· 论著 ·

微小 RNA-1 调节缺氧 / 复氧后 H9c2 心肌细胞凋亡的机制研究

李炳灿　周培森　殷佳娜　李章平

温州医科大学附属第一医院急诊科，浙江温州 325000

通信作者：李章平，Email：wzlizhangping@126.com

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-1（miR-1）对缺氧 / 复氧（H/R）心肌细胞凋亡的调节作用。**方法** 体外培养大鼠胚胎心脏组织来源心肌细胞株 H9c2，将处于对数生长期的细胞分为空白对照组、H/R 组、miR-1 模拟物（mimics）+H/R 组、miR-1 抑制剂反义寡核苷酸（ASO）+H/R 组和微小 RNA 阴性对照片段（miRNA NC）+H/R 组。用含低浓度胎牛血清（FBS）的低糖 DMEM 培养基作为缺氧条件下的培养基，置于 37 ℃密闭无氧培养箱中（95% N_2 和 5% CO_2）培养 12 h 后，再换取新鲜的含 5% FBS 的高糖 DMEM 培养基，置于 37 ℃密闭培养箱中培养，建立心肌细胞 H/R 模型；空白对照组用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。miR-1 mimics+H/R 组、miR-1 ASO+H/R 组、miRNA NC+H/R 组分别于制模前在高糖培养基中加入相应转染物，终浓度均为 50 nmol/L；空白对照组和 H/R 组不予转染处理。制模完成后，采用实时荧光定量聚合酶链反应（qPCR）检测细胞 miR-1 的表达水平；采用蛋白质免疫印迹试验（Western blotting）检测细胞凋亡相关蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9（caspase-9）、Bcl-2 和 Bax 的表达水平；应用流式细胞仪检测心肌细胞凋亡情况。**结果** 与空白对照组相比，H/R 组心肌细胞中 miR-1 表达水平、caspase-9 和 Bax 的蛋白表达水平、细胞凋亡率均明显升高，而 Bcl-2 表达水平明显下降，说明 H/R 心肌细胞中 miR-1 表达增加，凋亡水平升高。与 H/R 组相比，miR-1 mimics+H/R 组心肌细胞中 miR-1 表达水平、caspase-9 和 Bax 蛋白表达水平、细胞凋亡率均进一步升高〔miR-1（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）：11.59±1.48 比 2.57±0.38，caspase-9 蛋白（caspase-9/β-actin）：2.59±0.12 比 1.56±0.20，Bax 蛋白（Bax/β-actin）：4.09±0.38 比 1.97±0.13，细胞凋亡率：（25.23±0.87）% 比（17.86±0.73）%，均 $P<0.01$〕，而 Bcl-2 蛋白表达水平则进一步下降（Bcl-2/β-actin：0.37±0.02 比 0.49±0.03，$P<0.01$）；miR-1 ASO+H/R 组 miR-1 表达水平、caspase-9 和 Bax 蛋白表达水平、细胞凋亡率显著下降〔miR-1（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）：1.16±0.06 比 2.57±0.38，caspase-9 蛋白（caspase-9/β-actin）：1.05±0.24 比 1.56±0.20，Bax 蛋白（Bax/β-actin）：0.93±0.11 比 1.97±0.13，细胞凋亡率：（11.19±0.85）% 比（17.86±0.73）%，均 $P<0.05$〕，而 Bcl-2 的表达水平则显著升高（Bcl-2/β-actin：0.84±0.17 比 0.49±0.03，$P<0.05$）；miRNA NC+H/R 组 miR-1 表达，caspase-9、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达以及细胞凋亡率与 H/R 组比较差异均无统计学意义。**结论** H/R 心肌细胞中 miR-1 表达增加、凋亡水平升高，且 miR-1 可加剧心肌细胞凋亡。

【关键词】 微小 RNA；　缺血 / 再灌注损伤；　细胞凋亡；　心肌细胞学

基金项目：浙江省自然科学基金（LY16H150008）

DOI：10.3760/cma.j.cn121430-20210623-00940

Mechanism of microRNA-1 regulating H9c2 cardiomyocyte apoptosis after hypoxia/reoxygenation

