·论著·

lncRNA MEG3通过调节miR-202-5p/*STAT3*轴抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡

王志扬[1],刘占东[1],朴丽梅[1],金春子[2],许文虎[1]
(延边大学附属医院 1.心血管内科;2.中心实验室,吉林 延吉 133000)

摘要 目的 探讨长链非编码RNA(lncRNA)母系表达基因3(MEG3)调节miR-202-5p/信号传导及转录激活因子3(*STAT3*)轴对缺氧/复氧(H/R)诱导的心肌细胞凋亡的影响。**方法** 构建H/R细胞模型,随机分为sh-NC组(转染NC-shRNA),sh-MEG3组(转染lncRNA MEG3 shRNA),miR-NC组(转染lncRNA MEG3 shRNA+NC-miR),in-miR-202-5p组(转染lncRNA MEG3 shRNA+miR-202-5p抑制剂),另设置H/R组(未转染的H/R模型细胞),AC16组(正常AC16细胞)。实时定量PCR检测各组细胞lncRNA MEG3、miR-202-5p和*STAT3*表达;采用CCK-8法检测细胞活力;采用流式细胞仪检测细胞凋亡;采用酶联免疫吸附试验、比色法和探针法分别检测白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)、活性氧(ROS)水平;采用Western blotting检测STAT3、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)、胱天蛋白酶3(caspase-3)、胱天蛋白酶9(caspase-9)的表达;采用双萤光素酶实验分析lncRNA MEG3和miR-202-5p、miR-202-5p和*STAT3*关系。**结果** 与AC16组相比,H/R组细胞lncRNA MEG3和*STAT3*表达增加,miR-202-5p表达降低($P<0.05$);与H/R组和sh-NC组相比,sh-MEG3组lncRNA MEG3和*STAT3*表达降低,miR-202-5p表达增加($P<0.05$);与sh-MEG3组和miR-NC组相比,in-miR-202-5p组lncRNA MEG3和*STAT3*表达增加,miR-202-5p表达降低($P<0.05$)。与AC16组相比,H/R组凋亡率、IL-6、TNF-α、MDA、ROS水平及STAT3、Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达增加,细胞活力、克隆数、SOD、GSH-Px水平和Bcl-2表达降低($P<0.05$);与H/R组和sh-NC组相比,sh-MEG3组细胞活力、克隆数、SOD、GSH-Px含量和Bcl-2表达增加,凋亡率、IL-6、TNF-α、MDA、ROS水平和STAT3、Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达降低($P<0.05$);与sh-MEG3组和miR-NC组相比,in-miR-202-5p组凋亡率、IL-6、TNF-α、MDA、ROS水平和STAT3、Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达增加,细胞活力、克隆数、SOD、GSH-Px水平和Bcl-2表达降低($P<0.05$)。lncRNA MEG3和miR-202-5p、miR-202-5p和*STAT3*有多个结合位点。与WT-MEG3+miR-NC组相比,WT-MEG3+miR-202-5p组萤光素酶活性降低($P<0.05$);与WT-STAT3+miR-NC组相比,WT-STAT3+miR-202-5p组萤光素酶活性降低($P<0.05$)。**结论** 敲低lncRNA MEG3能通过负调节miR-202-5p下调*STAT3*,进而抑制H/R诱导的心肌细胞凋亡。

关键词 长链非编码RNA母系表达基因3;miR-202-5p/信号传导及转录激活因子3轴;缺氧/复氧;心肌细胞
中图分类号 R542.2 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)08-0733-07
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250728.1842.024
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.08.011

lncRNA MEG3 inhibits hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by regulating the miR-202-5p/*STAT3* axis

WANG Zhiyang[1], LIU Zhandong[1], PIAO Limei[1], JIN Chunzi[2], XU Wenhu[1]
(1. Department of Cardiovascular Medicine, Yanbian University Hospital, Yanji 133000, China; 2. Central Laboratory, Yanbian University Hospital, Yanji 133000, China)

Abstract Objective To investigate the impact of long non-coding RNA maternal expression gene 3 (lncRNA MEG3) on hypoxia/reoxygenation (H/R) -induced cardiomyocyte apoptosis by modulating the miR-202-5p/signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*) axis. **Methods** An H/R cell model was constructed and randomly separated into four groups: sh-NC (transfected with NC shRNA), sh-MEG3 (transfected with lncRNA MEG3 shRNA), miR-NC (transfected with lncRNA MEG3 shRNA and NC miR), and in-miR-202-5p (transfected with lncRNA MEG3 shRNA and miR-202-5p inhibitor). In addition, the H/R group (nontransfected H/R model cells) and the AC16 group (normal AC16 cells) were set. Quantitative real-time PCR method was used to analyze the expression of lncRNA MEG3, miR-202-5p, and *STAT3* in cells from each group. CCK-8 method was used to analyze cell viability. Flow cytometry was used to analyze apoptosis. Enzyme-linked immunosorbent, colorimetric, and probe assays were applied to detect the levels of inter-

