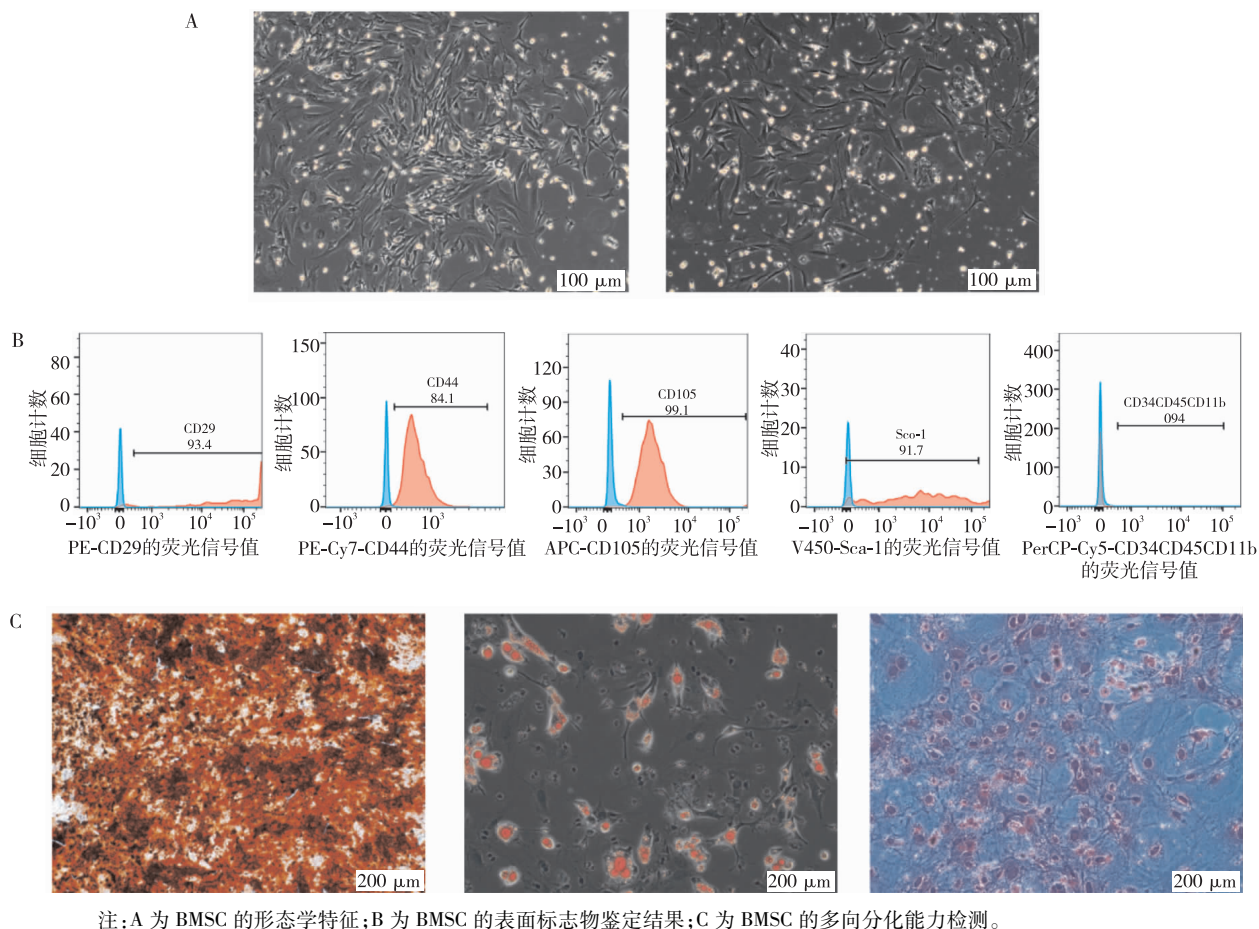
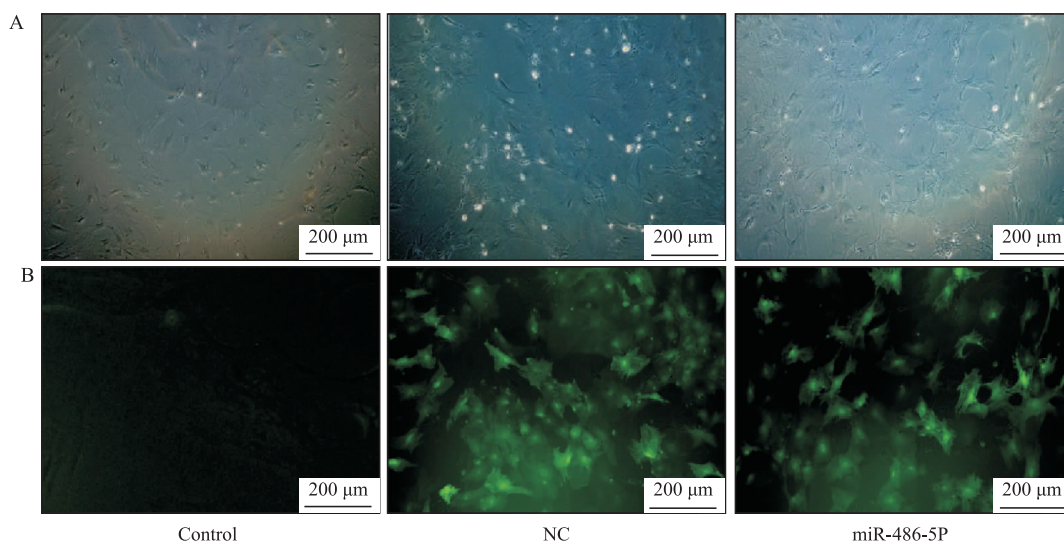


