

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.15.021

# 吗啡后处理经 miR-9-5p/HSP90 调控线粒体自噬 减轻心肌缺血再灌注损伤的机制研究\*

孙洪涛<sup>1</sup>, 陈子仪<sup>2</sup>, 陈作雷<sup>1△</sup>

1. 青岛滨海学院附属医院麻醉科, 山东青岛 266404; 2. 滨州医学院第一临床学院, 山东滨州 256603

**摘要:**目的 深入挖掘吗啡后处理(M postC)保护心肌缺血再灌注损伤(MI/RI)心肌的分子作用机制。**方法** 选取 42 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、假手术组、MI/RI 组、MI/RI+M postC 组。建立 MI/RI 小鼠模型并给予 M postC。2,3,5-三苯基四唑氯化物(TTC)染色检测小鼠心肌梗死体积。Ca<sup>2+</sup> Green-5N 荧光探针法检测小鼠左心室心肌组织来源线粒体通透性转换孔(mPTP)的开放。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测左心室心肌组织中 miR-9-5p 和热休克蛋白 90(HSP90)AA mRNA 水平。Western blot 试验检测左心室心肌组织中 HSP90AA 蛋白质及线粒体自噬相关蛋白因子 PINK1 和 E<sub>3</sub> 泛素连接酶的蛋白质水平。生物信息学分析、双荧光素酶报告基因分析验证 miR-9-5p 和 HSP90AA 的序列互作。**结果** 与假手术组比较,MI/RI 组心肌梗死体积百分比增大,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 MI/RI 组比较,MI/RI+M postC 组心肌梗死体积百分比降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与假手术组比较,MI/RI 组的 T 组 Ca<sup>2+</sup> 水平信号升高( $P < 0.05$ );与 MI/RI 组比较,MI/RI+M postC 组的 T 组 Ca<sup>2+</sup> 水平信号降低至基线水平( $P < 0.05$ )。与假手术组比较,MI/RI 组左心室心肌组织 miR-9-5p RNA 相对表达水平升高( $P < 0.05$ ),HSP90AA mRNA 和蛋白质相对表达水平均降低( $P < 0.05$ ),PINK1 和 E<sub>3</sub> 泛素连接酶蛋白质相对表达水平均升高( $P < 0.05$ )。与 MI/RI 组比较,MI/RI+M postC 组左心室心肌组织 miR-9-5p RNA 相对表达水平降低( $P < 0.05$ ),HSP90AA mRNA 和蛋白质相对表达水平均升高( $P < 0.05$ ),PINK1 和 E<sub>3</sub> 泛素连接酶蛋白质相对表达水平均升高( $P < 0.05$ )。与共转染 miR-9-5p mimic 和 HSP90AA-MUT 的细胞比较,共转染 miR-9-5p mimic 和 HSP90AA-WT 的细胞内荧光素酶活性降低,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** M postC 经 miR-9-5p/HSP90 轴可促进线粒体自噬,减轻心肌缺血再灌注损伤。**关键词:** 心肌缺血再灌注损伤; 吗啡后处理; 线粒体自噬; miR-9-5p; 热休克蛋白 90**中图分类号:** R542.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2024)15-2248-06

## Morphine postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating mitophagy via miR-9-5p/HSP90\*

SUN Hongtao<sup>1</sup>, CHEN Ziyi<sup>2</sup>, CHEN ZuoLei<sup>1△</sup>

1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Qingdao Binhai University, Qingdao, Shandong 266404, China; 2. the First Clinical College of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603, China

**Abstract: Objective** To explore the molecular mechanism of morphine postconditioning (M postC) in protecting myocardium against myocardial ischemia-reperfusion injury (MI/RI). **Methods** A total of 42 male C57BL/6 mice were selected and randomly divided into control group, sham operation group, MI/RI group, MI/RI+M postC group. MI/RI mouse model was established and M postC was administered. Myocardial infarction volume was detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Ca<sup>2+</sup> Green-5N fluorescent probe was used to detect the opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) from mouse left ventricular myocardial tissue. The mRNA levels of miR-9-5p and heat stress protein 90 (HSP90)AA in left ventricular myocardial tissue were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. Western blot test was used to detect the protein levels of HSP90AA, PINK1 and E<sub>3</sub> ubiquitin ligase in left ventricular myocardial tissue. Bioinformatics analysis and dual luciferase reporter gene analysis were used to verify the sequence interaction between miR-9-5p and HSP90AA. **Results** Compared with the sham-operation group, the per-

\* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(202004111273)。

作者简介:孙洪涛,男,主治医师,主要从事围术期心肌保护方面的研究。△ 通信作者, E-mail: qyfymzk@163.com。

centage of myocardial infarction volume in the MI/RI group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with MI/RI group, the percentage of myocardial infarction volume was significantly decreased in MI/RI+M postC group ( $P < 0.05$ ). Compared with sham group, the  $Ca^{2+}$  level signal in mitochondrial buffer from left ventricular myocardial tissue was significantly increased in the T group from MI/RI group ( $P < 0.05$ ). Compared with MI/RI group, the signal of  $Ca^{2+}$  level from MI/RI+M postC group decreased to the baseline level ( $P < 0.05$ ). Compared with the sham-operation group, the relative expression level of miR-9-5p RNA in left ventricular myocardial tissue was increased ( $P < 0.05$ ), and the relative expression levels of HSP90AA mRNA and protein were decreased in the MI/RI group ( $P < 0.05$ ). The relative protein expression levels of PINK1 and  $E_3$  ubiquitin ligase were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the MI/RI group, the relative expression level of miR-9-5p RNA in left ventricular myocardial tissue was decreased ( $P < 0.05$ ), and the relative expression levels of HSP90 AA mRNA and protein were increased in the MI/RI+M postC group ( $P < 0.05$ ). The relative protein expression levels of PINK1 and  $E_3$  ubiquitin ligase were further increased ( $P < 0.05$ ). Compared with cells co-transfected with miR-9-5p mimic and HSP90AA-MUT, the intracellular luciferase activity of cells co-transfected with miR-9-5p mimic and HSP90AA-WT was decreased, and the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** M postC can alleviate myocardial I/R injury by promoting mitophagy through miR-9-5p/HSP90 axis.

**Key words:** myocardial ischemia-reperfusion injury; Morphine postconditioning; mitochondrial autophagy; miR-9-5p; heat stress protein 90

冠心病是世界范围内发病率、致残率和致死率均很高的心血管疾病<sup>[1]</sup>。对冠心病最有力的治疗措施是及时给予有效的溶栓治疗或直接经皮冠状动脉介入治疗<sup>[2-3]</sup>。然而,当长时间缺血区域的心肌恢复供血,可引起次级的心肌再灌注损伤和不可逆的心肌细胞死亡,这种现象被称为心肌缺血/再灌注损伤(MI/RI),其中,线粒体自噬和稳态调节的程度决定了 MI/RI 导致的心肌梗死面积<sup>[4]</sup>。目前,临床上已有许多机械干预和药物治疗方案来保护心肌免受 MI/RI。目前,已知阿片类受体激动剂吗啡可通过预处理或后处理(postC)介导对模拟 MI/RI 的动物模型、离体心脏或心肌细胞发挥保护作用。吗啡的作用机制包括上调蛋白激酶 A(PKA)水平、抑制线粒体通透性转换孔(mPTP)开放、上调成纤维细胞生长因子 1 等,抑制线粒体膜破裂介导的心肌细胞凋亡和坏死并促进心肌细胞存活<sup>[5-6]</sup>。但临床使用吗啡存在一定的风险,可能引起患者因剂量依赖而诱导的镇静和呼吸抑制。因此,深入了解吗啡的作用机制,根据吗啡的作用靶点开辟新的保护心肌免受 MI/RI 的更安全、有效的吗啡替代药物十分必要。

热休克蛋白 90(HSP90)是一种分子伴侣,广泛参与调节蛋白质折叠和细胞内蛋白质稳定性的过程<sup>[7]</sup>。有研究表明,吗啡能够通过上调 HSP90/蛋白激酶 B 的水平保护 MI/RI 心肌<sup>[8]</sup>。而亚硝基化的 HSP90 和 HSP90 的小分子抑制剂均具有心脏毒性<sup>[9-11]</sup>。通过分子靶向调控 HSP90 或许能够更好地发挥 HSP90 的心肌保护功能。MicroRNAs 是一类重要的调节心血管生理、病理功能的非编码 RNA 分子<sup>[12]</sup>。miR-9-