Li Bingcan, Zhou Peisen, Yin Jiana, Li Zhangping

Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Li Zhangping, Email: wzlizhangping@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of cardiomyocyte apoptosis after hypoxia/reoxygenation (H/R) regulated by microRNA-1 (miR-1). **Methods** Cardiomyocyte strain H9c2 derived from rat embryonic heart tissue were cultured *in vitro*. The cells in logarithmic growth phase were divided into blank control group, H/R group, miR-1 mimics+H/R group, miR-1 inhibitor antisense oligonucleotide (ASO)+H/R group and microRNA negative control fragment (miRNA NC)+H/R group. The low sugar DMEM medium containing low concentration of fetal bovine serum (FBS) was used as the medium under anoxic condition. After being cultured in a closed anaerobic incubator at 37 ℃ (95% N_2 and 5% CO_2) for 12 hours, the cells were cultured with the fresh high sugar DMEM medium containing 5% FBS in a closed incubator at 37 ℃ for reproducing cardiomyocyte H/R model. The blank control group was cultured in high glucose DMEM medium containing 10% FBS in 37 ℃ and 5% CO_2 incubator. In miR-1 mimics+H/R group, miR-1 ASO+H/R group and miRNA NC+H/R group, the corresponding transfectants were mixed in high glucose DMEM medium and transfected into cells before H/R model was established, and the final concentration was 50 nmol/L. The blank control group and H/R group were added with DMEM medium at the same time. After the establishment of the model, the expression level of miR-1 was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The expression levels of apoptosis-related proteins caspase-9, Bcl-2 and Bax were detected by Western blotting, and cardiomyocyte apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** Compared with the blank control group, the expression levels of miR-1, caspase-9 and

Bax protein and the apoptosis rate of cardiomyocytes were significantly increased, while the expression level of Bcl-2 was significantly decreased, which indicated that the expression of miR-1 and the level of apoptosis were increased in H/R group. Compared with H/R group, the expressions of miR-1, caspase-9 and Bax and the apoptosis rate of cardiomyocytes in miR-1 mimics+H/R group were further increased [miR-1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 11.59±1.48 vs. 2.57±0.38, caspase-9 protein (caspase-9/β-actin): 2.59±0.12 vs. 1.56±0.20, Bax protein (Bax/β-actin): 4.09±0.38 vs. 1.97±0.13, apoptosis rate: (25.23±0.87)% vs. (17.86±0.73)%, all $P < 0.01$], while the expression of Bcl-2 was decreased (Bcl-2/β-actin: 0.37±0.02 vs. 0.49±0.03, $P < 0.01$). The expressions of miR-1, caspase-9 and Bax and the apoptosis rate were significantly decreased in miR-1 ASO+H/R group [miR-1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.16±0.06 vs. 2.57±0.38, caspase-9 protein (caspase-9/β-actin): 1.05±0.24 vs. 1.56±0.20, Bax protein (Bax/β-actin): 0.93±0.11 vs. 1.97±0.13, apoptosis rate: (11.19±0.85)% vs. (17.86±0.73)%, all $P < 0.05$], while the expression of Bcl-2 was increased (Bcl-2/β-actin: 0.84±0.17 vs. 0.49±0.03, $P < 0.05$). There was no significant difference in miR-1 expression, caspase-9, Bax and Bcl-2 protein expressions, and apoptosis rate between H/R+miRNA NC group and H/R group. **Conclusion** The expression of miR-1 and level of apoptosis were increased in H/R cells, and miR-1 could aggravate cardiomyocyte apoptosis.

