

【基础研究】

通信作者:贺 静(1980-),女,甘肃庆城人,学士,主治医师,研究方向:心肌肥厚、心肌纤维化;E-mail:hejingjh3@163.com。

PARP,cleaved caspase 3 and CDC42 protein were obviously increased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the miR-185 level,the mRNA level of ANP,BNP, β -MHC and CDC42, cell viability, apoptotic rich factor, and the expression of cleaved PARP,cleaved caspase 3 and CDC42 protein between the Ang II group and negative control group ($P > 0.05$). Compared with the Ang II group and negative control group,the level of miR-185 and cell viability were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of ANP,BNP, β -MHC and CDC42 mRNA, apoptotic rich factors, the expression of cleaved PARP,cleaved caspase 3 and CDC42 protein in the miR-185 overexpression group were significantly decreased in the miR-185 overexpression group ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-185 may reduce Ang II-mediated cardiomyocyte injury,inhibit Ang II-mediated cardiomyocyte hypertrophy,improve cardiomyocyte activity,inhibit cardiomyocyte apoptosis,and play a role in myocardial protection by down-regulating the CDC42 level of cardiomyocytes.

Key words: microRNA-185;angiotensin II ;cardiac hypertrophy;cell apoptosis;cell division cycle 42

病理性心肌肥厚是猝死、心力衰竭等心血管疾病的危险因素,其涉及心肌细胞肥大、凋亡、自噬及炎症反应等相关机制^[1]。寻找有效阻碍心肌细胞肥大和凋亡的靶分子对改善心肌肥厚具有重要意义。研究证实,微小核糖核苷酸(microRNA,miRNA)参与调控心脏疾病的发生、发展^[2],miR-185在心肌肥厚模型中表达下调^[3],但其对心肌细胞肥大及凋亡的影响尚不清楚。心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide,ANP)、脑钠肽(B-type natriuretic peptide,BNP)和 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)是心肌细胞肥大的标志物,这些指标升高表明存在心肌细胞肥大。细胞分裂周期蛋白42(cell division cycle 42,CDC42)是miR-185的一个靶分子,与心肌细胞肥大和凋亡有一定关系,其在压力超负荷的心脏和体外培养的心肌细胞中可被多种激动剂包括血管紧张素 II(angiotensin II,Ang II)和异丙肾上腺素激活,具有心肌损伤作用。活化型多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase,PARP)和活化型 caspase 3 是细胞凋亡的分子标志物。本研究通过观察 miR-185 对 Ang II 介导的心肌细胞系 H9c2 细胞中 ANP、BNP、 β -MHC 和 CDC42 mRNA 表达水平及细胞活性、细胞凋亡小体富计因子、活化型 PARP 和活化型 caspase 3 的影响,旨在探讨 miR-185 影响心肌细胞肥大及凋亡的作用机制,为 miR-185 在心脏疾病防治中的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 细胞 心肌细胞系 H9c2 细胞由中国科学院细胞库提供,冻存于含二甲基亚砜(dimethylsulfoxide,DMSO)的胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)中,液氮保存。

1.2 主要试剂与仪器 Ang II、青链霉素、达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)、FBS 购自美国 Hyclone 公司,DMSO 购自美国 Sigma 公司,miR-185 模拟物(miR-185 mimic)和 miR-185 阴性对照购自上海吉玛制药技术

有限公司,实时定量 SYBR Mix 试剂盒购自德国 Qiagen 公司,TRIzol 试剂盒、lipofactamine2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司,细胞凋亡检测试剂盒购自德国罗氏公司,细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量试剂盒、放射免疫沉淀分析(radio immunoprecipitation assay,RIPA)裂解液和胰蛋白酶细胞消化液购自上海碧云天生物技术有限公司,辣根过氧化物酶标志羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,蛋白显色液购自美国 Millipore 公司,抗 PARP、活化型 caspase 3、CDC42 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,双荧光素酶报告 miRNA 试剂盒和反转录试剂盒购自美国 Promega 公司;37 ℃ 恒温培养箱购自德国 Heraeus 公司,细胞培养板购自美国 Corning 公司,ABI 7500 聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)仪购自美国 Applied Biosystems 公司,低温高速离心机和多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 取冻存的 H9c2 细胞,37 ℃ 温水迅速融化,并悬浮于含体积分数 20% FBS 的 DMEM 中,混匀后转移至新的离心管,1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,弃培养基,沉淀的细胞加入 10 mL DMEM,混匀,接种于 10 cm 培养皿中,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 48 h 后进行细胞传代。传代 2 次后用于后续实验。