图 1 BMSC 的分离与鉴定



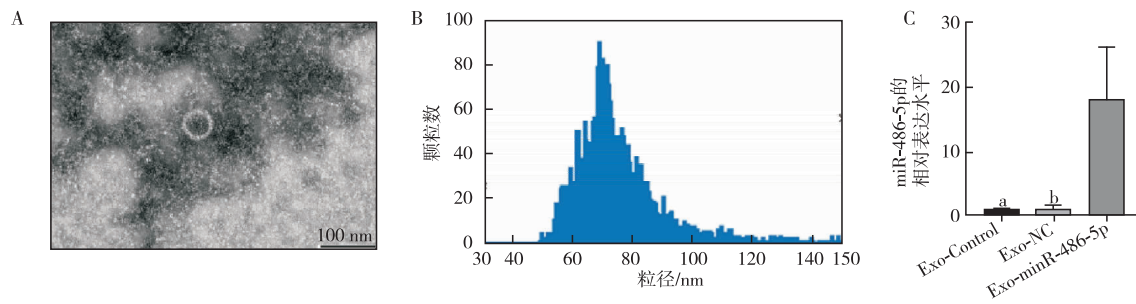
注: A 为光学显微镜图; B 为荧光显微镜图。

图 2 慢病毒转染 BMSC 荧光结果图

2.4 miR-486-5p 过表达促进缺氧处理后心肌细胞的增殖

与 Normoxia 组相比, 缺氧 24、48 和 72 h 后, Hypoxia 组心肌细胞增殖活性均显著下降 ($P < 0.05$); 与 Hypoxia + Exo-NC 组相比, 缺氧 24、48 和 72 h 后,

Hypoxia + Exo-miR-486 组心肌细胞增殖活性均明显升高 ($P < 0.05$), 见表 1。通过对缺氧 24 h 心肌细胞进行 Ki67 荧光染色同样验证了与其他组相比, 过表达 miRNA-486-5p 的 BMSC 所分泌的 Exo 能更有效地促进缺氧状态下心肌细胞的增殖 ($P < 0.05$), 见表 2。



注:A 为使用透射电子显微镜从 BMSC 培养上清液分离的 Exo 图像;B 为通过纳米测量仪分析 Exo 的尺寸大小;C 为采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测来自不同组别 BMSC-Exo 中 miR-486-5p 的相对表达量。a 表示与 Exo-miR-486-5p 组相比, $P < 0.05$; b 表示与 Exo-miR-486-5p 组相比, $P < 0.05$ 。

