doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.10.001

❖基础研究❖

miR-499a-5p 通过靶向 TLR2 抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞氧化应激和凋亡

杨伟,王雁,李俊杰,王燕琼,陈文栋
(昆明医科大学第一附属医院麻醉科,云南 昆明 650032)

【摘要】**目的:** 探究 miR-499a-5p 与 TLR2 的靶向关系,及其对缺氧/复氧(A/R)诱导的心肌细胞氧化应激和凋亡的影响。**方法:** 培养 H9c2 细胞并分为模型组和对照组,对照组在常氧条件下培养,模型组为缺氧/复氧模型,并进一步分为 miR-NC 组、miR-499a-5p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-499a-5p 组、miR-499a-5p + pGL3-Basic 组和 miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 组;流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率;qRT-PCR 检测 miR-499a-5p 和 TLR2 mRNA 的表达水平;免疫印迹(Western blot)检测 TLR2、B 淋巴细胞瘤因子 2XL(Bcl-xL)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)蛋白表达;酶联免疫吸附法(ELISA)检测活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量;双荧光素报告基因检测验证 miR-499a-5p 与 TLR2 的靶向关系。**结果:** 与对照组相比,模型组中 miR-499a-5p 表达降低,TLR2 表达升高($P < 0.05$);过表达 miR-499a-5p 可降低 A/R 模型心肌细胞凋亡和氧化应激作用,并靶向抑制 TLR2;过表达 TLR2 逆转了 miR-499a-5p 对 A/R 模型心肌细胞抗凋亡及降低氧化应激的作用。**结论:** miR-499a-5p 可能通过靶向抑制 TLR2 的激活,降低心肌细胞凋亡率及氧化应激反应,发挥保护心肌细胞的作用。

【关键词】miR-499;TLR2;心肌细胞;缺氧/复氧;氧化应激;细胞凋亡
【中图分类号】R542.2 【文献标志码】A

miR-499a-5p suppresses hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte oxidative stress and apoptosis by targeting TLR2

YANG Wei, WANG Yan, LI Jun-jie, WANG Yan-qiong, CHEN Wen-dong
(*Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming* 650032, *Yunnan, China*)

【**Abstract**】**Objective**: To explore the targeting relationship between miR-499a-5p and TLR2, and its effect on hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte oxidative stress and apoptosis. **Methods**: H9c2 cells were cultured and grouped, the control group was cultured under normoxia, and the model group was made into a hypoxia/reoxygenation model. The model group was divided into miR-NC group, miR-499a-5p group, anti-miR-NC group, anti-miR-499a-5p group, miR-499a-5p + pGL3-Basic group, and miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 group. The apoptosis rate of each group was detected by flow cytometry, and the expression levels of miR-499a-5p and TLR2 mRNA were detected by QRT-PCR. The expression of TLR2, B-lymphocytoma factor 2XL (Bcl-XL), Bcl-2 associated X protein (Bax) and caspase-3 protein containing cysteine were detected by Western blot. The contents of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The targeting relationship between miR-499a-5p and TLR2 was verified by dual luciferin reporter gene assay. **Results**: Compared with the control group, the expression of miR-499a-5p in the model group was decreased, and the expression of TLR2 was increased, overexpression of miR-499a-5p could reduce the promotion of apoptosis and oxidative stress in A/R model cardiomyocytes, and targeted inhibition TLR2. Overexpression of TLR2 reversed the effects of miR-499a-5p on anti-apoptotic and oxidative stress reduction in A/R model cardiomyocytes. **Conclusion**: miR-499a-5p may play a role in protecting cardiomyocytes by inhibiting the activation of TLR2, reducing the apoptosis rate and oxidative stress response of cardiomyocytes.

