

# miR-22-3p 靶向调控 PLAGL2 保护 OGD/R 诱导的心肌细胞损伤机制研究

陈玥璇 汪璐 柳华锋

**[摘要]** 目的 探讨 miR-22-3p 在氧-糖剥夺/复氧(OGD/R)心肌细胞铁死亡中的作用及机制。方法 大鼠心肌细胞系 H9c2 采用 OGD/R 处理以及转染 miR-22-3p 模拟物(miR-22-3p mimic)。细胞根据是否缺氧及有无转染分为常氧组、OGD/R 组、OGD/R+ miRNA 模拟物阴性对照(miRNA-NC 组)和 OGD/R+miR-22-3p 组。采用细胞计数(CCK-8)法检测细胞活力,酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测 H9c2 细胞中铁死亡指标水平,Western blot 检测谷胱甘肽过氧化物酶 4(Gpx4)及多形性腺瘤基因样蛋白 2(PLAGL2)蛋白表达,双荧光素酶报告实验验证 miR-22-3p 和 PLAGL2 靶向关系。结果 OGD/R 处理 H9c2 细胞后,第 4 天的吸光度值低于常氧组,活性氧(ROS)及丙二醛(MDA)水平、Fe<sup>2+</sup>的积累明显高于常氧组,miR-22-3p 水平明显低于常氧组( $t$  分别=3.78、4.24、2.54、4.47、3.53,  $P$  均 <0.05),H9c2 细胞转染 miR-22-3p mimic 及 OGD/R 处理后,第 3、4 天的吸光度值高于 miR-NC+OGD/R 组( $t$  分别=2.98、1.97、2.57、2.46,  $P$  均 <0.05),细胞 MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup>明显低于 OGD/R+miR-NC 组( $t$  分别=2.62、5.35、4.11,  $P$  均 <0.05),Gpx4 表达水平高于 OGD/R+miR-NC 组。Fer-1 和 OGD/R 处理 H9c2 细胞后,第 3、4 天的细胞吸光度值明显高于 OGD/R 组( $t$  分别=3.12、3.36,  $P$  均 <0.05),细胞 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup>水平显著低于 OGD/R 组( $t$  分别=3.03、5.33、2.48,  $P$  均 <0.05)。H9c2 细胞转染 miR-22-3p 组的 PLAGL2 蛋白表达明显低于 miR-NC 组,且 PLAGL2-WT+miR-22-3p 组的荧光素酶活性明显低于 PLAGL2-MUT+miR-22-3p 组( $t$ =2.69,  $P$ <0.05)。H9c2 细胞共转染 miR-22-3p mimic 和 PLAGL2 过表达质粒后,Gpx4 表达低于 OGD/R+miR-22-3p 组,吸光度值明显低于 OGD/R+miR-22-3p 组( $t$  分别=3.91、3.12,  $P$  均 <0.05),MDA、Fe<sup>2+</sup>、ROS 水平高于 OGD/R+miR-22-3p 组( $t$  分别=3.78、3.87、3.05,  $P$  均 <0.05)。结论 miR-22-3p 靶向调控 PLAGL2 表达抑制铁死亡,进而降低 OGD/R 诱导的心肌细胞损伤。

**[关键词]** miR-22-3p; PLAGL2; OGD/R; 心肌细胞; 铁死亡

**Study on mechanism of miR-22-3p protection against OGD/R-induced cardiomyocyte injury by targeting PLAGL2** CHEN Yuexuan, WANG Lu, LIU Huafeng. Department of Emergency, Hangzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310007, China.

