

## 研究论文

# 右美托咪定通过调节MALAT1/miR-126-5p/HMGB1轴减轻肝缺血/再灌注损伤

马新刚, 刘叶, 薛明喜\*

淄博市妇幼保健院手术麻醉科, 淄博 255000

**摘要:** 本文旨在探究右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)在肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia/reperfusion injury, HIRI)过程中的作用及其机制。将人正常肝细胞(HL-7702细胞)在低氧条件下培养24 h, 再在复氧条件下培养12 h, 用实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和Western blot检测长链非编码RNA MALAT1、microRNA-126-5p(miR-126-5p)和高迁移率族蛋白-1(high mobility group box-1, HMGB1)的表达水平。用生物信息学预测方法和双荧光素酶基因报告实验分析miR-126-5p与MALAT1、HMGB1的靶向关系。用试剂盒分别检测细胞培养液中活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和ATP的水平。结果显示, Dex能显著降低HL-7702细胞HIRI后培养液中ROS和MDA的水平, 提高ATP的水平。HIRI可上调细胞MALAT1和HMGB1的表达, 下调miR-126-5p的表达, 而Dex可逆转HIRI的上述作用。Dex可抑制HIRI诱导的细胞凋亡, 而过表达MALAT1可逆转Dex的抑制作用, 上调miR-126-5p表达水平可恢复Dex的此作用。以上结果提示, Dex可通过调节MALAT1/miR-126-5p/HMGB1轴在HIRI中发挥保护作用。

**关键词:** 右美托咪定; 肝缺血再灌注损伤; MALAT1; miR-126-5p; 高迁移率族蛋白-1

**中图分类号:** R333.4

## Dexmedetomidine alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury by regulating MALAT1/miR-126-5p/HMGB1 axis

MA Xin-Gang, LIU Ye, XUE Ming-Xi\*

Department of Anesthesiology, Zibo Maternal and Child Health Hospital, Zibo 255000, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of dexmedetomidine (Dex) on hepatic ischemia/reperfusion injury (HIRI) and the underlying mechanism. The *in vitro* HIRI was induced by culturing HL-7702 cells, a human hepatocyte cell line, under 24 h of hypoxia and 12 h of reoxygenation. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) and Western blot were performed to detect the expression levels of long non-coding RNA MALAT1, microRNA-126-5p (miR-126-5p) and high mobility group box-1 (HMGB1). Bioinformatics prediction and double luciferase assay were used to verify the targeting relationship between miR-126-5p and MALAT1, HMGB1. Reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and ATP levels in culture medium were detected by corresponding kits. The results showed that Dex significantly reduced the levels of ROS and MDA, but increased the level of ATP in HL-7702 cells with HIRI. HIRI up-regulated the expression levels of MALAT1 and HMGB1, and down-regulated the level of miR-126-5p. Dex reversed these effects of HIRI. Furthermore, Dex inhibited HIRI-induced cellular apoptosis, whereas MALAT1 reversed the effect of Dex. This inhibitory effect of Dex could be restored by up-regulation of miR-126-5p. The results suggest that Dex protects hepatocytes from HIRI via regulating MALAT1/miR-126-5p/HMGB1 axis.

**Key words:** dexmedetomidine; hepatic ischemia/reperfusion injury; MALAT1; miR-126-5p; high mobility group box-1

肝脏缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia/reperfusion injury, HIRI) 是由缺血肝脏组织血流恢复和氧气传递恢复引起的, 该损伤发生在多种临床环境中, 包括肝切除手术、移植和休克等<sup>[1]</sup>。HIRI 是肝脏功能障碍、原发性肝移植、肝功能不全和肝手术后肝功能衰竭的重要原因之一<sup>[2]</sup>。目前, 科学家们已经发现了几种涉及 HIRI 病理过程的机制, 包括 Kupffer 细胞活化、促炎细胞因子的释放和氧化应激<sup>[3]</sup>。研究表明, 过度的氧化应激会产生大量的炎症因子, 例如, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平的增加意味着细胞功能受损<sup>[4]</sup>。细胞内 ATP 水平的急剧下降和 ROS 的大量增加是诱导 HIRI 的重要原因之一<sup>[5]</sup>。此外, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 为脂质氧化物, 可反映自由基对细胞膜的损伤程度<sup>[6]</sup>。目前, HIRI 导致的肝切除术后肝功能衰竭仍然是临床肝脏外科中的一大难题<sup>[7]</sup>。因此, 如何有效控制入肝血流, 减轻 HIRI, 从而保护肝脏功能是肝脏外科的研究热点。

右美托咪定 (dexmedetomidine, Dex) 是一种常见的  $\alpha_2$  肾上腺素能受体激动剂<sup>[8]</sup>。研究表明 Dex 对体内多种脏器具有保护作用<sup>[9]</sup>。Dex 对心肌缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤具有抑制作用<sup>[10]</sup>。Dex 可预防主动脉手术患者的骨骼肌 I/R 损伤<sup>[11]</sup>。近期有研究显示, Dex 对 HIRI 有减轻作用<sup>[12]</sup>, 但 Dex 的保护作用机制尚不明了。

长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, lncRNAs) 是核苷酸长度 >200 nt 的非编码核苷酸序列, 在过去被认为是生物代谢的废物, 但近十年的研究表明 lncRNA 参与转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要的调控过程<sup>[13]</sup>。肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 是生物体内广泛存在的 lncRNAs, 它位于人染色体 11q13, 可通过选择性剪接或转录调控介导多种生物学进程<sup>[14]</sup>。MALAT1 在多种肿瘤中异常高表达, 并作为一种致癌基因促进肿瘤的恶性进展<sup>[15, 16]</sup>。此外, MALAT1 在炎症反应中也发挥着重要的调节作用, 例如, MALAT1 在急性心肌梗死患者外周血浆中表达升高, 敲低 MALAT1 可减轻急性心肌梗死<sup>[17]</sup>。MALAT1 可通过激活 ERK/MAPK 信号通路促进心肌细胞凋亡<sup>[18]</sup>。MALAT1 还参与调节 I/R 损伤机制, 敲低 MALAT1 可在肾 I/R 损伤中发挥保护作用<sup>[19]</sup>。然而, MALAT1 在 HIRI 中的作用及其机制尚不清楚。