【**Key words**】miR-499a-5p; TLR2; Cardiomyocytes; Hypoxia/reoxygenation; Oxidative stress; Apoptosis

急性心肌梗死是临床上常见的心血管疾病,由于冠状动脉内斑块破裂、血栓形成导致冠状动脉血管闭塞、心肌细胞缺血缺氧损害[1]。然而心肌细胞在长时间缺血缺氧状态下可导致细胞内线粒体功能

基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金项目资助[2019FE001(-045)];云南省后备人才基金项目(H-2019028)
作者简介: 杨伟(1980-),男,博士,副主任医师。E-mail:ywkm0@163.com
通讯作者: 陈文栋,博士。E-mail:chenwendong1105@163.com

障碍,启动氧化应激反应,激活细胞凋亡途径,最终引起心肌细胞损害[2]。因此,抑制氧化应激反应、降低心肌细胞凋亡率对减轻心肌细胞缺血缺氧损伤的具有重要意义。近年来,微小 RNA(miRNA)在人类疾病中的作用已经逐渐受到大量研究的认可,尤其在心血管疾病中的作用[3]。Zhu 等[4]指出,miR-499a-5p 下调可能与心肌细胞缺氧发生氧化应激反应,并诱导心肌细胞凋亡途径相关,然而其具体作用靶点研究尚未完善。Toll 样受体 2(Toll-like receptors 2,TLR2)是一种参与非特异性免疫的蛋白分子,其通过识别不同病原体相关分子模式,激动信号级联反应,进而促进免疫应答[5]。Zhang 等[6]指出,miR-499 可能参与 IPostC 的心脏保护,通过抑制局部和全身 TLR2 激活、炎症和 PKC 信号传导。因此,本研究拟探讨 miR-499a-5p 与 TLR2 的靶向关系,并分析其对缺氧/复氧诱导的心肌细胞氧化应激和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠心肌细胞 H9c2(购自北京北纳创联生物公司);杜氏细胞培养基(DMEM)、胎牛血清(购自 Hyclone 公司);pGL3-Basic 质粒载体(购自上海康朗生物科技有限公司);脂质体 Lipofectamine3000(购自 Invitrogen 公司);实时荧光定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒(购自日本 TaKaRa 公司);B 淋巴细胞瘤因子 2XL(Bcl2-xL)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)的第一抗体(购自 abcam 公司),丙二醛(MDA)(S0131S)、超氧化物歧化酶(SOD)(S0103)、活性氧(ROS)(PS835)试剂盒、双荧光素酶报告基因、miR-499 表达检测试剂盒(均购自上海碧云天研究所);膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素-碘化丙啶(V-FITC/P1)凋亡检测试剂盒(购自南京森贝伽生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养、模型建立及分组干预

将 H9c2 细胞株置于 5% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基进行常规培养传代,取对数期心肌细胞进行分组干预,每组干预条件重复 5 次:(1)对照组心肌细胞置于常氧培养箱中传代培养;(2)将其余细胞置于 1% O_2、94% N_2、5% CO_2 条件下缺氧处理 3 h,在 37 ℃ 5% CO_2 条件下复氧培养 6 h,制造缺氧/复氧模型细胞,设为模型组;根据实验设计情况,将细胞分为 miR-NC 组、miR-499a-5p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-499a-5p 组、miR-499a-5p + pGL3-Basic 组、miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 组。将 miR-NC、miR-499a-5p、anti-miR-NC、anti-miR-499a-5p、miR-499a-5p + pGL3-Basic、miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 按照 1∶3 量加入脂质体试剂,混匀转染至模型组心肌细胞 H9c2,转染 5 h 后,更换新鲜培养基继续培养 48 h 后,对各培养基采样进行 qRT-PCR,确认转染是否成功。

1.3 qRT-PCR 检测细胞中 miR-499a-5p、TLR2mRNA 的表达[7]