5p 通过多种机制广泛参与炎症反应。本研究拟建立 MI/RI 小鼠模型并给予吗啡后处理,检测小鼠左室心肌组织来源线粒体 mPTP 的开放程度及深入挖掘吗啡上调 HSP90 水平具体作用机制,以期为开发更具安全性的吗啡替代药物提供前期研究基础,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** 选取 42 只 11~12 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠作为研究对象。体质量均为 21~25 g。饲养于恒温[(22±2)℃]、恒湿(50%~70%)、配备 12 h/12 h 的光照/黑暗循环的标准无特定病原体(SPF)级鼠房中,饲喂标准啮齿类动物饲料,可以自由采食和饮水。小鼠接受建模手术前,先适应性饲养 1 周。每 6 只小鼠 1 个鼠笼,共 7 个鼠笼。42 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组(6 只)、假手术组(12 只)、MI/RI 组(12 只)、MI/RI+M postC 组(12 只),取每组其中的 6 只进行造模手术后用于心内灌注、心脏 2,3,5-三苯基四唑氯化物(TTC)染色和检测心肌梗死体积,另外 6 只取其左室心肌组织,浸入液氮速冻,放入-80℃冰箱中备用。小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。吗啡来自本院药剂科。

**1.2 仪器与试剂** TTC(货号:298-96-4)购自上海雅吉生物科技有限公司。心肌组织线粒体提取试剂盒(货号:C0010-50)购自北京普利莱基因技术有限公司。 $Ca^{2+}$  Green-5N 荧光探针(货号:HY-D1631)购自 MedChemExpress 公司(美国)。兔抗小鼠 HSP90 多克隆抗体(货号:PA5-17610)、PTEN 诱导激酶蛋白 1

(PINK1)多克隆抗体(货号:PA5-86941)、E<sub>3</sub>泛素连接酶多克隆抗体(货号:PA5-13399)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(货号:MA5-15738-D680)均购自 Thermo Fisher 公司(美国)。双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号:E1910)购自 Promega 公司(美国)。引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司代为合成。LS 50B 型号荧光光谱仪为美国 Perkin-Elmer 品牌。Synergy H1 型号多功能酶标仪为美国 Agilent BioTek 品牌。

### 1.3 方法

**1.3.1 建立 MI/RI 小鼠模型** MI/RI 模型小鼠腹腔注射 60 mg/kg 戊巴比妥钠进行麻醉,取仰卧位置于 37 °C 恒温加热垫上,剔除小鼠胸部毛发。对小鼠施以气管插管,并连接至呼吸机上。于小鼠左侧胸骨第三肋间开胸,使用 7-0 丝线结扎冠状动脉左前降支,根据心电图识别 ST 段抬高。结扎 30 min 后松开结扎线,以实现再灌注(24 h)。手术后,继续使用心电图监测小鼠 1 h,未出现再灌注性心律失常的小鼠关闭胸腔,缝合,并肌肉注射 400 kU/kg 的青霉素。将其继续置于 37 °C 恒温加热垫上直至苏醒,每只隔离饲养 24 h 后,对小鼠进行心内灌注和心脏 TTC 染色。假手术组,在小鼠冠状动脉左前降支放置丝线,但不进行结扎,其余处理同 MI/RI 组。MI/RI + M postC 组,在小鼠接受 MI/RI 造模手术过程中,松开结扎线进行再灌注的同时给予吗啡(1.5 μmol/L) 10 min。其余处理方式同 MI/RI 组。

**1.3.2 TTC 染色和检测心肌梗死体积** 小鼠腹腔注射 60 mg/kg 戊巴比妥钠进行麻醉,使用 50 mL 预冷的磷酸盐缓冲液进行心内灌注。取小鼠心脏,立即置于 -80 °C 冰箱速冻处理 15 min,以 2 mm 的厚度横切心脏制备心脏切片。使用 2% 的 TTC 在 37 °C 下对心脏切片进行染色 30 min。结束后可见切片的红色区域为非缺血的心肌组织,白色区域为缺血的心肌组织。采集切片图像,使用 Image-Pro Plus 软件分别检测切片的白色区域和整个切片面积。心肌梗死体积百分比 = 所有切片白色区域面积之和 / 所有切片面积之和 × 100%。