图 3 BMSC-Exo 的鉴定

表 1 不同缺氧时间下不同组别心肌细胞活力比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|-----------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Normoxia | 101.34 ± 4.30 | 165.16 ± 12.82 | 355.06 ± 11.55 | 711.50 ± 10.90 |
| Hypoxia | 99.32 ± 0.69 | 124.69 ± 14.12 ^a | 240.08 ± 14.96 ^a | 397.00 ± 18.57 ^a |
| Hypoxia + Exo-NC | 99.92 ± 0.32 | 133.82 ± 4.59 | 253.87 ± 1.21 ^b | 522.17 ± 1.04 ^b |
| Hypoxia + Exo-miR-486 | 100.48 ± 0.93 | 151.80 ± 33.34 | 309.82 ± 24.38 ^b | 602.52 ± 46.36 ^{bc} |

注:a 表示与 Normoxia 组比较, $P < 0.05$; b 表示与 Hypoxia 组比较, $P < 0.05$; c 表示与 Hypoxia + Exo-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 不同组别心肌细胞 Ki67 阳性细胞占比、细胞凋亡率及细胞 ROS 表达量比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | Ki67 阳性细胞占比/% | 细胞凋亡率/% | ROS 表达量 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Normoxia | 0.64 ± 0.06 | 6.10 ± 0.37 | 102.87 ± 15.59 |
| Hypoxia | 0.38 ± 0.05 ^a | 9.47 ± 0.61 ^a | 224.37 ± 24.63 ^a |
| Hypoxia + Exo-NC | 0.48 ± 0.05 ^b | 8.05 ± 0.33 ^b | 160.93 ± 9.93 ^b |
| Hypoxia + Exo-miR-486 | 0.57 ± 0.04 ^{bc} | 6.27 ± 0.23 ^{bc} | 128.95 ± 33.34 ^{bc} |

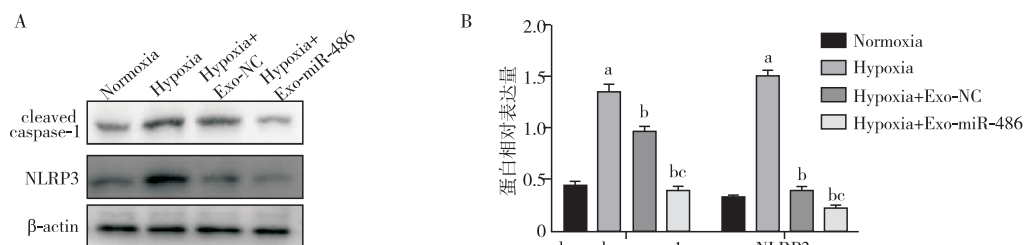
注:a 表示与 Normoxia 组比较, $P < 0.05$; b 表示与 Hypoxia 组比较, $P < 0.05$; c 表示与 Hypoxia + Exo-NC 组比较, $P < 0.05$ 。ROS, 活性氧。

2.5 miR-486-5p 过表达减少缺氧处理后心肌细胞活性氧的产生及细胞的凋亡

与 Normoxia 组相比, Hypoxia 组心肌细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的表达量及细胞的凋亡率显著增加 ($P < 0.05$), 而 Exo 可显著减少细胞 ROS 的产生及细胞的凋亡, 而与 Hypoxia + Exo-NC 组比较, Hypoxia + Exo-miR-486 组效果更佳 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.6 miR-486-5p 过表达对缺氧心肌细胞中 NLRP3/cleaved caspase-1 通路的影响

与 Normoxia 组相比, Hypoxia 组心肌细胞 NLRP3 和 cleaved caspase-1 的表达水平显著增高 ($P < 0.05$); 与 Hypoxia 组相比, Hypoxia + Exo-NC 组心肌细胞 NLRP3 和 cleaved caspase-1 的表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 Hypoxia + Exo-NC 组比较, Hypoxia + Exo-miR-486 组心肌细胞 NLRP3 和 cleaved caspase-1 的表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图 4。



注:A 为蛋白质印迹法检测心肌细胞中 NLRP3 和 cleaved caspase-1 蛋白;B 为 NLRP3 和 cleaved caspase-1 蛋白的表达水平。a 表示与 Normoxia 组比较, $P < 0.05$; b 表示与 Hypoxia 组比较, $P < 0.05$; c 表示与 Hypoxia + Exo-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 不同心肌细胞组别中 NLRP3 和 cleaved caspase-1 的表达水平