收集各组细胞,用 Trizol 法提取细胞中 RNA,采用逆转录试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司)合成 cDNA,反应体系 5 μL(5 × Prime Script RT Master MiX 2 μL,RNase-free ddH_2O 3 μL),轻柔混匀后进行加入 DNA 扩增仪中。反应条件为:37 ℃ 15 min 反转录,85 ℃ 5 s 反转录酶失活后,4 ℃保存。最后采用 qRT-PCR 试剂盒对 cDNA 中的 miR-499a-5p、TLR2 mRNA 进行荧光定量 PCR,qRT-PCR 反应体系 20 μL,SYBR Premix Ex Taq Ⅱ (2 ×) 10 μL、PCR 正反向引物(10 μM)各 0.8 μL、ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL、cDNA 2 μL、灭菌蒸馏水 6 μL,进行 PCR 扩增。反应条件:95 ℃ 120 s,95 ℃ 45 s,60 ℃ 30 s,70 ℃ 45 s,共进行 40 次循环。最终在软件中生成 PCR 循环曲线及循环阈值(Ct),以 GAPDH 为内参,以 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算 miR-499a-5p、TLR2 mRNA 的表达量。见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列(5′-3′)	产物大小 (bp)
GAPDH	F-ACC ACA GCT CAT GCC ATC AC R-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	580
has-miR-499a-5p	F-AAC AUC ACA GCA AGU CUG UGC U R-UUA AGA CUU GCA GUG AUG UUU	21
TLR2 mRNA	F- CGC GGA TCC GAA TCC TCC AAT CA R-CCG CTC GAG TCA CAG TGC TGT CC	340

1.4 Western blot 检测细胞中 TLR2、Bcl-xL、Bax、Caspase-3 的蛋白表达

收集各组 H9c2 细胞,加入 RIPA 蛋白裂解使其充分裂解后,提取细胞中的总蛋白;将蛋白质置于在 100 ℃沸水中变性 10 min,取上清液进行蛋白电泳上样;采用转膜仪将上样蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,转膜完成后用 5% 脱脂牛奶封闭处理 2 h,而后在一抗 [包括兔抗 TLR2(abcam,ab209216)、兔抗 Bcl-xL(abcam,ab32370)、兔抗 Bax(abcam,ab32503)、兔抗 Caspase-3(abcam,ab32351)] 溶液中以 4 ℃处理过夜;次日取膜洗净后置于二抗溶液中,37 ℃孵育 2 h;最后在凝胶仪中曝光得到蛋白条带,根据蛋白条带灰度值计算蛋白的相对表达量。

1.5　流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组 H9c2 细胞,将细胞接种在 6 孔板内,严格按照 V-FITC/P1 凋亡试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司)说明书操作,取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 流式管中,加入 5 μL Annexin V-APC 混匀后于室温避光孵育 5 min。加入 10 μL 的碘化丙啶(PI)20 μg/mL,并加 400 μL 磷酸缓冲盐溶液(PBS),立刻进行流式检测。流式细胞仪检测时,Annexin V-APC 用 633 nm 激发器激发,最大发射波长 660 nm,建议使用 FL4 或 RL1 通道检测。凋亡率(%)=早期凋亡(%)+晚期凋亡(%)

1.6　酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞中 ROS、SOD、MDA 含量

收集各组 H9c2 细胞,弃去培养液加入染色工作液于 37 ℃孵育 40 min,PBS 缓冲液洗脱后,严格遵循试剂盒说明书操作步骤,完成一抗反应、二抗结合、底物制备及显色,最后将样本直接置于酶标仪中读取吸光度(波长 405 ~ 450 nm)并计算 MDA(碧云天)、SOD(碧云天)和 ROS(碧云天)含量。每个样本做 3 个复孔,上述实验重复 3 次取均值。

1.7　双荧光素报告基因检测[8]

通过使用 Rnahybrid(https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid)生物信息学数据库检索 miR-499a-5p 靶向目的基因 TLR2 的结合位点。在 H9c2 细胞中构建双荧光素酶基因报告分析。使用 PCR 扩增 TLR2 的野生型(WT)3′-UTR 序列,并将其克隆到 pmirGLO 载体中,采用点突变法扩增 TLR2 突变株(MUT)3′-UTR 序列,并克隆到 pmirGLO 载体中,建立荧光素酶报告质粒。再将已载入基因片段的 pGL3-Basic 与脂质体混合分别与 miR-NC、miR-499a-5p、anti-miR-NC、anti-miR-499a-5p 共同转染至 H9c2 细胞。以每孔 100 μL 的量加入细胞悬液,缓慢摇 15 min 后,将细胞裂解液吸至 1.5 mL 离心管,4 ℃ 12 000 rpm 离心 10 min,取上清液,96 孔板中加入 Luciferase Assay Reagent Ⅱ (LAR Ⅱ)工作液 100 μL,加入 20 μL 细胞裂解液,测定记录内参(firefly luciferase,Fl)值。加入 100 μL Stop&Glo Reagent,测定记录 Renilla luciferase (Rl)值,即为报告基因发光值。上述操作严格遵从双荧光素酶报告基因测试试剂盒(碧云天)说明书。