**[Abstract]** **Objective** To study the role of miR-22-3p in oxygen and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) induced myocardial cell injury and the mechanism. **Methods** Rat myocardial cell line H9c2 was cultured upon OGD/R and transfected with miR-22-3p mimic. Based on the presence or absence of hypoxia and transfection, cells were divided into normal oxygen group, OGD/R group, OGD/R+ miRNA-NC group, and OGD/R+miR-22-3p mimic group. Cell viability and ferroptosis markers were detected by CCK-8 and ELISA methods. The expression of Gpx4 and PLAGL2 proteins were detected by western blot. Dual luciferase reporting assay verified the targeting relationship between miR-22-3p and PLAGL2. **Results** After OGD/R treatment, the absorbance value of H9c2 cells on 4th day was lower than that of the normal oxygen group, the accumulation of ROS, MDA and Fe<sup>2+</sup> was significantly higher than that of the normal oxygen group, the level of miR-22-3p was significantly lower than that of the normal oxygen group ( $t$ =3.78, 4.24, 2.54, 4.47, 3.53,  $P$ <0.05). After transfected with miR-22-3p mimic and subjected to OGD/R in H9c2 cells, the absorbance was higher than that of miR-NC+OGD/R group at third and fourth day ( $t$ =2.98, 1.97, 2.57, 2.46,  $P$ <0.05). MDA, ROS and Fe<sup>2+</sup> were significantly lower than those in OGD/R+miR-NC group ( $t$ =2.62, 5.35, 4.11,  $P$ <0.05), and Gpx4 expression level was higher than that in OGD/R+miR-NC group. After Fer-1 and OGD/R treatment, the absorbance of H9c2 cells at third and fourth day was significantly higher than

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2023.009.005

作者单位:310007 浙江杭州,杭州市中医院急诊科

that of OGD/R group ( $t=3.12, 3.36, P<0.05$ ). The levels of MDA, ROS and  $Fe^{2+}$  were significantly lower than those of OGD/R group ( $t=3.03, 5.33, 2.48, P<0.05$ ). The PLAGL2 protein expression in H9c2 cells transfected with miR-22-3p group was significantly lower than that of miR-NC group. The luciferase activity in PLAGL2-WT+miR-22-3p group was significantly lower than that of PLAGL2-MUT+miR-22-3p group ( $t=2.69, P<0.05$ ). After co-transfected with miR-22-3p mimic and PLAGL2 overexpression plasmid, the Gpx4 expression in H9c2 cells was lower than that of OGD/R+miR-22-3p group, and the absorbance was significantly lower than that of OGD/R+miR-22-3p group ( $t=3.91, 3.12, P<0.05$ ). The levels of MDA,  $Fe^{2+}$  and ROS were higher than those of OGD/R+miR-22-3p group ( $t=3.78, 3.87, 3.05, P<0.05$ ).

**Conclusion** miR-22-3p inhibits ferroptosis and reduces OGD/R-induced myocardial cell injury via targeting PLAGL2.

**[Key words]** miR-22-3p; PLAGL2; OGD/R; cardiomyocytes; ferroptosis

心肌缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤是指急性冠状动脉闭塞后,再灌注导致更严重的心肌损伤,是影响心肌梗死患者预后的重要因素<sup>[1]</sup>。铁死亡是一种新型的调节性细胞死亡,其特征是铁依赖的脂质过氧化物累积,在心肌缺血等多种疾病中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。微小RNA (microRNAs, miRNAs) 在转录后水平调控基因表达,参与调控细胞增殖、分化、凋亡和自噬等过程。有研究表明 miR-22-3p 可作为诊断冠心病的特异性生物标志物<sup>[3]</sup>,然而 miR-22-3p 在 I/R 损伤期间对于心肌细胞损伤的保护机制尚不清楚。因此,本次研究探讨了 I/R 过程中 miR-22-3p 对心肌细胞保护的分子机制。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 本次研究起止时间为2022年8月至2023年4月,采用购自武汉普诺赛生命科技有限公司的大鼠心肌细胞系 H9c2 作为研究对象。所有实验操作均在杭州市中医院实验室进行。

1.2 细胞培养和转染 H9c2 细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 g/ml 链霉素的 DMEM 培养液中,置于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中培养。转染方法参考 Lipofectamine™2 000 转染说明书,转染 48 h 后收集细胞用于后续实验。

1.3 氧糖剥夺/复氧 (oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 体外细胞模型构建 H9c2 细胞根据是否缺氧分为常氧组、OGD/R 组,根据是否转染 miR-22-3p mimic 分为 OGD/R 组+miR-NC 组,OGD/R+miR-22-3p 组,根据是否共转染 miR-22-3p mimic 和 Fer-1 分为 OGD/R+Fer-1 组和 OGD/R+Fer-1+miR-22-3p 组,根据是否共转染 miR-22-3p mimic 和 PLAGL2 过表达质粒分为 OGD/R+miR-22-3p 组和 OGD/R+miR-22-3p+PLAGL2 组。OGD/R 处理方法如下:H9c2 细胞在血清和无糖 DMEM 中