此外, 微小 RNA (microRNA, miR) 也在炎症反应中发挥重要作用, MALAT1 通过靶向 miR-200a 促进心肌细胞凋亡<sup>[20]</sup>。Zhao 等研究显示, 过表达的 MALAT1 可通过吸附 miR-145 逆转芬太尼对心肌 I/R 损伤的保护作用<sup>[21]</sup>。miR 还通过靶向调控下游靶基因在 I/R 损伤中发挥调节作用, miR-146a 通过靶向调控肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 抑制核因子 (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路的激活, 从而在小肠 I/R 损伤中发挥保护作用<sup>[22]</sup>。有研究显示, 内皮祖细胞产生的 miR-126-5p 是迄今为止重要的血管源性 miR 之一, 它们对内皮祖细胞功能的调控起着非常重要的作用<sup>[23]</sup>。研究表明, miR-126-5p 在小鼠肾 I/R 损伤模型中异常表达<sup>[24]</sup>。目前, miR-126-5p 在 HIRI 中的作用及机制还不明了。

另外, Lai 等研究显示, 高迁移率族蛋白 -1 (high mobility group box-1, HMGB1) 可促进 HIRI 的进程<sup>[25]</sup>。本研究建立 HL-7702 细胞低氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 损伤的细胞模型, 以观察和探究 Dex 在 HIRI 过程中对 MALAT1/miR-126-5p/HMGB1 轴作用及其作用机制, 为进一步阐明 HIRI 发生、发展的分子机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和主要试剂

Dex 购自 Sigma-Aldrich。人正常肝细胞系 HL-7702 购于 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, 美国), 人胚肾细胞 293T 购于中国科学院细胞库。RPMI-1640 培养基中购于 Gibco (Grand Island, NY, 美国)。Lipofectamine 3000 试剂和低氧培养箱购于 Thermo Scientific (HERACELL 150i, Hanau, 德国)。MALAT1 过表达质粒 (pcDNA3.1-MALAT1)、对照组空载质粒 NC (pcDNA3.1)、miR-126-5p 模拟物 (miR-126-5p mimics) 及其对照物 miR-NC、双荧光素酶系统均购于 Promega 公司 (Madison, WI, 美国), 双荧光素酶报告基因载体 [MALAT1 野生型 (MALAT1-WT)、MALAT1 突变型 (MALAT1-MUT)、HMGB1 野生型 (HMGB1-WT) 和 HMGB1 突变型 (HMGB1-MUT)] 由 Promega 公司构建。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒、TRIzol 试剂、RIPA 裂解缓冲液、ROS 检测试剂盒、MDA 检测试剂盒和 ATP 检测试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司。ECL 试剂盒购于 Amersham Pharmacia Biotech。兔多克隆抗

HMGB1 抗体 (ab18256, 1:500), 兔多克隆抗 GAPDH 抗体 (ab181602, 1:500), 山羊抗兔 IgG (ab205718, 1:2 000) 均购于 Abcam 公司 (Cambridge, MA, 美国)。引物由上海 GenePharma 公司设计合成。

**1.2 H/R 损伤模型的建立及分组** 将 HL-7702 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 当细胞融合度达到 80% 左右时, 弃掉培养基, 适量 PBS 清洗, 使用 0.25% 胰蛋白酶消化, 1 000 r/min 离心收集细胞, 细胞接种到 96 孔板中, 接种密度为 1 × 10<sup>5</sup> 个 /mL。HL-7702 细胞进行随机分组: (1) 对照组: 细胞培养在常氧条件 (5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub> 和 74% N<sub>2</sub>) 下, 不加 Dex; (2) H/R 组: 细胞暴露于低氧环境 (5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub> 和 94% N<sub>2</sub>) 中 24 h (将细胞放入低氧培养箱中, 用 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的混合气体孵育细胞), 然后在含 5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub> 和 74% N<sub>2</sub> 的培养箱中复氧 12 h; (3) H/R+0.1 μmol/L Dex 组: 细胞用 0.1 μmol/L Dex 预处理 1 h, 暴露于低氧环境中 24 h, 然后复氧 12 h; (4) H/R+1.0 μmol/L Dex 组: 细胞用 1.0 μmol/L Dex 预处理 1 h, 暴露于低氧环境中 24 h, 然后复氧 12 h; (5) H/R+10.0 μmol/L Dex 组: 细胞用 10.0 μmol/L Dex 预处理 1 h, 暴露于低氧环境中 24 h, 然后复氧 12 h; (6) H/R+10 μmol/L Dex+MALAT1 组: 细胞转染 MALAT1 过表达质粒, 后续处理方法同 H/R+10.0 μmol/L Dex 组; (7) H/R+10 μmol/L Dex+MALAT1+miR-126-5p 组: 细胞共转染 MALAT1 过表达质粒和 miR-126-5p mimics, 后续处理方法同 H/R+10.0 μmol/L Dex 组。(8) NC 组: 仅转染 NC。(9) MALAT1 组: 转染 MALAT1 过表达质粒。

**1.3 qRT-PCR** 用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA, 检测其纯度后将其反转录成 cDNA, 随后取各组逆转录产物 cDNA 1 μL, 设置反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 45 个循环, 加入不同引物 (表 1) 扩增各个样本的目的基因和内参基因。U6 被用作 miR-126-5p 的内参, GAPDH 被用作 MALAT1 和 HMGB1 的内参。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 分析法检测 MALAT1、miR-126-5p 和 HMGB1 mRNA 的相对表达量。

**1.4 Western blot** 取各组细胞, 分别加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min 后, 以 12 000 r/min 的转速离心 15 min, 取上清, 采用 BCA 方法测量各组蛋白浓度。取 40 μg 各组蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 350 mA 转膜 150 min, 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 孵育抗 HMGB1 抗体和抗 GAPDH 抗体, 4 °C 过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。随后, 将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗于室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。滴入 ECL 化学发光液后放入暗盒中压片并依次显影、定影, 在凝胶成像系统中拍摄照片, 采用 ImageJ 软件进行条带的灰度值分析, 以 GAPDH 作为内参蛋白计算目标蛋白的相对表达水平。

**1.5 双荧光素酶报告基因检测** 取处于对数生长期且状态良好的 293T 细胞接种于 96 孔板中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温、恒湿的无菌孵箱内培养过夜。待次日细胞融合度达到 50%~70% 时, 准备共转染。将 10 μL 无血清 RPMI-1640 培养液与 0.3 μL Lipofectamine 3000 试剂充分混匀 (溶液 A), 室温静置 5 min。同时将 10 μL 无血清 RPMI-1640 培养液分别与 0.16 μg MALAT1-WT、MALAT1-MUT、HMGB1-