**1.3.3 体外线粒体通透性转换孔(mPTP)开放水平检测** 使用心肌组织线粒体提取试剂盒提取新鲜左心室心肌组织中的线粒体。通过检测线粒体打开 mPTP 释放的 Ca<sup>2+</sup> 来衡量 mPTP 的开放水平。检测原理为线粒体被加载越来越多的 Ca<sup>2+</sup> 直到负载达到一个阈值,超过这个阈值,线粒体打开 mPTP 而快速释放大量的 Ca<sup>2+</sup>,此时线粒体内 Ca<sup>2+</sup> 进入低水平,线粒体外缓冲液中 Ca<sup>2+</sup> 进入瞬时高水平。向心肌线粒体(1 mg/mL)悬液中加入 5 mmol/L 丙酮酸进行激发,然后加入补充有 1 mol/L 的 Ca<sup>2+</sup> Green-5N 荧光

探针的呼吸缓冲液[成分为 50 mmol/L 蔗糖,100 mmol/L 氯化钾(KCl),10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和 5 mM (pH = 7.4) 磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)],在 25 °C 环境中孵育。随后逐次、在 5 min 内连续添加 10 mol/L 的 Ca<sup>2+</sup> 脉冲,并在 Perkin-Elmer LS 50B 荧光光谱仪上,分别在 Ex = 506 nm 和 Em = 532 nm 波长下监测 Ca<sup>2+</sup> Green-5N 荧光探针的荧光值,以反映线粒体外缓冲液介质中 Ca<sup>2+</sup> 的浓度水平。每次添加后,将观察到线粒体对 Ca<sup>2+</sup> 的快速摄取过程,然后进入动态平衡,这与 Ca<sup>2+</sup> 的内流和外排之间的平衡对应。当线粒体加载到 Ca<sup>2+</sup> 阈值后,这个动态平衡将被破坏,mPTP 打开,Ca<sup>2+</sup> 被释放,线粒体外缓冲液介质中 Ca<sup>2+</sup> 的水平陡增(T 组信号值)。线粒体外缓冲液介质中的基线 Ca<sup>2+</sup> 水平信号通过已知 Ca<sup>2+</sup> 水平的缓冲液进行校准(C 组信号值)。

**1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测心肌组织中 miR-9-5p RNA 和 HSP90AA mRNA 相对表达水平** 将左心室心肌组织浸入液氮,加入 1 mL TRIzol 裂解液研磨制备心肌组织匀浆。使用组织/细胞总 RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA。使用 cDNA 第一链合成试剂盒反转录合成 cDNA。使用 2 × SYBR Green RT-qPCR 试剂进行 RT-qPCR 扩增。RT-qPCR 特异性引物:miR-9-5p 正向引物为 5'-ACACTCCAGCTGGGACAAAGG-3',miR-9-5p 反向引物为 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTC-3';U6 正向引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',U6 反向引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';HSP90AA 正向引物为 5'-GACTGCGCAGGCGTGCTCAC-3',HSP90AA 反向引物为 5'-ACCAGCCCCGC-CGCGGTTC-3',GAPDH 正向引物为 5'-GCGG-TAGAGCGGCCCATGT-3',GAPDH 反向引物为:5'-TCACCCGGAGGAGAAATCGG-3'。

**1.3.5 Western blot 试验检测心肌组织中 HSP90、PINK1 和 E<sub>3</sub> 泛素连接酶相对表达水平** 向左心室心肌组织中加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,在液氮中制备组织匀浆。采用半干转印法将 PAGE 胶上的蛋白质转印至 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 1 h。向膜上滴加一抗工作液,在 4 °C 下共同孵育过夜。第二天向膜上滴加二抗工作液,在室温下共同孵育 1 h。使用超敏电化学发光底物对目的条带进行显影。抗体工作液信息如下:HSP90(稀释度 1:1 500)、PINK1(稀释度 1:2 000)、E<sub>3</sub> 泛素连接酶(稀释度 1:2 000)、GAPDH(稀释度 1:2 000)。

**1.3.6 细胞培养** HEK 293T 细胞培养于补充有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37 °C 恒温、湿润的、充入有 5% CO<sub>2</sub> 的细胞孵育箱中持续培养。

