

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230778

· 论著 ·

## 基于 miRNA-134-5p/BDNF/Akt 信号通路探讨 X 线辐射致大鼠心肌细胞凋亡的机制

顾 静<sup>1\*</sup>, 付力文<sup>1</sup>, 韩晓斐<sup>1</sup>, 方 丹<sup>1</sup>, 金 戈<sup>1</sup>, 董晓丽<sup>1</sup>, 颜亚辉<sup>2</sup>, 侯 敏<sup>3</sup>

1. 甘肃中医药大学基础医学院生理学教研室, 兰州 730000

2. 甘肃中医药大学公共卫生学院数学与卫生统计学教研室, 兰州 730000

3. 甘肃中医药大学基础医学院解剖学与组织胚胎学教研室, 兰州 730000

**[摘要]** 目的 探讨 X 线辐射对大鼠心肌细胞凋亡的影响及相关机制。方法 将大鼠 H9C2 心肌细胞分为空白对照组、X 线照射组 (X-ray 组)、X 线照射 miRNA-134-5p 抑制剂组 (X-inhibitor 组)、X 线照射 miRNA-134-5p 抑制剂阴性对照组 (X-NC 组)。最终选择以 6 Gy X 线辐照大鼠 H9C2 心肌细胞, 48 h 后检测各项指标变化。采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 用流式细胞术和 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡率, 用 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内活性氧 (ROS) 水平, 用 JC-1 法检测细胞线粒体膜电位变化, 用超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 检测试剂盒分别测定细胞中 SOD 活性、MDA 水平, 用 qPCR 法检测细胞中 miRNA-134-5p 表达, 用蛋白质印迹法检测细胞中脑源性神经营养因子 (BDNF)、Akt、磷酸化 Akt (p-Akt)、Bcl2、Bax 蛋白的表达。结果 与空白对照组相比, X-ray 组大鼠心肌细胞中 ROS 和 MDA 水平上升、SOD 活性下降、线粒体膜电位下降百分比增加、DNA 损伤微核形成数增加、细胞凋亡率升高 (均  $P < 0.01$ ) ; 与 X-ray 组相比, X-inhibitor 组上述各项指标均有所逆转 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而 X-NC 组的以上各指标差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) 。与空白对照组相比, X-ray 组大鼠心肌细胞中 miRNA-134-5p 水平上调, BDNF 表达及 Bcl2/Bax、p-Akt/Akt 比值下降 (均  $P < 0.01$ ) ; 与 X-ray 组相比, X-inhibitor 组大鼠心肌细胞中 miRNA-134-5p 水平下降, BDNF 表达及 Bcl2/Bax、p-Akt/Akt 比值升高 (均  $P < 0.01$ ) , X-NC 组各项指标差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) 。结论 X 线照射诱导了大鼠心肌细胞发生氧化应激、线粒体损伤及 DNA 损伤, 最终导致细胞凋亡, 其发生机制可能涉及 miRNA-134-5p/BDNF/Akt 信号通路。

**[关键词]** 放射性心脏损伤; 辐射; 心肌细胞; 微 RNA-134-5p; 细胞凋亡

**[引用本文]** 顾静, 付力文, 韩晓斐, 等. 基于 miRNA-134-5p/BDNF/Akt 信号通路探讨 X 线辐射致大鼠心肌细胞凋亡的机制 [J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(11): 1352-1361. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230778.

## Mechanism of X-ray radiation-induced rat myocardial cell apoptosis based on miRNA-134-5p/BDNF/Akt signaling pathway

GU Jing<sup>1\*</sup>, FU Liwen<sup>1</sup>, HAN Xiaofei<sup>1</sup>, FANG Dan<sup>1</sup>, JIN Ge<sup>1</sup>, DONG Xiaoli<sup>1</sup>, XIE Yahui<sup>2</sup>, HOU Min<sup>3</sup>

1. Department of Physiology, Basic Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China

2. Department of Mathematics and Health Statistics, School of Public Health, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China

3. Department of Anatomy and Histoembryology, Basic Medical College, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of radiation on cardiomyocyte apoptosis and its related mechanism.

**Methods** Rat H9C2 cardiomyocytes were divided into blank control group, X-ray irradiation group (X-ray group), X-ray irradiation + microRNA (miRNA)-134-5p inhibitor group (X-inhibitor group) and X-ray irradiation + miRNA-134-5p inhibitor negative control group (X-NC group). H9C2 cardiomyocytes were irradiated with 6 Gy X-ray, and the changes of various indexes were detected 48 h after irradiation. Cell viability was detected by cell counting kit 8 assay. The apoptosis rate was

[收稿日期] 2023-12-29

[接受日期] 2024-05-07

[基金项目] 国家自然科学基金(82360878), 甘肃省中医药管理局重点项目(GZKZ-2020-10)。Supported by National Natural Science Foundation of China (82360878) and Key Project of Traditional Chinese Medicine Administration of Gansu Province (GZKZ-2020-10).