培养,含有 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 和 94% N<sub>2</sub>, 37 °C 下培养 6 h。缺氧后,细胞在正常生长条件下 (5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气) 的完全培养基中再培养 12 h。常氧组细胞在正常生长条件下,用完全 DMEM 培养液培养。本次实验为验证 miR-22-3p 对铁死亡的调控,H9c2 细胞用 60 nmol/L 铁死亡抑制剂 Fer-1 进行预处理 24 h,然后用 OGD (6 h)/R (12 h) 处理。

1.4 CCK-8 检测细胞活力 将 H9c2 细胞以  $1 \times 10^4$  细胞/孔的密度接种到 96 孔板中。OGD/R 处理 18 h 后,根据说明书要求,使用 CCK-8 试剂盒检测分别在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的细胞活力。每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液,在 37 °C 孵育 3 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

1.5 实时定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 用 Nanodrop 检测从 H9c2 细胞中分离的 RNA 浓度和纯度。逆转录体系为 1  $\mu$ l oligo (dT) Primer,用 ddH<sub>2</sub>O 补充至 10  $\mu$ l,逆转录程序为 37 °C, 15 min, 85 °C, 5 s。qRT-PCR 反应体系, 12.5  $\mu$ l SYBR Premix Ex Taq II, 1  $\mu$ l cDNA 和上下游引物各 0.5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 补充至 25  $\mu$ l。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算 miR-22-3p 相对表达量,U6 作为内参。引物如下所示: miR-22-3p: 5'-AAGCUGCCGUUGAAGAACUGU-3' (正向), 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (反向); U6: 5'-AACCTTATATCGGGCGGGA-3' (正向), 5'-TTACGGCGATGCATAAT-3' (反向)。

1.6 铁死亡水平测定 取细胞悬液,用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞 1~2 次。通过反复冻融,使细胞破坏并放出细胞内成份。4 °C, 2 500 r/min 离心 20 min,弃沉淀、取上清。根据试剂盒说明书,测定细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、 $Fe^{2+}$  水平。

1.7 双荧光素酶报告基因实验 借助 TargetScan7.1 ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)) 网站用于预测 miR-22-3p 与 PLAGL2 的靶向结合位点。含有预测 miR-22-3p 结合位点的报告载体 pmiRGLO-PLAGL2 野生型质粒 (PLAGL2-WT) 或 miRGLO-PLAGL2 突变型质粒 (PLAGL2-MUT)。使用 Lipofectamine 2 000 进行 miR-22-3p mimic 与 PLAGL2 质粒共转染, 并分为 PLAGL2-WT+miR-22-3p 组和 PLAGL2-MUT-miR-22-3p 组。48 h 后, 用双荧光素酶报告基因检测系统测定荧光素酶活性。

1.8 Western blot 检测 Gpx4 蛋白 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 再用 10% SDA-PAGE 进行电泳, 转移至 PVDF 膜上。室温下使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, PVDF 膜与一抗 PLAGL2 (1:1000)、Gpx4 (1:1000) 或  $\beta$ -actin (1:10000) 4 °C 过夜孵育。TBST 洗膜, 使用兔二抗 (1:5000) 孵育 1 h。TBST 洗膜, 使用 ECL 试剂检测蛋白信号。

1.9 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。组间计量资料比较采用 *t* 检验; 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。设  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 OGD/R 诱导 H9c2 细胞后不同时间的吸光度值比较见表 1

表 1 OGD/R 诱导 H9c2 细胞后不同时间的吸光度值比较

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
OGD/R 组	0.17 $\pm$ 0.04	0.20 $\pm$ 0.13	0.31 $\pm$ 0.27	0.42 $\pm$ 0.34*
常氧组	0.18 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.25	0.55 $\pm$ 0.42	0.78 $\pm$ 0.38