【Key words】 MicroRNA; Ischemia/reperfusion injury; Apoptosis; Myocardia cytology

Fund program: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY16H150008)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210623-00940

微小 RNA（microRNA，miRNA）是一种长度约为 18～22 个核苷酸的非编码小 RNA 分子，可以通过靶 mRNA 的翻译或促进其降解，在转录后调控基因的表达[1]。研究显示，多种 miRNA 参与心脏发育、心肌重构、心肌细胞凋亡、心力衰竭等病理生理过程，在心血管系统中发挥重要作用[2-3]。微小 RNA-1（microRNA-1，miR-1）是一种肌肉特异性的 miRNA，优先在心肌和骨骼肌中表达。本课题组前期研究显示，大鼠心肌缺血 / 再灌注（ischemia/reperfusion，I/R）后，循环血中 miR-1 表达升高，与心肌 I/R 损伤密切相关[4]，但具体作用机制和靶基因尚不完全明确。

心肌 I/R 损伤是心搏骤停后心肺复苏和心肌梗死后血管再通时心肌损伤的主要病理生理机制[5]，与细胞凋亡、炎症、中性粒细胞活化和氧化应激等有关[6]。细胞凋亡在维持机体稳态以及在多种疾病中发挥重要作用[7]。体内和体外实验均表明，细胞凋亡在心肌 I/R 损伤后发挥了重要作用[8-9]。本研究利用体外实验，通过缺氧 / 复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）模拟心肌细胞 I/R 损伤，并调控心肌细胞 miR-1 表达，观察细胞凋亡及相关实验参数的变化，验证 miR-1 是否参与心肌细胞 H/R 后损伤。

1 材料与方法

1.1 细胞来源：大鼠胚胎心脏组织来源心肌细胞株 H9c2 购于上海中科院细胞库。本实验中细胞培养、制模等操作过程和涉及相关方法均符合伦理学要求，并通过医院的伦理审批（审批号：2021528）。

1.2 细胞培养和转染：将 H9c2 细胞置于含 10% 胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）的高糖 DMEM 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。细胞生长至 70% 融合时，换液备用。取对数生长期细胞分为空白对照组、H/R 组、miR-1 模拟物（mimics）+H/R 组、miR-1 抑制剂反义寡核苷酸（antisense oligonucleotide，ASO）+H/R 组和 miRNA 阴性对照片段（negative control，NC）+H/R 组。miR-1 mimics+H/R 组、miR-1 ASO+H/R 组和 miRNA NC+H/R 组分别于制模前将相应转染物混于高糖 DMEM 培养基中，通过 Lipofectamine 3000 试剂转染入细胞，终浓度均为 50 nmol/L；空白对照组和 H/R 组不给予转染处理。

1.3 细胞 H/R 模型制备：选取含 1% FBS 的低糖 DMEM 培养基作为缺氧条件下的培养基，将已铺满的 H9c2 细胞换上缺氧条件下的培养基，置于 37 ℃无氧培养箱中（95% N_2 和 5% CO_2），培养 12 h 后，弃去缺氧条件下的培养基，再换取新鲜的含 5% FBS 的高糖 DMEM 完全培养基，将细胞置于 37 ℃培养箱中，继续培养 2 h 完成制模。空白对照组细胞用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。制模完成后进行相应细胞检测。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative polymerase chain reaction，qPCR）检测细胞 miR-1 表达：用 TRIzol 提取细胞总 RNA 并检测其浓度和纯度，甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。反转录合成 cDNA 后进行实时荧光 qPCR 检测，以 U6 作为内参。qPCR 扩增条件：95 ℃预变性 15 min；95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，45 个循环。引物均由上海生工生物工程有限公司设计合成。以空白对照组表达量为 1，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达量。

1.5 原位末端缺刻标记法（TdT-mediated dUTP nick-end labeling，TUNEL）检测细胞凋亡：细胞爬片后用 4% 多聚甲醛固定，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）洗 2 次，加含 0.2% 曲通 X-100 的 PBS，室温孵育 5 min，PBS 洗 2 次，加入 TUNEL 检测液，37 ℃下避光孵育 60 min，4′,6-二脒基-2-苯基吲哚