1.3.2 细胞分组及转染 取传代 2 次的 H9c2 细胞接种于 6 孔板,培养 24 h 后随机分为对照组、Ang II 处理组、阴性对照组和 miR-185 过表达组。对照组细胞采用无血清培养基培养 5 h 后更换为完全培养基,继续培养 43 h;Ang II 处理组细胞采用无血清培养基培养 5 h 后更换为完全培养基,继续培养 19 h,给予 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 处理 24 h;阴性对照组细胞采用含 50 pmol · L⁻¹ miR-185 阴性对照的无血清培养基培养 5 h,更换为完全培养基继续培养 19 h,给予 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 处理 24 h;miR-185 过表达组细胞采用含 50 pmol · L⁻¹ miR-185 mimic 的无

血清培养基培养 5 h, 更换为完全培养基继续培养 19 h, 给予 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 处理 24 h。阴性对照组和 miR-185 过表达组细胞使用的转染试剂为 lipofectamine2000。

1.3.3 实时定量 PCR 检测各组细胞中 miR-185 及 ANP、BNP、 β -MHC、CDC42 mRNA 表达 取“1.3.2 项”培养的各组细胞, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solation, PBS) 清洗 3 次, 各孔加入 1 mL TRIzol 试剂, 于冰上反应 10 min, 提取细胞总 RNA。按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。反转录体系为: $2 \times \text{PCR}$ 缓冲液 $12.5 \mu\text{L}$, cDNA $1 \mu\text{L}$, 上游引物 $0.5 \mu\text{L}$, 下游引物 $0.5 \mu\text{L}$, SYBR Green I $0.5 \mu\text{L}$, 灭菌蒸馏水 $10.0 \mu\text{L}$, 总体积为 $25 \mu\text{L}$ 。每组设置 3 个复孔, 使用 ABI 7500 PCR 仪进行实时定量, 工作程序设定为: 94°C 预热 2 min, 94°C 变性 15 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 40 个循环。以 U6 作为 miR-185 的内参, β -actin 作为 ANP、BNP、 β -MHC 和 CDC42 的内参。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的 mRNA 和 miR-185 的相对表达量。

1.3.4 CCK-8 法检测各组细胞活性 取“1.3.2 项”培养的各组细胞, 弃培养基, 各孔加入 $100 \mu\text{L}$ PBS 洗涤 2 次, 加入 $100 \mu\text{L}$ 培养基和 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液混匀; 同时设置空白孔, 加入 $100 \mu\text{L}$ 培养基和 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液; 37°C 培养箱中孵育 2 h, 采用多功能酶标仪于 450 nm 波长处测定各组细胞的吸光度值 (A), 细胞活性 (%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。其中 $A_{\text{实验组}}$ 代表对照组、Ang II 处理组、阴性对照组和 miR-185 过表达组细胞 A 值。每组设 3 个复孔, 取均值。

1.3.5 细胞凋亡检测试剂盒检测各组细胞凋亡情况 取“1.3.2 项”培养的各组细胞, 弃培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 胰蛋白酶消化后将细胞重悬于 PBS 中, $800 \times g$ 离心 10 min, 弃上清液, 加入 $200 \mu\text{L}$ 裂解液, 室温反应 30 min; $800 \times g$ 离心 10 min。取 $20 \mu\text{L}$ 上清液加至链霉亲和素包被的微孔板中, 再加入 $80 \mu\text{L}$ 免疫反应试剂 (偶联有过氧化物酶的抗-DNA 单克隆抗体、抗组蛋白-生物素、温育缓冲液, $1:1:18$ 混合), 在摇床上避光室温反应 2 h, 弃上清液, 加入 $250 \mu\text{L}$ 温育缓冲液清洗 3 次, 弃上清。加入 $100 \mu\text{L}$ 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸二铵盐, 室温孵育 45 min。另设 1 个孔, 加入 $100 \mu\text{L}$ 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸二铵盐作为空白对照孔 (不含细胞裂解液)。于 405 nm 波长处测定各孔 A 值, 每组设置 3 个复孔。结果用凋亡小体富计因子表示, 富计因子 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白对照组}}) / A_{\text{对照组}}$ 。其中 $A_{\text{实验组}}$ 代表对照组、Ang II