基金项目: 吉林省卫生健康科技能力提升项目(2022JC031)
作者简介: 王志扬(1999-),男,医师,本科.
通信作者: 许文虎,E-mail:g38bah@163.com
收稿日期: 2024-07-24
网络出版时间: 2025-07-29 13:51:36

leukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF-α), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidases (GSH-Px), and reactive oxygen species (ROS). Western blotting was carried out to examine the expression of STAT3, Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), caspase-3, and caspase-9. A dual luciferase assay was used to analyze the relationship between lncRNA MEG3 and miR-202-5p, as well as the relationship between miR-202-5p and *STAT3*. **Results** Compared with that in the AC16 group, the expression of lncRNA MEG3 and *STAT3* in cells in the H/R group increased, while the expression of miR-202-5p decreased ($P < 0.05$). Compared with that in the H/R group and sh-NC group, the expression of lncRNA MEG3 and *STAT3* decreased in the sh-MEG3 group, while the expression of miR-202-5p increased ($P < 0.05$). Compared with that in the sh-MEG3 group and miR-NC group, the expression of lncRNA MEG3 and *STAT3* increased in the in-miR-202-5p group, while the expression of miR-202-5p decreased ($P < 0.05$). Compared with that in the AC16 group, the apoptosis rate, levels of IL-6, TNF-α, MDA, and ROS, and the expression of STAT3, Bax, cleaved caspase-3, and cleaved caspase-9 increased in the H/R group. In contrast, the cell viability, clone count, levels of superoxide dismutase (SOD) and GSH-Px, and the expression of Bcl-2 decreased ($P < 0.05$). Compared with that in the H/R group and sh-NC group, the cell viability, clone count, levels of SOD and GSH-Px, and the expression of Bcl-2 increased in the sh-MEG3 group. In contrast, the apoptosis rate, levels of IL-6, TNF-α, MDA, and ROS, and the expression of STAT3, Bax, cleaved caspase-3, and cleaved caspase-9 decreased ($P < 0.05$). Compared with that in the sh-MEG3 group and miR-NC group, the apoptosis rate, levels of IL-6, TNF-α, MDA, and ROS, and the expression of STAT3, Bax, cleaved caspase-3, and cleaved caspase-9 increased in the in-miR-202-5p group. In contrast, the cell viability, clone count, levels of SOD and GSH-Px, and the expression of Bcl-2 decreased ($P < 0.05$). There were multiple binding sites between lncRNA MEG3 and miR-202-5p, and between miR-202-5p and *STAT3*. The luciferase activity was lower in the WT-MEG3+miR-202-5p group than in the WT-MEG3+miR-NC group ($P < 0.05$). The luciferase activity was lower in the WT-STAT3+miR-202-5p group than in the WT-STAT3+miR-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** Knocking down lncRNA MEG3 can downregulate *STAT3* by negatively regulating miR-202-5p, inhibiting H/R-induced cardiomyocyte apoptosis.

Keywords long non-coding RNA maternal expression gene 3; miR-202-5p/signal transducer and activator of transcription 3 axis; hypoxia/reoxygenation; cardiomyocyte

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是一种以心外膜动脉粥样硬化斑块积聚、炎症和内皮功能障碍为特征的疾病。心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)是心肌损伤的重要原因[1-2]。长链非编码RNA母系表达基因3(long non-coding RNA maternal expression gene 3, lncRNA MEG3)能够调节基因和通路激活,在心血管疾病中发挥重要作用。沉默lncRNA MEG3可明显改善心力衰竭小鼠心功能障碍,减弱氧化应激、纤维化、细胞凋亡和过度自噬等,从而抑制心力衰竭等心血管疾病进展[3]。lncRNA MEG3与miR-202-5p存在结合位点,而miR-202-5p在MIRI中下调,其高表达能通过调节TRPV2水平改善缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的心肌细胞损伤,减少体内MIRI诱导的MI面积[4]。miR-202-5p与信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, *STAT3*)间存在结合位点。*STAT3*能调控活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成和炎症的发生,还参与细胞凋亡和其他形式的程序性细胞死亡,从而介导缺血再灌注损伤[5]。*STAT3*信号转导可上调NCOA4表达,加速高脂肪饮食诱导的肥胖和心脏损伤[6]。本研究旨在探讨lncRNA MEG3通过调节miR-202-5p/*STAT3*轴对H/R诱导的心肌细胞凋亡的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