(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染,倒置荧光显微镜下计数每个视野 TUNEL 阳性细胞,计算凋亡率(凋亡率=TUNEL 阳性细胞数/视野细胞核总数)。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡:用胰酶消化并收集细胞,PBS 洗涤 2 次,用缓冲液重悬细胞并调整细胞密度至 1×10^6/mL,将细胞转移至流式专用管中,加入荧光标记的膜联蛋白Ⅴ(Annexin Ⅴ)和碘化丙啶(propidium iodide, PI)试剂各 5 μL,室温下避光孵育 15 min,应用流式细胞仪检测。

1.7 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9(caspase-9)、Bcl-2、Bax 的蛋白表达:提取细胞总蛋白,用 BCA 法定量。细胞蛋白经凝胶电泳、电转移和缓冲液封闭后,加入一抗 Bcl-2(1∶500)、Bax(1∶1 000)、caspase-9(1∶1 000)或 β-肌动蛋白(β-actin, 1∶1 000), 4 ℃孵育过夜。洗膜后加入二抗(1∶500),常温孵育 2 h。再次洗膜后,加入 1 mL 电化学发光试剂与膜充分接触,使用成像系统进行图像采集。以目的蛋白条带与内参 β-actin 蛋白条带吸光度(absorbance, *A*)值的比值表示目的蛋白的表达量。

1.8 统计学方法:应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布,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,并采用 Bonferroni 校正。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结　果

2.1 miR-1 表达(表 1):与空白对照组比较,H/R 组 H9c2 细胞 miR-1 表达水平显著升高($P<0.05$)。与 H/R 组比较, miR-1 mimics+H/R 组细胞 miR-1 表达水平进一步升高,miR-1 ASO+H/R 组 miR-1 表达水平则明显下降(均 $P<0.05$);而 miRNA NC+H/R 组与 H/R 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1　各组 H9c2 细胞 miR-1 表达及细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(孔)	miR-1 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	细胞凋亡率(%)
空白对照组	3	1	13.74±2.36
H/R 组	3	2.57±0.38 [a]	17.86±0.73 [a]
miR-1 mimics+H/R 组	3	11.59±1.48 [b]	25.23±0.87 [b]
miR-1 ASO+H/R 组	3	1.16±0.06 [c]	11.19±0.85 [c]
miRNA NC+H/R 组	3	3.05±0.66	16.83±0.94

注:H/R 为缺氧/复氧,miR-1 mimics 为微小 RNA-1(miR-1)模拟物,miR-1 ASO 为 miR-1 抑制剂反义寡核苷酸,miRNA NC 为微小 RNA 阴性对照片段, H9c2 细胞为大鼠胚胎心脏组织来源心肌细胞株;与空白对照组比较,[a]$P<0.05$;与 H/R 组比较,[b]$P<0.01$,[c]$P<0.05$

2.2 细胞凋亡检测结果

2.2.1 TUNEL 染色结果(图 1):与空白对照组比较,H/R 组 TUNEL 阳性细胞显著增加。与 H/R 组比较,miR-1 mimics+H/R 组 TUNEL 阳性细胞进一步增加,miR-1 ASO+H/R 组 TUNEL 阳性细胞则明显减少;而 miRNA NC+H/R 组与 H/R 组无明显差异。

图 1 倒置荧光显微镜下观察各组大鼠胚胎心脏组织来源心肌细胞株 H9c2 凋亡情况　4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)标记的细胞核呈蓝色荧光,原位末端缺刻标记法(TUNEL)标记的凋亡细胞呈绿色荧光。空白对照组偶见凋亡细胞;缺氧/复氧(H/R)组凋亡细胞较空白对照组增多;微小 RNA-1(miR-1)模拟物(mimics)+H/R 组凋亡细胞较 H/R 组进一步增多;miR-1 抑制剂反义寡核苷酸(ASO)+H/R 组凋亡细胞较 H/R 组明显减少;而微小 RNA 阴性对照片段(miRNA NC)+H/R 组凋亡细胞与 H/R 组无明显差异　TUNEL 染色　低倍放大