**1.3.7 生物信息学分析** 使用 TargetScan 7.2(ht-

tps://www.targets can. org/vert\_72/) 分析 miR-9-5p 与 HSP90AA 3' UTR 的序列互作方式。

**1.3.8 双荧光素酶报告基因分析** 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Cat. No. E1910, Promega) 进行序列互作分析。将序列互作分析获得的野生型 (WT) 和突变型 (MUT) HSP90 3' UTR 序列分别克隆到表达荧光素酶的载体 pGL3 上, 并分别与 miR-9-5p 的模拟物 (miR-9-5p mimic) 或对照组 (miRNA NT) 共转染至 HEK 293T 细胞中。转染后 48 h, 根据试剂盒说明书, 使用 Synergy H1 多功能酶标仪对双荧光素酶报告基因系统的活性进行检测分析。

**1.4 统计学处理** 采用 GraphPad Prism v8 软件进行数据处理与统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 各组小鼠心肌梗死体积百分比比较** 与假手术组比较, MI/RI 组心肌梗死体积百分比增大, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 MI/RI 组比较, MI/RI+M postC 组心肌梗死体积百分比降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 各组小鼠左心室心肌组织中线粒体 mPTP 的开放情况比较** 对照组、假手术组、MI/RI 组和 MI/RI+M postC 组的 C 组  $Ca^{2+}$  水平信号比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与假手术组比较, MI/RI 组的 T 组  $Ca^{2+}$  水平信号升高 ( $P < 0.05$ ); 与 MI/RI 组比较, MI/RI+M postC 组的 T 组  $Ca^{2+}$  水平信号降低至基线水平 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.3 各组小鼠左心室心肌组织中 miR-9-5p、HSP90 和线粒体自噬水平比较** 与假手术组比较, MI/RI 组左心室心肌组织 miR-9-5p RNA 相对表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), HSP90AA mRNA 和蛋白质相对表达水平平均降低 ( $P < 0.05$ ), PINK1 和  $E_3$  泛素连接酶蛋白

质相对表达水平平均升高 ( $P < 0.05$ )。与 MI/RI 组比较, MI/RI+M postC 组左心室心肌组织 miR-9-5p RNA 相对表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), HSP90AA mRNA 和蛋白质相对表达水平平均升高 ( $P < 0.05$ ), PINK1 和  $E_3$  泛素连接酶蛋白质相对表达水平平均升高 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.4 双荧光素酶报告基因分析比较** 共转染 miRNA NT 与 HSP90AA-WT 细胞内荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。共转染 miRNA NT 和 HSP90AA-MUT 细胞内荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与共转染 miR-9-5p mimic 和 HSP90AA-MUT 的细胞比较, 共转染 miR-9-5p mimic 和 HSP90AA-WT 的细胞内荧光素酶活性虽降低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组小鼠心肌梗死体积比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	心肌梗死体积百分比 (%)
对照组	6	0.00 ± 0.00
假手术组	6	0.00 ± 0.00
MI/RI 组	6	39.67 ± 2.98*
MI/RI+M postC 组	6	19.15 ± 3.30#
<i>F</i>		435.200
<i>P</i>		< 0.001

注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MI/RI 组比较, #  $P < 0.05$ 。

表 2 各组小鼠左心室心肌组织中线粒体 mPTP 的开放情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ , Unit)

组别	<i>n</i>	C 组 $Ca^{2+}$ 水平信号	T 组 $Ca^{2+}$ 水平信号
对照组	6	29.03 ± 2.04	41.61 ± 1.86
假手术组	6	28.17 ± 2.16	40.83 ± 1.66
MI/RI 组	6	29.42 ± 2.66	57.73 ± 3.52*
MI/RI+M postC 组	6	32.24 ± 1.92	40.82 ± 2.41#
<i>F</i>		2.783	68.210
<i>P</i>		0.068	< 0.001