[作者简介] 顾 静, 博士, 副教授, 硕士生导师。

\*通信作者(Corresponding author). Tel: 0931-5161248, E-mail: 120233234@qq.com

detected by flow cytometry and Hoechst 33342 staining. The level of reactive oxygen species (ROS) in cells was detected by DCFH-DA fluorescence probe. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 method. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of malondialdehyde (MDA) in cells were measured by kits. The expression of miRNA-134-5p was detected by quantitative polymerase chain reaction. The protein expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), protein kinase B (Akt), phosphorylated Akt (p-Akt), Bcl2 and Bax was detected by Western blotting. **Results** Compared with the blank control group, in the X-ray group the levels of ROS and MDA were significantly increased, the activity of SOD was significantly decreased, the decreased percentage in mitochondrial membrane potential was significantly increased, the number of micronuclei of DNA damage was significantly increased, and the apoptosis rate was significantly increased (all  $P < 0.01$ ). Compared with the X-ray group, all the indexes of the X-inhibitor group were reversed ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while there was no significant difference in the above parameters in the X-NC group (all  $P > 0.05$ ). Compared with the blank control group, the X-ray group had a significant increase in the miRNA-134-5p level and significant reductions in the protein level of BDNF, Bcl2/Bax ratio, and p-Akt/Akt ratio (all  $P < 0.01$ ). Compared with the X-ray group, the X-inhibitor group had a significant reduction in the level of miRNA-134-5p and significant increases in the protein level of BDNF, Bcl2/Bax ratio, and p-Akt/Akt ratio (all  $P < 0.01$ ), and there was no significant difference in all parameters in the X-NC group (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** X-ray irradiation can induce oxidative stress, mitochondrial damage, and DNA damage, eventually leading to apoptosis in rat cardiomyocytes, and the mechanism may involve miRNA-134-5p/BDNF/Akt signaling pathway.

[Key words] radiation-induced heart damage; radiation; cardiomyocytes; microRNA-134-5p; apoptosis

[Citation] GU J, FU L, HAN X, et al. Mechanism of X-ray radiation-induced rat myocardial cell apoptosis based on miRNA-134-5p/BDNF/Akt signaling pathway[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(11): 1352-1361. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230778.

放射性心脏损伤 (radiation-induced heart damage, RIHD) 是由辐射诱发的心脏损伤, 是肿瘤患者放疗后最为严重的并发症之一, 其主要表现为心包炎、心肌病、心脏瓣膜病、冠状动脉疾病、传导系统异常等心血管疾病<sup>[1]</sup>; 在发病过程中心脏逐渐发生病理性纤维化并伴随心肌细胞凋亡<sup>[2]</sup>。由于心肌细胞没有再生能力, 一旦过度凋亡, 心脏必然会出现不可逆损伤。在心脏发育缺陷、缺血性心脏病、动脉粥样硬化、心肌病和心力衰竭等诸多心脏疾病中均可观察到心肌细胞凋亡<sup>[3]</sup>。

心肌细胞凋亡的发生机制主要涉及蛋白质寡聚化、蛋白质构象变化、瞬时蛋白质相互作用、蛋白质易位等<sup>[4]</sup>, 但随着miRNA的发现, 有研究证实miRNA在心肌细胞凋亡中的作用。研究表明高浓度葡萄糖能够上调miRNA-1的表达, 通过靶向胰岛素样生长因子1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 诱导大鼠H9C2心肌细胞发生凋亡<sup>[5]</sup>。另有研究显示, 在心脏缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤小鼠中miRNA-208表达的下调有效促进了心肌细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 同时通过靶向p21增加心肌细胞凋亡, 以上2种变化共同加剧了心肌细胞凋亡, 从而加重了心肌组织损伤<sup>[6]</sup>。miRNA是一类

长20~22个核苷酸残基的内源性非编码单链RNA<sup>[7]</sup>, 在细胞内稳定表达、含量丰富, 且在不同物种之间高度保守。作为一种具有广泛调控功能的内源性非编码RNA, miRNA通过与靶mRNA的3'-非翻译区碱基配对, 在转录后水平调控基因表达, 诱导mRNA降解或抑制蛋白质翻译<sup>[8]</sup>。miRNA广泛存在于心肌组织中, 参与急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 等多种心血管疾病的病理生理过程<sup>[9-10]</sup>, 实验证明miRNA可通过调控相关靶基因表达促进或抑制心肌细胞凋亡<sup>[11-13]</sup>。

本课题组前期通过外泌体测序发现X线照射可诱导miRNA-134-5p表达上调<sup>[14]</sup>, 并通过生物信息学分析预测发现其靶基因可能为脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), 而BDNF通过调控下游Akt信号通路启动线粒体途径的细胞凋亡通路<sup>[15]</sup>。基于此, 本研究探讨了miRNA-134-5p/BDNF/Akt信号通路在X线辐射致大鼠心肌细胞损伤中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、试剂与仪器