注：H/R 为缺氧 / 复氧，miR-1 mimics 为微小 RNA-1（miR-1）模拟物，miR-1 ASO 为 miR-1 抑制剂反义寡核苷酸，miRNA NC 为微小 RNA 阴性对照片段，H9c2 细胞为大鼠胚胎心脏组织来源心肌细胞株，Annexin Ⅴ-FITC 为膜联蛋白Ⅴ-异硫氰酸荧光素，PI 为碘化丙啶；左下象限代表活细胞，左上象限代表裸核细胞，右下象限代表凋亡早期细胞，右上象限代表凋亡晚期或死亡细胞

图 2 流式细胞仪检测各组 H9c2 细胞凋亡情况

注：H/R 为缺氧 / 复氧，miR-1 mimics 为微小 RNA-1（miR-1）模拟物，miR-1 ASO 为 miR-1 抑制剂反义寡核苷酸，miRNA NC 为微小 RNA 阴性对照片段，H9c2 细胞为大鼠胚胎心脏组织来源心肌细胞株，caspase-9 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9，β-actin 为 β-肌动蛋白；与空白对照组比较，$^{a}P<0.05$，$^{b}P<0.01$；与 H/R 组比较，$^{c}P<0.01$，$^{d}P<0.05$

图 3 各组 H9c2 细胞凋亡相关蛋白表达比较

2.2.2 流式细胞仪检测结果（表 1；图 2）：与空白对照组比较，H/R 组细胞凋亡率显著升高（$P<0.05$）。与 H/R 组比较，miR-1 mimics+H/R 组细胞凋亡率进一步升高，miR-1 ASO+H/R 组细胞凋亡率则显著下降（均 $P<0.05$）；而 miRNA NC+H/R 组与 H/R 组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.3 凋亡相关蛋白表达（图 3～4）：与空白对照组比较，H/R 组细胞 caspase-9 和 Bax 蛋白表达水平显著升高，Bcl-2 蛋白表达水平显著下降（均 $P<0.05$）。与 H/R 组比较，miR-1 mimics+H/R 组 caspase-9、Bax 蛋白表达水平进一步升高，Bcl-2 蛋白表达水平进一步下降（均 $P<0.01$）；miR-1 ASO+H/R 组凋亡相关蛋白表达水平则表现出与 miR-1 mimics+H/R 组相反的变化趋势；而 miRNA NC+H/R 组与 H/R 组凋亡相关蛋白表达水平差异无统计学意义（均 $P>0.05$）。

H/R 为缺氧 / 复氧，miR-1 mimics 为微小 RNA-1（miR-1）模拟物，miR-1 ASO 为 miR-1 抑制剂反义寡核苷酸，miRNA NC 为微小 RNA 阴性对照片段，H9c2 细胞为大鼠胚胎心脏组织来源心肌细胞株，caspase-9 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9，β-actin 为 β-肌动蛋白

图 4 蛋白质免疫印迹试验（Western blotting）检测各组 H9c2 细胞凋亡相关蛋白表达

3 讨 论

miRNA 参与心血管的发育过程和心血管疾病的发生发展[10-11]。在 I/R 损伤的发生发展中，miRNA 起着重要作用。研究表明，在冠心病的病理过程中，miR-126 表达减少可增强内皮炎症反应，miR-199 下调可促进心肌缺氧，心肌梗死后抑制 miR-92 可促进心脏血管生成[12-13]；Zhai 等[14]研究发现，miR-206 过表达可明显减少心肌梗死面积，抑制 I/R 损伤诱导的心肌细胞凋亡；还有研究表明，miR-378 抑制了

心肌细胞中caspase-3表达，减轻了I/R损伤[15]。说明miRNA在心肌细胞损伤和保护中具有重要作用。

目前针对miR-1与心脏关系的研究较深入。研究表明，缺血后适应可抑制I/R损伤诱导的miR-1上调，而miR-1下调可防止连接蛋白43的减少和再分布，起到心肌保护作用[16]。miR-1还可通过刺激Bcl-2调节硫化氢，对抗I/R损伤诱导的心肌细胞凋亡[17-18]。此外，miR-1可通过增加小鼠细胞凋亡加重I/R损伤，而抑制miR-1会减轻I/R损伤[19]。还有研究显示，增加miR-1表达会减少抗凋亡蛋白Bcl-2和热休克蛋白60表达，而与miR-1调控方向相反的miR-133则会减少促凋亡蛋白caspase-9表达[20-21]。因此，有效抑制miR-1是保护心肌细胞的可行思路。

