

LncRNA OIP5-AS1靶向miR-126-5p/TRAF3轴 对缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤的影响

曹凯¹ 张维丽² 李亮^{1*}

(¹武警湖北省总队医院急诊医学科, 武汉 430061; ²武汉市第一医院创面修复与周围血管科, 武汉 430061)

摘要 该研究旨在探讨长链非编码RNA(LncRNA) Opa相互作用蛋白-5反义转录物(OIP5-AS1)靶向微小RNA-126-5p(miR-126-5p)/肿瘤坏死因子受体相关因子3(TRAF3)轴对缺氧复氧(H/R)诱导的心肌细胞损伤的影响。为验证LncRNA OIP5-AS1与miR-126-5p、miR-126-5p与TRAF3之间的互相作用关系,该研究采用双荧光素酶报告基因实验进行检测。构建不同处理组,将H9C2细胞分为以下10组:①NC组(正常培养);②H/R组(采用无糖培养基置于94% N₂、5% CO₂、1% O₂的培养箱中缺氧2 h,弃去培养基换为含糖培养基置于95% O₂、5% CO₂中培养24 h);③OE-NC组(H/R处理+转染空载对照);④OE-OIP5-AS1组(H/R处理+转染OIP5-AS过表达载体);⑤OE-OIP5-AS1+mimic NC(H/R处理+共转染OIP5-AS过表达载体+mimic NC);⑥OE-OIP5-AS1+miR-126-5p mimic(H/R处理+转染OE-OIP5-AS1+miR-126-5p mimic);⑦sh-NC组(H/R处理+转染sh-NC);⑧sh-OIP5-AS1组(H/R处理+转染sh-OIP5-AS1);⑨sh-OIP5-AS1+anti-NC组(H/R处理+转染sh-OIP5-AS1+anti-NC);⑩sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p组(H/R处理+转染sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p)。MTT法检测H9C2细胞增殖情况;流式细胞仪检测H9C2细胞凋亡情况;ELISA法检测H9C2细胞中SOD、ROS、MDA的表达情况;Western blot检测H9C2细胞中TRAF3、Cleaved Caspase-3/Caspase-3蛋白的表达水平。实验结果显示,LncRNA OIP5-AS1可以靶向负调控miR-126-5p;miR-126-5p可以靶向负调控TRAF3。H/R处理的H9C2细胞中LncRNA OIP5-AS1、TRAF3 mRNA和蛋白表达水平上升,miR-126-5p表达水平下降,D₄₉₀值降低,出现明显的氧化应激(ROS、MDA含量升高,SOD含量降低),凋亡率和凋亡相关蛋白Cleaved Caspase-3/Caspase-3表达水平升高(P<0.01)。过表达OIP5-AS1可上调H/R处理的H9C2细胞中LncRNA OIP5-AS1、TRAF3 mRNA和蛋白表达,下调miR-126-5p表达,D₄₉₀值降低(P<0.01);过表达miR-126-5p可抑制过表达OIP5-AS1对H/R处理的H9C2细胞增殖的抑制作用(P<0.01)。敲低OIP5-AS1可抑制H/R处理的H9C2细胞中LncRNA OIP5-AS1、TRAF3 mRNA和蛋白表达,促进miR-126-5p表达,D₄₉₀值升高,抑制氧化应激(ROS、MDA含量降低,SOD含量升高),凋亡率和凋亡相关蛋白Cleaved Caspase-3/Caspase-3表达水平降低(P<0.01);抑制miR-126-5p可逆转敲低OIP5-AS1对H/R处理的H9C2细胞功能的改善作用(P<0.01)。敲低LncRNA OIP5-AS1可能通过靶向miR-126-5p/TRAF3轴,减轻H/R诱导的心肌细胞损伤。

关键词 长链非编码RNA Opa相互作用蛋白-5反义转录物; miR-126-5p; 肿瘤坏死因子受体相关因子3; 缺氧复氧; 心肌细胞损伤

The Effect of LncRNA OIP5-AS1 on Hypoxia/Reoxygenation-Induced Cardiomyocyte Injury by Targeting miR-126-5p/TRAF3 Axis

收稿日期: 2025-08-26

接受日期: 2026-02-02

湖北省卫生健康委员会中医药科研项目(批准号: ZY2021M047)资助的课题

*通信作者。Tel: 027-50723212, E-mail: bzznj5@163.com

Received: August 26, 2025

Accepted: February 2, 2026

This work was supported by the Traditional Chinese Medicine Scientific Research Projects of the Hubei Provincial Health Commission (Grant No.ZY2021M047)

*Corresponding author. Tel: +86-27-50723212, E-mail: bzznj5@163.com

CAO Kai¹, ZHANG Weili², LI Liang^{1*}

¹Emergency Medicine Department, Hubei Provincial Armed Police Corps Hospital, Wuhan 430061, China;

²Wound Repair and Peripheral Vascular Department, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430061, China)