大鼠H9C2心肌细胞购自苏州海星生物科技有限公司。高糖DMEM购自美国HyClone公司; FBS购自苏州依科赛生物科技

股份有限公司; CCK-8 检测试剂盒、总 RNA 提取试剂盒均购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; 青-链霉素混合液、线粒体膜电位检测试剂盒、Hoechst 33342 染色液、吉姆萨染色液均购自北京索莱宝科技有限公司; ROS 检测试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 大鼠 BDNF 单克隆抗体购自美国 GeneTex 公司; 大鼠 GAPDH 单克隆抗体、大鼠 Akt 单克隆抗体、大鼠磷酸化的 Akt(phosphorylated Akt, p-Akt) 单克隆抗体、大鼠 Bcl2 单克隆抗体、大鼠 Bax 单克隆抗体均购自美国 ImmunoWay 公司; miRNA-134-5p 抑制剂和 miRNA-134-5p 抑制剂阴性对照均购自广州锐博生物技术有限公司。

生物辐照仪购自美国 Precision X-Ray 公司; CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购自天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; 化学发光成像系统购自美国 Azure 公司; SpectraMax 酶标检测仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司; Olympus IX53 倒置荧光显微镜购自上海普赫光电科技有限公司; NanoFCM 纳米流式检测仪购自厦门福流生物科技有限公司; LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司。

**1.2 细胞培养** 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下, 将大鼠 H9C2 心肌细胞置于含 10% FBS、1% 青-链霉素混合液的高糖 DMEM 中进行培养。用胰蛋白酶-EDTA 消化液(含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA) 消化细胞, 后加入完全培养基终止消化, 轻轻吹打混匀细胞后传代培养。

**1.3 细胞照射及分组** 细胞照射在甘肃中医药大学生物辐照检测室进行, 用生物辐照仪照射, 放射源中心到细胞照射野中心的距离为 48 cm, 剂量率为 2 Gy/min, 按照 0、2、4、6、8、10 Gy X 线辐射剂量完成照射。根据 CCK-8 实验结果, 结合相关文献<sup>[16-17]</sup> 及本课题组前期实验结果, 6 Gy X 线辐射剂量为建立细胞损伤模型的最佳辐照剂量, 因此采用 6 Gy X 线辐射剂量作为本实验的辐照干预剂量。

细胞分为 4 组: (1) 空白对照组; (2) X 线照射组(X-ray 组), 即按照预先筛选的 X 线照射方案照射的 H9C2 细胞; (3) X 线照射 miRNA-

134-5p 抑制剂组(X-inhibitor 组), 即 X 线照射转染 miRNA-134-5p 抑制剂的 H9C2 细胞; (4) X 线照射 miRNA-134-5p 抑制剂阴性对照组(X-NC 组), 即 X 线照射转染 miRNA-134-5p 抑制剂阴性对照的 H9C2 细胞。

**1.4 CCK-8 法检测大鼠心肌细胞存活情况** 取对数生长期的大鼠 H9C2 心肌细胞, 将细胞接种于 96 孔板, 每组 8 个复孔, 培养 24 h, 等待细胞贴壁。按照 0、2、4、6、8、10 Gy X 线辐照剂量照射细胞, 分别于照射后 6、12、24、48、72 h 用酶标仪检测 450 nm 处的光密度值(D), 计算细胞存活率。细胞存活率(%) = [(D<sub>实验孔</sub> - D<sub>空白孔</sub>) / (D<sub>对照孔</sub> - D<sub>空白孔</sub>)] × 100%。

**1.5 大鼠心肌细胞凋亡检测** (1) 膜联蛋白 V-FITC/PI 双染流式细胞实验。将大鼠 H9C2 心肌细胞接种于 6 孔板中, 按 1.3 项分组干预后消化并收集细胞, 用预冷 PBS 离心洗涤 2~3 次, 各加入适量结合缓冲液重悬。每组加入 5 μL 膜联蛋白 V-FITC 和 10 μL PI 染色, 轻柔涡旋混匀, 室温避光孵育 5 min, 采用流式细胞仪检测心肌细胞凋亡情况。

(2) Hoechst 33342 染色实验。将大鼠 H9C2 心肌细胞接种于 24 孔板, 按 1.3 项分组干预后加入适量 Hoechst 33342 工作液, 37 °C 孵育 20~30 min, 用 PBS 洗 2~3 次, 每次 3~5 min, 在荧光显微镜下拍照。

**1.6 微核试验检测大鼠心肌细胞 DNA 损伤** 将大鼠 H9C2 心肌细胞接种于 6 孔板, 按 1.3 项分组干预后收集细胞, 加入适量 0.075% 氯化钾溶液混匀 1 min, 再加入适量固定液(甲醇:冰醋酸按 3:1 体积比配制, 现配现用)吹匀, 160.992×g 离心 10 min, 弃上清; 加入 5 mL 固定液吹匀, 静置 20~30 min, 160.992×g 离心 10 min, 弃上清; 加入适量固定液重悬, 将细胞重悬液滴至载玻片上晾干, 滴加适量吉姆萨工作液染色 20 min, 纯水冲洗晾干后置于显微镜下观察, 随机选取视野, 每组计数 1 000 个细胞 × 3 次, 计算细胞微核数量。