Bcl-2是一种重要抗凋亡蛋白，影响细胞色素C释放，进而影响caspase-9依赖型细胞凋亡通路，防止细胞凋亡，保护组织器官[22]。Bax也是细胞凋亡内在途径核心调节因子，通过上述通路促进细胞凋亡[23]。本研究中采用改良H9c2细胞H/R模型模拟心肌细胞I/R损伤，发现细胞凋亡增加；转染miR-1 mimics后心肌细胞促凋亡蛋白Bax增加，抗凋亡蛋白Bcl-2减少，活化了caspase-9依赖型细胞凋亡通路，使凋亡水平升高；转染miR-1 ASO后促凋亡蛋白Bax减少，抗凋亡蛋白Bcl-2增加，抑制了caspase-9依赖型细胞凋亡通路，使凋亡水平降低。提示调节miR-1表达可调节心肌细胞凋亡，过表达miR-1会加剧细胞凋亡，减少miR-1表达则可抑制细胞凋亡。

综上所述，心肌细胞H/R后miR-1表达增加，引起凋亡水平升高，其机制可能与通过Bax/Bcl-2调节caspase-9依赖型细胞凋亡通路有关，为miR-1的临床应用研究提供了可靠的实验依据。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Johnson JL. Elucidating the contributory role of microRNA to cardiovascular diseases (a review) [J]. Vascul Pharmacol, 2019, 114: 31–48. DOI: 10.1016/j.vph.2018.10.010.

[2] 王安，孙波，仇佳，等. 微小RNA-1在高糖培养下心肌成纤维细胞致纤维化中的调控作用[J]. 中华危重病急救医学，2016, 28 (12): 1113–1117. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2016.12.010.
Wang A, Sun B, Qiu J, et al. Role of microRNA-1 on fibrosis induced by high glucose cultured cardiac fibroblasts [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (12): 1113–1117. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2016.12.010.

[3] Kukreja RC, Yin C, Salloum FN. MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection [J]. Mol Pharmacol, 2011, 80 (4): 558–564. DOI: 10.1124/mol.111.073528.

[4] 何爱文，王东升，张倩倩，等. 血浆miR-1在心搏骤停大鼠心肺复苏后的表达及意义[J]. 江苏医药，2017, 43 (24): 1753–1756. DOI: 10.19460/j.cnki.0253–3685.2017.24.002.
He AW, Wang DS, Zhang QQ, et al. Expression and significance of miR-1 in plasma of rats with cardiac arrest after cardiopulmonary resuscitation [J]. Jiangsu Med J, 2017, 43 (24): 1753–1756. DOI: 10.19460/j.cnki.0253–3685.2017.24.002.

[5] 杨艳丽，马骏，林多茂. 线粒体分裂蛋白1在大鼠心肌缺血/再灌注损伤中的作用[J]. 中华危重病急救医学，2017, 29 (10): 902–906. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2017.10.008.
Yang YL, Ma J, Lin DM. Effect of dynamin-related protein 1 in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (10): 902–906. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2017.10.008.

[6] Zuurbier CJ, Bertrand L, Beauloye CR, et al. Cardiac metabolism as a driver and therapeutic target of myocardial infarction [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24 (11): 5937–5954. DOI: 10.1111/jcmm.15180.

[7] 赵亚娜，李倩晓，施育平. miRNA与心肌细胞凋亡研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，2020, 29 (2): 179–182. DOI: 10.16705/j.cnki.1004–1850.2020.02.014.
Zhao YN, Li QX, Shi YP. Research progress of miRNA in cardiomyocyte apoptosis [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2020, 29 (2): 179–182. DOI: 10.16705/j.cnki.1004–1850.2020.02.014.