表1. 各引物序列

Table 1. Sequences of different primers

Gene	Primer sequences (5'-3')	Product length
MALAT1	F: AGGCGTTGTGCGTAGAGGA	80 bp
	R: GGATTTTTACCAACCACTCGC	
miR-126-5p	F: GGAATGTAAGGAAGTGTG	72 bp
	R: GAGCAGGCTGGAGAA	
HMGB1	F: ACAAGGCCCGTTATGAAAGA	116 bp
	R: GAAGAGGAAGAAGGCCGAAG	
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCAC	96 bp
	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	
GAPDH	F: CGGAGTCAACGGATTTGGTAT	598 bp
	R: AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA	

WT 或 HMGB1-MUT 混匀, 再按需要加入 5 pmol miR-126-5p mimics 或 miR-NC, 充分混匀 (溶液 B)。将溶液 A 与溶液 B 充分混匀, 室温孵育 20 min 后, 使用移液器将转染混合物加入 96 孔板内。细胞置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温、恒湿的无菌孵箱内培养, 转染 6 h 后培养液更换为新鲜的 RPMI-1640 高糖完全培养基, 转染 48 h 后弃培养基, PBS 洗涤细胞 2 次。将 5 × PLB 用双蒸水稀释至 1 × PLB, 每孔加入 20 μL 1 × PLB, 移液器吹打、打散细胞, 将孔板置于室温摇床上缓慢摇晃 15 min。在 EP 管中加入 100 μL Luciferase Assay Reagent II (LAR II), 之后加入 20 μL PLB 裂解液, 荧光发光仪检测 Firefly luciferase 值。在 EP 管中加入 100 μL Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent, 荧光发光仪检测 Renilla luciferase 值。以 Firefly luciferase

值作为内参, 根据需要将转染 MALAT1-WT、HMGB1-WT 分别与 miR-NC 共转染细胞的荧光素酶活性标准化为 1, 计算各组相对荧光素酶活性。

**1.6 流式细胞术** 将细胞用胰蛋白酶消化液制成细胞悬液, 1 500 r/min 离心 3 min 后收集细胞。所得细胞按细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤操作: PBS 洗细胞 2 次后, 加入 400 μL 预冷 PBS, 然后分别加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 4 °C 避光孵育 30 min 后, 立即用流式细胞仪测定, 经计算机软件处理后, 计算出凋亡细胞的百分率。

**1.7 细胞 ROS、MDA、ATP 水平检测** 将三组细胞制成细胞悬液并离心, 取上清液按试剂盒说明书进行细胞培养液中 ROS、MDA、ATP 水平的检测。

**1.8 生物信息学预测** StarBase 数据库 ([http://star-](http://starbase.sysu.edu.cn/)

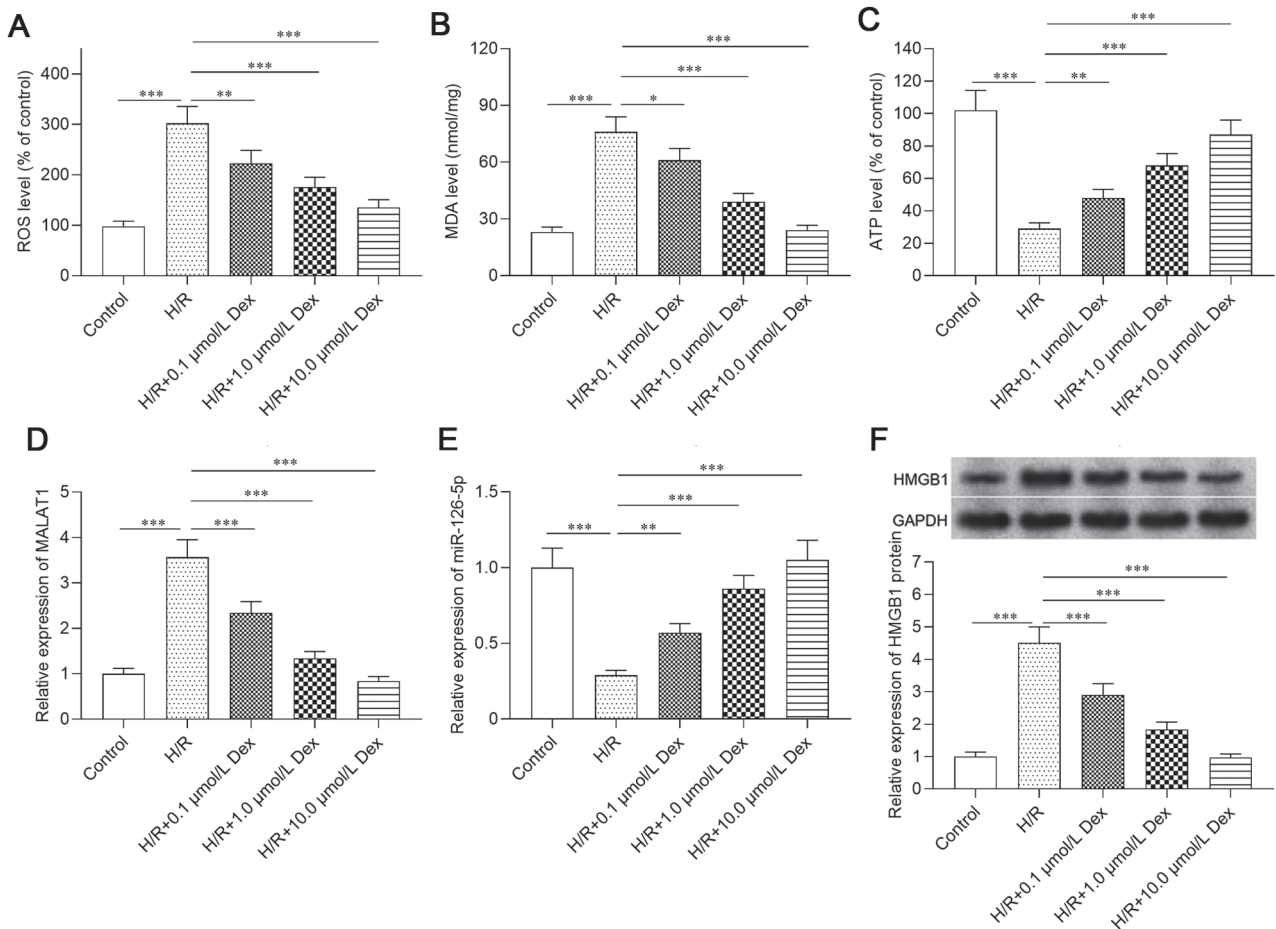


图 1. 右美托咪定(Dex)对肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)标记物水平和MALAT1、miR-126-5p以及高迁移率族蛋白-1 (HMGB1)表达水平的影响