注: \* 与常氧组比较,  $P < 0.05$ 。

由表 1 可见, OGD/R 组 H9c2 细胞在第 1 天、第 2 天和第 3 天的吸光度值与常氧组比较, 差异均无统计学意义 ( $t$  分别=0.21、0.86、0.25,  $P$  均  $> 0.05$ ), OGD/R 组 H9c2 细胞在第 4 天的吸光度值低于常氧组, 差异有统计学意义 ( $t=3.78, P < 0.05$ )。

2.2 OGD/R 诱导 H9c2 细胞后 ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup> 及 miR-22-3p 水平比较见表 2

表 2 OGD/R 诱导 H9c2 细胞后 ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup> 及 miR-22-3p 水平比较

组别	ROS/ng/L	MDA/nmol/L	Fe <sup>2+</sup> /nmol/L	miR-22-3p
OGD/R 组	380.45 $\pm$ 5.64*	3.22 $\pm$ 0.76*	20.56 $\pm$ 4.35*	0.15 $\pm$ 0.02*
常氧组	55.56 $\pm$ 2.15	0.26 $\pm$ 0.20	4.95 $\pm$ 1.02	0.57 $\pm$ 0.13

注: \* 与常氧组比较,  $P < 0.05$ 。

由表 2 可见, OGD/R 组 H9c2 细胞 ROS 及 MDA 水平、Fe<sup>2+</sup> 的积累明显高于常氧组, miR-22-3p 水平明显低于常氧组, 差异均有统计学意义 ( $t$  分别=4.24、2.54、4.47、3.53,  $P$  均  $< 0.05$ )。

2.3 Western blot 检测 OGD/R 诱导 H9c2 细胞后 Gpx4 蛋白水平见图 1

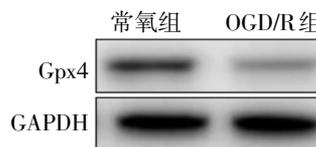


图 1 Western blot 检测 OGD/R 诱导 H9c2 细胞后 Gpx4 蛋白水平

由图 1 可见, Western blot 实验进一步证实, Gpx4 蛋白表达在 OGD/R 组明显降低。

2.4 H9c2 细胞中 miR-22-3p mimic 转染效率 miR-22-3p 组的 miR-22-3p 表达水平 (3.56 $\pm$ 0.43), 明显高于 OGD/R+miR-NC 组 (0.23 $\pm$ 0.14), 差异有统计学意义 ( $t=3.25, P < 0.05$ )。

2.5 H9c2 细胞 OGD/R 处理及转染 miR-22-3p mimic 后吸光度值比较见表 3

表 3 H9c2 细胞 OGD/R 处理及转染 miR-22-3p mimic 后吸光度值比较

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
常氧组	0.13 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.15	0.59 $\pm$ 0.22	0.82 $\pm$ 0.28
OGD/R 组	0.14 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.10	0.32 $\pm$ 0.25*	0.43 $\pm$ 0.24*
OGD/R+miR-NC 组	0.15 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.13	0.33 $\pm$ 0.20	0.44 $\pm$ 0.21
OGD/R+miR-22-3p 组	0.14 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.15	0.45 $\pm$ 0.16 <sup>#</sup>	0.66 $\pm$ 0.19 <sup>#</sup>

注: \* 与常氧组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>#</sup>: 与 OGD/R+miR-NC 组比较,  $P < 0.05$ 。

由表 3 可见, 各组在第 1 天和第 2 天吸光度值比较, 差异均无统计学意义 ( $F$  分别=0.88、0.22,  $P$  均  $> 0.05$ ), 第 3 天和第 4 天, OGD/R 组吸光度值高于常氧组, OGD/R+miR-22-3p 组吸光度值高于 OGD/R+miR-NC 组, 差异均有统计学意义 ( $t$  分别=2.98、1.97、2.57、2.46,  $P$  均  $< 0.05$ )。

2.6 H9c2 细胞中转染 miR-22-3p mimic 后 ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup> 水平比较见表 4

由表 4 可见, OGD/R 组 H9c2 细胞中 MDA、ROS 水平、Fe<sup>2+</sup> 的积累明显高于常氧组, 差异均有统计学意义 ( $t$  分别=3.33、2.47、2.03,  $P$  均  $< 0.05$ ), 而 OGD/R+miR-22-3p 组 MDA、ROS 水平、Fe<sup>2+</sup> 的积累明显低于