入理组、阴性对照组和 miR-185 过表达组细胞 A 值。富计因子越大, 表明细胞凋亡水平越高。

1.3.6 Western blot 法测定各组细胞中活化型 PARP、活化型 caspase 3 和 CDC42 蛋白表达 取“1.3.2 项”培养的各组细胞, PBS 清洗 3 次, 每孔加入 $80 \mu\text{L}$ 蛋白裂解液, 于冰上反应 15 min, 收集细胞总蛋白, BCA 法测定各组细胞的蛋白浓度。每组取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白样品, 在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (dodecyl sulfate, sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 中进行电泳分离, 采用 200 mA 恒流湿转移法将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 室温条件下采用 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白封闭 1 h, 加入抗 PARP ($1:500$)、活化型 caspase 3 ($1:500$)、CDC42 ($1:1000$) 和 β -actin ($1:5000$) 一抗, 4°C 过夜孵育, 加入羊抗兔二抗 ($1:5000$) 室温孵育 2 h, 每张膜上加入 $200 \mu\text{L}$ 显色液, 进行 X 胶片曝光显影, 采用 Image J 软件分析各条带的灰度值。实验重复 3 次, 取均值。

1.4 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组细胞中 miR-185 及 ANP、BNP、 β -MHC mRNA、CDC42 mRNA 相对表达量比较 结果见表 1。与对照组比较, Ang II 处理组和阴性对照组细胞中 miR-185 相对表达量显著下降, ANP、BNP、 β -MHC 和 CDC42 mRNA 相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Ang II 处理组与阴性对照组细胞中 miR-185 及 ANP、BNP、 β -MHC、CDC42 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 Ang II 处理组和阴性对照组比较, miR-185 过表达组细胞中 miR-185 相对表达量显著升高, ANP、BNP、 β -MHC、CDC42 mRNA 相对表达量显著下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 4 组细胞中 miR-185 及 ANP、BNP、 β -MHC、CDC42 mRNA 相对表达量比较

Tab. 1 Comparison of relative expressions of miR-185 and ANP, BNP, β -MHC and CDC42 mRNA among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

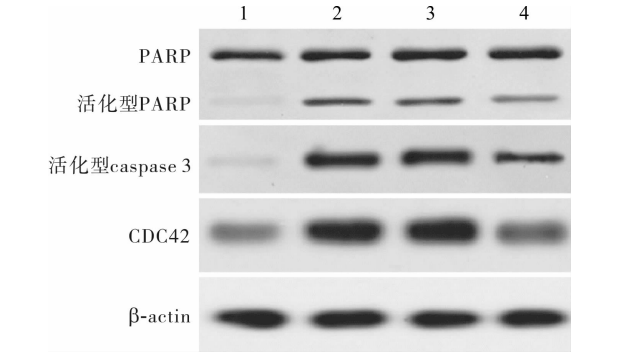
组别	<i>n</i>	miR-185	ANP mRNA	BNP mRNA	β -MHC mRNA	CDC42 mRNA
对照组	3	1.02 ± 0.02	0.96 ± 0.02	0.98 ± 0.03	1.12 ± 0.04	1.02 ± 0.03
Ang II 处理组	3	0.43 ± 0.04^a	4.62 ± 0.3^{1a}	4.16 ± 0.3^{1a}	3.67 ± 0.27^a	2.42 ± 0.15^a
阴性对照组	3	0.51 ± 0.05^a	5.08 ± 0.37^a	4.28 ± 0.46^a	4.05 ± 0.35^a	2.51 ± 0.23^a
miR-185 过表达组	3	1.78 ± 0.26^{bc}	3.01 ± 0.12^{bc}	2.49 ± 0.27^{bc}	2.16 ± 0.18^{bc}	1.68 ± 0.11^{bc}