Fig. 1. Effects of dexmedetomidine (Dex) on hepatic ischemia/reperfusion injury (HIRI) markers and MALAT1, miR-126-5p and high mobility group box-1 (HMGB1) expression levels. A–C: Levels of ROS (A), MDA (B) and ATP (C). D, E: Levels of MALAT1 (D) and miR-126-5p (E) expression detected by qRT-PCR. F: Protein expression levels of HMGB1. Mean ± SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



base.sysu.edu.cn/) 是一个公开的用于生物信息学分析的数据库, 本研究使用此数据库的 miRNA-Target 和 miRNA-lncRNA 模块, 预测 miR-126-5p 与 MALAT1 的结合序列。另外, TargetsScan 数据库 ([http://www.targetsScan.org/vert\\_72/](http://www.targetsScan.org/vert_72/)) 是一个用于分析多物种靶点的数据库, 本研究使用此数据库的 miRNA-Target 功能模块预测 miR-126-5p 与 HMGB1 mRNA 3'UTR 的结合序列。

**1.9 统计学处理** 本研究中所有样品的测定实验重复 3 次, 所有数据均以 mean ± SD 表示。用 SPSS 22.0 软件进行统计检验, 用 Graphpad Prism 8.0 进行制图, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 有显著差异者用 Student-Newman-Keuls 检验进行两两比较。P < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Dex对H/R诱导的HIRI标记物水平、MALAT1、miR-126-5p和HMGB1表达的影响

为了研究 Dex 对细胞中 ROS、MDA、ATP 水平的影响, 将正常肝细胞 HL-7702 暴露于 H/R 条件下, 结果显示, ROS 和 MDA 的水平显著升高, ATP 水平显著降低。随后, 采用不同浓度 Dex 处理后, 结果显示 0.1~10 μmol/L Dex 均可显著降低 ROS 和 MDA

水平, 并显著提高 ATP 水平, 表明 Dex 能够减轻 HL-7702 细胞的 H/R 损伤 (图 1A~C)。

qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, 相对对照组, H/R 组中的 MALAT1 和 HMGB1 表达水平显著上调, miR-126-5p 表达水平显著下调; 而 Dex 处理后可逆转 H/R 的作用 (图 1D~F)。上述结果提示, Dex 可能通过调节 MALAT1、miR-126-5p 和 HMGB1 的表达在 HIRI 中发挥保护作用。

### 2.2 miR-126-5p是MALAT1可能靶点

通过分析 StarBase 数据库, 我们发现 MALAT1 与 miR-126-5p 可能存在结合序列 (图 2A)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-126-5p mimics 可抑制 MALAT1-WT 组的荧光素酶活性; 而 miR-126-5p mimics 对 MALAT1-MUT 组的荧光素酶活性无显著影响 (图 2B)。过表达 MALAT1 可抑制 miR-126-5p 的表达 (图 2C)。这些结果提示 MALAT1 直接靶向作用于 miR-126-5p。

### 2.3 Dex调节H/R诱导的HL-7702细胞miR-126-5p和HMGB1的表达

通过分析 TargetsScan 数据库, 我们发现 HMGB1 基因与 miR-126-5p 存在可能的结合位点 (图 3A)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-126-5p mimics 抑制 HMGB1-WT 的荧光素酶活性, 而对 HMGB1-MUT 的荧光素酶活性无显著作用 (图 3B)。

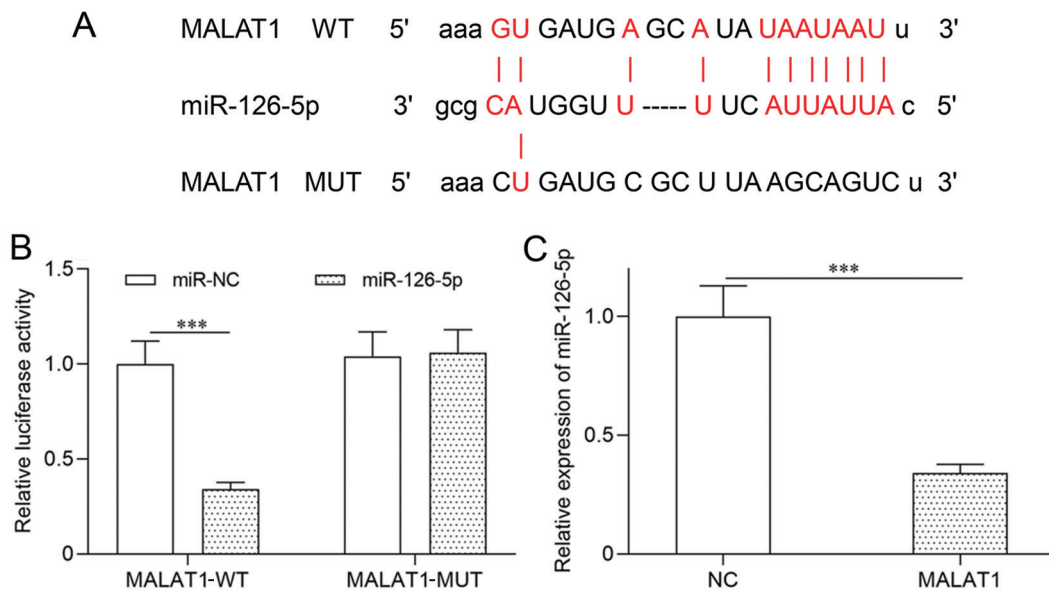


图 2. MALAT1与miR-126-5p的靶向关系

Fig. 2. Targeting relationship between MALAT1 and miR-126-5p. A: Binding sites of MALAT1 and miR-126-5p predicted by bioinformatics. B: Results of double luciferase reporter gene analysis. C: Results of qRT-PCR. NC: pcDNA3.1; MALAT1: pcDNA3.1-MALAT1. Mean ± SD, n = 3. \*\*\*P < 0.001.