人心肌细胞系AC16、CCK-8试剂盒、Annexin V-FITCPI试剂盒、ROS、谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidases, GSH-Px)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购自上海沪震实业有限公司;lncRNA MEG3、miR-202-5p、*STAT3*引物及NC-shRNA、lncRNA MEG3 shRNA、NC-miR、miR-202-5p模拟物、miR-202-5p抑制剂、WT-*MEG3*、MUT-*MEG3*、WT-*STAT3*、MUT-*STAT3*购自生工生物工程(上海)股份有限公司;STAT3、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、GAPDH、二抗购自英国abcam公司,cleaved caspase-3、cleaved caspase-9购自美国CST实业有限公司。LMD6显微镜购自徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;CytPix流式细胞仪购

自美国赛默飞世尔科技公司；EPS200电泳仪购自北京原平皓生物技术有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　H/R模型构建：AC16细胞常规培养至细胞汇合度约80%，传代。取对数期细胞移至5% CO_2、95% N_2、37 ℃培养箱缺氧培养3 h，再置于5% CO_2、95%空气、37 ℃培养箱培养3 h，获得H/R模型细胞[7]。

1.2.2　细胞转染与分组：将H/R模型细胞移至24孔板（2×10^5/孔），通过lipofectamine 3000试剂进行转染，转染NC-shRNA为sh-NC组，转染lncRNA MEG3 shRNA为sh-MEG3组，转染lncRNA MEG3 shRNA、NC-miR为miR-NC组，转染lncRNA MEG3 shRNA、miR-202-5p抑制剂为in-miR-202-5p组，各组细胞均转染48 h。另设置未转染H/R模型细胞为H/R组，正常AC16细胞为AC16组。

1.2.3　实时定量PCR检测各组细胞lncRNA MEG3、miR-202-5p和*STAT3*表达：提取各组细胞总RNA，逆转录为cDNA，进行实时定量PCR，反应条件：95 ℃ 2 min，95 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，循环40次。以*GAPDH*、*U6*为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算lncRNA MEG3、miR-202-5p和*STAT3*表达量。引物序列见表1。

表1　引物序列

Tab.1　Primer sequences

Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
lncRNA MEG3	CTGCCCATCTACACCTCACG	CTCTCCGCCGTCTGCGCTAGGGGCT
GAPDH	TGCAACGGATTTGGTCTGTATT	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT
miR-202-5p	ACACTCCAGCTGGGTTCCTATGCATATA	CTCAACTGGTCTCCTGGAGT
U6	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	GGAACGCTTCACGATTTG
STAT3	ACCAGCAGTATAGCCGCTTC	GCCACAATCCGGGCAATCT

1.2.4　CCK-8法检测细胞活力：各组细胞分别于培养24 h、48 h、72 h后加CCK-8溶液 10 μL，37 ℃反应2 h，测量450 nm处吸光度（absorbance，A），并计算细胞活力=$A_{实验组}/A_{对照组}$。细胞移至6孔板，常规培养14 d，固定后结晶紫染色，显微镜下计数。

1.2.5　流式细胞仪检测细胞凋亡：将FITC-Annexin V和PI制成1 μg/mL的标记液，取100 μL重悬各组细胞，室温避光15 min，加荧光溶液4 ℃避光20 min，用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.6　酶联免疫吸附试验、比色法和探针法分别检测炎症和氧化应激指标水平：收集细胞上清培养液，按照试剂盒说明书依次加入酶标抗原、显色液、终止液，通过检测450 nm处A计算IL-6、TNF-α水平。裂解各组细胞，离心收集上清液，根据上述方法通过特定波长A值分析SOD、MDA、GSH-Px水平；上清液加入2，7–二氢二氯荧光黄双乙酸钠（2'，7'-dichlorofluorescein diacetate，DCFH-DA），37 ℃孵育20 min，用流式细胞仪分析ROS水平。

1.2.7　Western blotting检测STAT3、Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达：提取各组细胞蛋白，用BCA法定量。电泳转膜、封闭。与STAT3、Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9（1 ∶ 1 000）、GAPDH（1 ∶ 10 000）抗体4 ℃过夜孵育，与二抗（1 ∶ 5 000）室温孵育1 h。增强化学发光剂（enhanced chemilum inescence，ECL）显影各条带，分析蛋白表达。