Abstract This study aims to explore the effect of LncRNA (long non coding RNA) OIP5-AS1 (Opa-interacting protein 5 antisense RNA 1) on hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced myocardial cell injury by targeting the miR-126-5p (microRNA-126-5p)/TRAF3 (tumor necrosis factor receptor associated factor 3) axis. To validate the interaction relationships between LncRNA OIP5-AS1 and miR-126-5p, as well as between miR-126-5p and TRAF3, this study employed a dual-luciferase reporter assay. Different treatment groups were constructed, and H9C2 cells were divided into the following 10 groups: ① NC group (normal culture); ② H/R group (cultured in glucose-free medium placed in an incubator with 94% N₂, 5% CO₂, and 1% O₂ for 2 hours of hypoxia, then the medium was replaced with sugar-containing medium and cultured under 95% O₂ and 5% CO₂ for 24 hours); ③ OE-NC group (H/R treatment+transfection with empty vector control); ④ OE-OIP5-AS1 group (H/R treatment+transfection with OIP5-AS1 overexpression vector); ⑤ OE-OIP5-AS1+mimic NC group (H/R treatment+co-transfection with OIP5-AS1 overexpression vector and mimic NC); ⑥ OE-OIP5-AS1+miR-126-5p mimic group (H/R treatment+co-transfection with OE-OIP5-AS1 and miR-126-5p mimic); ⑦ sh-NC group (H/R treatment+transfection with sh-NC); ⑧ sh-OIP5-AS1 group (H/R treatment+transfection with sh-OIP5-AS1); ⑨ sh-OIP5-AS1+anti-NC group (H/R treatment+co-transfection with sh-OIP5-AS1 and anti-NC); ⑩ sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p group (H/R treatment+co-transfection with sh-OIP5-AS1 and anti-miR-126-5p). MTT was performed to measure H9C2 cell proliferation. Flow cytometry was performed to measure apoptosis in H9C2 cells. ELISA method was used to measure the expression of SOD, ROS, and MDA in H9C2 cells. Western blot was used to detect the expression of TRAF3 and Cleaved Caspase-3/Caspase-3 proteins in H9C2 cells. The experimental result shows, LncRNA OIP5-AS1 was able to target and negatively regulate miR-126-5p. MiR-126-5p was able to target and negatively regulate TRAF3. In H9C2 cells subjected to H/R treatment, the expression of LncRNA OIP5-AS1, TRAF3 mRNA, and protein increased, while the expression of miR-126-5p decreased. The D_{490} value was reduced, accompanied by significant oxidative stress (evidenced by elevated ROS and MDA levels, and decreased SOD activity). The apoptosis rate and the expression of the apoptosis-related protein Cleaved Caspase-3/Caspase-3 were also increased ($P<0.01$). Overexpression of OIP5-AS1 further upregulated the mRNA, and protein expression of LncRNA OIP5-AS1, TRAF3 in H/R-treated H9C2 cells, downregulated miR-126-5p expression, and reduced the D_{490} value ($P<0.01$). Conversely, overexpression of miR-126-5p mitigated the inhibitory effect of OIP5-AS1 overexpression on the proliferation of H/R-treated H9C2 cells ($P<0.01$). Knockdown of OIP5-AS1 decreased the expression of LncRNA OIP5-AS1, TRAF3 mRNA and protein, promoted miR-126-5p expression, increased the D_{490} value, alleviated oxidative stress (reduced ROS and MDA, increased SOD), and lowered the apoptosis rate and Cleaved Caspase-3/Caspase-3 expression in H/R-treated H9C2 cells ($P<0.01$). Inhibition of miR-126-5p reversed the ameliorative effects of OIP5-AS1 knockdown on H/R-treated H9C2 cells ($P<0.01$). Knockdown of LncRNA OIP5-AS1 may alleviate H/R-induced myocardial cell injury by targeting the miR-126-5p/TRAF3 axis.

Keywords long non coding RNA Opa-interacting protein 5 antisense RNA 1; miR-126-5p; tumor necrosis factor receptor associated factor 3; hypoxia/reoxygenation; myocardial cell injury

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是全球死亡的主要原因之一。临床上,及时再灌注(包括溶栓、冠状动脉搭桥手术、经皮冠状动脉介入治疗等)

对挽救缺血心肌组织,减少梗死面积,维持左心室收缩功能,防止心力衰竭的发生至关重要^[1]。但证据表明,治疗本身容易诱发心肌损伤和心功能恶化,这

种现象被称为心肌缺血再灌注 (myocardial ischemia-reperfusion, MI/R) 损伤。研究表明致死性 MI/R 占最终 MI 面积的 50%^[2]。到目前为止,除了充分再灌注和缺血预处理外,没有任何治疗方法能有效预防 MI/R 损伤^[3]。因此,进一步了解心肌 MI/R 诱导的心肌细胞损伤的病理生理机制,对于寻找预防 MI/R 的有效策略和改善临床预后具有重要意义。长链非编码 RNA (long non coding RNA, LncRNA) 参与调控 RNA 剪接、蛋白质定位和蛋白质修饰等多种生物过程,在心脏发育、细胞命运决定和功能维持中扮演着复杂而关键的角色^[4-5]。LncRNA Opa 相互作用蛋白-5 反义转录物 (Opa-interacting protein 5 antisense RNA 1, OIP5-AS1) 作为其中一种 LncRNA,在进化上是保守的,且主要在细胞质中表达,相关研究显示 LncRNA OIP5-AS1 在缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 处理的心肌细胞和 MI/R 大鼠模型中高表达,抑制 LncRNA OIP5-AS1 表达可以抑制心肌 I/R 损伤中的细胞凋亡^[6]。本研究通过网站预测,miR-126-5p 和 LncRNA OIP5-AS1 有靶向结合位点。相关研究显示,miR-126-5p 在扩张型心脏病心肌组织中低表达^[7]。肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (tumor necrosis factor receptor associated factor 3, TRAF3) 通过与受体、酶和调节剂结合,调节细胞生物学行为、炎症反应等多种生物过程,在 I/R 大鼠模型和 H/R 处理的心肌细胞中均高表达,其高表达加重 MI/R 诱导的心肌细胞焦亡和损伤^[8]。已有研究证实 TRAF3 是 miR-126-5p 的下游靶基因^[9]。本研究根据上述报道推测并验证,LncRNA OIP5-AS1 可能靶向 miR-126-5p/TRAF3 轴参与 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

H9C2 细胞 (货号: CL1075) 购自无锡欣润生物科技有限公司; 双荧光素酶试剂盒 (货号: GM-040502) 购自上海吉满生物科技有限公司; miR-126-5p mimic (货号: HY-R00175) 购自 Med Chem Express LLC; anti-miR-126-5p (货号: SBI-MZIP126-3p-PA-1) 购自武汉佰瑞得生物技术有限公司; qRT-PCR 试剂盒 (货号: F-430) 购自北京美科美生物技术有限公司; SOD、ROS、MDA ELISA 试剂盒 (货号: U96-9801E、U96-3425E、U96-1651E) 购自上海攸碧艾生物科技有限公司; GAPDH、

TRAF3、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、HRP (货号: ab181602、ab239357、ab214430、ab32351、ab7090) 购自英国 Abcam 公司; 流式细胞仪 (型号: CytoFLEX S) 购自苏州苏童生物科技有限公司; qRT-PCR 仪 [型号: TC-96/G/H(b)B] 购自杭州博日科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 双荧光素酶报告基因实验 我们采用 Starbase 数据库对 LncRNA OIP5-AS1 与 miR-126-5p、miR-126-5p 与 TRAF3 之间的潜在靶向关系进行了预测。将野生型 (WT) 和突变型 (MUT) OIP5-AS1-WT/MUT 或 TRAF3-WT/MUT 片段插入 pmirGLO 载体,将这些质粒与 miR-126-5p mimic、mimic NC 共转染到 H9C2 细胞中,在 37 °C 孵育 24 h 后,测定荧光素酶活性。