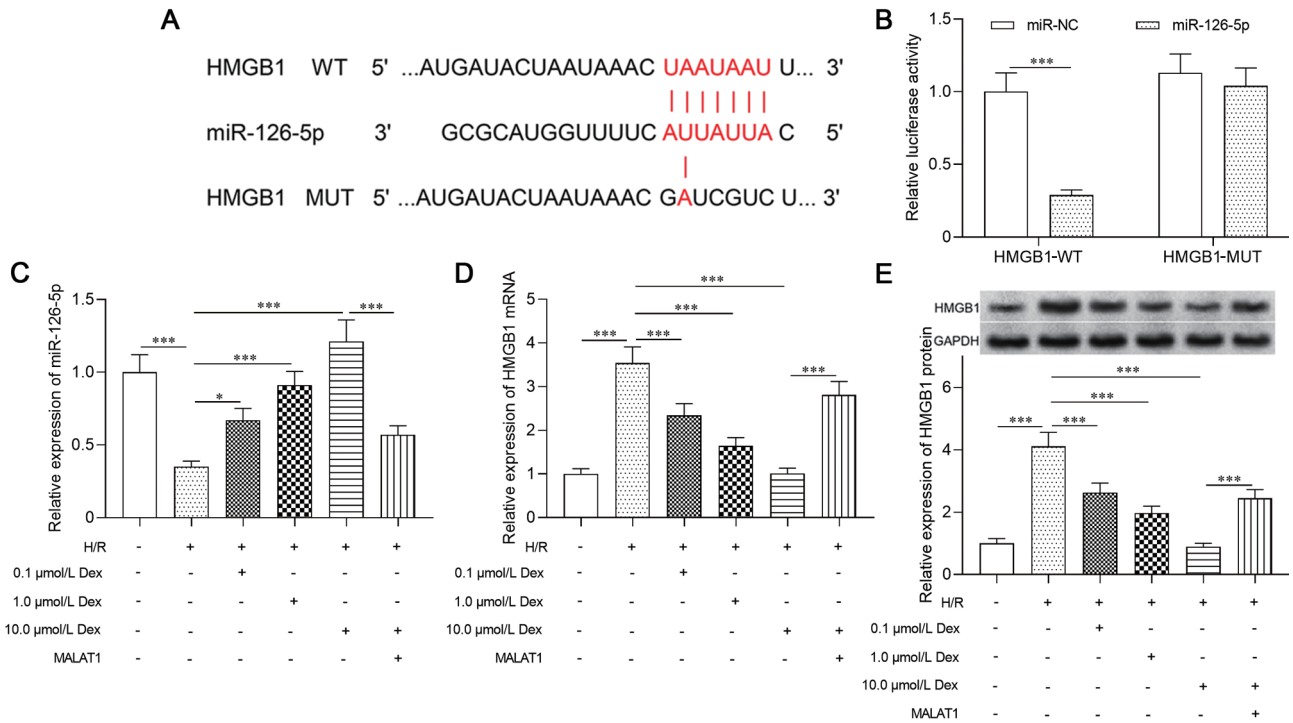


图 3. 高迁移率族蛋白-1 (HMGB1)与miR-126-5p的靶向关系以及右美托咪定(Dex)对二者表达的作用  
 Fig. 3. Targeting relationship between high mobility group box-1 (HMGB1) and miR-126-5p, as well as effects of dexmedetomidine (Dex) on their expression levels. *A*: Binding sites of HMGB1 and miR-126-5p predicted by bioinformatics. *B*: Results of double luciferase reporter gene analysis. *C*, *D*: Expression levels of miR-126-5p (*C*) and HMGB1 mRNA (*D*) detected by qRT-PCR. *E*: Protein expression level of HMGB1 detected by Western blot. Mean ± SD, *n* = 3. \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001.

这些结果提示 miR-126-5p 直接靶向作用于 HMGB1 基因。

随后，我们首先将 MALAT1 过表达质粒转染 HL-7702，再进行 H/R 处理，最后采用 10.0 μmol/L Dex 预处理细胞 1 h，qRT-PCR 和 Western blot 结果显示，过表达 MALAT1 可削弱 Dex 对 miR-126-5p 表达的上调作用 (图 3C)，并逆转 Dex 对 HMGB1 mRNA 和蛋白表达的下调作用 (图 3D、E)。这些结果表明 Dex 通过调节 MALAT1/miR-126-5p/HMGB1 轴在 HIRI 中发挥作用。

### 2.4 Dex通过调控MALAT1/miR-126-5p轴对HL-7702细胞凋亡的影响

为探讨 Dex 通过调控 MALAT1/miR-126-5p 轴对 HL-7702 细胞凋亡的影响，我们用 10.0 μmol/L Dex 预处理 HL-7702 细胞，再进行 H/R 处理，最后转染 MALAT1 过表达质粒或 miR-126-5p mimics。流式细胞术结果显示，Dex 预处理后 H/R 诱导的细胞凋亡率降低，过表达 MALAT1 后细胞凋亡率升高，而上调 miR-126-5p 可以逆转过表达 MALAT1 的作

用 (图 4)。这些结果提示 Dex 可能通过调控 MALAT1/miR-126-5p 轴抑制 H/R 诱导的细胞凋亡。

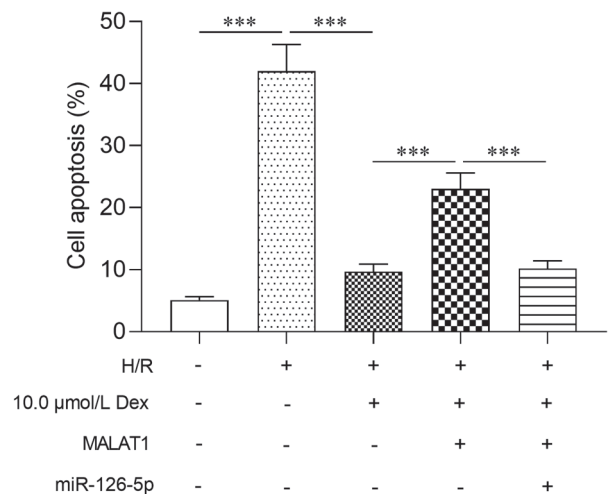


图 4. 各组细胞凋亡率  
 Fig. 4. Cell apoptotic rate of different groups detected by flow cytometry. Mean ± SD, *n* = 3. \*\*\**P* < 0.001.