注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MI/RI 组比较, #  $P < 0.05$ 。

表 3 各组小鼠左心室心肌组织中 miR-9-5p/HSP90 和线粒体自噬水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	miR-9-5p RNA 相对表达水平	HSP90AA mRNA 相对表达水平	HSP90AA 蛋白质 相对表达水平	PINK1 蛋白质 相对表达水平	$E_3$ 泛素连接酶 蛋白质相对表达水平
对照组	6	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10
假手术组	6	1.05 ± 0.07	0.94 ± 0.13	1.05 ± 0.06	1.11 ± 0.07	0.95 ± 0.05
MI/RI 组	6	2.21 ± 0.14*	0.35 ± 0.03*	0.41 ± 0.02*	1.57 ± 0.12*	1.70 ± 0.12*
MI/RI+M postC 组	6	1.57 ± 0.11#	0.80 ± 0.06#	0.75 ± 0.04#	2.33 ± 0.13#	3.52 ± 0.23#
<i>F</i>		189.900	70.260	102.800	205.800	434.200
<i>P</i>		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MI/RI 组比较, #  $P < 0.05$ 。

### 3 讨 论

Ca<sup>2+</sup> 诱导的线粒体钙释放是由 Ca<sup>2+</sup> 诱导的 mPTP 开放引起的<sup>[13]</sup>, 缺血性心脏损伤主要由缺血后再灌注造成。由于再灌注使细胞充满钙, 触发 mPTP 大量开放, 会直接导致大量心肌细胞死亡<sup>[13-14]</sup>。健康的心肌细胞内线粒体的保护途径包括线粒体内多种抗氧化物质和酶类, 如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)以及胞内促细胞存活的酶类。在短暂缺氧诱导下会被激活并发挥更为有效的保护心肌细胞免于损伤的能力。但长时间或频繁缺氧将造成线粒体内活性氧自由基(ROS)大量积累并损伤线粒体 DNA 和线粒体膜, 引起线粒体膜破裂, 释放细胞色素 C 等细胞凋亡因子, 引起心肌细胞凋亡, 线粒体内快速积累的大量 ROS 还会引起大量线粒体不可逆的破裂损伤, 导致心肌细胞坏死<sup>[15]</sup>。吗啡通常用于抢救心脏病发作的患者, 且常用于心脏手术后的镇痛<sup>[16]</sup>, 可通过多靶点、多通路对 MI/RI 心脏发挥明显有效的保护作用, 这种活性可通过预处理或后处理介导。吗啡可通过环磷酸腺苷/PKA 通路明显上调 SOD 和 GSH-Px 水平, 降低 MI/RI 大鼠心肌梗死的体积<sup>[17]</sup>。同时, 吗啡具有抗心脏重塑潜能, 在 MI/RI 大鼠心肌梗死后连续 5 d 给予吗啡治疗, 梗死后第 7 天检测发现, 心肌组织基质金属蛋白酶-2 活性、成纤维细胞的密度和心肌细胞凋亡程度明显低于 MI/RI 模型组<sup>[18]</sup>。吗啡还能通过上调 Toll 样受体 4/核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 通路降低 MI/RI 大鼠心肌梗死体积的作用<sup>[19]</sup>。本研究观察到, 吗啡后处理能够有效降低 MI/RI 小鼠心肌梗死体积。特别是与 MI/RI 模型组比较, 吗啡治疗能够有效抑制 mPTP 的开放。T 组左心室心肌组织来源线粒体缓冲液中 Ca<sup>2+</sup> 水平信号, 与假手术组比较, MI/RI 组 Ca<sup>2+</sup> 水平信号升高; 与 MI/RI 组比较, MI/RI + M postC 组 Ca<sup>2+</sup> 水平信号降低至基线水平, 表明只有 MI/RI 组小鼠心肌组织来源的线粒体在给予 Ca<sup>2+</sup> 脉冲后发生了 mPTP 的开放, 线粒体 Ca<sup>2+</sup> 承载能力降低, 动态稳态已被破坏, 线粒体发生过损伤。

作为阿片类受体激动剂, 剂量依赖性诱导镇静和呼吸抑制是吗啡最常报告的不良反<sup>[20]</sup>。此外, 吗啡还具有潜在的引发心肌纤维化的副作用<sup>[21]</sup>。因此, 深入了解吗啡保护心肌的作用机制, 开发以此特定通路作为靶标的吗啡替代药物, 将为保护 MI/RI 心肌的药物开发开辟新的、有效的策略。有报道表明, 吗啡能够上调 HSP90/蛋白激酶 B 的水平, 抑制补体成分 5a/NF- $\kappa$ B 信号参与介导的 MI/RI 心肌损伤<sup>[8]</sup>。在本研究中也发现吗啡通过上调 HSP90 水平介导心肌保护活性。