1.2.8　双萤光素酶实验：查阅ENCORI数据库分析lncRNA MEG3和miR-202-5p、miR-202-5p和*STAT3*关系。通过lipofectamine 3000试剂将WT-*MEG3*、MUT-*MEG3*、WT-*STAT3*、MUT-*STAT3*分别与miR-NC、miR-202-5p共转染，记为WT-MEG3+miR-NC组、WT-MEG3+miR-202-5p组、MUT-MEG3+miR-NC组、MUT-MEG3+miR-202-5p组、WT-STAT3+miR-NC组、WT-STAT3+miR-202-5p组、MUT-STAT3+miR-NC组、MUT-STAT3+miR-202-5p组。转染48 h，比较各组萤光素酶活性。

1.3　统计学分析

采用SPSS 25.0进行统计分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组比较用单因素方差分析，两两比较用SNK-q检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组细胞lncRNA MEG3、miR-202-5p和*STAT3*表

达比较

与AC16组相比，H/R组细胞lncRNA MEG3和*STAT3*表达增加，miR-202-5p表达降低（$P<0.05$）；与H/R组和sh-NC组相比，sh-MEG3组lncRNA MEG3和STAT3表达降低，miR-202-5p表达增加（$P<0.05$）；与sh-MEG3组和miR-NC组相比，in-miR-202-5p组lncRNA MEG3和*STAT3*表达增加，miR-202-5p表达降低（$P<0.05$）。见表2。

表2　各组细胞lncRNA MEG3、miR-202-5p和*STAT3*表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab.2　Comparison of lncRNA MEG3，miR-202-5p，and *STAT3* expression in different groups of cells（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Group	lncRNA MEG3	miR-202-5p	*STAT3*
AC16	0.98 ± 0.10	1.03 ± 0.10	1.01 ± 0.12
H/R	2.05 ± 0.14[1)]	0.35 ± 0.08[1)]	2.56 ± 0.15[1)]
sh-NC	2.02 ± 0.12	0.32 ± 0.06	2.53 ± 0.15
sh-MEG3	1.17 ± 0.11[2),3)]	0.86 ± 0.09[2),3)]	1.41 ± 0.13[2),3)]
miR-NC	1.19 ± 0.13	0.88 ± 0.09	1.38 ± 0.11
in-miR-202-5p	1.73 ± 0.13[4),5)]	0.41 ± 0.07[4),5)]	2.33 ± 0.14[4),5)]

1）$P<0.05$ vs. AC16 group；2）$P<0.05$ vs. H/R group；3）$P<0.05$ vs. sh-NC group；4）$P<0.05$ vs. sh-MEG3 group；5）$P<0.05$ vs. miR-NC group.

2.2　各组细胞活力和克隆数比较

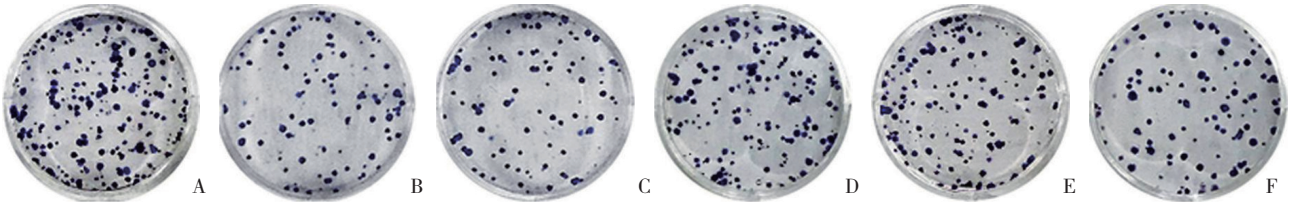
与AC16组相比，H/R组细胞活力和克隆数降低（$P<0.05$）；与H/R组和sh-NC组相比，sh-MEG3组细胞活力和克隆数增加（$P<0.05$）；与sh-MEG3组和miR-NC组相比，in-miR-202-5p组细胞活力和克隆数降低（$P<0.05$）。见表3、图1。

表3　各组细胞活力和克隆数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab.3　Comparison of cell viability and clone number among different groups（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Group	Cell viability (%)			Number of cloned cells
	24 h	48 h	72 h	
AC16	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	127.83 ± 6.29
H/R	33.26 ± 4.75[1)]	35.28 ± 4.37[1)]	37.61 ± 5.03[1)]	52.73 ± 5.85[1)]
sh-NC	34.12 ± 4.53	35.37 ± 4.61	37.93 ± 5.15	51.29 ± 5.93
sh-MEG3	78.65 ± 4.92[2),3)]	79.13 ± 4.79[2),3)]	80.82 ± 5.46[2),3)]	105.19 ± 6.15[2),3)]
miR-NC	78.04 ± 5.05	79.51 ± 4.58	81.07 ± 5.57	103.76 ± 6.23
in-miR-202-5p	40.37 ± 4.81[4),5)]	42.35 ± 4.46[4),5)]	44.19 ± 5.28[4),5)]	62.31 ± 6.01[4),5)]

1）$P<0.05$ vs. AC16 group；2）$P<0.05$ vs. H/R group；3）$P<0.05$ vs. sh-NC group；4）$P<0.05$ vs. sh-MEG3 group；5）$P<0.05$ vs. miR-NC group.