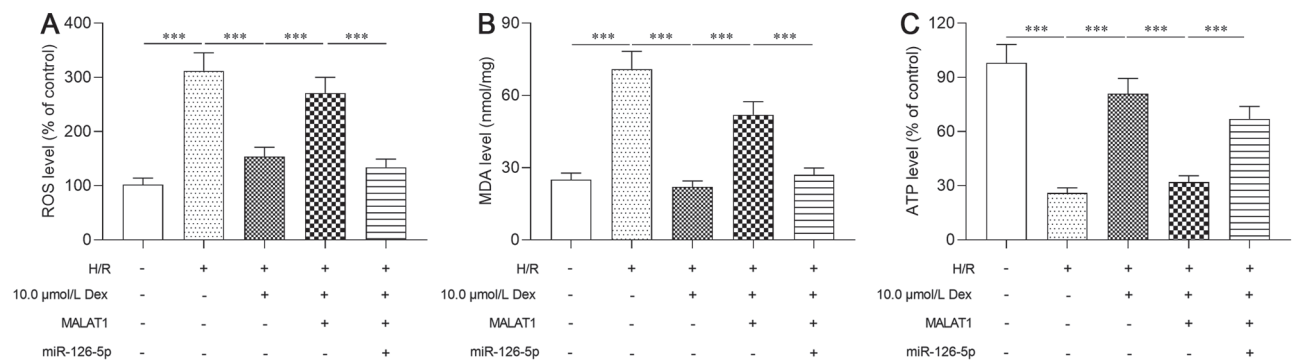


图 5. 各组活性氧、丙二醛和ATP的水平

Fig. 5. Reactive oxygen species (ROS, A), malondialdehyde (MDA, B) and ATP (C) levels detected by corresponding kits. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2.5 Dex通过调控MALAT1/miR-126-5p轴对H/R诱导的细胞损伤的影响

为探讨Dex通过调控MALAT1/miR-126-5p轴对H/R诱导的细胞损伤的影响,我们用10.0  $\mu\text{mol/L}$  Dex预处理细胞,再进行H/R处理,最后转染MALAT1过表达质粒或miR-126-5p mimics。结果显示过表达MALAT1可逆转Dex对H/R诱导的细胞ROS、MDA和ATP水平的影响,而上调miR-126-5p可削弱此作用(图5)。这些结果提示Dex可能通过调节MALAT1/miR-126-5p轴在HIRI中发挥保护作用。

## 3 讨论

本研究结果显示,H/R损伤后,HL-7702细胞培养液中ROS和MDA水平增加,ATP水平降低;而Dex可降低H/R诱导的ROS和MDA水平增加,并提高ATP的水平。既往研究表明,Dex对心脏、肾脏、中枢神经系统、呼吸系统和小肠具有保护作用<sup>[26]</sup>。Dex可减少氧化应激和炎症因子的释放,从而改善免疫功能,减少细胞凋亡<sup>[27]</sup>;I/R处理的心肌细胞内MDA大量增多,而Dex通过抑制氧化应激,降低细胞内MDA水平,从而减轻心肌I/R损伤<sup>[27]</sup>。此外,Dex在肾I/R损伤过程中可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路,从而提供肾保护作用<sup>[28,29]</sup>。本研究结果与前述研究一致,表明了Dex在HIRI中发挥保护作用。

本研究结果显示,MALAT1在H/R处理后的HL-7702细胞中表达水平显著上调,而miR-126-5p表达水平显著下调;而Dex预处理可削弱H/R的作用。本研究结果进一步显示,MALAT1可能直接

靶向miR-126-5p,Dex可通过抑制MALAT1上调miR-126-5p的表达,从而在HIRI中发挥保护作用。越来越多的证据表明非编码RNA(noncoding RNAs, ncRNAs)在调节HIRI中发挥了重要作用<sup>[30]</sup>。Wang等研究显示,MALAT1通过竞争性结合miR-145而促进脑H/R损伤<sup>[31]</sup>。类似地,Wei等研究显示,MALAT1通过抑制p300介导的IL-8的表达从而抑制肺I/R损伤<sup>[32]</sup>。此外,Hu等研究显示,miR-145通过促进细胞自噬加重心肌I/R损伤<sup>[33]</sup>。miR-126可通过负向调控SOX6减轻缺血性损伤,并改善神经功能障碍<sup>[34]</sup>。Pan等研究显示,miR-126-5p能减轻大脑中动脉闭塞小鼠模型中的血脑屏障破坏<sup>[35]</sup>。此外,Dex还通过调节ncRNAs在I/R损伤中发挥调节作用,Dex通过下调miR-29b的表达激活FoxO3a/ARC信号通路,从而减轻大鼠心肌I/R损伤<sup>[36]</sup>。Zhou等研究显示,Dex通过上调lncRNA-CCAT1的表达抑制细胞凋亡,并阻滞细胞周期,从而保护肝细胞免受氧葡萄糖剥夺/再灌注损伤<sup>[37]</sup>。以上这些研究与本研究结果一致。MALAT1是I/R损伤进程中潜在的作用靶点,生物信息学分析表明Dex可靶向多种ncRNA<sup>[38]</sup>,我们推测MALAT1也是Dex潜在的作用靶点之一,本研究结果表明Dex通过调控MALAT1/miR-126-5p轴在HIRI中发挥保护作用。

本研究结果进一步显示,Dex可抑制H/R诱导的HL-7702细胞培养液中ROS和MDA水平的上升、细胞凋亡的促进,其机制可能是通过调控MALAT1/miR-126-5p/HMGB1轴抑制I/R导致的细胞损伤。Xiang等研究显示,Dex通过结合特异性蛋白来调节下游信号途径,从而在I/R过程中发挥保护作用。

用<sup>[39]</sup>。Peng 等研究显示,低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 在心脏 I/R 损伤的凋亡进程中起着关键调节作用,而 Dex 在转录后可下调 HIF-1 $\alpha$  的表达,并抑制其靶基因 BNIP3 的激活,Dex 后处理可减轻体内心脏 I/R 损伤和体外 H/R 损伤<sup>[40]</sup>。类似地,Li 等研究显示,Dex 可通过激活 PI3K/AKT/GSK3 $\beta$  途径以及下游 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径来减轻大鼠脑 I/R 损伤,Wnt/ $\beta$ -catenin 途径在其中发挥了重要作用<sup>[41]</sup>。