HSP90 是一种分子伴侣, 与细胞内多达 10% 的

蛋白质相互作用, 并广泛参与蛋白质折叠和细胞内蛋白质稳定性的调节<sup>[7]</sup>。在人类和啮齿类中 HSP90 主要由 HSP90AA1 编码。HSP90 被发现通过转化生长因子  $\beta$ 、丝裂原活化激酶、肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、G 蛋白偶联受体和钙信号等, 广泛参与心脏病理性过程<sup>[22]</sup>。亚硝基化的 HSP90 通过与糖原合成酶激酶 3 $\beta$  相互作用介导磷酸化-糖原合成酶激酶 3 $\beta$  的水平升高和心肌肥大<sup>[11]</sup>。亚硝基化的 HSP90 还通过 TGF- $\beta$ /信号传导蛋白 3 通路介导心脏纤维化<sup>[23]</sup>。然而, 在某些情况下 HSP90 的小分子抑制剂却具有心脏毒性<sup>[9-10]</sup>。本研究发现吗啡上调 HSP90 后进一步促进了线粒体自噬, 加强维持了线粒体的动态稳态。这说明 HSP90 很可能具有通过作为线粒体膜表面相关蛋白的分子伴侣调节线粒体自噬的功能<sup>[24]</sup>。这一结果也从另一个方面解释了吗啡作用机制复杂性的原因, 以及对于 HSP90 水平上调的心脏毒性的争议。

最近研究者们都将关注点集中于通过 HSP90 分子靶向调控的方式特异性调节 HSP90 表达的药物开发策略。本研究通过生物信息学分析发现, miR-9-5p 是 HSP90 的海绵体, 吗啡后处理能抑制心肌组织 miR-9-5p 的水平。既往关于 miR-9-5p 的研究报道, 主要在神经生物学和肿瘤方面。神经元通过外泌体释放 miR-9-5p 介导小神经胶质细胞向 M1 极化和抑郁<sup>[25]</sup>。miR-9-5p 通过负调控叉头框蛋白 O1/细胞质聚腺苷酸化元件结合蛋白 3 促进肝细胞肝癌恶性进展<sup>[26]</sup>。且 miR-9-5p 靶向抑制 SIRT1, 一种重要的抗氧化因子<sup>[27]</sup>。说明 miR-9-5p 通过多种机制广泛参与炎症反应。本研究结果显示, 吗啡抑制了心肌组织中的 miR-9-5p 发挥增强 HSP90 水平的功能, 为以 miR-9-5p/HSP90 轴开发心肌保护药物提供了前期在体和体外实验依据。

综上所述, 尽管在本研究中尚未大规模从组学的角度深入检测吗啡可能改变的 MI/RI 心肌组织中的 microRNA 谱, 以及因此而改变的蛋白质因子的表达谱, 但根据本研究目前的结果可知, 吗啡后处理经 miR-9-5p/HSP90 轴促进线粒体自噬减轻 MI/RI。

### 参考文献

- [1] SANCHIS-GOMAR F, PEREZ-QUILIS C, LEISCHIK R, et al. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome[J]. Ann Transl Med, 2016, 4(13):256.
- [2] 武赞堂, 王雷, 王燕涛. 不同入路经皮冠状动脉介入治疗冠心病对老年患者心功能的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2023, 26(2):255-259.
- [3] IBANEZ B, JAMES S, AGEWALL S, et al. 2017 ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: the task force for the management of acute myocardial infarction