**1.7 大鼠心肌细胞线粒体膜电位检测** 将大鼠 H9C2 心肌细胞接种于 6 孔板, 按 1.3 项分组干预后消化并收集细胞, 重悬于 500 μL 完全培养基中, 再加入 500 μL JC-1 染色工作液, 颠倒数次混匀; 37 °C 避光孵育 20 min 后, 4 °C 600×g 离心 3~

4 min, 弃上清; 加入 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次, 4 °C 600×g 离心 3~4 min, 弃上清; 加入适量 JC-1 染色缓冲液重悬, 采用流式细胞仪检测。

1.8 大鼠心肌细胞氧化应激检测 (1) ROS 检测。将大鼠 H9C2 心肌细胞接种于 6 孔板, 按 1.3 项分组干预后消化并收集细胞, 重悬于适当体积的 DCFH-DA 工作液; 37 °C 避光孵育 20~30 min, 其间颠倒数次混匀, 111.8×g 离心 5 min 后弃上清; 加入适量无血清培养基洗涤细胞 3 次, 111.8×g 离心 5 min 后弃上清; 加入适量 PBS 重悬, 采用流式细胞仪检测。

(2) MDA、SOD 检测。按 1.3 项分组干预细胞, 消化并收集细胞; 按照 MDA、SOD 检测试剂盒操作步骤, 用硫代巴比妥酸法检测细胞中 MDA 水平, 用水溶性四氮唑法检测 SOD 活性。

1.9 qPCR 法检测大鼠心肌细胞中 miRNA-134-5p 的表达 收集各组大鼠 H9C2 心肌细胞, 提取总 RNA, 超微量分光光度法测定其纯度和浓度, 使用 Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit (广州锐博生物技术有限公司) 反转录得到 cDNA, 将其与广州锐博生物技术有限公司配套内参、miRNA-14-5p 引物共同加入扩增体系, 使用 LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪进行检测分析。

1.10 蛋白质印迹法检测大鼠心肌细胞中 BDNF、Akt、p-Akt、Bcl2、Bax 蛋白的表达 按 1.3 项将细胞分组干预后收集细胞, 分别加入 250 μL RIPA 裂解液, 4 °C 裂解 30 min, 使用细胞刮刀收集细胞裂解液, 111.8×g 离心 5 min 并收取上清液, 使用 BCA 法对蛋白进行定量后将蛋白配平并煮沸变性。蛋白经电泳、转膜、封闭、孵育一抗和二抗后, 滴加曝光液, 置于凝胶成像仪曝光, 用 ImageJ 软件检测曝光后蛋白条带的灰度值。

1.11 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理, 数据以  $\bar{x} \pm s$  示, 多组间比较采用重复测量方差分析。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结 果

2.1 大鼠心肌细胞照射剂量及观察时间点的确定 CCK-8 法检测结果 (表 1) 表明, 不同剂量的 X 线辐射对大鼠心肌细胞的存活均有一定的抑制效应, 且这种抑制效应呈一定的剂量 - 时间依赖性, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。辐射剂量为 6 Gy、培养 48 h 时, 细胞存活率为  $0.76 \pm 0.01$ 。基于实验结果并结合文献<sup>[16-17]</sup>, 本实验最终选择 6 Gy 为 X 线照射大鼠 H9C2 心肌细胞的最佳剂量, 照射后 48 h 为指标检测时间点。

表 1 不同剂量 X 线照射对大鼠 H9C2 心肌细胞存活的影响

Tab 1 Effect of different doses of X-ray irradiation on survival of rat H9C2 cardiomyocytes

Irradiation dose/Gy	Duration after X-ray irradiation/h					$n=3, \bar{x} \pm s$
	6	12	24	48	72	
0	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.02	1.00±0.02	
2	0.99±0.03	0.92±0.07	0.96±0.03*	0.92±0.01**	0.83±0.01**	
4	0.98±0.03	1.01±0.01	1.02±0.01	0.87±0.03**	0.78±0.01**	
6	1.00±0.01	1.01±0.02	0.93±0.01**	0.76±0.01**	0.64±0.01**	
8	0.96±0.01	0.81±0.13**	0.91±0.03**	0.72±0.02**	0.58±0.01**	
10	0.96±0.09	0.92±0.08	0.94±0.02**	0.72±0.04**	0.58±0.02**	

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0 Gy group.

2.2 X 线照射对大鼠心肌细胞凋亡的影响 膜联蛋白 V - FITC/PI 双染流式细胞术检测结果显示, 与空白对照组 [(11.53±3.01)%] 相比, X-ray 组大鼠 H9C2 心肌细胞凋亡率 [(64.92±13.18)%] 增加约 463% ( $P < 0.01$ ); 与 X-ray 组相比, X-NC 组心肌细胞凋亡率 [(63.50±19.45)%] 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 X-inhibitor 组心肌细胞凋亡率 [(20.97±1.67)%] 减少约 68% ( $P < 0.05$ )。