HMGB1 是一种位于真核生物细胞内的非组蛋白染色体结合蛋白。Zhai 等研究显示, HMGB1 可激活 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/NF- $\kappa$ B 通路,从而促进大鼠脑 I/R 损伤<sup>[42]</sup>。此外, Dex 能够下调 HMGB1 表达水平,从而抑制大鼠心肌 I/R 损伤<sup>[43]</sup>。而且在 HIRI 中, HMGB1 可作为炎症和器官损害的早期介质而发挥作用,过表达 HMGB1 可加重 HIRI<sup>[44]</sup>,其作用机制是通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路加重 HIRI 的炎症反应<sup>[45]</sup>。和以上研究结果相一致,本研究结果显示, HMGB1 参与 HIRI 进程,而 Dex 通过调控 MALAT1/miR-126-5p/HMGB1 轴在 HIRI 中发挥保护作用。

总之,本研究结果提示, Dex 对 HIRI 具有减轻作用,其机制是通过调节 MALAT1/miR-126-5p/HMGB1 轴保护肝脏。本研究可为未来 HIRI 的诊断和治疗提供有用的信息。

### 参考文献

- Dusabimana T, Kim SR, Kim HJ, Park SW, Kim H. Nobiletin ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury through the activation of SIRT1/FOXO3a-mediated autophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Mol Med* 2019; 51(4): 1–16.
- Ren Y, Wang LH, Deng FS, Li JS, Jiang L. Protective effect and mechanism of alpha-lipoic acid on partial hepatic ischemia-reperfusion injury in adult male rats. *Physiol Res* 2019; 68(5): 739–745.
- Costa CCC, Pereira NG, Machado ALM, Dórea MA, Cruz R, Silva RC, Domingues RJS, Yasojima EY. Splenic ischemic preconditioning attenuates oxidative stress induced by hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Acta Cir Bras* 2019; 34(7): e201900707.
- Li S, Zheng X, Li H, Zheng J, Chen X, Liu W, Tai Y, Zhang Y, Wang G, Yang Y. Mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia/reperfusion injury via inhibition of neutrophil recruitment. *J Immunol Res* 2018; 2018: 7283703.
- Katwal G, Baral D, Fan X, Weiyang H, Zhang X, Ling L, Xiong Y, Ye Q, Wang Y. SIRT3 a major player in attenuation of hepatic ischemia-reperfusion injury by reducing ROS via its downstream mediators: SOD2, CYP-D, and HIF-1 $\alpha$ . *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 2976957.
- Shen SQ (沈世强), Lin FS, Yan RC, Liu JC. Effects of estrogen on SOD and MDA and apoptosis in hepatic ischemia-reperfusion injury of rats. *Chin J Curr Advan Gen Surg* (中国现代普通外科进展) 2010; 13(10): 772–775 (in Chinese with English abstract).
- Ni D, Wei H, Chen W, Bao Q, Rosenkrans ZT, Barnhart TE, Ferreira CA, Wang Y, Yao H, Sun T, Jiang D, Li S, Cao T, Liu Z, Engle JW, Hu P, Lan X, Cai W. Ceria nanoparticles meet hepatic ischemia-reperfusion injury: The perfect imperfection. *Adv Mater* 2019; 31(40): e1902956.
- Wang XG (王晓阁). Progress in clinical application of dexmedetomidine. *Tianjin Pharm* (天津药学) 2019; 31(2): 68–70 (in Chinese).
- Yang PJ (杨鹏举), Yuan F, Xia L, Yang XH, Dong TL. Effects of dexmedetomidine on inflammatory factors and renal function in rats with hepatic ischemia-reperfusion injury. *Henan Med Res* (河南医学研究) 2019; 28(19): 3457–3459 (in Chinese with English abstract).
- Xue KK (薛凯凯), Yang L, Chen HM. Effects of dexmedetomidine combined with limb remote ischemic preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Chin Heart J* (心脏杂志) 2019; 31(3): 302–305 (in Chinese with English abstract).
- Kundra TS, Thimmarayappa A, Dhananjaya M, Manjunatha N. Dexmedetomidine for prevention of skeletal muscle ischaemia-reperfusion injury in patients with chronic limb ischaemia undergoing aortobifemoral bypass surgery: A prospective double-blind randomized controlled study. *Ann Card Anaesth* 2018; 21(1): 22–25.
- Zhao Y, Kong GY, Pei WM, Zhou B, Zhang QQ, Pan BB. Dexmedetomidine alleviates hepatic injury via the inhibition of oxidative stress and activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Eur Cytokine Netw* 2019; 30(3): 88–97.
- Wang J, Su Z, Lu S, Fu W, Liu Z, Jiang X, Tai S. LncRNA HOXA-AS2 and its molecular mechanisms in human cancer. *Clin Chim Acta* 2018; 485: 229–233.
- Li ZX, Zhu QN, Zhang HB, Hu Y, Wang G, Zhu YS. MALAT1: a potential biomarker in cancer. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 6757–6768.
- Kim J, Piao HL, Kim BJ, Yao F, Han Z, Wang Y, Xiao Z, Siverly AN, Lawhon SE, Ton BN, Lee H, Zhou Z, Gan B, Nakagawa S, Ellis MJ, Liang H, Hung MC, You MJ, Sun Y, Ma L. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat Genet* 2018; 50(12): 1705–1715.
- Sun Y, Ma L. New insights into long non-coding RNA MALAT1 in cancer and metastasis. *Cancers* 2019; 11(2):