3 讨论

冠状动脉性心脏病是全球范围内最常见的疾病之一,也是导致死亡的主要原因之一^[11]。冠状动脉供血不足会导致心肌缺氧,进而引发一系列的病理生理改变,最终可能导致心肌细胞死亡,严重影响心脏功能。目前,临床上常用的治疗手段包括药物治疗、冠状动脉介入治疗等。然而以上方案仅起到延缓心力衰竭的作用,并不能从根本上防治心力衰竭的发生和发展。因此,寻找一种更有效的治疗方法来保护缺血心肌细胞、改善其不良预后具有重要的临床意义。

BMSC 是一种起源于骨髓的成体干细胞,因其具有自我更新能力及多向分化的潜能,成为干细胞治疗心肌损伤的最佳“种子细胞”。近年来的研究^[12-14]表明, BMSC 所释放的 Exo 对多种疾病具有保护作用,包括缺氧缺血性脑病、肿瘤性疾病、顺铂诱导的耳毒性及慢性肾脏病的血管钙化等。在冠状动脉性心脏病中, BMSC-Exo 在诱导心肌细胞增殖、增强毛细血管密度、抑制心肌纤维化等方面表现出色^[15]。在 Exo 所包含的多种分子中, miRNA 因其对体内的细胞生物学过程具有广泛的调节作用而备受关注^[16]。作为细胞通信的中介分子, Exo 来源的 miRNA 可降低心肌缺血再灌注损伤程度,改善心力衰竭后的心脏功能,并调节心肌梗死后的炎症反应,从而发挥其心脏保护作用^[17]。

miR-486-5p 被认为是在细胞存活中扮演重要角色的 miRNA。研究^[9]表明,含有 miR-486-5p 的 Exo 可促进小鼠心肌梗死后血管的形成。此外, miR-486-5p 还可通过 p53 介导的 Bcl-2 相关线粒体凋亡通路来调控心肌细胞凋亡^[18]。这一发现提供了 miR-486-5p 作为潜在心脏疾病治疗靶点的新线索,也为深入研究 miR-486-5p 在心脏健康和疾病中的作用机制提供了重要的启示。在本研究中,通过慢病毒转染构建 miR-486-5p 过表达的 BMSC,提取分泌的 Exo 来验证缺氧条件下不同来源 Exo 对损伤心肌的修复作用。

在缺氧条件下,心肌细胞内能量代谢紊乱、线粒体功能受损、ATP 合成减少,导致细胞增殖所需的能量供应不足。此外,缺氧会导致细胞核 DNA 损伤,影响细胞 DNA 合成和修复,细胞周期调控受阻,特别是在 G1/S 和 G2/M 期的转变受到影响,从而影响细胞的增殖^[19]。本研究同样证实了在缺氧条件下,心肌细胞的增殖受到了显著的抑制,而 Exo 的治疗可显著改善这一现象,尤其是 Exo-miR-486 效果更为显著。

缺氧状态下细胞内氧化应激反应增加,大量的自由基和氧化物质的堆积将显著影响细胞正常功能,细胞内一系列信号通路会被激活,包括线粒体途径、细胞凋亡受体途径和内质网应激等。这些信号通路会

引发一系列凋亡相关蛋白的表达和活化,并最终导致细胞凋亡与坏死^[20]。其中, ROS 已被确定为心脏疾病中重要的 NLRP3 炎症小体激活剂, ROS 过量产生可在心脏毒性中通过 NLRP3 炎症小体引起大量心肌细胞凋亡^[21-22]。本研究结果显示,在缺氧条件下心肌细胞 ROS 水平增加,这与先前的研究^[23]结果相一致。