Hoechst 33342 染色 (图 1) 结果显示, 空白对照组细胞核染色均匀, 细胞核形态规则, 细胞荧光强度为  $21.36 \pm 1.67$ ; X-ray 组的部分细胞核凝聚固缩, 染色致密呈亮蓝色, 与空白对照组相比, 荧光强度增高 ( $28.63 \pm 0.59, P < 0.01$ ); 与 X-ray 组相比, X-NC 组细胞荧光强度 ( $27.42 \pm 0.77$ ) 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 X-inhibitor 组细胞荧光强度 ( $23.25 \pm 0.77$ ) 降低 ( $P < 0.01$ )。

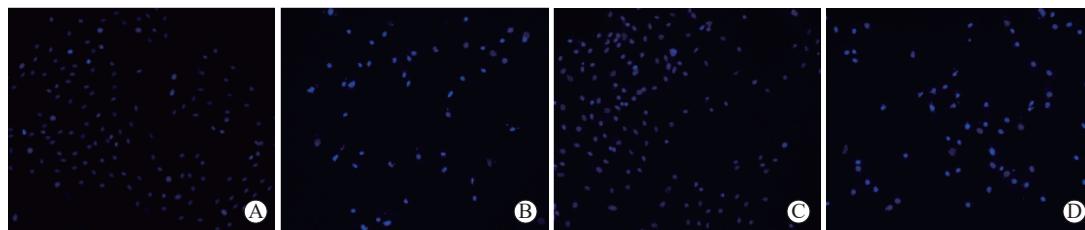


图1 Hoechst 33342染色检测各组大鼠H9C2心肌细胞凋亡情况(10×)

Fig 1 Apoptosis of rat H9C2 cardiomyocytes in each group detected by Hoechst 33342 staining (10×)

A: Blank control group; B: X-ray irradiation (X-ray) group; C: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor (X-inhibitor) group; D: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor negative control (X-NC) group. miRNA: MicroRNA.

**2.3 大鼠心肌细胞DNA的损伤情况** 在各组中随机选取1 000个大鼠H9C2心肌细胞进行镜下观察(图2),结果显示空白对照组、X-ray组、X-inhibitor组及X-NC组细胞内的微核形成数分别为(71±23)、(767±70)、(316±63)及(728±31)

个,与空白对照组相比,X-ray组细胞内微核形成数增加约980%( $P<0.01$ ) ;与X-ray照射组相比,X-NC组细胞内微核形成数差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而X-inhibitor组细胞内微核形成数减少约59%( $P<0.01$ )。

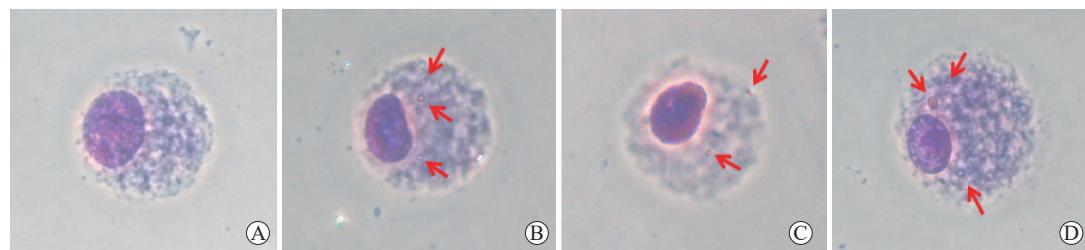


图2 微核试验检测各组大鼠H9C2心肌细胞内微核的变化(40×)

Fig 2 Changes of intracellular micronuclei in rat H9C2 cardiomyocytes in each group detected by micronucleus test (40×)

A: Blank control group; B: X-ray irradiation (X-ray) group; C: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor (X-inhibitor) group; D: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor negative control (X-NC) group. The arrows indicate the micronucleus in the cells. miRNA: MicroRNA.

**2.4 X线照射对大鼠心肌细胞线粒体膜电位的影响** 大鼠H9C2心肌细胞线粒体膜电位下降百分比检测结果(图3)显示,与空白对照组[(14.57±1.36)%]相比,X-ray组心肌细胞线粒体膜电位下降百分比[(54.33±0.46)%]增加了约273%( $P<0.01$ ) ;与X-ray组相比,X-NC组心肌细胞线粒体膜电位下降百分比[(53.30±3.36)%]差异无统计学意义( $P>0.05$ ),X-inhibitor组心肌细胞线粒体膜电位下降百分比[(30.20±5.20)%]降低了约44%( $P<0.01$ )。

**2.5 X线照射对大鼠心肌细胞氧化应激的影响** ROS检测结果显示,空白对照组、X-ray组、X-inhibitor组及X-NC组大鼠H9C2心肌细胞ROS水平分别为188.67±51.73、502.33±20.03、278.67±7.51及484.00±59.41。与空白对照组相比,X-ray组受到X线辐照后ROS水平上升( $P<0.01$ ) ;与X-ray

组相比,X-NC组大鼠心肌细胞ROS水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),X-inhibitor组大鼠心肌细胞ROS水平下降( $P<0.01$ )。