OGD/R+miR-NC组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=2.62、5.35、4.11,  $P$ 均 $<0.05$ )。

表4 H9c2细胞中转染miR-22-3p mimic后ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup>水平比较

组别	ROS/ng/L	MDA/nmol/L	Fe <sup>2+</sup> /nmol/L
常氧组	58.35± 2.15	0.31±0.16	2.45±0.17
OGD/R组	390.45± 8.24*	3.14±0.42*	20.63±5.14*
OGD/R+miR-NC组	386.58±14.18	2.84±0.80	17.27±4.52
OGD/R+miR-22-3p组	166.38±11.64 <sup>#</sup>	1.24±0.15 <sup>#</sup>	8.35±4.31 <sup>#</sup>

注: \*:与常氧组比较,  $P<0.05$ ; <sup>#</sup>:与OGD/R+miR-NC组比较,  $P<0.05$ 。

2.7 H9c2细胞中转染miR-22-3p mimic后Gpx4表达水平比较见图2



图2 Western blot检测H9c2细胞中Gpx4蛋白表达

由图2可见,OGD/R组Gpx4表达水平下调,而OGD/R+miR-22-3p组Gpx4表达水平显著上调。

2.8 OGD/R后细胞转染miR-22-3p mimic和Fer-1处理后吸光度值比较见表5

由表5可见,第1天和第2天,各组间吸光度值比较,差异均无统计学意义( $F$ 分别=0.04、0.32,  $P$ 均 $>0.05$ )。第3天和第4天,OGD/R组吸光度值低于常氧组( $t$ 分别=4.66、3.21,  $P$ 均 $<0.05$ ),OGD/R+Fer-1组吸光度值明显高于OGD/R组( $t$ 分别=3.12、3.36,  $P$ 均 $<0.05$ )。而OGD/R+ Fer-1+miR-22-3p组吸光度值与OGD/R+Fer-1组比较,差异均无统计学意义( $t$ 分别=0.31、1.06,  $P$ 均 $>0.05$ )。

表5 OGD/R后细胞转染miR-22-3p mimic和Fer-1处理后吸光度值比较

组别	第1天	第2天	第3天	第4天
常氧组	0.22±0.02	0.35±0.05	0.62±0.17	0.88±0.18
OGD/R组	0.20±0.05	0.25±0.10	0.42±0.19*	0.53±0.23*
OGD/R+Fer-1组	0.21±0.04	0.23±0.03	0.59±0.12 <sup>#</sup>	0.80±0.17 <sup>#</sup>
OGD/R+Fer-1+miR-22-3p组	0.21±0.03	0.22±0.12	0.55±0.14	0.71±0.23

注: \*:与常氧组比较,  $P<0.05$ ; <sup>#</sup>:与OGD/R+miR-NC组比较,  $P<0.05$ 。

2.9 OGD/R后细胞转染miR-22-3p mimic和Fer-1处理后ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup>水平比较见表6

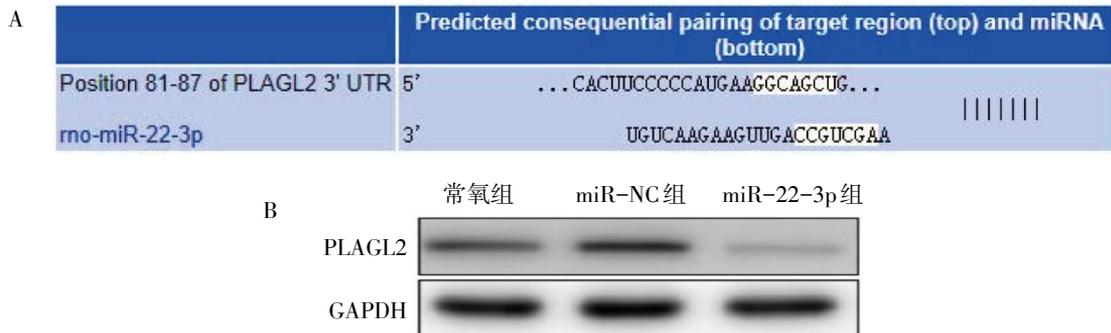
表6 OGD/R后细胞转染miR-22-3p mimic和Fer-1处理后ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup>水平检测