1.8　统计学分析

采用 SPSS 21.0 及 Graph Pad Prism 7.0 软件进行统计与分析。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,两组组间比较采用 t 检验。$P<0.05$ 表示差异统计学意义。

2　结果

2.1　miR-499a-5p 及 TLR2 在 A/R 模型 H9c2 细胞中的表达

与对照组相比,模型组 TLR2 蛋白的表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-NC 组相比,miR-499a-5p 组 TLR2 蛋白表达降低,anti-miR-499a-5p 组 TLR2 蛋白表达升高,anti-miR-499a-5p 组 TLR2 蛋白表达水平高于 miR-499a-5p 组,上述差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

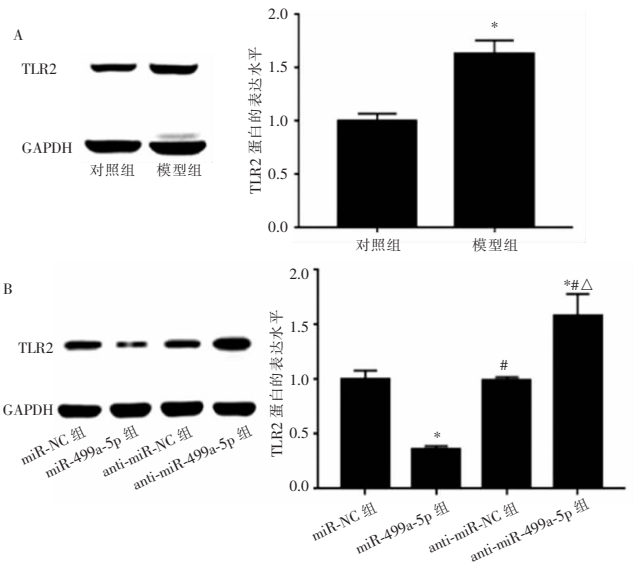


图 1　TLR2 蛋白 H9c2 细胞中表达水平比较

A.Westernblot 检测 TLR2 蛋白在对照组及模型组 H9c2 细胞中的表达水平,*$P<0.05$,与对照组相比;B.Westernblot 检测 TLR2 蛋白在各模型组 H9c2 细胞中的表达水平,*$P<0.05$,与 miR-NC 组相比,#$P<0.05$,与 miR-499a-5p 组相比,△$P<0.05$,与 anti-miR-NC 组相比。

与对照组相比，模型组 miR-499a-5p 低表达，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与 miR-NC 组相比，miR-499a-5p 组高表达，anti-miR-499a-5p 组低表达，miR-499a-5p 组与 anti-miR-NC 组相比呈高表达，上述差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见图 2。

2.2　过表达 miR-499a-5p 对 A/R 模型 H9c2 细胞氧化应激及凋亡的影响

与 miR-NC 组相比，miR-499a-5p 组细胞凋亡率下降，Bax、Caspase-3 低表达，Bcl-xL 高表达，ROS、MDA 含量降低，SOD 水平升高，上述差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见图 3 及图 4。

2.3　过表达 TLR2 对 A/R 模型 H9c2 细胞氧化应激及凋亡的影响

与 miR-499a-5p + pGL3-Basic 组相比，miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 组细胞中细胞凋亡率上升，Bax、Caspase-3 高表达，Bcl-xL 低表达，ROS、MDA 含量上升，SOD 水平下降，上述差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见图 5 及图 6。