MDA检测结果显示,空白对照组、X-ray组、X-inhibitor组及X-NC组大鼠H9C2心肌细胞MDA水平(单位为nmol/mg)分别为0.22±0.05、1.23±0.22、0.54±0.04、1.11±0.22;SOD检测结果显示,空白对照组、X-ray组、X-inhibitor组及X-NC组大鼠H9C2心肌细胞SOD活性(单位为U/mL)分别为153.21±5.82、118.54±8.03、137.23±2.65、112.20±3.33。与空白对照组相比,X-ray组大鼠心肌细胞的MDA水平升高、SOD活性下降(均 $P<0.01$ ) ;与X-ray组相比,X-NC组大鼠心肌细胞的MDA水平和SOD活性差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ ),X-inhibitor组大鼠心肌细胞的MDA水平下降( $P<0.01$ )、SOD活性升高( $P<0.05$ )。

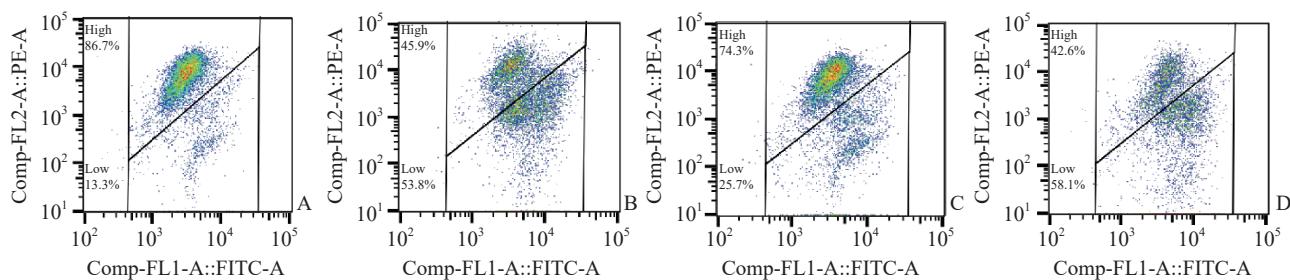


图3 流式细胞术检测各组大鼠H9C2心肌细胞线粒体膜电位的变化

Fig 3 Changes of mitochondrial membrane potential of rat H9C2 cardiomyocytes in each group detected by flow cytometry

A: Blank control group; B: X-ray irradiation (X-ray) group; C: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor (X-inhibitor) group; D: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor negative control (X-NC) group. miRNA: MicroRNA.

**2.6 X线照射对大鼠心肌细胞miRNA-134-5p表达水平的影响** qPCR检测结果显示,空白对照组、X-ray组、X-inhibitor组及X-NC组大鼠H9C2心肌细胞中miRNA-134-5p表达水平分别为 $0.30\pm0.07$ 、 $1.00\pm0.04$ 、 $0.40\pm0.10$ 、 $0.94\pm0.07$ 。与空白对照组相比,X-ray组大鼠心肌细胞中miRNA-134-5p的表达水平增加( $P<0.01$ );与X-ray组相比,X-NC组大鼠心肌细胞中miRNA-134-5p的表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),X-inhibitor组大鼠心肌细胞中miRNA-134-5p的表达水平下降( $P<0.01$ )。

**2.7 X线照射对大鼠心肌细胞中BDNF、Akt、p-Akt、Bcl2、Bax蛋白表达的影响** 蛋白质印迹法检测结果(图4、表2)显示,与空白对照组相比,X-ray组大鼠H9C2心肌细胞中BDNF蛋白表达降低约43%( $P<0.01$ );与X-ray组相比,X-NC组大鼠心肌细胞中BDNF蛋白表达的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),X-inhibitor组大鼠心肌细胞中BDNF蛋白表达增加约49%( $P<0.01$ )。

与空白对照组相比,X-ray组大鼠心肌细胞中p-Akt蛋白表达及p-Akt/Akt比值分别降低约53%、51%(均 $P<0.01$ );与X-ray组相比,X-NC组大鼠心肌细胞中p-Akt蛋白表达及p-Akt/Akt比值差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ),X-inhibitor组大鼠心肌细胞中p-Akt蛋白表达及p-Akt/Akt比值分别增加约67%、55%(均 $P<0.01$ )。结果提示,与空白对照组相比,X线照射对Akt的蛋白表达没有明显影响,但可抑制其磷酸化过程导致p-Akt/Akt比值降低,而抑制miRNA-134-5p后p-Akt/Akt比值较X-ray组上调。见图4、表2。

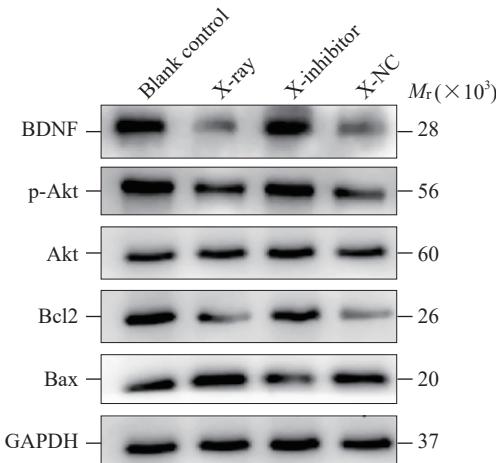


图4 蛋白质印迹法检测各组大鼠H9C2心肌细胞中BDNF、Akt、p-Akt、Bcl2、Bax蛋白的表达

Fig 4 Expressions of BDNF, Akt, p-Akt, Bcl2, and Bax proteins in rat H9C2 cardiomyocytes in each group detected by Western blotting

X-ray: X-ray irradiation group; X-inhibitor: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor group; X-NC: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor negative control group. BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; p-Akt: Phosphorylated Akt; Akt: Protein kinase B; Bcl2: B-cell lymphoma gene 2; Bax: Bcl2-associated X; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; miRNA: MicroRNA.