A，AC16 group；B，H/R group；C，sh-NC group；D，sh-MEG3 group；E，miR-NC group；F，in-miR-202-5p group.

图1　各组细胞克隆情况

Fig.1　Cell cloning status of each group

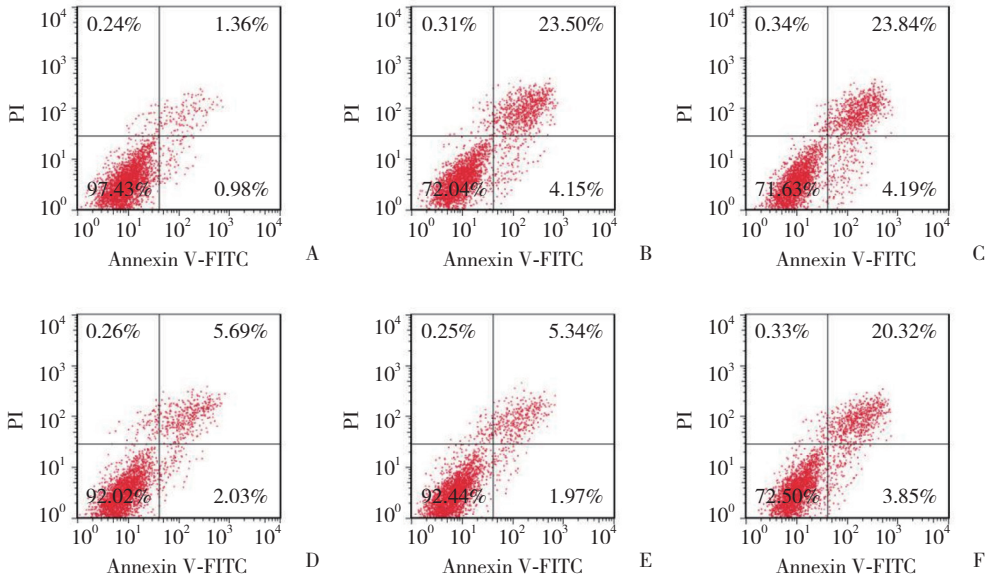
2.3　各组细胞凋亡率比较

与AC16组（2.34% ± 0.75%）相比，H/R组细胞凋亡率（27.65% ± 0.86%）增加（$P<0.05$）；与H/R组和sh-NC组（28.03% ± 0.88%）相比，sh-MEG3组细胞凋

亡率(7.72%±0.79%)降低($P<0.05$)；与sh-MEG3组和miR-NC组(7.31%±0.82%)相比，in-miR-202-5p组细胞凋亡率(24.17%±0.85%)增加($P<0.05$)。见图2。

2.4　各组细胞氧化应激和炎症指标水平比较

与AC16组相比，H/R组细胞中IL-6、TNF-α、MDA、ROS水平增加，SOD、GSH-Px水平降低($P<0.05$)；与H/R组和sh-NC组相比，sh-MEG3组IL-6、TNF-α、MDA、ROS水平降低，SOD、GSH-Px水平增加($P<0.05$)；与sh-MEG3组和miR-NC组相比，in-miR-202-5p组IL-6、TNF-α、MDA、ROS水平增加，SOD、GSH-Px水平降低($P<0.05$)。见表4。



A，AC16 group；B，H/R group；C，sh-NC group；D，sh-MEG3 group；E，miR-NC group；F，in-miR-202-5p group.