NLRP3 炎症小体是由固有免疫受体蛋白 NLRP3、衔接蛋白和炎症蛋白酶 cleaved caspase-1 组成的胞质多蛋白复合体,能对微生物感染、内源性危险信号和环境刺激做出反应^[24-25]。既往与 NLRP3 炎症小体相关的研究主要集中在免疫反应,近年来,越来越多的证据发现 NLRP3 炎症小体在心血管疾病中发挥关键作用^[26]。研究^[27-28]表明, NLRP3 炎症小体在心脏缺血再灌注损伤、心肌梗死和动脉粥样硬化的病理过程中发挥重要作用。异丙酚可通过 PPAR γ /HMGB1/NLRP3 轴抑制炎症和凋亡,改善内毒素诱导的心肌细胞损伤^[29]。糖原合成酶激酶-3 β 可介导 NLRP3 炎症小体激活,导致大鼠心肌细胞和成纤维细胞发生凋亡^[30]。这些研究都表明 NLRP3/cleaved caspase-1 通路在心肌细胞的凋亡中具有重要的作用。在本研究中,通过蛋白质印迹法检测各组心肌细胞中 NLRP3 和 cleaved caspase-1 的表达量,流式细胞仪观察心肌细胞的凋亡。结果表明, Exo-miR-486 干预可显著减少缺氧心肌细胞中 NLRP3 和 cleaved caspase-1 的表达,这与其可减少心肌细胞中的 ROS 相对应,并可能通过该途径减少心肌细胞的凋亡。

综上所述,过表达 miR-486-5p 的 BMSC 所释放的 Exo 可促进心肌细胞的增殖,并抑制心肌细胞 ROS 的产生,其中 NLRP3/cleaved caspase-1 通路在心肌细胞生理和病理过程中起着重要调节作用。

参考文献

- [1] Zhang H, Zhao C, Jiang G, et al. Apelin rejuvenates aged human mesenchymal stem cells by regulating autophagy and improves cardiac protection after infarction[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 628463.
- [2] Matta A, Nader V, Lebrin M, et al. Pre-conditioning methods and novel approaches with mesenchymal stem cells therapy in cardiovascular disease[J]. *Cells*, 2022, 11(10): 1620.
- [3] Han Y, Li X, Zhang Y, et al. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 886.
- [4] Zou Y, Li L, Li Y, et al. Restoring cardiac functions after myocardial infarction-ischemia/reperfusion via an exosome anchoring conductive hydrogel[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(48): 56892-56908.
- [5] Sahoo S, Adamiak M, Mathiyalagan P, et al. Therapeutic and diagnostic translation of extracellular vesicles in cardiovascular diseases: roadmap to the clinic[J]. *Circulation*, 2021, 143(14): 1426-1449.
- [6] 叶莎, 杨翠玲, 郑媛媛. 骨髓间充质干细胞来源外泌体通过 PI3K/Akt 途径减轻过氧化氢诱导心肌细胞损伤[J]. *心血管病学进展*, 2022, 43(3): 269-273.