与空白对照组相比,X-ray组大鼠心肌细胞中Bcl2蛋白表达降低约54%、Bax蛋白表达增加约29%(均 $P<0.01$ ),Bcl2/Bax比值降低( $P<0.01$ );与X-ray组相比,X-NC组大鼠心肌细胞中Bcl2、Bax蛋白表达差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ),X-inhibitor组大鼠心肌细胞中Bcl2蛋白表达增加约65%、Bax蛋白表达降低约16%(均 $P<0.01$ ),Bcl2/Bax比值增加( $P<0.01$ )。见图4、表2。

表2 各组大鼠H9C2心肌细胞中BDNF、Akt、p-Akt、Bcl2、Bax蛋白的相对表达量

Tab 2 Relative expression levels of BDNF, Akt, p-Akt, Bcl2, and Bax proteins in rat H9C2 cardiomyocytes in each group

Group	BDNF/GAPDH	p-Akt/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/Akt	Bcl2/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl2/Bax	<i>n=3, x̄±s</i>
BC	1.38±0.03	1.08±0.06	0.99±0.08	1.09±0.05	1.04±0.03	0.80±0.04	1.31±0.06	
X-ray	0.79±0.06 <sup>**</sup>	0.51±0.04 <sup>**</sup>	0.97±0.06	0.53±0.07 <sup>**</sup>	0.48±0.02 <sup>**</sup>	1.03±0.02 <sup>**</sup>	0.47±0.02 <sup>**</sup>	
X-inhibitor	1.18±0.06 <sup>△△</sup>	0.85±0.04 <sup>△△</sup>	1.04±0.06	0.82±0.01 <sup>△△</sup>	0.79±0.02 <sup>△△</sup>	0.87±0.02 <sup>△△</sup>	0.90±0.02 <sup>△△</sup>	
X-NC	0.76±0.03	0.56±0.03	0.95±0.03	0.59±0.04	0.45±0.02	1.10±0.04	0.41±0.02	

<sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs BC group; <sup>△△</sup>*P*<0.01 vs X-ray group. BC: Blank control; X-ray: X-ray irradiation group; X-inhibitor: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor group; X-NC: X-ray irradiation+miRNA-134-5p inhibitor negative control group. BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; p-Akt: Phosphorylated Akt; Akt: Protein kinase B; Bcl2: B-cell lymphoma gene 2; Bax: Bcl2-associated X; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; miRNA: MicroRNA.

### 3 讨 论

RIHD作为肿瘤患者放射治疗的严重并发症之一,发病前通常具有较长潜伏期,其发生、发展可能与辐射引起的氧化应激、DNA损伤、神经-体液-免疫调节紊乱、miRNA异常表达等有关<sup>[18-20]</sup>,是多种复杂信号通路共同作用的结果。本实验采用CCK-8法进行最佳辐照剂量的筛选,结果提示X线照射后大鼠H9C2心肌细胞的存活率呈剂量-时间依赖性降低。6 Gy X线照射后48 h细胞活性良好,同时检测发现氧化应激、细胞凋亡明显。朱贝贝等<sup>[17]</sup>研究表明,6 Gy X线照射可有效诱导大鼠心肌细胞发生氧化应激、线粒体膜电位下降及线粒体通路相关的细胞凋亡;韩金晏等<sup>[16]</sup>也发现6 Gy X线照射后大鼠心肌细胞的Bcl2/Bax比值发生变化,辐射诱导的细胞凋亡增加。为此,本实验最终选择6 Gy为X线照射大鼠H9C2心肌细胞的剂量,照射后48 h为指标检测时间点。虽然临床患者实际上存在长时间、反复照射的放疗,但在基础研究中如果多次照射细胞,一方面细胞难以耐受,可能造成较大的实验误差,降低实验数据的准确性和实验的可行性;另一方面,放射性损伤有显著的迟发效应,单次照射后的细胞因子表达变化、DNA和细胞器损伤、细胞功能受损均能较长时间影响心脏,促使其发生渐进性病理损害。有理由认为,单次照射细胞可以满足实验研究的目的和要求,且简单易行,是多数RIHD基础研究者的首选照射方法。基于上述细胞照射基础,本研究观察到X线照射可诱发大鼠H9C2心肌细胞发生氧化应激、损伤DNA和线粒体,引起细胞凋亡,miRNA-134-5p/BDNF/Akt信号通路参与调控X线诱导的心肌细胞