1.2.2 细胞分组 构建 2 条 OE-OIP5-AS1 载体 (记为 OE-OIP5-AS1 #1、OE-OIP5-AS1 #2)、2 条 sh-OIP5-AS1 载体 (记为 sh-OIP5-AS1 #1、sh-OIP5-AS1 #2) 转染 H9C2 细胞,并采用 qRT-PCR 检测转染效率。另将 H9C2 细胞分为 NC 组 (正常培养)、H/R 组 (使用无糖培养基并置于 940 mL/L N₂、50 mL/L CO₂、10 mL/L O₂ 的培养箱中缺氧 2 h,弃去培养基换为含糖培养基置于 950 mL/L O₂、50 mL/L CO₂ 中培养 24 h^[10])、OE-NC 组 (H/R 处理+转染 OE-NC)、OE-OIP5-AS1 组 (H/R 处理+转染 OE-OIP5-AS1)、OE-OIP5-AS1+mimic NC 组 (H/R 处理+转染 OE-OIP5-AS1+mimic NC)、OE-OIP5-AS1+miR-126-5p mimic 组 (H/R 处理+转染 OE-OIP5-AS1+miR-126-5p mimic)、sh-NC 组 (H/R 处理+转染 sh-NC)、sh-OIP5-AS1 组 (H/R 处理+转染 sh-OIP5-AS1)、sh-OIP5-AS1+anti-NC 组 (H/R 处理+转染 sh-OIP5-AS1+anti-NC)、sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p 组 (H/R 处理+转染 sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p)。

1.2.3 qRT-PCR 法检测 LncRNA OIP5-AS1、miR-126-5p、TRAF3 mRNA 表达 用 TRIzol 试剂从 H9C2 细胞中提取总 RNA,使用 NanoDrop 2000 分光光度计定量 RNA 浓度和纯度,进行反转录合成 cDNA,使用 qRT-PCR 试剂盒,按以下程序进行扩增: 95 °C 初始变性 15 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。以 GAPDH 和 U6 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 相对表达量,引物序列见表 1。

1.2.4 MTT 检测 H9C2 细胞增殖情况 H9C2 细胞密度调整为 5×10³/mL,将置于 96 孔板中,每孔细胞悬液 100 μL,37 °C 孵育过夜,然后在每个孔中加入 10 μL

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Sequences of qRT-PCR primers

基因 Gene	上游引物(5'→3') Upream primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primer (5'→3')
LncRNA OIP5-AS1	AGG TGC AAG CAT ACCGTC TC	TCA ACA CAG CCC TCT GCA TT
miR-126-5p	CATT ATT ACT TTT GGT ACG CGA	GTG CGT GTC GTG GAG TCG
TRAF3	GCG TGT CAA GAG AGC ATC GTT	GCA GAT GTC CCA GCA TTA ACT
U6	CCG ATG ACG ATC AGG CT	TGC GGA TAG ACG ACA
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA	AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG

MTT溶液, 37 °C孵育4 h, 加入150 μL二甲亚砷, 振荡10 min, 应用酶标仪测定490 nm处的吸光度(D_{490})值。

1.2.5 流式细胞仪和TUNEL染色检测H9C2细胞凋亡情况 将H9C2细胞用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液于37 °C消化2 min, 加入完全培养基终止消化, 25 °C条件下9 800 r/min离心5 min, 弃上清, 用500 μL结合缓冲液重悬, 用5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI溶液在黑暗中25 °C处理细胞悬液15 min, 染色样品使用流式细胞进行分析。以 4×10^4 /孔的密度将H9C2细胞接种于预先铺有无菌爬片的24孔板中, 经培养过夜充分贴壁后, 每孔加入40 mL/L多聚甲醛1 mL, 于室温条件下避光固定15 min, 每孔加入0.5 mL 预冷的1 mL/L Triton X-100溶液, 于冰上进行透膜处理5 min, 每孔滴加50 μL TUNEL反应液于37 °C避光孵育60 min, 加入DAPI染液对细胞核进行复染, 使用抗荧光淬灭封片剂封片后, 在荧光显微镜下观察。

1.2.6 ELISA法检测H9C2细胞中SOD、ROS、MDA的表达情况 采用RIPA裂解缓冲液裂解H9C2细胞于4 °C、3 500 r/min离心15 min, 收集上清液, 分别采用相应ELISA试剂盒按说明书进行反应, 加入终止液终止后, 在酶标仪450 nm处检测SOD、ROS、MDA的表达情况。

1.2.7 Western blot检测H9C2细胞中TRAF3、Cleaved Caspase-3/Caspase-3蛋白的表达情况 采用RIPA裂解缓冲液提取H9C2细胞总蛋白, 采用BCA试剂盒测定上清液中蛋白的浓度, 100 mL/L SDS-PAGE用于分离蛋白质, 然后将其电转移到PVDF膜上, 用浓度为50 mL/L的BSA阻断后, 将膜与稀释的GAPDH(1:10 000)、TRAF3(1:1 000)、Cleaved Caspase-3(1:5 000)、Caspase-3(1:5 000)一抗4 °C下孵育过夜, 用二抗(1:2 000)在25 °C孵育1 h, ECL显色底物用于显示条带。

1.3 统计与分析

数据用SPSS 25.0分析, 符合正态分布的计量资

料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较行SNK- q 检验。

2 结果

2.1 LncRNA OIP5-AS1和miR-126-5p、miR-126-5p和TRAF3的靶向关系分析

LncRNA OIP5-AS1与miR-126-5p、miR-126-5p和TRAF3之间存在结合位点, 见图1、图2。在转染OIP5-AS1-WT和TRAF3-WT的细胞中, miR-126-5p mimic组的荧光素酶活性降低($P < 0.01$), 见表2。

2.2 LncRNA OIP5-AS1过表达对H9C2细胞中mRNA表达的影响

与OE-NC组(1.00 ± 0.01)比较, OE-OIP5-AS1 #1(3.98 ± 4.05)、#2(4.56 ± 4.87)中LncRNA OIP5-AS1表达水平显著升高($P < 0.01$), 代表转染成功。OE-OIP5-AS1 #2转染效率更高, 故选择OE-OIP5-AS1 #2进行后续研究。