注: 与对照组比较^a $P < 0.05$; 与 Ang II 处理组比较^b $P < 0.05$; 与阴性对照组比较^c $P < 0.05$ 。

2.2 4 组细胞活性比较 对照组、Ang Ⅱ组、阴性对照组和 miR-185 过表达组细胞活性分别为(100.03 ± 1.29)%、(43.26 ± 6.06)%、(36.18 ± 4.27)% 和 (79.28 ± 5.18)%。与对照组比较,Ang Ⅱ处理组和阴性对照组细胞活性显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。阴性对照组与 Ang Ⅱ处理组细胞活性比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 Ang Ⅱ处理组和阴性对照组比较,miR-185 过表达组细胞活性升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 4 组细胞凋亡情况比较 对照组、Ang Ⅱ处理组、阴性对照组和 miR-185 过表达组细胞凋亡小体富计因子分别为 0.12 ± 0.02、0.56 ± 0.06、0.49 ± 0.04 和 0.39 ± 0.04。与对照组比较,Ang Ⅱ处理组和阴性对照组细胞凋亡小体富计因子显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。阴性对照组与 Ang Ⅱ处理组细胞凋亡小体富计因子比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 Ang Ⅱ处理组和阴性对照组比较,miR-185 过表达组细胞凋亡小体富计因子显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 4 组细胞活化型 PARP、活化型 caspase 3 和 CDC42 蛋白相对表达量比较 结果见图 1 和表 2。与对照组比较,Ang Ⅱ处理组和阴性对照组细胞中活化型 PARP、活化型 caspase 3 和 CDC42 蛋白相对表达量显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。阴性对照组与 Ang Ⅱ处理组细胞中活化型 PARP、活化型 caspase 3 和 CDC42 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 Ang Ⅱ处理组和阴性对照组比较,miR-185 过表达组细胞中活化型 PARP、活化型 caspase 3 和 CDC42 蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:对照组;B:Ang Ⅱ处理组;C:阴性对照组;D:miR-185 过表达组。
图 1 4 组细胞中活化型 PARP、活化型 caspase 3、CDC42 蛋白的表达(Western blot)

Fig.1 Expression of cleaved PARP,cleaved caspase 3 and CDC42 protein in the four groups (Western blot)

表 2 4 组细胞中活化型 PARP、活化型 caspase 3 和 CDC42 蛋白相对表达量比较

Tab. 2 Comparison of relative expressions of cleaved PARP,cleaved caspase 3 and CDC42 protein among the four groups

组别	n	活化型 PARP	活化型 caspase 3	CDC42
对照组	3	1.02 ± 0.03	0.95 ± 0.03	1.01 ± 0.02
Ang Ⅱ处理组	3	4.26 ± 0.38 ^a	6.87 ± 0.71 ^a	3.49 ± 0.21 ^a
阴性对照组	3	3.94 ± 0.45 ^a	7.03 ± 0.61 ^a	3.28 ± 0.32 ^a
MiR-185 过表达组	3	2.38 ± 0.25 ^{bc}	4.05 ± 0.36 ^{bc}	1.54 ± 0.15 ^{bc}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 Ang Ⅱ处理组比较^b $P < 0.05$;与阴性对照组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

心肌肥厚分为生理性肥厚和病理性肥厚,生理性心肌肥厚常发生于儿童猛长期、女性孕期及运动员,病理性心肌肥厚是由长期的压力负荷导致异常血流动力学应激、高血压、心肌梗死等因素引起。早期心肌肥厚有利于维持正常心功能,但肥厚的心肌耗氧量增加,心肌顺应性降低,故长期病理性心肌肥厚会引起心律失常、心力衰竭或者猝死,增加患者死亡风险。研究证实,靶向抑制病理性心肌肥厚能够有效改善心功能^[4],因此,如何阻碍心肌肥厚的发生、发展已成为研究热点。心肌肥厚的发生机制复杂,除压力负荷外,交感神经兴奋性增强、肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活、胰岛素抵抗、自噬及氧化应激均参与心肌肥厚的发展过程^[5-6]。目前,研究者着重于探索能够靶向阻碍心肌细胞肥大的分子或者药物,Ang Ⅱ处理心肌细胞能够建立体外心肌肥厚模型,可用于心肌肥厚发生机制的研究^[7]。Ang Ⅱ是 Ang I 在血管紧张素转化酶作用下产生的一种多肽物质。有研究证实,Ang Ⅱ通过激活血管紧张素受体 1,经 Ca²⁺-磷脂依赖性蛋白激酶途径,使细胞内 Ca²⁺浓度增加,导致心脏后负荷增加,引起心肌肥厚^[8]。在 Ang Ⅱ介导的心肌细胞损伤中,心肌细胞肥大的标志因子 ANP、BNP 和 β-MHC 表达显著上调^[9-10]。本研究中,Ang Ⅱ处理组细胞中 ANP、BNP 和 β-MHC mRNA 相对表达量较对照组显著升高,提示 Ang Ⅱ成功诱导了心肌细胞肥大;阴性对照组细胞中 ANP、BNP 和 β-MHC mRNA 相对表达量与Ang Ⅱ处理组比较差异无统计学意义,表明细胞转染 miR-185 阴性对照对 Ang Ⅱ造成的心肌细胞肥大无明显影响。