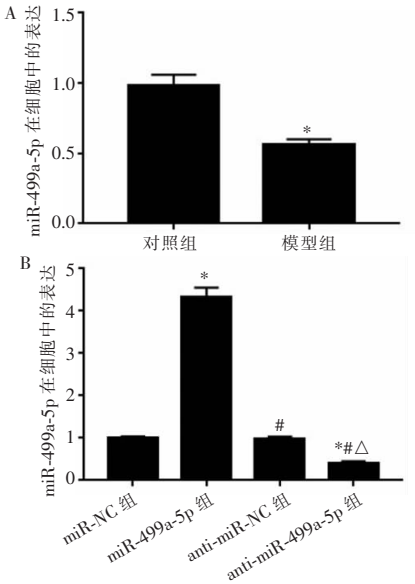


图 2　miR-499a-5p 在 H9c2 细胞中表达水平比较

A. qRT-PCR 检测对照组及模型组细胞中 miR-499a-5p 表达水平，*$P<0.05$，与对照组相比；B. qRT-PCR 检测各模型组细胞中 miR-499a-5p 表达水平，*$P<0.05$，与 miR-NC 组相比，#$P<0.05$，与 miR-499a-5p 组相比，△$P<0.05$，与 anti-miR-NC 组相比。

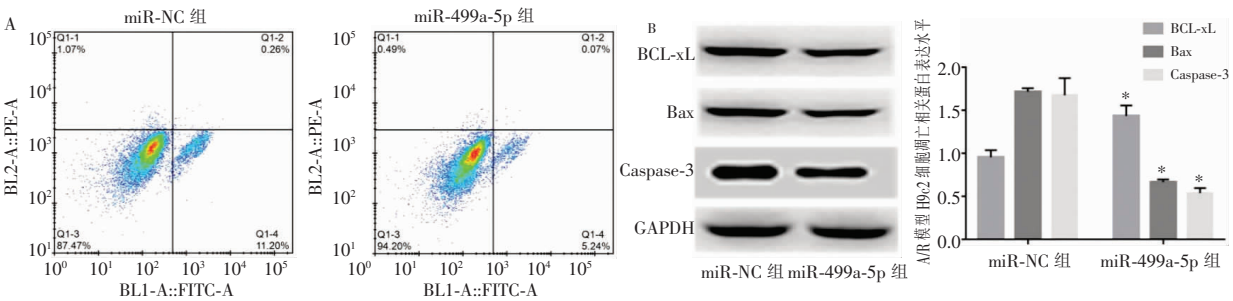


图 3　过表达 miR-499a-5p 对 A/R 模型 H9c2 细胞凋亡的影响

A. 过表达 miR-499a-5p 对 A/R 模型 H9c2 细胞凋亡率的影响；B. 过表达 miR-499a-5p 对细胞凋亡相关蛋白的影响；*$P<0.05$，与 miR-NC 组相比。

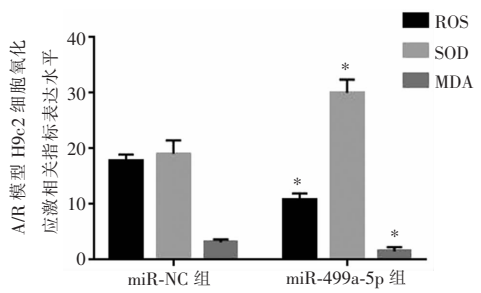


图 4　过表达 miR-499a-5p 对 A/R 模型 H9c2 细胞氧化应激相关指标的影响

*$P<0.05$，与 miR-NC 组相比。

2.4　miR-499a-5p 靶向 TLR2

与 miR-499a-5p + pGL3-Basic 组比较，miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 组 TLR2-WT 细胞荧光活性降低（$t=14.393$，$P<0.001$），TLR2 蛋白呈低表达（$t=16.042$，$P<0.001$）；与 anti-miR-499a-5p + pGL3-Basic 组比较，anti-miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 组 TLR2-WT 细胞荧光活性上升（$t=6.227$，$P<0.001$），TLR2 蛋白表达呈高表达（$t=8.697$，$P<0.001$），可见，miR-499a-5p 靶向作用于 TLR2 的表达。见表 2。

表 2　miR-499a-5p 靶向 TLR2（$\bar{x}\pm s$）

组别	荧光活性		TLR2 蛋白
	TLR2-WT	TLR2-MUT	
miR-499a-5p + pGL3-Basic 组（$n=9$）	1.02 ± 0.08	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07
miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 组（$n=9$）	0.51 ± 0.07	0.98 ± 0.08	0.54 ± 0.05
anti-miR-499a-5 + pGL3-Basic 组（$n=9$）	0.97 ± 0.08	0.97 ± 0.06	1.01 ± 0.09
anti-miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 组（$n=9$）	1.36 ± 0.17	0.95 ± 0.04	1.40 ± 0.10