H/R组LncRNA OIP5-AS1、TRAF3 mRNA表达水平高于NC组, miR-126-5p表达水平低于NC组($P < 0.01$); OE-OIP5-AS1组LncRNA OIP5-AS1、TRAF3 mRNA表达水平高于H/R组、OE-NC组, miR-126-5p表达水平低于H/R组、sh-NC组($P < 0.01$); OE-OIP5-AS1+miR-126-5p mimic组TRAF3 mRNA表达水平低于OE-OIP5-AS1组、OE-OIP5-AS1+mimic NC组, miR-126-5p表达水平高于OE-OIP5-AS1组、OE-OIP5-AS1+mimic NC组($P < 0.01$); 见表3。

2.3 LncRNA OIP5-AS1过表达对H9C2细胞增殖的影响

H/R组 D_{490} 值低于NC组($P < 0.01$); OE-OIP5-AS1组 D_{490} 值低于H/R组、sh-NC组($P < 0.01$); OE-OIP5-AS1+miR-126-5p mimic组 D_{490} 值高于OE-OIP5-AS1组、OE-OIP5-AS1+mimic NC组($P < 0.01$),



图1 LncRNA OIP5-AS1与miR-126-5p的结合位点

Fig.1 The binding site of LncRNA OIP5-AS1 and miR-126-5p

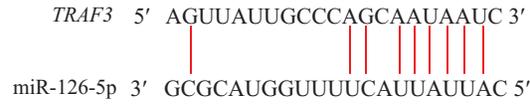


图2 miR-126-5p与TRAF3的结合位点

Fig.2 The binding site of miR-126-5p and TRAF3

表2 双荧光素酶活性比较

Table 2 Comparison of dual luciferase activity

组别 Groups	OIP5-AS1-WT	OIP5-AS1-MUT	TRAF3-WT	TRAF3-MUT
mimic-NC	1.00±0.04	0.95±0.11	1.00±0.03	1.03±0.02
miR-126-5p	0.34±0.05*	1.02±0.14	0.48±0.11*	0.91±0.04

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与mimic-NC组比较。

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with mimic-NC group.

表3 LncRNA OIP5-AS1过表达对H9C2细胞中LncRNA OIP5-AS1、miR-126-5p、TRAF3 mRNA表达和 D_{490} 值的影响Table 3 The effect of LncRNA OIP5-AS1 overexpression on the expression levels of LncRNA OIP5-AS1, miR-126-5p, TRAF3 mRNA and D_{490} value in H9C2 cells

分组 Groups	LncRNA OIP5-AS1	miR-126-5p	TRAF3	D_{490}
NC	1.00±0.03	1.00±0.02	1.00±0.02	0.93±0.11
H/R	3.59±0.41*	0.19±0.03*	2.46±0.31*	0.34±0.08*
OE-NC	3.53±0.45	0.21±0.04	2.43±0.33	0.37±0.09
OE-OIP5-AS1	8.17±0.93 ^{#&}	0.06±0.01 ^{#&}	5.98±0.63 ^{#&}	0.13±0.05 ^{#&}
OE-OIP5-AS1+mimic NC	8.23±0.96	0.05±0.01	6.03±0.64	0.11±0.04
OE-OIP5-AS1+miR-126-5p mimic	8.21±0.95	0.18±0.03 ^{△▽}	3.11±0.36 ^{△▽}	0.31±0.06 ^{△▽}

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与NC组比较; [#] $P<0.05$, 与H/R组比较; [&] $P<0.05$, 与OE-NC组比较; [△] $P<0.05$, 与OE-OIP5-AS1组比较; [▽] $P<0.05$, 与OE-OIP5-AS1+mimic NC组比较。

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with NC group; [#] $P<0.05$ compared with H/R group; [&] $P<0.05$ compared with OE-NC group; [△] $P<0.05$ compared with OE-OIP5-AS1 group; [▽] $P<0.05$ compared with OE-OIP5-AS1+mimic NC group.

见表3。

2.4 LncRNA OIP5-AS1敲低对H9C2细胞中mRNA表达的影响

与sh-NC组(1.00±0.03)比较, sh-OIP5-AS1 #1(0.25±0.05)、#2(0.32±0.06)中LncRNA OIP5-AS1表达水平显著降低($P<0.01$), 代表转染成功, sh-OIP5-AS1 #1转染效率更高, 故选择sh-OIP5-AS1 #1进行后续研究。H/R组LncRNA OIP5-AS1、TRAF3 mRNA表达水平高于NC组, miR-126-5p表达水平低于NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1组LncRNA OIP5-

AS1、TRAF3 mRNA表达水平低于H/R组、sh-NC组, miR-126-5p表达水平高于H/R组、sh-NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p组TRAF3 mRNA表达水平高于sh-OIP5-AS1组、sh-OIP5-AS1+anti-NC组, miR-126-5p表达水平低于sh-OIP5-AS1组、sh-OIP5-AS1+anti-NC组($P<0.01$); 见表4。

2.5 LncRNA OIP5-AS1敲低对H9C2细胞增殖的影响

H/R组 D_{490} 值低于NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1组 D_{490} 高于H/R组、sh-NC组($P<0.01$); sh-OIP5-

AS1+anti-miR-126-5p组 D_{490} 值低于sh-OIP5-AS1组、sh-OIP5-AS1+anti-NC组($P<0.01$);见表4。

2.6 LncRNA OIP5-AS1敲低对H9C2细胞凋亡的影响

H/R组凋亡率高于NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1组凋亡率低于H/R组、sh-NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p组凋亡率高于sh-OIP5-AS1组、sh-OIP5-AS1+anti-NC组($P<0.01$);见图3、图4和表4。

2.7 LncRNA OIP5-AS1敲低对H9C2中SOD、ROS、MDA含量的影响

H/R组SOD值低于NC组, ROS、MDA表达水平高于NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1组SOD值高于

H/R组、sh-NC组, ROS、MDA表达水平低于H/R组、sh-NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p组SOD表达低于sh-OIP5-AS1组、sh-OIP5-AS1+anti-NC组, ROS、MDA表达水平高于sh-OIP5-AS1组、sh-OIP5-AS1+anti-NC组($P<0.01$);见表5。