MiRNA 是一类长度约 20 ~ 24 个核苷酸的小

RNA, 研究显示, miRNA 能够作为疾病诊断及预后判断的标志物, 同时, miRNA 参与调控心血管疾病、肿瘤等多种疾病的发生、发展^[11]。研究发现, miR-185 通过调控癌细胞增殖、凋亡、自噬、侵袭和迁移而参与癌症的发生和发展^[12-13]。有研究证实, Ang II 处理心肌成纤维细胞可导致细胞中 miR-185 表达水平下调^[14]。目前, miR-185 对 Ang II 介导的心肌细胞肥大的作用机制尚不明确。因此, 本研究就 miR-185 对 Ang II 介导的心肌细胞系 H9c2 细胞肥大的作用进行探讨, 结果显示, Ang II 处理组细胞中 miR-185 表达较对照组下调, 提示 miR-185 可能参与调控 Ang II 介导的心肌细胞损伤; Ang II 处理组与阴性对照组细胞中 miR-185 相对表达量比较差异无统计学意义, 表明细胞转染 miR-185 阴性对照对 miR-185 表达无明显影响; 同时, 与 Ang II 处理组和阴性对照组比较, miR-185 过表达组细胞中 miR-185 相对表达量显著升高, 而 ANP、BNP 和 β -MHC mRNA 相对表达量下降, 提示过表达 miR-185 可以抑制 Ang II 介导的心肌细胞肥大。

Ang II 通过促进心肌细胞肥大、成纤维细胞增殖而参与心脏重构。体外实验研究证实, Ang II 能够诱导心肌细胞凋亡^[15], 在体内应用血管紧张素转换酶抑制剂可以阻止心肌细胞凋亡^[16]。细胞凋亡是心血管疾病中一个重要的病理过程, 阻止或者减少心肌细胞凋亡是保护心肌细胞、改善心功能的一个重要措施。有研究显示, miR-185 促进肺上皮细胞凋亡^[17]; 但在内质网应激介导的心肌细胞损伤模型中, 过表达 miR-185 可抑制心肌细胞凋亡^[18]; 这些研究表明, miR-185 对不同细胞的作用不完全一致。Caspase 家族成员在细胞凋亡中具有重要作用, 其家族成员主要包括凋亡启动因子和凋亡执行因子。Caspase 3 是关键的凋亡执行因子, 是细胞凋亡过程中的主要效应因子, 其活化是凋亡进入不可逆阶段的标志。活化型 caspase 3 能够对其底物进行切割, PARP 就是活化型 caspase 3 的底物之一, 被活化型 caspase 3 切割后, 得到的活化型 PARP 也是细胞凋亡早期标志因子^[19-20]。因此, 可以通过测定活化型 caspase 3 和活化型 PRAP 来评价细胞凋亡水平。本研究结果显示, Ang II 处理组细胞较对照组细胞活性降低, 细胞凋亡小体富计因子显著升高, 活化型 caspase 3 和活化型 PARP 蛋白表达水平上调, 表明 Ang II 可以降低心肌细胞活性, 诱导心肌细胞凋亡; 阴性对照组与 Ang II 处理组细胞活性及细胞中凋亡小体富计因子、活化型 caspase 3 和活化型 PARP 蛋白表达

水平比较差异无统计学意义, 表明细胞转染 miR-185 阴性对照对 Ang II 造成的心肌细胞活性降低和凋亡无影响; 与 Ang II 处理组和阴性对照组比较, miR-185 过表达组细胞活性增高, 细胞凋亡小体富计因子显著降低, 活化型 caspase 3 和活化型 PARP 蛋白表达下调, 提示 miR-185 过表达可以改善 Ang II 导致的心肌细胞活性降低, 抑制心肌细胞凋亡。