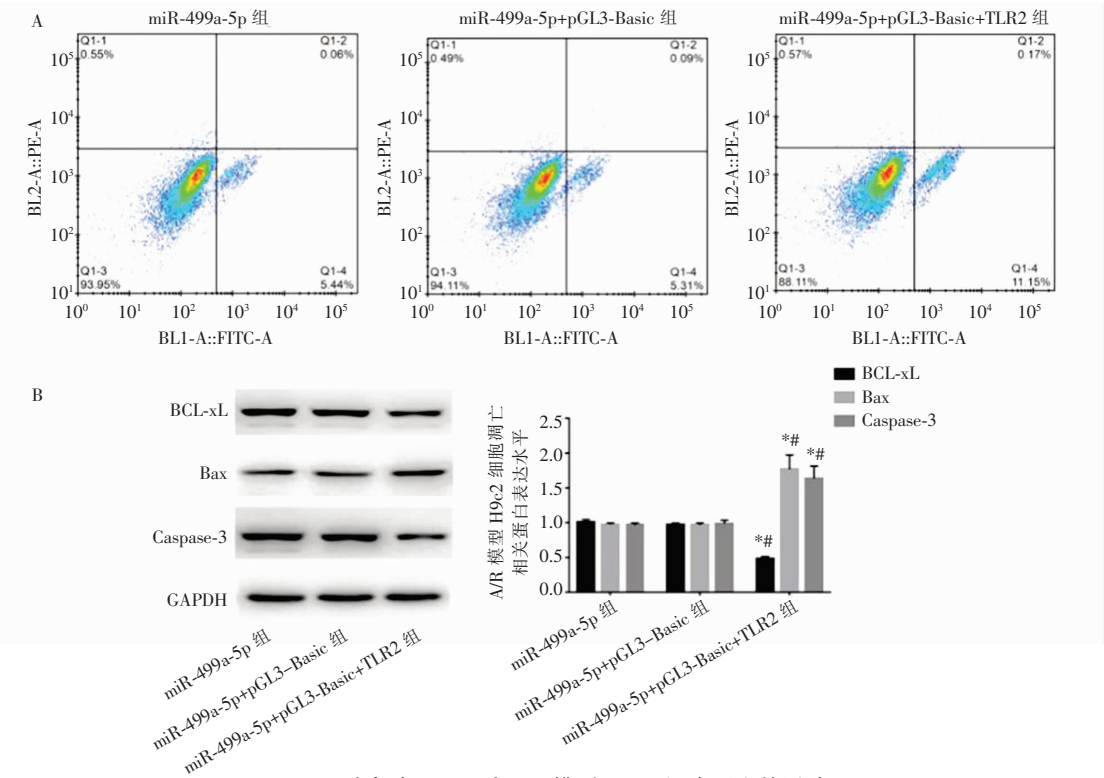


图 5　过表达 TLR2 对 A/R 模型 H9c2 细胞凋亡的影响

A. 过表达 TLR2 对 A/R 模型 H9c2 细胞凋亡率的影响;B. 过表达 TLR2 对 A/R 模型 H9c2 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响;*P<0.05,与 miR-499a-5p 组相比,#P<0.05,与 miR-499a-5p+pGL3-Basic 组相比。