2.8 LncRNA OIP5-AS1敲低对TRAF3、Cleaved Caspase-3/Caspase-3蛋白表达的影响

H/R组TRAF3、Cleaved Caspase-3/Caspase-3高于NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1组TRAF3、Cleaved Caspase-3/Caspase-3低于H/R组、sh-NC组($P<0.01$); sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p组TRAF3、Cleaved Caspase-3/Caspase-3高于sh-OIP5-AS1组、sh-OIP5-

表4 LncRNA OIP5-AS1敲低H9C2细胞中LncRNA OIP5-AS1、miR-126-5p、TRAF3 mRNA表达, D_{490} 和凋亡率的影响
Table 4 The effects of LncRNA OIP5-AS1 knockdown on the expression of LncRNA OIP5-AS1, miR-126-5p, TRAF3 mRNA, D_{490} and apoptosis rate in H9C2 cells

分组 Groups	LncRNA OIP5-AS1	miR-126-5p	TRAF3	D_{490}	凋亡率/% Apoptotic rate /%
NC	1.00±0.01	1.00±0.05	1.00±0.02	0.95±0.15	1.83±0.42
H/R	3.63±0.32*	0.23±0.06*	2.47±0.31*	0.29±0.06*	36.17±3.97*
sh-NC	3.57±0.39	0.26±0.06	2.73±0.29	0.34±0.07	35.92±3.83
sh-OIP5-AS1	1.42±0.18 ^{#*}	0.92±0.10 ^{#*}	1.48±0.20 ^{#*}	0.85±0.14 ^{#*}	13.56±1.98 ^{#*}
sh-OIP5-AS1+anti-NC	1.49±0.25	0.88±0.10	1.45±0.17	0.82±0.13	14.08±2.15
sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p	1.45±0.22	0.42±0.08 ^{△▽}	2.37±0.26 ^{△▽}	0.46±0.08 ^{△▽}	27.31±3.27 ^{△▽}

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与NC组比较; # $P<0.05$, 与H/R组比较; * $P<0.05$, 与sh-NC组比较; [△] $P<0.05$, 与sh-OIP5-AS1组比较; [▽] $P<0.05$, 与sh-OIP5-AS1+anti-NC组比较。

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with NC group; # $P<0.05$ compared with H/R group; * $P<0.05$ compared with sh-NC group; [△] $P<0.05$ compared with sh-OIP5-AS1 group; [▽] $P<0.05$ compared with sh-OIP5-AS1+anti-NC group.