组别	ROS/ng/L	MDA/nmol/L	Fe <sup>2+</sup> /nmol/L
常氧组	61.30± 6.03	0.22±0.06	2.25±0.31
OGD/R组	394.60±10.12*	2.93±0.12*	18.26±4.53*
OGD/R+Fer-1组	171.35± 8.14 <sup>#</sup>	1.17±0.43 <sup>#</sup>	5.57±1.02 <sup>#</sup>
OGD/R+Fer-1+miR-22-3p组	180.43± 9.55	1.19±0.25	6.05±1.31

注: \*:与常氧组比较,  $P<0.05$ ; <sup>#</sup>:与OGD/R+miR-NC组比较,  $P<0.05$ 。

由表6可见,OGD/R组H9c2细胞MDA及ROS水平、Fe<sup>2+</sup>的积累明显高于常氧组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=4.52、3.49、3.39,  $P$ 均 $<0.05$ ),GD/R+ Fer-1组逆转下调MDA、ROS和Fe<sup>2+</sup>水平( $t$ 分别=3.03、5.33、2.48,  $P$ 均 $<0.05$ )。OGD/R+Fer-1+miR-22-3p组H9c2细胞MDA及ROS水平、Fe<sup>2+</sup>的积累与OGD/R+Fer-1组比较,差异均无统计学意义( $t$ 分别=0.21、1.18、0.63,  $P$ 均 $>0.05$ )。

2.10 miR-22-3p对PLAGL2的表达调控检测见图3



注: A为TargetsCan预测PLAGL2和miR-22-3p的特异性结合位点;B为Western blot检测PLAGL2蛋白表达水平。

图3 miR-22-3p对PLAGL2的表达调控检测

由图3A可见,通过TargetsCan靶向关系预测网站发现miR-22-3p和PLAGL2存在特异性结合位点。由图3B可见,H9c2细胞转染miR-22-3p组的PLAGL2蛋白表达明显低于miR-NC组。

2.11 miR-22-3p靶向调控PLAGL2表达的检测  
PLAGL2-WT+miR-22-3p组的荧光素酶活性为(0.95±0.15),明显低于PLAGL2-MUT+miR-22-3p组(0.24±0.05),差异有统计学意义( $t=2.69, P<0.05$ )。

2.12 过表达PLAGL2对Gpx4的表达调控见图4

由图4A、4B可见,共转染miR-22-3p mimic和PLAGL2过表达质粒组细胞中PLAGL2表达显著高于miR-22-3p转染组,Gpx4表达显著低于miR-22-

3p转染组。

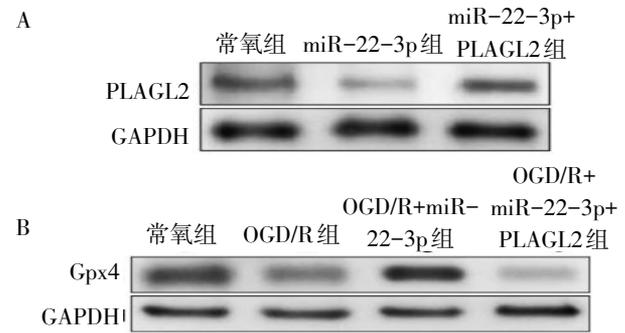


图4 Western blot检测H9c2细胞PLAGL2和Gpx4蛋白表达水平

2.13 OGD/R后细胞共转染miR-22-3p mimic和PLAGL2过表达质粒后吸光度值见表7

表7 OGD/R后细胞共转染miR-22-3p mimic和PLAGL2过表达质粒后吸光度值

组别	第1天	第2天	第3天	第4天
常氧组	0.18±0.03	0.37±0.04	0.61±0.09	0.84±0.13
OGD/R组	0.18±0.04	0.32±0.09	0.32±0.07*	0.41±0.10*
OGD/R+miR-22-3p组	0.17±0.03	0.35±0.07	0.57±0.11 <sup>#</sup>	0.78±0.15 <sup>#</sup>
OGD/R+miR-22-3p+PLAGL2组	0.19±0.02	0.34±0.11	0.41±0.12 <sup>△</sup>	0.46±0.15 <sup>△</sup>