- 216.
- 17 Hu H, Wu J, Li D, Zhou J, Yu H, Ma L. Knockdown of lncRNA MALAT1 attenuates acute myocardial infarction through miR-320-Pten axis. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 738–746.
- 18 Fan YZ, Huang H, Wang S, Tan GJ, Zhang QZ. Effect of lncRNA MALAT1 on rats with myocardial infarction through regulating ERK/MAPK signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(20): 9041–9049.
- 19 Kölling M, Genschel C, Kaucsar T, Hübner A, Rong S, Schmitt R, Sörensen-Zender I, Haddad G, Kistler A, Seeger H, Kielstein JT, Fliser D, Haller H, Wüthrich R, Zörnig M, Thum T, Lorenzen J. Hypoxia-induced long non-coding RNA Malat1 is dispensable for renal ischemia/reperfusion-injury. *Sci Rep* 2018; 8(1): 3438.
- 20 Li JR (李家睿), Yan B. Inhibiting lncRNA MALAT1 targeting to promote miR-200a expression and reduce cardiomyocyte apoptosis. *Chin J Gerontol (中国老年学杂志)* 2019; 39(18): 4527–4530 (in Chinese with English abstract).
- 21 Zhao ZH, Hao W, Meng QT, Du XB, Lei SQ, Xia ZY. Long non-coding RNA MALAT1 functions as a mediator in cardioprotective effects of fentanyl in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cell Biol Int* 2017; 41(1): 62–70.
- 22 He X, Zheng Y, Liu S, Shi S, Liu Y, He Y, Zhang C, Zhou X. MiR-146a protects small intestine against ischemia/reperfusion injury by down-regulating TLR4/TRAF6/NF- $\kappa$ B pathway. *J Cell Physiol* 2018; 233(3): 2476–2488.
- 23 Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405(1): 42–46.
- 24 Zhao B, Chen X, Li H. Protective effects of miR-126 specifically regulates Nrf2 through ischemic postconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Transplant Proc* 2020; 52(1): 392–397.
- 25 Lai X, Gong J, Wang W, Cao D, Wang M, Liu Y, Wu H, Wu Y, Chen Y, Zeng Z, Li J, Gong J. Acetyl-3-aminoethyl salicylate ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury and liver graft survival through a high-mobility group box 1/Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *Liver Transpl* 2019; 25(8): 1220–1232.
- 26 Ji M (姬梅), Xue QS. Clinical application of dexmedetomidine. *Surg Theory Pract (外科理论与实践)* 2017; 22(5): 455–458 (in Chinese).
- 27 Yu J, Yang W, Wang W, Wang Z, Pu Y, Chen H, Wang F, Qian J. Involvement of miR-665 in protection effect of dexmedetomidine against oxidative stress injury in myocardial cells via CB2 and CK1. *Biomed Pharmacother* 2019; 115: 108894.
- 28 Zhao Y, Feng X, Li B, Sha J, Wang C, Yang T, Cui H, Fan H. Dexmedetomidine protects against lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by enhancing autophagy through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Front Pharmacol* 2020; 11: 128.
- 29 Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, Otani K, Tanigawa T, Fujiwara Y. Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Biochem Nutr* 2018; 63(1): 26–32.
- 30 Su M, Hu X, Lin J, Zhang L, Sun W, Zhang J, Tian Y, Qiu W. Identification of candidate genes involved in renal ischemia/reperfusion injury. *DNA Cell Biol* 2019; 38(3): 256–262.
- 31 Wang H, Zheng X, Jin J, Zheng L, Guan T, Huo Y, Xie S, Wu Y, Chen W. LncRNA MALAT1 silencing protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through miR-145 to regulate AQP4. *J Biomed Sci* 2020; 27(1): 40.
- 32 Wei L, Li J, Han Z, Chen Z, Zhang Q. Silencing of lncRNA MALAT1 prevents inflammatory injury after lung transplant ischemia-reperfusion by downregulation of IL-8 via p300. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 18: 285–297.
- 33 Hu S, Cao S, Tong Z, Liu J. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy. *Am J Transl Res* 2018; 10(11): 3677–3688.
- 34 Gai HY, Wu C, Zhang Y, Wang D. Long non-coding RNA CHRF modulates the progression of cerebral ischemia/reperfusion injury via miR-126/SOX6 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 514(2): 550–557.
- 35 Pan J, Qu M, Li Y, Wang L, Zhang L, Wang Y, Tang Y, Tian HL, Zhang Z, Yang GY. MicroRNA-126-3p/-5p overexpression attenuates blood-brain barrier disruption in a mouse model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2020; 51(2): 619–627.
- 36 Zhong Y, Li YP, Yin YQ, Hu BL, Gao H. Dexmedetomidine inhibits pyroptosis by down-regulating miR-29b in myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Int Immunopharmacol* 2020; 86: 106768.
- 37 Zhou Z, Chen Q, Wan L, Zheng D, Li Z, Wu Z. Dexmedetomidine protects hepatic cells against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury via lncRNA CCAT1. *Cell Biol Int* 2018; 42(9): 1250–1258.
- 38 Wang L, Tang S, Wang Z, Chen H, Rajcha SS, Qian J. The administration of dexmedetomidine changes microRNA expression profiling of rat hearts. *Biomed Pharmacother* 2019; 120: 109463.
- 39 Xiang BQ (项冰倩), He JB, Gao H, Luo ZY, Dai YY, Wang WT. Effects of Dexmedetomidine on the levels of proinflammatory mediators IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in pulmonary ischemia/reperfusion injury rats and the mechanisms. *Chin J Applied Physiol (中国应用生理学杂志)* 2017; 33(5): 415–419 (in

- Chinese with English abstract).
- 40 Peng K, Chen WR, Xia F, Liu H, Meng XW, Zhang J, Liu HY, Xia ZY, Ji FH. Dexmedetomidine post-treatment attenuates cardiac ischaemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis through HIF-1 $\alpha$  signalling. *J Cell Mol Med* 2020; 24(1): 850–861.
- 41 Li P, Zhang Y, Liu H. The role of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the protection process by dexmedetomidine against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Life Sci* 2019; 236: 116921.
- 42 Zhai Y, Zhu Y, Liu J, Xie K, Yu J, Yu L, Deng H. Dexmedetomidine post-conditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting high mobility group protein b1 group (HMGB1)/Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. *Med Sci Monit* 2020; 26: e918617.
- 43 Zhang J, Xia F, Zhao H, Peng K, Liu H, Meng X, Chen C, Ji F. Dexmedetomidine-induced cardioprotection is mediated by inhibition of high mobility group box-1 and the cholinergic anti-inflammatory pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 2019; 14(7): e0218726.
- 44 Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005; 201(7): 1135–1143.
- 45 Xie T, Li K, Gong X, Jiang R, Huang W, Chen X, Tie H, Zhou Q, Wu S, Wan J, Wang B. Paeoniflorin protects against liver ischemia/reperfusion injury in mice via inhibiting HMGB1-TLR4 signaling pathway. *Phytother Res* 2018; 32(11): 2247–2255.