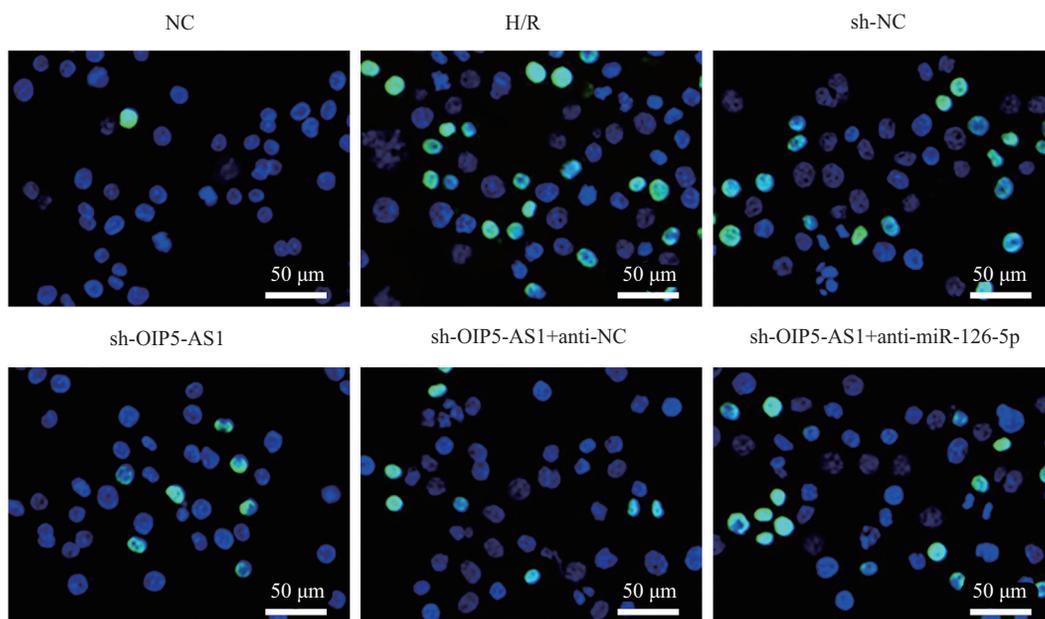


图3 TUNNEL染色检测H9C2细胞凋亡

Fig.3 TUNNEL staining for detecting apoptosis in H9C2 cells

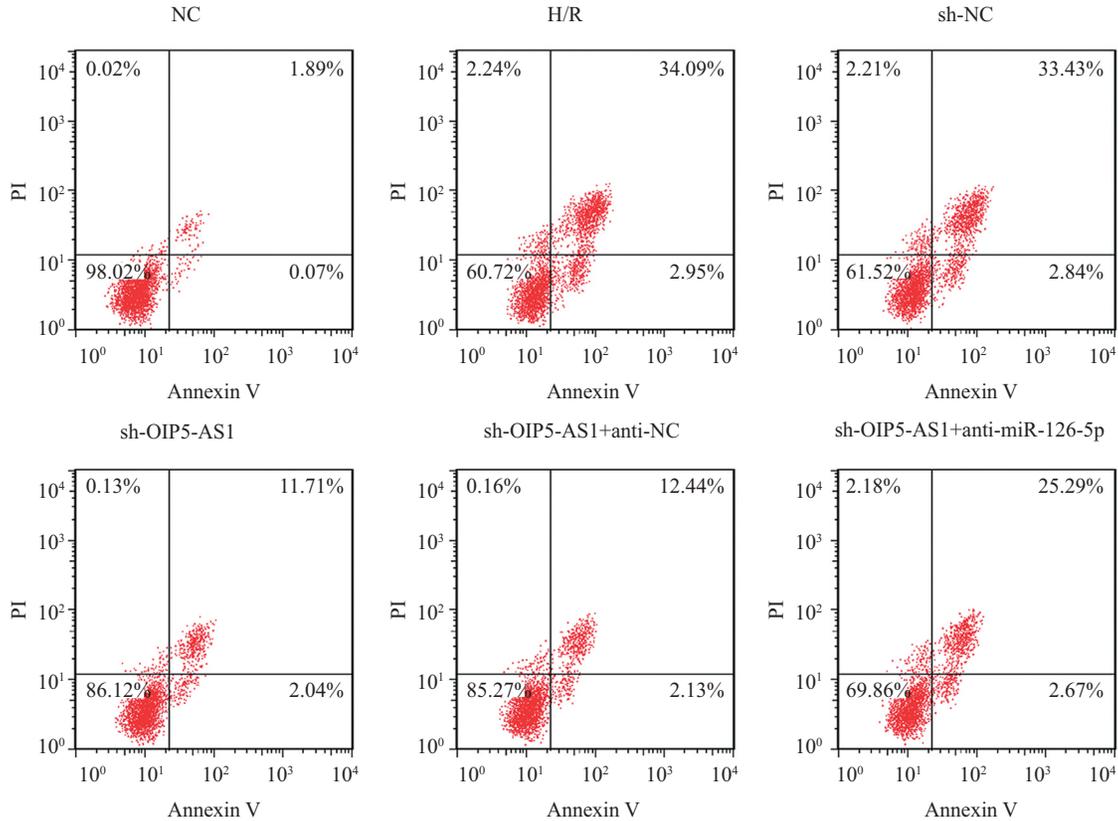


图4 流式细胞仪检测H9C2细胞的凋亡

Fig.4 Apoptosis of H9C2 cells detected by flow cytometry

表5 LncRNA OIP5-AS1敲低对H9C2细胞中SOD、ROS、MDA含量的影响

Table 5 The effects of LncRNA OIP5-AS1 knockdown on the contents of SOD, ROS and MDA in H9C2 cells

分组 Groups	SOD /U·mL ⁻¹	ROS /U·mL ⁻¹	MDA /nmol·mL ⁻¹
NC	89.36±9.28	41.92±6.08	13.69±1.57
H/R	23.48±3.76*	98.13±9.92*	49.12±5.26*
sh-NC	22.87±4.02	97.94±9.84	48.74±5.13
sh-OIP5-AS1	74.13±8.32 ^{#&}	48.03±7.48 ^{#&}	15.07±2.34 ^{#&}
sh-OIP5-AS1+anti-NC	72.49±8.07	47.85±7.21	14.93±2.17
sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p	36.51±6.12 ^{△▽}	89.49±9.03 ^{△▽}	42.38±4.84 ^{△▽}

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与NC组比较; [#] $P<0.05$, 与H/R组比较; [&] $P<0.05$, 与sh-NC组比较; [△] $P<0.05$, 与sh-OIP5-AS1组比较; [▽] $P<0.05$, 与sh-OIP5-AS1+anti-NC组比较。

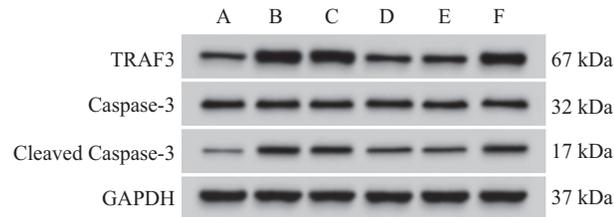
$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with NC group; [#] $P<0.05$ compared with H/R group; [&] $P<0.05$ compared with sh-NC group; [△] $P<0.05$ compared with sh-OIP5-AS1 group; [▽] $P<0.05$ compared with sh-OIP5-AS1+anti-NC group.

AS1+anti-NC组($P<0.01$); 见图5、表6。

3 讨论

MI是一项重大的全球性健康挑战,具有高发病率和死亡率的特点。目前,心肌血运重建的主要策略包括经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉旁路移植术及传统溶栓治疗,这些方法虽能有效恢复梗死区的血液灌注,但在增加梗死周围区域含氧血流量的

同时,也容易诱发心肌缺血再灌注损伤^[11]。心肌再灌注的早期阶段会引起氧化应激,缺血期间产生的ROS水平较低,在再灌注期间由于复氧而急剧增加,过量的ROS可引起心肌细胞广泛的氧化损伤,进而导致SOD水平降低、MDA水平升高,而氧化应激亦可通过多种机制介导心肌损伤和心肌细胞凋亡^[12-13]。本研究通过H/R处理心肌细胞构建MI/R体外细胞模型时发现,心肌细胞的氧化应激、细胞凋亡明显增



A: NC组; B: H/R组; C: sh-NC组; D: sh-OIP5-AS1组; E: sh-OIP5-AS1+anti-NC组; F: sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p组。

A: NC group; B: H/R group; C: sh-NC group; D: sh-OIP5-AS1 group; E: sh-OIP5-AS1+anti-NC group; F: sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p group.

图5 Western blot检测H9C2细胞中蛋白表达

Fig.5 Western blot analysis of protein expression in H9C2 cells

表6 LncRNA OIP5-AS1敲低对H9C2细胞中蛋白表达的影响

Table 6 The effect of LncRNA OIP5-AS1 knockdown on protein expression in H9C2 cells

分组 Groups	TRAF3	Cleaved Caspase-3/Caspase-3
NC	0.35±0.08	0.24±0.08
H/R	1.29±0.15*	0.92±0.13*
sh-NC	1.26±0.13	0.88±0.12
sh-OIP5-AS1	0.49±0.09 ^{*&}	0.38±0.10 ^{*&}
sh-OIP5-AS1+anti-NC	0.52±0.10	0.37±0.10
sh-OIP5-AS1+anti-miR-126-5p	1.14±0.12 ^{△▽}	0.79±0.11 ^{△▽}

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与NC组比较; [#] $P<0.05$, 与H/R组比较; [&] $P<0.05$, 与sh-NC组比较; [△] $P<0.05$, 与sh-OIP5-AS1组比较; [▽] $P<0.05$, 与sh-OIP5-AS1+anti-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with NC group; [#] $P<0.05$ compared with H/R group; [&] $P<0.05$ compared with sh-NC group; [△] $P<0.05$ compared with sh-OIP5-AS1 group; [▽] $P<0.05$ compared with sh-OIP5-AS1+anti-NC group.