注:\*,与常氧组比较, $P<0.05$ ;<sup>#</sup>:与OGD/R组比较, $P<0.05$ ;<sup>△</sup>:与OGD/R+miR-22-3p组比较, $P<0.05$ 。

由表7可见,第1、2天,各组细胞吸光度值比较,差异均无统计学意义( $F$ 分别=0.21、0.12, $P$ 均>0.05)。第3、4天,OGD/R组吸光度值明显高于常氧组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=6.33、7.18, $P$ 均<0.05)。OGD/R+miR-22-3p组吸光度值明显高于OGD/R组( $t$ 分别=3.11、4.22, $P$ 均<0.05),OGD/R+

miR-22-3p+PLAGL2组的吸光度值明显低于OGD/R+miR-22-3p组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=3.91、3.12, $P$ 均<0.05)。

2.14 OGD/R后细胞共转染miR-22-3p mimic和PLAGL2过表达质粒后ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup>水平比较见表8

表8 OGD/R后细胞共转染miR-22-3p mimic和PLAGL2过表达质粒后ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup>水平

组别	ROS/ng/L	MDA/nmol/L	Fe <sup>2+</sup> /nmol/L
常氧组	56.35±4.24	0.26±0.16	2.13±0.46
OGD/R组	383.50±7.32*	2.91±0.10*	18.18±3.58*
OGD/R+miR-22-3p组	156.63±8.05 <sup>#</sup>	1.21±0.31 <sup>#</sup>	5.17±1.32 <sup>#</sup>
OGD/R+miR-22-3p+PLAGL2组	356.46±8.58 <sup>△</sup>	2.79±0.20 <sup>△</sup>	14.85±1.25 <sup>△</sup>

注:\*,与常氧组比较, $P<0.05$ ;<sup>#</sup>:与OGD/R组比较, $P<0.05$ ;<sup>△</sup>:与OGD/R+miR-22-3p组比较, $P<0.05$ 。

由表8可见,OGD/R组ROS、MDA、Fe<sup>2+</sup>水平明显高于常氧组( $t$ 分别=4.52、3.54、4.01, $P$ 均<0.05),OGD/R+miR-22-3p组MDA及Fe<sup>2+</sup>、ROS水平明显低于OGD/R组( $t$ 分别=4.71、4.35、3.05, $P$ 均<0.05)。OGD/R+miR-22-3p+PLAGL2组的MDA及Fe<sup>2+</sup>、ROS水平高于OGD/R+miR-22-3p( $t$ 分别=3.74、3.87、3.05, $P$ 均<0.05)。

### 3 讨论

最近的研究表明,I/R损伤会导致miRNAs的表达改变,影响心肌细胞的存活和恢复。此外,仍有其它研究指出miR-22-3p在冠状动脉疾病过程中起作用,可作为诊断冠状动脉疾病的特异性标志物<sup>[3]</sup>。本次研究揭示miR-22-3p在体外心肌细胞OGD/R损伤过程起到保护作用,其机制为通过靶向

PLAGL2蛋白表达抑制铁死亡。

既往研究已证实铁死亡在心肌病、心肌梗死、缺血再灌注损伤等疾病中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。miRNAs如miR-7-5p、miR-150-5p和miR-706等通过调控心肌细胞铁死亡,参与心脏发育、心肌重塑和心力衰竭等生物过程。本次研究发现OGD/R诱导心肌细胞损伤过程中伴随铁死亡指标MDA及Fe<sup>2+</sup>、ROS水平上调,miR-22-3p表达水平降低。Gpx4在阻断铁死亡过程中起主要作用,本次研究发现OGD/R可诱导心肌细胞中Gpx4表达下调。进一步的研究结果发现,过表达miR-22-3p下调了OGD/R诱导的心肌细胞MDA及Fe<sup>2+</sup>、ROS水平,提高心肌细胞活力,上调Gpx4表达,而铁死亡抑制剂Fer-1对过表达miR-22-3p后H9c2细胞活力及铁死亡无明显影响,提示miR-22-3p对心肌细胞OGD/R损伤的保护功效被Fer-1阻断,miR-22-3p对心肌细胞OGD/R损伤的保护机制依赖于降低铁死亡。Cao等<sup>[5]</sup>发现miR-22在OGD/R诱导的大鼠神经干细胞中表达降低,而过表达miR-22可减轻OGD/R诱导的神经干细胞损伤。Yuan等<sup>[6]</sup>揭示心肌梗死患者心肌细胞中过表达miR-22-3p能够抑制肿瘤细胞铁死亡。这些研究可一定程度上也支持本次研究结论,证实了miR-22-3p通过抑制铁死亡保护心肌细胞I/R损伤的作用。