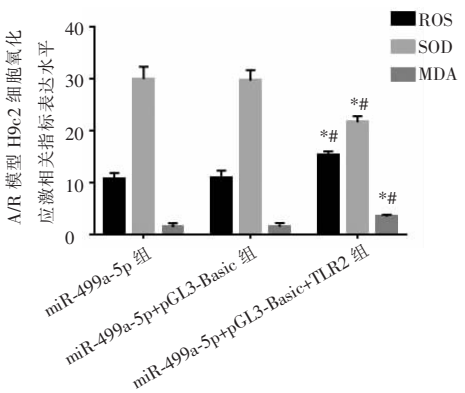


图 6　过表达 TLR2 对 A/R 模型 H9c2 细胞氧化应激相关指标的影响

*P<0.05,与 miR-499a-5p 组相比;#P<0.05,与 miR-499a-5p+PGL3-Basic 组相比。

3　讨论

本研究通过建立缺氧/复氧模型,观察模型心肌细胞与正常心肌细胞时发现,模型细胞内 miR-499a-5p 呈低表达,TLR2 蛋白高表达;在模型内各组比较中发现,与 miR-NC 组相比,miR-499a-5p 组 miR-499a-5p 呈高表达,而 anti-miR-499a-5p 呈低表达,而 TLR2 的表达则与 miR-499a-5p 表达相反;在观察过表达 miR-499a-5p 或过表达 TLR2 时发现,与氧化应激及细胞凋亡相关蛋白表达时呈现相反的趋势。

国外一项临床研究报告[9]显示,发生不稳定型心绞痛、非 ST 段抬高型心肌梗死患者发病后 3 h 内血清 miR-499a-5p 表达水平降低,提示 miR-499a-5p 可能与心肌细胞损伤有关,但其对心肌细胞的作用机制及靶基因研究尚不明确。Zhao 等[10]通过制造缺氧/复氧模型研究指出,miR-499a-5p 在心肌细胞中表达显著降低,而过表达 miR-499a-5p 后心肌细胞的凋亡率下降;而另一相关研究[6]指出,miR-499a-5p 通过抑制缺血再灌注模型中 TLR2 信号传导,抑制如白细胞介素-6、白细胞介素-1β 等促炎细胞因子的级联反应,发挥对心肌细胞的保护作用。TLR2 是近年来缺血再灌注损伤及心肌保护作用的新兴治疗靶点,此前的基础研究[11-12]指出,通过抑制 TLR2 的激活,可明显降低心肌梗塞面积及局部和全身炎症细胞,而单核细胞中 TLR2 的表达水平或可作为心肌损伤程度的参考指标。虽然以往研究确立了 miR-499a-5p 对心肌细胞的作用及其可能与抑制 TLR2 表达相关,但对于缺氧/复氧心肌细胞的作用及 miR-499a-5p 与 TLR2 二者之间的靶向关系研究尚不明确。本研究通过观察 H9c2A/R 模型细胞发现,与正常 H9c2 细胞相比,A/R 模型细胞内 miR-499a-5p 低表达,TLR2 却呈高表达,这与上述研究基本一致。在通过进一步对比 miR-499a-5p、miR-NC、anti-miR-499a-5p、anti-miR-NC 中发现,在 miR-499a-5p 降低的组别中,TLR2 均呈高表达,而在 miR-499a-5p 升高的组别中,TLR2 均呈低表达,因此

二者之间可能存在负调控关系。

在进一步研究 H9c2 细胞凋亡率时发现,miR-499a-5p 过表达组凋亡率均低于对照组,而 TLR2 过表达组凋亡率均高于对照组。心肌细胞在缺氧条件下会发生线粒体功能障碍,线粒体内细胞色素 C(Cyt-C)激活并被释放入胞质,通过级联反应激活 Caspase-3 蛋白并启动线粒体凋亡程序[13-14]。Bcl-xL 和 Bax 是一对负责调控线粒体膜上 Cyt-C 的蛋白分子,Bax 蛋白可增加 Cyt-C 的释放,促进凋亡作用,而 Bcl-xL 蛋白作用与其正好相反[15-16]。本研究通过对各模型组细胞进行 Western blot 检验,对比上述参与细胞凋亡的相关蛋白水平发现,与 miR-NC 组相比,miR-499a-5p 组上调 Bcl-xL 蛋白表达,而 Bax 及 Caspase-3 蛋白均表达下调,而过表达 TLR2 的 miR-499a-5p + pGL3-Basic + TLR2 组下调 Bcl-xL 蛋白表达,而 Bax 及 Caspase-3 蛋白均表达上调。此外,在进行心肌细胞凋亡研究的同时,采用 ELISA 法检测心肌细胞中 ROS、SOD 及 MDA 的水平,结果显示,过表达 miR-499a-5p 的组别中 ROS 及 MDA 水平明显降低,SOD 水平升高,而过表达 TLR2 的组别中,ROS 及 MDA 水平明显上升,SOD 水平降低,这结果与细胞凋亡率及其相关蛋白表达量波动情况相互吻合。另外,双荧光素报告基因检测结果显示,miR-499a-5p 与 TLR2 确实存在靶向关系。因此,miR-499a-5p 一方面可能通过靶向下调 TLR2 的表达,抑制 TLR2 对免疫应答的作用,减少促炎细胞的累积及炎症因子对心肌细胞的破坏,降低氧化应激反应程度,从而发挥保护心肌细胞的作用;另一方面,miR-499a-5p 通过抑制 Bax、Caspase-3 蛋白的表达,上调 Bcl-xL 蛋白的表达,抑制心肌线粒体启动凋亡程序,进而降低心肌细胞凋亡率,减轻损伤程度。