图2　各组细胞凋亡情况

Fig.2　Apoptosis of cells in each group

表4　各组细胞氧化应激和炎症指标水平比较($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab.4　Comparison of cellular oxidative stress and inflammatory markers in each group ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Group	IL-6(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)	MDA(nmol/L)	ROS
AC16	107.32±16.15	80.14±12.79	61.73±2.83	86.51±3..85	5.25±1.39	11.23±6.92
H/R	368.95±16.61[1)]	267.53±13.12[1)]	18.92±2.91[1)]	33.45±3.43[1)]	24.33±1.75[1)]	71.56±7.05[1)]
sh-NC	373.04±16.58	271.15±12.83	19.01±2.76	32.79±3.52	24.61±1.68	72.18±7.13
sh-MEG3	168.73±15.97[2),3)]	119.37±12.91[2),3)]	50.78±2.85[2),3)]	73.94±3.79[2),3)]	8.56±1.51[2),3)]	35.14±6.97[2),3)]
miR-NC	170.58±16.69	116.76±13.05	51.23±2.94	80.13±3.68	8.49±1.43	34.73±6.75
in-miR-202-5p	344.19±15.52[4),5)]	238.91±13.28[4),5)]	23.35±2.77[4),5)]	45.61±3.65[4),5)]	20.17±1.62[4),5)]	65.88±6.91[4),5)]

1)$P<0.05$ vs. AC16 group；2)$P<0.05$ vs. H/R group；3)$P<0.05$ vs. sh-NC group；4)$P<0.05$ vs. sh-MEG3 group；5)$P<0.05$ vs. miR-NC group.

2.5　各组细胞STAT3及凋亡蛋白表达

与AC16组相比，H/R组细胞中STAT3、Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达增加，Bcl-2表达降低($P<0.05$)；与H/R组和sh-NC组相比，sh-MEG3组STAT3、Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达降低，Bcl-2表达增加($P<0.05$)；与sh-MEG3组和miR-NC组相比，in-miR-202-5p组STAT3、Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达增加，Bcl-2表达降低($P<0.05$)。见表5、图3。

2.6　lncRNA MEG3和miR-202-5p、miR-202-5p和*STAT3*关系分析

ENCORI数据库显示，lncRNA MEG3和miR-202-5p、miR-202-5p和*STAT3*有结合位点。见图4、5。与WT-MEG3+miR-NC组(1.25±0.07)相比，WT-MEG3+miR-

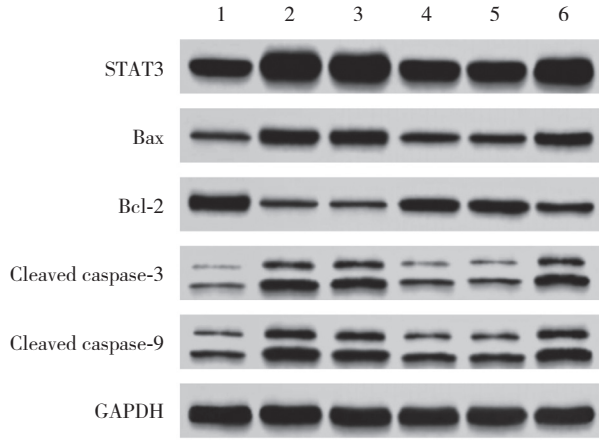
202-5p组萤光素酶活性（0.32 ± 0.05）降低（$P < 0.05$）；MUT-MEG3+miR-NC组与MUT-MEG3+miR-202-5p组萤光素酶活性（1.23 ± 0.07 vs. 1.21 ± 0.06）比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。与WT-STAT3+miR-NC组（1.21 ± 0.07）相比，WT-STAT3+miR-202-5p组萤光素酶活性（0.30 ± 0.06）降低（$P < 0.05$）；MUT-STAT3+miR-NC组与MUT-STAT3+miR-202-5p组萤光素酶活性（1.19 ± 0.08 vs.1.17 ± 0.07）比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

表5　各组细胞STAT3及凋亡蛋白表达（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Tab.5　STAT3 and apoptotic protein expression in each group of cells（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Group	STAT3	Bax	Bcl-2	Cleaved caspase-3	Cleaved caspase-9
AC16	1.02 ± 0.21	0.25 ± 0.05	0.77 ± 0.08	0.20 ± 0.05	0.30 ± 0.07
H/R	2.43 ± 0.25[1)]	0.62 ± 0.07[1)]	0.26 ± 0.07[1)]	0.67 ± 0.07[1)]	0.85 ± 0.09[1)]
sh-NC	2.39 ± 0.25	0.60 ± 0.06	0.28 ± 0.06	0.69 ± 0.07	0.83 ± 0.09
sh-MEG3	1.28 ± 0.21[2),3)]	0.31 ± 0.05[2),3)]	0.62 ± 0.07[2),3)]	0.26 ± 0.06[2),3)]	0.39 ± 0.07[2),3)]
miR-NC	1.31 ± 0.22	0.33 ± 0.05	0.65 ± 0.07	0.28 ± 0.06	0.41 ± 0.07
in-miR-202-5p	2.15 ± 0.23[4),5)]	0.56 ± 0.06[4),5)]	0.34 ± 0.06[4),5)]	0.62 ± 0.07[4),5)]	0.77 ± 0.08[4),5)]

1）$P < 0.05$ vs. AC16 group；2）$P < 0.05$ vs. H/R group；3）$P < 0.05$ vs. sh-NC group；4）$P < 0.05$ vs. sh-MEG3 group；5）$P < 0.05$ vs. miR-NC group.