PLAGL2是一类源自于PLAG基因家族的锌指蛋白,也是一种细胞核转录因子,可参与调控多种基因表达,已被报道在多种肿瘤进展中发挥重要作用<sup>[7]</sup>,然而在I/R损伤中鲜有研究。本次研究通过Targetscan预测发现PLAGL2和miR-22-3p存在特异性结合位点,且过表达miR-22-3p显著降低H9c2细胞中PLAGL2蛋白水平。双荧光素酶报告实验显示过表达miR-22-3p显著降低PLAGL2-WT的荧光素酶活性,而对PLAGL2-MUT的荧光素酶活性无明显影响,证实miR-22-3p与PLAGL2可直接结合。这些结果提示miR-22-3p通过靶向结合PLAGL2负调控其表达。此外,本次研究结果还显示,PLAGL2过表达可明显逆转miR-22-3p过表达诱导的H9c2细胞活力增加,MDA及Fe<sup>2+</sup>、ROS水平抑制和Gpx4表达上调,提示PLAGL2参与心肌I/R损伤后细胞活力和铁死亡的调控,miR-22-3p对心肌细胞损伤保护功效可能是通过靶向负调控PLAGL2蛋白表达来完成。Fan等<sup>[8]</sup>研究显示,miR-22-3p可通过靶向调

控PLAGL2表达抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭。在心肌I/R损伤过程中,miR-22-3p与PLAGL2存在调控关系,即miR-22-3p可通过靶向调控PLAGL2表达进而抑制铁死亡保护心肌I/R损伤。

综上所述,本次研究结果证实了miR-22-3p靶向调控PLAGL2蛋白表达抑制铁死亡,从而保护OGD/R诱导的心肌细胞损伤,为开发新的临床治疗提供研究方向。本次研究缺乏体内实验,因此需要后续开展动物研究进一步确证miR-22-3p对心肌缺血保护的分子机制。然而,本次研究只在体外细胞模型中探究miR-22-3p对心肌细胞的保护作用,不能完全模拟人体心肌I/R损伤。因此需要继续开展动物或原代心肌细胞实验,以进一步确证miR-22-3p对心肌缺血保护的能效及分子机制。

#### 参考文献

- 1 Li Y, Li Z, Liu J, et al. miR-190-5p alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting PHLPP1[J]. Dis Markers, 2021, 2021: 8709298.
- 2 Lillo-Moya J, Rojas-Sole C, Munoz-Salamanca D, et al. Targeting ferroptosis against ischemia/reperfusion cardiac injury[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(5): 667.
- 3 Zhang M, Hu Y, Li H, et al. miR-22-3p as a potential biomarker for coronary artery disease based on integrated bioinformatics analysis[J]. Front Genet, 2022, 13: 936937.
- 4 Wang Z, Yao M, Jiang L, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced ferroptosis via AMPK/GSK-3beta/Nrf2 axis[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 154: 113572.
- 5 Cao Y, Liu H, Zhang J, Dong Y. Circular RNA cZNF292 silence alleviates OGD/R-induced injury through up-regulation of miR-22 in rat neural stem cells (NSCs)[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 594-601.
- 6 Yuan Y, Mei Z, Qu Z, et al. Exosomes secreted from cardiomyocytes suppress the sensitivity of tumor ferroptosis in ischemic heart failure[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 121.
- 7 赵琪, 何长海, 王志, 等. PLAGL2、p16、p53基因在前列腺癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2020, 41(8): 818-824.
- 8 Fan T, Wang C, Li X, et al. MiR-22-3p suppresses cell migration and invasion by targeting PLAGL2 in breast cancer[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2021, 31(8): 937-940.

(收稿日期 2023-06-16)

(本文编辑 高金莲)