[8] Ge L, Cai Y, Ying F, et al. miR-181c-5p exacerbates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis via targeting PTPN4 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 1957920. DOI: 10.1155/2019/1957920.

[9] Zeng GW, Lian C, Yang P, et al. E3-ubiquitin ligase TRIM6 aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury via promoting STAT1-dependent cardiomyocyte apoptosis [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11 (11): 3536–3550. DOI: 10.18632/aging.101995.

[10] Ucar A, Gupta SK, Fiedler J, et al. The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy [J]. Nat Commun, 2012, 3: 1078. DOI: 10.1038/ncomms2090.

[11] 苏彤，张晓璞，韩志君，等. 循环微小RNA-1对胸痛患者发生急性心肌梗死的早期诊断价值[J]. 中华危重病急救医学，2016, 28 (7): 607–611. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2016.07.007.
Su T, Zhang XP, Han ZJ, et al. Early diagnostic value of circulating microRNA-1 on acute myocardial infarction in patients with chest pain [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (7): 607–611. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2016.07.007.

[12] Liu DW, Zhang YN, Hu HJ, et al. Downregulation of microRNA-199a-5p attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cytotoxicity in cardiomyocytes by targeting the HIF-1α-GSK3β-mPTP axis [J]. Mol Med Rep, 2019, 19 (6): 5335–5344. DOI: 10.3892/mmr.2019.10197.

[13] Liu HX, Li GF, Zhao WX, et al. Inhibition of miR-92a may protect endothelial cells after acute myocardial infarction in rats: role of KLF2/4 [J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 2451–2462. DOI: 10.12659/msm.897266.

[14] Zhai CL, Qian Q, Tang GM, et al. MicroRNA-206 protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rats by targeting Gadd45β [J]. Mol Cells, 2017, 40 (12): 916–924. DOI: 10.14348/molcells.2017.0164.

[15] Fang J, Song XW, Tian J, et al. Overexpression of microRNA-378 attenuates ischemia-induced apoptosis by inhibiting caspase-3 expression in cardiac myocytes [J]. Apoptosis, 2012, 17 (4): 410–423. DOI: 10.1007/s10495–011–0683–0.

[16] Bian B, Yu XF, Wang GQ, et al. Role of miRNA-1 in regulating connexin 43 in ischemia-reperfusion heart injury: a rat model [J]. Cardiovasc Pathol, 2017, 27: 37–42. DOI: 10.1016/j.carpath.2016.12.006.

[17] Kang B, Hong J, Xiao J, et al. Involvement of miR-1 in the protective effect of hydrogen sulfide against cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41 (10): 6845–6853. DOI: 10.1007/s11033–014–3570–2.

[18] Zhai CL, Tang GM, Peng L, et al. Inhibition of microRNA-1 attenuates hypoxia/re-oxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes by directly targeting Bcl-2 but not GADD45beta [J]. Am J Transl Res, 2015, 7 (10): 1952–1962.

[19] Pan ZW, Sun XL, Ren JS, et al. miR-1 exacerbates cardiac ischemia-reperfusion injury in mouse models [J]. PLoS One, 2012, 7 (11): e50515. DOI: 10.1371/journal.pone.0050515.

[20] Hu YY, Chen X, Li XN, et al. MicroRNA-1 downregulation induced by carvedilol protects cardiomyocytes against apoptosis by targeting heat shock protein 60 [J]. Mol Med Rep, 2019, 19 (5): 3527–3536. DOI: 10.3892/mmr.2019.10034.

[21] Song T, Yao Y, Wang T, et al. Tanshinone Ⅱ A ameliorates apoptosis of myocardiocytes by up-regulation of miR-133 and suppression of caspase-9 [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815: 343–350. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.08.041.

[22] Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Leverson JD, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16 (4): 273–284. DOI: 10.1038/nrd.2016.253.

[23] Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond: mitochondrial performance in apoptosis [J]. FEBS J, 2018, 285 (3): 416–431. DOI: 10.1111/febs.14186.

（收稿日期：2021-06-23）