CDC42 是肾素-血管紧张素系统同系物家族成员之一, 具有心肌损伤作用。与野生型小鼠相比, 特异性敲除心脏 CDC42 的小鼠在第 2、8 周心肌肥厚程度加重, 并很快转变为心力衰竭^[21]。胚胎心肌细胞 CDC42 缺失会导致右心室发育不良^[22], 且 CDC42 可促进缺血再灌注诱导的心肌细胞凋亡^[23]。CDC42 在压力超负荷的心脏和体外培养的心肌细胞中可被多种激动剂包括 Ang II 和异丙肾上腺素激活。本研究发现, 与对照组比较, Ang II 处理组细胞中 CDC42 mRNA 和蛋白相对表达量显著增高, 提示 CDC42 参与 Ang II 介导的细胞损伤; 阴性对照组细胞中 CDC42 mRNA 和蛋白相对表达量与 Ang II 组比较差异无统计学意义, 表明细胞转染 miR-185 阴性对照对 Ang II 造成的 CDC42 mRNA 和蛋白表达无明显影响; 与 Ang II 处理组和阴性对照组比较, miR-185 过表达组细胞中 CDC42 mRNA 和蛋白相对表达量显著下调, 表明 miR-185 能够抑制 CDC42 表达。

综上所述, miR-185 可能通过下调心肌细胞 CDC42 水平来减轻 Ang II 介导的心肌细胞损伤, 抑制 Ang II 介导的心肌细胞肥大, 改善心肌细胞活性, 抑制心肌细胞凋亡, 从而发挥心肌保护作用。

参考文献:

- [1] MAKAVOS G, KAPPAAIRIS C, TSELEKIDIS M E, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: an updated review on diagnosis, prognosis, and treatment[J]. *Heart Fail Rev*, 2019, 24(4): 439-459.
- [2] PINTI M V, HATHAWAY Q A, HOLLANDER J M. Role of microRNA in metabolic shift during heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312(1): H33-H45.
- [3] CHENG Y, JI R, YUE J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy[J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(6): 1831-1840.
- [4] GESMUNDO I, MIRAGOLI M, CARULLO P, et al. Growth hormone-releasing hormone attenuates cardiac hypertrophy and improves heart function in pressure overload-induced heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(45): 12033-12038.
- [5] 王卓, 司澳洋, 刘亚坤, 等. 抵抗素通过酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导子和转录激活子 3 信号通路诱导心肌细胞肥厚的分子机制研究[J]. *新乡医学院学报*, 2017, 34(4): 265-269.
- [6] 肖坤. 心肌肥厚的发病机制与治疗现状[J]. *赣南医学院学报*,

2017,37(3):495-500.

[7] SHENG Z,XU Y,LI F, *et al.* CSN5 attenuates Ang II-induced cardiac hypertrophy through stabilizing LKB1 [J]. *Exp Cell Res*, 2019,376(1):11-17.

[8] TANAKA Y,OBATA K,OHMORI T, *et al.* Angiotensin II induces automatic activity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium through activation of the IP3 receptor and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(7):E1768.

[9] YU X J,HUANG Y Q,SHAN Z X, *et al.* MicroRNA-92b-3p suppresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy via targeting HAND2[J]. *Life Sci*,2019,232:116635.

[10] DONG Z X,WAN L,WANG R J, *et al.* (-)-Epicatechin suppresses angiotensin II-induced cardiac hypertrophy via the activation of the SPI1/SIRT1 signaling pathway[J]. *Cell Physio Biochem*,2017,41(5):2004-2015.

[11] PARIZADEH S M,JAFARZADEH-ESFEHANI R,GHANDEHARI M, *et al.* Circulating and tissue microRNAs as biomarkers for ovariancancer prognosis[J]. *Curr Drug Targets*,2019,20(14):1447-1460.

[12] CHENG J Z,CHEN J J,WANG Z G, *et al.* MicroRNA-185 inhibits cell proliferation while promoting apoptosis and autophagy through negative regulation of TGF-β/mTOR axis and HOXC6 in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2018,23(1):107-123.

[13] LI L,WANG X,LIU D. MicroRNA-185 inhibits proliferation, migration and invasion in human osteosarcoma MG63 cells by targeting vesicle-associated membrane protein 2 [J]. *Gene*, 2019, 696:80-87.

[14] JIANG X,NING Q,WANG J. Angiotensin II induced differenti-

ally expressed microRNAs in adult rat cardiac fibroblasts[J]. *J Physiol Sci*,2013,63(1):31-38.

[15] WANG X,YANG C,LIU X, *et al.* Ghrelin alleviates angiotensin II-induced H9c2 apoptosis; impact of the miR-208 family[J]. *Med Sci Monit*,2018,24:6707-6716.