- [7] Zhan C, Liu K, Zhang Y, et al. Myocardial infarction unveiled: key miRNA players screened by a novel lncRNA-miRNA-mRNA network model[J]. *Comput Biol Med*, 2023, 160:106987.
- [8] Mompeón A, Pérez-Cremades D, Paes AB, et al. Circulating miRNA fingerprint and endothelial function in myocardial infarction: comparison at acute event and one-year follow-up[J]. *Cells*, 2022, 11(11):1823.
- [9] Li Q, Xu Y, Lv K, et al. Small extracellular vesicles containing miR-486-5p promote angiogenesis after myocardial infarction in mice and nonhuman primates[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(584):eabb0202.
- [10] Wang H, Fan M, An Y, et al. Molecular mechanism of long noncoding RNA SNHG14 in osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through the NEDD4L/FOXA2/PCP4 axis[J]. *Stem Cells Int*, 2023, 2023:7545635.
- [11] 苏未, 张颖, 马爽. 1990—2019 年中国和全球缺血性心脏病疾病负担变化趋势与发病预测分析[J]. *中国全科医学*, 2024, 27(19):2375-2381.
- [12] Yi F, Xiao H, Song M, et al. BMSC-derived exosomal miR-148b-3p attenuates OGD/R-induced HMC3 cell activation by targeting DLL4 and Notch1[J]. *Neurosci Res*, 2024, 199:36-47.
- [13] Liu SC, Cao YH, Chen LB, et al. BMSC-derived exosomal lncRNA PTENP1 suppresses the malignant phenotypes of bladder cancer by upregulating SCARA5 expression[J]. *Cancer Biol Ther*, 2022, 23(1):1-13.
- [14] Liu Y, Guo Y, Bao S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-381-3p alleviates vascular calcification in chronic kidney disease by targeting NFAT5[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3):278.
- [15] Han C, Yang J, Sun J, et al. Extracellular vesicles in cardiovascular disease: biological functions and therapeutic implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 233:108025.
- [16] Heo J, Kang H. Exosome-based treatment for atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2):1002.
- [17] Cai Y, Li Y. Upregulation of miR-29b-3p protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis by targeting TRAF5[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24:27.
- [18] Sun Y, Su Q, Li L, et al. MiR-486 regulates cardiomyocyte apoptosis by p53-mediated BCL-2 associated mitochondrial apoptotic pathway[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2017, 17(1):119.
- [19] Zhang Z, Yang J, Yan W, et al. Pretreatment of cardiac stem cells with exosomes derived from mesenchymal stem cells enhances myocardial repair[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(1):e002856.
- [20] Morales CR, Pedrozo Z, Lavandro S, et al. Oxidative stress and autophagy in cardiovascular homeostasis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3):507-518.
- [21] Songbo M, Lang H, Xinyong C, et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Toxicol Lett*, 2019, 307:41-48.
- [22] Wei S, Ma W, Li X, et al. Involvement of ROS/NLRP3 inflammasome signaling pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(5):507-519.
- [23] Rabinovich-Nikitin I, Rasouli M, Reitz CJ, et al. Mitochondrial autophagy and cell survival is regulated by the circadian Clock gene in cardiac myocytes during ischemic stress[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11):3794-3812.
- [24] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12):1012-1021.
- [25] Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9):2114-2127.
- [26] Liu D, Zeng X, Li X, et al. Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases[J]. *Basic Res Cardiol*, 2018, 113(1):5.
- [27] Peng JF, Zhao XN, Zhang M, et al. Punicalagin attenuates ventricular remodeling after acute myocardial infarction via regulating the NLRP3/caspase-1 pathway[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1):963-972.
- [28] Jin Y, Fu J. Novel insights into the NLRP3 inflammasome in atherosclerosis[J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(12):e012219.
- [29] Zhao H, Gu Y, Chen H. Propofol ameliorates endotoxin-induced myocardial cell injury by inhibiting inflammation and apoptosis via the PPAR γ /HMGB1/NLRP3 axis[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(3):176.
- [30] Wang SH, Cui LG, Su XL, et al. GSK-3 β -mediated activation of NLRP3 inflammasome leads to pyroptosis and apoptosis of rat cardiomyocytes and fibroblasts[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 920:174830.

收稿日期:2024-01-15

本刊增加论著栏目的启事

本刊 2019 年起新增论著栏目,论著投稿注意事项如下。

1. 论著文章 6 000 字以内(包括摘要、图表及参考文献);论著采用结构式摘要(含目的、方法、结果和结论),摘要篇幅以 200~400 个汉字符为宜,并有完整的英文(含文题、作者、单位、摘要和关键词);关键词以 3~8 个为宜;论著引用参考文献要求达到 20 条以上。

2. 论文如属国家自然科学基金项目或省、部级以上重点攻关课题,其他科研基金资助的项目,请在文稿首页脚注“【基金项目】xxx 科研资助项目(编号)”,如获专利请注明专利号。本刊对重大研究成果、国家自然科学基金、卫生部科研基金、省科技厅项目,将优先发表。

3. 本刊已全部实行网上投稿,请通过《心血管病学进展》杂志的稿件远程处理系统投稿(登录 <http://xxgbxzz.paperopen.com> 后,点击“作者投稿”,在“作者投稿管理平台”中投稿)。网上投稿成功后还需报送以下材料:(1)稿件处理费 50 元(可通过手机银行转账)。(2)论文投送介绍信和著作权授权书(可发电子版):来稿需经作者单位审核,应注明对稿件的审评意见、无一稿多投等学术不端行为以及其他与国家有关法律法规相违背的问题,并加盖公章。如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。(3)若此项研究为基金项目者,需附基金批文复印件(可发电子版)。

本刊编辑部