加, 提示氧化应激通过促进心肌细胞凋亡, 导致H/R诱导的心肌细胞损伤。

LncRNA虽不编码蛋白质, 但可通过表观遗传调控、转录干扰、miRNA海绵作用等多种机制在表观遗传、转录及转录后水平发挥调控作用, 并广泛参与动脉粥样硬化、心肌肥厚、心力衰竭等心血管疾病的发生发展进程^[4]。ZHANG等^[15]发现, 在人脐血管内皮细胞中, ox-LDL暴露可显著抑制细胞活力, 上调LncRNA OIP5-AS1表达, 证实LncRNA OIP5-AS1可通过调节miR-30c-5p/NF- κ B通路导致ox-LDL诱导的HUVECs损伤。ZHENG等^[16]发现, LncRNA OIP5-AS1在ox-LDL诱导的内皮细胞中高表达, 抑制LncRNA OIP5-AS1可以通过miR-98-5p/HMGB1轴抑制ox-LDL诱导的细胞凋亡、炎症损伤和氧化应激损伤。YUE等^[17]发现, 在棕榈酸诱导的心肌细胞中LncRNA OIP5-AS1表达量显著增加, LncRNA OIP5-AS1的下调可以通过调节miR-22/NLRP3抑制肥胖诱导的心功能障碍、心肌肥大、纤维化、重塑和焦亡。上述研究表明, LncRNA OIP5-AS1在心肌损伤细胞中高表达, 敲低LncRNA OIP5-AS1可以通过抑

制炎症反应、氧化应激、纤维化等过程, 进而促进细胞的活力, 抑制细胞凋亡, 减轻细胞损伤。本研究发现在H/R诱导的心肌细胞中LncRNA OIP5-AS1高表达, LncRNA OIP5-AS1过表达抑制H/R诱导的心肌细胞增殖, 敲低LncRNA OIP5-AS1可以促进H/R诱导的心肌细胞增殖, 抑制细胞凋亡和氧化应激, 提示LncRNA OIP5-AS1可能通过促进氧化应激、细胞凋亡, 导致H/R诱导的心肌细胞损伤。NIU等^[18]发现, 在H/R处理的心肌细胞和MI/R大鼠模型中LncRNA OIP5-AS1高表达, 且LncRNA OIP5-AS1高表达可通过调节DRP1磷酸化抑制MI/R中线粒体过度裂变。这和本研究的结果相反, 这可能是由LncRNA OIP5-AS1在H/R诱导的心肌细胞损伤的不同阶段发挥的作用不同, 具有较高的异质性导致的。

作为竞争性内源性RNA, LncRNA可以以多种方式与miRNA相互作用。本研究发现LncRNA OIP5-AS1可以靶向负调控miR-126-5p, 提示LncRNA OIP5-AS1可能靶向调控miR-126-5p参与调控H/R诱导的心肌细胞损伤。前人发现, 急性MI患者血清中miR-126-5p低表达, 在缺氧条件下miR-126-

5p过表达通过靶向IL-17A促进H9C2细胞的增殖,抑制细胞凋亡^[19]。研究表明,在MI/R模型大鼠中miR-126-5p低表达,过表达miR-126-5p通过激活PI3K/Akt信号通路,抑制MI/R模型大鼠的炎症反应、氧化应激、心肌细胞凋亡,减轻心肌病理损伤^[20]。此外有研究显示,稳心汤通过调控miR-126-5p/Bcl-2/mPTP信号通路,抑制氧化应激和心肌细胞凋亡,降低线粒体膜通透性,减轻H/R诱导的心肌细胞损伤^[21]。以上研究说明,miR-126-5p在心肌损伤细胞中低表达,激活miR-126-5p可以通过抑制炎症反应、氧化应激、降低线粒体膜通透性,减轻心肌细胞损伤。与前人研究类似本研究发现,在H/R诱导的心肌细胞中miR-126-5p低表达;LncRNA OIP5-AS1过表达导致miR-126-5p表达水平进一步降低,而在LncRNA OIP5-AS1过表达的基础上进一步上调miR-126-5p则促进细胞增殖;LncRNA OIP5-AS1敲低导致miR-126-5p高表达,而在LncRNA OIP5-AS1敲低的基础上抑制miR-126-5p则逆转LncRNA OIP5-AS1敲低的作用,提示LncRNA OIP5-AS1可能通过海绵化miR-126-5p,促进H/R诱导的心肌细胞损伤。

研究表明,miRNA通过抑制mRNA翻译或促进mRNA降解来控制基因表达。本研究前期发现,miR-126-5p可以靶向负调控TRAF3,提示miR-126-5p可以调控TRAF3抑制H/R诱导的心肌细胞损伤。TRAF3是一种E3泛素连接酶,参与各种蛋白激酶和磷酸酶的激活和调节,在多种心血管疾病中发挥促进作用^[22]。XIE等^[23]发现,TRAF3在阿霉素诱导的心肌病小鼠模型中高表达,ADAM17通过激活TRAF3/TAK1/MAPKs信号转导,加重阿霉素诱导的心肌细胞凋亡、心脏重塑和功能障碍。YAN等^[24]发现,TRAF3在氧-葡萄糖剥夺的心肌细胞中高表达,间充质干细胞外泌体负载miRNA-129-5p通过抑制TRAF3表达减轻心力衰竭的细胞凋亡和氧化应激。JIN等^[25]发现,在体外心肌I/R模型中TRAF3高表达,Circ_0050908敲低通过miR-324-5p/TRAF3轴减少细胞凋亡、炎症反应和氧化应激,从而保护心肌细胞免受I/R损伤。这提示TRAF3在心肌受损细胞中高表达,抑制TRAF3可以通过抑制炎症反应、氧化应激,减轻心肌损伤。本研究发现,TRAF3在H/R诱导的心肌细胞中高表达,LncRNA OIP5-AS1敲低导致TRAF3低表达,而进一步在LncRNA OIP5-AS1敲低的基础上,抑制miR-126-5p则促进TRAF3表达,提示

LncRNA OIP5-AS1可以减轻H/R诱导的心肌细胞损伤,其机制可能是通过靶向miR-126-5p/TRAF3轴实现的。

综上所述,LncRNA OIP5-AS1可能通过靶向miR-126-5p/TRAF3轴,减轻H/R诱导的心肌细胞损伤。然而,本研究仅使用细胞的H/R模型,无法完全模拟体内MI/R的复杂微环境,且未进行TRAF3 siRNA或过表达质粒干预后的表型变化,无法排除其他潜在靶标干扰,因此后续会重新设计实验,继续分析。