- in patients presenting with ST-segment elevation of the European society of cardiology (ESC)[J]. *Eur Heart J*, 2018,39(2):119-177.
- [4] ZHOU M L, YU Y F, LUO A A, et al. Myocardial Ischemia-reperfusion injury: therapeutics from a Mitochondria-centric perspective[J]. *Cardiology*, 2021, 146(6): 781-792.
- [5] 殷俊茹, 喻倩, 陶蕾, 等. 氢吗啡酮预处理在冠心病患者骨科手术中的超前镇痛效果及对患者心功能的影响[J]. *海南医学*, 2022, 33(8): 997-1001.
- [6] WANG M, LIU S, WANG H, et al. Morphine post-conditioning-induced up-regulation of lncRNA TINCR protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via inhibiting degradation and ubiquitination of FGF1 [J]. *QJM*, 2020, 113(12): 859-869.
- [7] SCHOPF F H, BIEBL M M, BUCHNER J. The HSP90 chaperone machinery[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(6): 345-360.
- [8] TU R H, WANG D X, ZHONG G Q, et al. New targets of morphine postconditioning protection of the myocardium in ischemia/reperfusion injury: involvement of HSP90/Akt and C5a/NF- $\kappa$ B[J]. *Open Med(Wars)*, 2021, 16(1): 1552-1563.
- [9] RAY-COQUARD I, BRAICU I, BERGER R, et al. Part I of GANNET53: a European multicenter phase I / II trial of the Hsp90 inhibitor ganetespib combined with weekly paclitaxel in women with high-grade, platinum-resistant epithelial ovarian cancer-a study of the GANNET53 consortium[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 832.
- [10] JOHNSON M L, YU H A, HART E M, et al. Phase I / II study of HSP90 inhibitor AUY922 and erlotinib for EGFR-Mutant lung cancer with acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(15): 1666-1673.
- [11] ZHAO S, SONG T Y, WANG Z Y, et al. S-nitrosylation of Hsp90 promotes cardiac hypertrophy in mice through GSK3 $\beta$  signaling[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(8): 1979-1988.
- [12] HENNING R J. Cardiovascular exosomes and MicroRNAs in cardiovascular physiology and pathophysiology [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021, 14(2): 195-212.
- [13] CARRARO M, BERNARDI P. The mitochondrial permeability transition pore in Ca<sup>2+</sup> homeostasis[J]. *Cell Calcium*, 2023, 111: 102719.
- [14] ROBICHAUX D J, HARATA M, MURPHY E, et al. Mitochondrial permeability transition pore-dependent necrosis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2023, 174: 47-55.
- [15] MORCIANO G, NAUMOVA N, KOPROWSKI P, et al. The mitochondrial permeability transition pore: an evolving concept critical for cell life and death[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2021, 96(6): 2489-2521.
- [16] DHAWAN R, DAUBENSPECK D, WROBLEWSKI K E, et al. Intrathecal morphine for analgesia in minimally invasive cardiac surgery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical trial[J]. *Anesthesiology*, 2021, 135(5): 864-876.
- [17] GONG H J, LIN J J, LI H, et al. A study on protective effect of morphine against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via CAMP/PKA signaling pathway [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(5): 1669-1677.
- [18] RAJANI S F, FAGHIHI M, IMANI A. Post-infarct morphine treatment reduces apoptosis and myofibroblast density in a rat model of cardiac ischemia-reperfusion[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 887: 173590.
- [19] WANG Y, WANG L, LI J H, et al. Morphine alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8616-8624.
- [20] CASPI O, ARONSON D. Morphine in the setting of acute heart failure; do the risks outweigh the benefits[J]. *Card Fail Rev*, 2020, 6: e20.
- [21] GAWEDA G, IYER R P, SHAVER P R, et al. Dopamine receptor D3 agonist (Pramipexole) reduces morphine-induced cardiac fibrosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(4): 1080-1085.
- [22] ROBERTS R J, HALLEE L, LAM C K. The potential of Hsp90 in targeting pathological pathways in cardiac diseases[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(12): 1373.
- [23] ZHANG X Y, ZHANG Y H, MIAO Q, et al. Inhibition of HSP90 S-nitrosylation alleviates cardiac fibrosis via TGF $\beta$ /SMAD3 signalling pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(23): 4608-4625.
- [24] LU D, LIU R, ZHOU Y T, et al. FOXO3a-dependent up-regulation of HSP90 alleviates cisplatin-induced apoptosis by activating FUNDC1-mediated mitophagy in hypoxic osteosarcoma cells[J]. *Cell Signal*, 2023, 101: 110500.
- [25] XIAN X, CAI L L, LI Y, et al. Neuron secrete exosomes containing miR-9-5p to promote polarization of M1 microglia in depression[J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 122.
- [26] HU H, HUANG W, ZHANG H, et al. A miR-9-5p/FOXO1/CPEB3 Feed-Forward loop drives the progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2116.
- [27] WANG Z B, SUN L, JIA K X, et al. miR-9-5p modulates the progression of parkinson's disease by targeting SIRT1 [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 701: 226-233.