1，AC16 group；2，H/R group；3，sh-NC group；4，sh-MEG3 group；5，miR-NC group；6，in-miR-202-5p group.

图3　STAT3及凋亡蛋白表达

Fig.3　Expression of STAT3 and apoptotic proteins

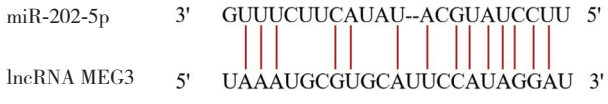


图4　lncRNA MEG3和miR-202-5p结合位点

Fig.4　lncRNA MEG3 and miR-202-5p binding sites

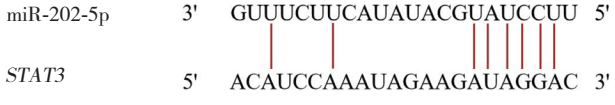


图5　miR-202-5p和*STAT3*结合位点

Fig.5　miR-202-5p and *STAT3* binding sites

3　讨论

lncRNA MEG3能直接或竞争性地与miRNA结合，参与细胞炎症、凋亡、氧化应激等过程，对心肌细胞和血皮内皮细胞等发挥病理调控作用，在心血管疾病防治中有巨大潜力[8]。有研究[9]指出，lncRNA MEG3表达下调能增强心脏功能，改善心肌供血，保护心肌细胞。ZHOU等[10]也发现lncRNA MEG3在缺氧心肌细胞中表达升高，敲低lncRNA MEG3表达能有效减轻心肌细胞损伤。本研究敲低lncRNA MEG3后，H/R诱导的心肌细胞中的MEG3表达下调，细胞活力、克隆数增加，凋亡率降低，促炎因子IL-6、TNF-α、氧化应激标志物MDA、ROS水平及促凋亡因子Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达下降，抗氧化因子SOD、GSH-Px水平和抗凋亡因子Bcl-2表达增高，说明敲低lncRNA MEG3可能通过调控上调Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达和下调Bcl-2表达激活线粒体依赖的细胞凋亡途径抑制H/R诱导的心肌细胞凋亡，并通过抑制促炎因子分泌和氧化标志物水平和提高抗氧化酶活性减轻炎症、氧化应激反应。

靶向上调miR-202-5p可抑制TRPV2的激活，促进心肌细胞增殖，同时改善受损线粒体结构，减轻氧化应激，进而改善MIRI大鼠心脏功能和心肌损

伤[11]。LI等[12]发现miR-202-5p在MIRI大鼠中下调，其能负调控TRPV2，导致血清心肌酶及ROS浓度升高，增强心肌细胞钙离子负荷，加重心肌组织损伤。本研究结果显示，敲低lncRNA MEG3后H/R细胞中miR-202-5p表达增加，lncRNA MEG3和miR-202-5p间存在结合位点，提示lncRNA MEG3可能调控miR-202-5p表达。本研究还发现，miR-202-5p能降低WT-MEG3的萤光素酶活性，说明lncRNA MEG3可以靶向负调控miR-202-5p；抑制miR-202-5p减轻了lncRNA MEG3沉默对心肌细胞凋亡、炎症和氧化应激的影响，证明lncRNA MEG3能调控miR-202-5p表达，进而调节H/R诱导的心肌细胞凋亡。

MIRI的主要特征是氧化应激、细胞凋亡和炎症反应，而调节*STAT3*信号转导能通过减少氧化应激、抑制细胞凋亡和减轻炎症保护MI和心肌损伤[13]。CHENG等[14]建立MI大鼠模型，发现STAT3表达与MI大鼠炎性细胞因子水平、梗死面积和心功能有关，可通过调控*STAT3*表达调节心肌细胞凋亡缓解心肌损伤。RAO等[15]也通过构建MI小鼠模型，发现下调*STAT3*表达能抑制心肌细胞凋亡，降低心肌细胞ROS水平和氧化应激、心肌纤维化水平，增加心功能，减小心肌梗死面积。本研究敲低lncRNA MEG3后H/R细胞中*STAT3*表达降低，而进一步抑制miR-202-5p后*STAT3*表达增加；miR-202-5p和*STAT3*间有多个结合位点，且miR-202-5p能降低WT-*STAT3*的萤光素酶活性，表明lncRNA MEG3能通过调节miR-202-5p负调控*STAT3*，从而抑制H/R诱导的心肌细胞凋亡。