[16] 柳培雨,田毅. 血管紧张素转换酶抑制剂与心肌缺血再灌注的细胞凋亡[J]. *医学与哲学*,2010,31(9):41-43.

[17] ZHANG D,LEE H,CAO Y, *et al.* miR-185 mediates lung epithelial cell death after oxidative stress[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2016,310(7):700-710.

[18] KIM J O,KWON E J,SONG D W, *et al.* miR-185 inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by targeting Na⁺/H⁺ exchanger-1 in the heart[J]. *BMB Rep*,2016,49(4):208-213.

[19] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. *Annual Rev Immunol*,2018,36(1):489-517.

[20] WEI Q,DENG H,CUI H, *et al.* A mini review of fluoride-induced apoptotic pathways[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*,2018, 25(34):33926-33935.

[21] MAILLET M,LYNCH J M,SANNA B, *et al.* Cdc42 is an antihypertrophic molecular switch in the mouse heart[J]. *J Clin Invest*,2009,119(10):3079-3088.

[22] LIU Y,WANG J,LI J, *et al.* Deletion of Cdc42 in embryonic cardiomyocytes results in right ventricle hypoplasia [J]. *Clin Transl Med*,2017,6(1):40.

[23] XU X,KONG L,SONG X, *et al.* Effect of Cdc42 on myocardial ischemia-reperfusion of rats[J]. *Cell Mol Biology*,2017,63(7):31-34.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)

(上接第 1023 页)

[13] GAO S,MCMILLAN R P,ZHU Q, *et al.* Therapeutic effects of adropin on glucose tolerance and substrate utilization in diet-induced obese mice with insulin resistance[J]. *Mol Metab*,2015,4(4):310-324.

[14] NIU H,WANG J,LI H, *et al.* Rapamycin potentiates cytotoxicity by docetaxel possibly through downregulation of Survivin in lung cancer cells[J]. *J Exp Clin Canc Res*,2011,30(1):28.

[15] BAÑOS R M,OLIVER E,NAVARRO J, *et al.* Efficacy of a cognitive and behavioral treatment for childhood obesity supported by the ETIOBE web platform[J]. *Psychol Health Med*,2019,24(6):703-713.

[16] 刘群,陈莎莎,刘守胜,等. Adropin 在非酒精性脂肪性肝病中的研究进展[J]. *中国肝病杂志:电子版*,2018,10(2):12-16. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-7380. 2018. 02. 002.

[17] 柏雪,王建萍,丁雪梅,等. 氨基酸缺乏诱导细胞自噬的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 C1 信号通路机制研究进展[J]. *动物营养学报*,2017,29(3):28-33.

[18] ZHANG Q,WANG D,ZHANG H, *et al.* Detection of autophagy processes during the development of nonarticulated laticifers in *Euphorbia kansui* Liou[J]. *Planta*,2018,247(4):845-861.

[19] 李蓉,杜军辉,姚杨,等. 血管内皮细胞生长因子抑制剂对视网膜血管内皮细胞自噬的促进作用[J]. *眼科新进展*,2018, 38(10):935-939.

[20] 杨万霞,苏强,邢爱华,等. 饥饿对 Beclin-1 依赖的 Ana-1 细胞自噬和凋亡的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*,2018,44(4):18-22.

[21] MAEJIMA Y,ISOBE M,SADOSHIMA J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*. 2016,95(1):19-25.

[22] 魏砚明. 多种细胞自噬调节剂对自噬标记物 LC3 II 及 p62 表达的影响[J]. *中国药科大学学报*,2018,49(3):341-347.

[23] ZHANG Y,GENG Y,HE J, *et al.* Tanshinone II A induces apoptosis and autophagy in acute monocytic leukemia via downregulation of PI3K/Akt pathway[J]. *Am J Transl Res*,2019,11(5):2995-3006.

[24] KIM K Y,PARK K I,KIM S H, *et al.* Inhibition of autophagy promotes salinomycin-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated PI3K/AKT/mTOR and ERK/p38 MAPK-dependent signaling in human prostate cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*,2017, 18(5):1088.

[25] GAO F,FANG J,CHEN F, *et al.* Enho mutations causing low adropin: a possible pathomechanism of MPO-ANCA associated lung injury[J]. *Ebiomedicine*,2016,9:324-335.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)