综上,miR-499a-5p 与 TLR2 为靶向关系,可能通过抑制局部和全身 TLR2 激活,降低心肌细胞凋亡率及氧化应激反应,发挥保护心肌细胞的作用。

参考文献

[1] Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, *et al*. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights[J]. Kardiologia Polska, 2018, 76(4): 713-722.

[2] 陈思,杨富国,彭红军,等. 丙泊酚减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤[J]. 基础医学与临床,2022,42(4):583-589.

[3] Schulte C, Karakas M, Zeller T. microRNAs in cardiovascular disease-clinical application [J]. Clinical Chemistry and Labratory Medicine, 2017, 55(5): 687-704.

[4] Zhu J, Yao K, Wang Q, *et al*. Ischemic postconditioning-regulated miR-499 protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis through PDCD4[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2016, 39(6): 2364-2380.

[5] Ward JR, Wilson HL, Francis SE, *et al*. Translational mini-review series on immunology of vascular disease: Inflammation, infections and Toll-like receptors in cardiovascular disease[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2009, 156(3): 386-394.

[6] Zhang XY, Huang Z, Li QJ, *et al*. Ischemic postconditioning attenuates the inflammatory response in ischemia/reperfusion myocardium by upregulating miR 499 and inhibiting TLR2 activation[J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(1): 209-218.

[7] 武国利,马竞. miR-499a-5p 通过靶向 APC 减轻氧化应激对心肌细胞的损伤[J]. 中国动脉硬化杂志,2020,28(6):501-506.

[8] 刘文莉,国东,刘加霏,等. miRNA-7 靶向 SP1 的 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体构建及评价[J]. 中国免疫学杂志,2021,37(1):72-77.

[9] Shalaby SM, El-Shal AS, Shoukry A, *et al*. Serum miRNA-499 and miRNA-210: A potential role in early diagnosis of acute coronary syndrome[J]. IUBMB Life, 2016, 68(8): 673-682.

[10] Zhao L, Wang B, Zhang W, *et al*. Effect of miR-499a-5p on damage of cardiomyocyte induced by hypoxia-reoxygenation via downregulating CD38 protein[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 121(2): 996-1004.

[11] Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, *et al*. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody[J]. Circulation, 2010, 121(1): 80-90.

[12] Mersmann J, Berkels R, Zacharowski P, *et al*. Preconditioning by toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 reduces CXCL1-dependent leukocyte recruitment in murine myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Critical Care Medicine, 2010, 38(3): 903-909.

[13] Zhao H, Xu M, Chu G. Association between myocardial cell apoptosis and calpain1/caspase-3 expression in "Rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 15(5): 2727-2731.

[14] Almohammedi A, Kapetanaki SM, Wood BR, *et al*. Spectroscopic analysis of myglobin and cytochrome c dynamics in isolated cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2015, 12(105): 20141339.

[15] Zhou YL, Sun Q, Zhang L, *et al*. miR-208b targets Bax to protect H9c2 cells against hypoxia-induced apoptosis[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 106: 1751-1759.

[16] Yang C, Liu X, Yang F, *et al*. Mitochondrial phosphatase PGAM5 regulates Keapl-mediated Bcl-xL degradation and controls cardiomyocyte apoptosis driven by myocardial is chemia/reperfusion injury[J]. In Vito Cellular & Developmental Biology-Animal, 2017, 53(3): 248-257.

(**收稿日期**:2022-03-17 **修回日期**:2022-04-19)