综上所述，敲低lncRNA MEG3能通过负调节miR-202-5p下调*STAT3*，进而抑制H/R诱导的心肌细胞凋亡。本研究存在一定局限性，仅进行了细胞实验，未进行体内实验，未来将选择MIRI大鼠对本研究结论进行验证。

参考文献：

[1] WEI DS，QI JJ，WANG YX，et al. NR4A2 may be a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction：a comprehensive bioinformatics analysis and experimental validation [J]. Front Immunol，2022，13：1061800. DOI：10.3389/fimmu.2022.1061800.

[2] LIU Y，LI L，WANG Z，et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury：Molecular mechanisms and prevention [J]. Microvasc Res，2023，149：104565. DOI：10.1016/j.mvr.2023.104565.

[3] MI S，HUANG F，JIAO ML，et al. Inhibition of MEG3 ameliorates cardiomyocyte apoptosis and autophagy by regulating the expression of miRNA-129-5p in a mouse model of heart failure [J]. Redox Rep，2023，28（1）：2224607. DOI：10.1080/13510002.2023.2224607.

[4] ZHAO W，WU YY，YE FH，et al. Tetrandrine ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through miR-202-5p/TRPV2 [J]. Biomed Res Int，2021，2021：8870674. DOI：10.1155/2021/8870674.

[5] YANG HW，ZHANG PP，WANG Q，et al. The research development of STAT3 in hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. Front Immunol，2023，14：1066222. DOI：10.3389/fimmu.2023.1066222.

[6] ZHU MY，PENG LL，HUO SQ，et al. STAT3 signaling promotes cardiac injury by upregulating NCOA4-mediated ferritinophagy and ferroptosis in high-fat-diet fed mice [J]. Free Radic Biol Med，2023，201：111-125. DOI：10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.003.

[7] 李悦，郝艳丽，吴涛. lncRNA RMST靶向miR-224-3p调控缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2023，21（7）：1206-1212. DOI：10.12102/j.issn.1672-1349.2023.07.008.

[8] LI ZN，GAO JL，SUN D，et al. LncRNA MEG3：potential stock for precision treatment of cardiovascular diseases [J]. Front Pharmacol，2022，13：1045501. DOI：10.3389/fphar.2022.1045501.

[9] LI J，LIU WX，PENG F，et al. The multifaceted biology of lncR-Meg3 in cardio-cerebrovascular diseases [J]. Front Genet，2023，14：1132884. DOI：10.3389/fgene.2023.1132884.

[10] ZHOU Y，LI XG，ZHAO D，et al. Long non-coding RNA MEG3 knockdown alleviates hypoxia-induced injury in rat cardiomyocytes via the miR-325-3p/TRPV4 axis [J]. Mol Med Rep，2021，23（1）：18. DOI：10.3892/mmr.2020.11656.

[11] JIANG LL，ZHOU X，ZHAO XL，et al. Tetrandrine downregulates TRPV2 expression to ameliorate myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via regulation of cardiomyocyte apoptosis，calcium homeostasis and mitochondrial function [J]. Eur J Pharmacol，2024，964：176246. DOI：10.1016/j.ejphar.2023.176246.

[12] LI YB，LI Q，ZHANG O，et al. miR-202-5p protects rat against myocardial ischemia reperfusion injury by downregulating the expression of Trpv2 to attenuate the Ca^{2+} overload in cardiomyocytes [J]. J Cell Biochem，2019，120（8）：13680-13693. DOI：10.1002/jcb.28641.

[13] LIU YW，CHENG X，QI BC，et al. Aucubin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating STAT3/NF-κB/HMGB-1 pathway [J]. Int J Cardiol，2024，400：131800. DOI：10.1016/j.ijcard.2024.131800.

[14] CHENG XJ，LI L，XIN BQ. miR-124 regulates the inflammation and apoptosis in myocardial infarction rats by targeting STAT3 [J]. Cardiovasc Toxicol，2021，21（9）：710-720. DOI：10.1007/s12012-021-09661-2.

[15] RAO TC，TONG H，LI J，et al. Exploring the role and mechanism of hyperoside against cardiomyocyte injury in mice with myocardial infarction based on JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Phytomedicine，2024，128：155319. DOI：10.1016/j.phymed.2023.155319.

（编辑　于　溪）