参考文献 (References)

- [1] CHEN W, ZHANG Y, WANG Z, et al. Dapagliflozin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing ferroptosis via MAPK signaling inhibition [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14(1): 1078205-19.
- [2] WANG L, LIU J, WANG Z, et al. Dexmedetomidine abates myocardial ischemia reperfusion injury through inhibition of pyroptosis via regulation of miR-665/MEF2D/Nrf2 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165(1): 115255-68.
- [3] HEUSCH G. Myocardial ischemia/reperfusion: translational pathophysiology of ischemic heart disease [J]. *Med*, 2024, 5(1): 10-31.
- [4] WEI P, DONG Z, LOU M. Lncrna FGD5-AS1 aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by sponging Mir-129-5p [J]. *Iran J Public Health*, 2022, 51(10): 2281-8.
- [5] WANG Z, LUO W, ZHONG P, et al. LncRNA HAGLR modulates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice through regulating miR-133a-3p/MAPK1 axis [J]. *Open Med*, 2022, 17(1): 1299-307.
- [6] YANG J, LIU J, LIU X, et al. Downregulation of OIP5-AS1 inhibits apoptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury via modulating the MiR-145-5p/ROCK1 axis [J]. *PLoS One*, 2025, 20(5): 324909-24.
- [7] CHENG X, JIAN D, XING J, et al. Circulating cardiac MicroRNAs safeguard against dilated cardiomyopathy [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(5): 1258-78.
- [8] ZHANG Y, HAILATI J, MA X, et al. Ubiquitin-specific protease 11 aggravates ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte pyroptosis and injury by promoting TRAF3 deubiquitination [J]. *Balkan Med J*, 2023, 40(3): 205-14.
- [9] WANG J, CHENG Y, WANG L, et al. Chicken miR-126-5p negatively regulates antiviral innate immunity by targeting TRAF3 [J]. *Vet Res*, 2022, 53(1): 82-95.
- [10] 张燕群, 孟昭昀, 王秀玲, 等. CircHIPK3调节miR-495-3p/CCND1轴对缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤的影响[J]. *中国老年学杂志(ZHANG Y Q, MENG Z Y, WANG X L, et al. The effect of CircHIPK3 regulating miR-495-3p/CCND1 axis in hypoxia/reoxygenation induced myocardial cell injury [J]. Chinese Journal of Gerontology)*, 2025, 45 (9): 2144-9.
- [11] CHEN L, LÜ Y, WU H, et al. Gastrodin exerts perioperative myocardial protection by improving mitophagy through the PINK1/Parkin pathway to reduce myocardial ischemia-reperfu-

- sion injury [J]. *Phytomedicine*, 2024, 133(1): 155900-14.
- [12] ZHANG X, WANG C, XU H, et al. Propofol inhibits myocardial injury induced by microvesicles derived from hypoxia-reoxygenated endothelial cells via lncCCT4-2/CCT4 signaling [J]. *Biol Res*, 2023, 56(1): 20-35.
- [13] WANG N, YU Y B. MiR-486 alleviates hypoxia/reoxygenation-induced H9c2 cell injury by regulating forkhead box D3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(2): 422-31.
- [14] WANG Y, SUN X, SUN X. The Functions of Long Non-Coding RNA (lncRNA) H19 in the Heart [J]. *Heart Lung Circ*, 2022, 31(3): 341-9.
- [15] ZHANG L, LI Q, CHEN Y, et al. lncRNA OIP5-AS1 accelerates ox-LDL-treated HUVECs injury by NF- κ B pathway via miR-30c-5p [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2021, 78(4): 449-60.
- [16] ZHENG Z, ZHANG G, LIANG X, et al. lncRNA OIP5-AS1 facilitates ox-LDL-induced endothelial cell injury through the miR-98-5p/HMGB1 axis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(1): 443-55.
- [17] YUE Q, LIU Y, JI J, et al. Down-regulation of OIP5-AS1 inhibits obesity-induced myocardial pyroptosis and miR-22/NLRP3 inflammasome axis [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11(10): 1066-179.
- [18] NIU X, ZHANG J, HU S, et al. lncRNA Oip5-as1 inhibits excessive mitochondrial fission in myocardial ischemia/reperfusion injury by modulating DRP1 phosphorylation [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 72-109.
- [19] REN Y, BAO R, GUO Z, et al. miR-126-5p regulates H9c2 cell proliferation and apoptosis under hypoxic conditions by targeting IL-17A [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(1): 67-74.
- [20] 李静, 张晨峰, 于丽娜, 等. miR-126-5p过表达激活PI3K/Akt信号通路对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响研究[J]. *联勤军事医学*(LI J, ZHANG C F, YU L N, et al. Effect of miR-126-5p overexpression activating PI3K/Akt signaling pathway on myocardial ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Mil Med Jnt Log*, 2024, 38(11): 916-21,987.
- [21] 解紫从, 刘咏梅, 陈恒文, 等. 基于miR-126-5p/Bcl-2/mPTP通路探究稳心汤对缺氧/复氧诱导H9c2心肌细胞损伤修复的作用机制[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*(XIE Z Z, LIU Y M, CHEN H W, et al. The effect of wenxin formula on the damage and repair of H9c2 myocardial cells induced by hypoxia/reoxygenation based on miR-126-5p/Bcl-2/mPTP regulatory pathway [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease*), 2023, 21(15): 2754-65.
- [22] WANG J, WANG X, CAO M, et al. CircUSP39/miR-362-3p/TRAF3 axis mediates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Int Heart J*, 2023, 64(2): 263-73.
- [23] XIE L, XUE F, CHENG C, et al. Cardiomyocyte-specific knockout of ADAM17 alleviates doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibiting TNF α -TRAF3-TAK1-MAPK axis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 273-92.
- [24] YAN F, CUI W, CHEN Z. Mesenchymal stem cell-derived exosome-loaded microRNA-129-5p Inhibits TRAF3 Expression to alleviate apoptosis and oxidative stress in heart failure [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(7): 631-45.
- [25] JIN A, ZHANG Q, CHENG H, et al. Circ_0050908 up-regulates TRAF3 by sponging miR-324-5p to aggravate myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108(1): 108740.