### 损伤及凋亡。

#### 3.1 X线照射引起的心肌细胞损伤与凋亡

3.1.1 氧化应激损伤与心肌细胞凋亡 氧化应激是由细胞氧化和抗氧化系统之间的不平衡引起<sup>[21]</sup>,与细胞凋亡密切相关。在许多细胞系中,照射后细胞内ROS持续增加,形成脂质过氧化物MDA,细胞内MDA水平的变化反映了整体的脂质过氧化程度,也间接反映了细胞的损伤程度<sup>[22]</sup>。SOD是一种重要的抗氧化酶,也是防止ROS增加和脂质过氧化引起细胞损伤的主要防线<sup>[23]</sup>。本实验结果显示,X线照射提高了受照细胞的ROS和MDA水平、降低了SOD活性,表明X线照射可诱导大鼠H9C2心肌细胞发生明显的氧化应激损伤,加重受照细胞凋亡;抑制miRNA-134-5p表达后,受照细胞的氧化应激程度有所减轻,且与各组细胞的凋亡变化呈相同趋势,证明细胞氧化应激程度与细胞凋亡之间关系密切。有研究证实X线照射能诱导斑马鱼胚胎发生氧化应激损伤,并进一步使下游Bax及caspase家族等凋亡相关基因表达上调,导致受照斑马鱼胚胎凋亡数量增加<sup>[24]</sup>,与本实验结果一致,有力证明X线照射引起的氧化应激损伤参与了心肌细胞凋亡。此外辐射诱导的过量ROS不仅能破坏DNA,还损害线粒体功能加剧氧化应激,诱导细胞凋亡<sup>[25]</sup>。

3.1.2 DNA损伤与心肌细胞凋亡 研究表明X线照射加重了受照细胞DNA损伤及细胞凋亡<sup>[26]</sup>。微核是一种含有染色质的小体,在细胞质中可见<sup>[27]</sup>,是由DNA损伤或基因组不稳定引起<sup>[28]</sup>。本实验分别检测了正常大鼠H9C2心肌细胞与X线照射后大鼠心肌细胞中的微核数量,结果显示,与正常心肌细胞相比,X线诱导受照心肌细胞微核数量增加,

说明X线照射诱导大鼠心肌细胞发生DNA损伤，同时与受照细胞凋亡率上升的趋势一致，表明X线可诱导心肌细胞发生DNA损伤，加重心肌细胞凋亡。

**3.1.3 线粒体损伤与心肌细胞凋亡** 研究发现，受射线照射的心肌细胞发生了能量代谢异常、胞内钙超载、线粒体功能障碍和结构损伤<sup>[29]</sup>，随后多种死亡因子、信号通路和效应分子启动心肌细胞凋亡<sup>[30]</sup>，其中线粒体功能障碍和不可逆性损伤是细胞凋亡和坏死的关键环节<sup>[31]</sup>。有研究进一步证实，辐射暴露导致促凋亡蛋白Bax表达上调并激活，活化的Bax易位并插入到线粒体外膜<sup>[32-33]</sup>，加速线粒体电压依赖性阴离子通道的开放。本实验亦发现受X线照射的心肌细胞线粒体膜电位下降，流式细胞术及Hoechst 33342染色结果表明受照细胞凋亡比例上升，进一步佐证了X线照射会诱导细胞发生线粒体损伤，加重细胞凋亡。

**3.2 miRNA-134-5p/BDNF介导X线照射引起的心肌细胞损伤和凋亡** 本课题组前期通过RNA-seq技术测序发现辐照可引起受照的心肌成纤维细胞及其辐射旁效应细胞的miRNA谱发生改变，表现为包括miRNA-134-5p在内的多种miRNA表达上调<sup>[14]</sup>，本实验进一步检测证实大鼠H9C2心肌细胞受到X线照射后miRNA-134-5p表达上调。miRNA-134-5p是一种对细胞增殖、分化、迁移和凋亡都必不可少的miRNA<sup>[34]</sup>，在心肌梗死小鼠模型中高表达，抑制miRNA-134-5p表达可减少心肌细胞凋亡<sup>[12]</sup>，敲低miRNA-134-5p能减轻线粒体损伤及氧化应激<sup>[13]</sup>。另有研究支持AMI早期血清miRNA-134-5p表达上调，具有潜在诊断价值<sup>[35]</sup>。基于此，本课题组进一步对miRNA-134-5p进行生物信息学分析，发现miRNA-134-5p/BDNF/Akt信号通路可能参与调节辐照诱导的心肌细胞凋亡。

BDNF是哺乳动物中枢神经系统中最丰富的神经营养因子之一，参与心血管疾病的发展<sup>[36-39]</sup>。实验证实miRNA-134-5p可通过转录后调节BDNF的表达<sup>[40]</sup>，进而调节主动脉内皮功能<sup>[41]</sup>、抑制心肌细胞凋亡，修复受损心肌<sup>[42]</sup>。本实验观察到转染miRNA-134-5p抑制剂后，X线诱导的大鼠H9C2心肌细胞miRNA-134-5p高表达被逆转，同时miRNA-134-5p的预测靶点BDNF蛋白表达量下调，表明miRNA-134-5p抑制剂成功转染进心肌细

胞并抑制X线照射诱导的miRNA-134-5p的mRNA表达上调，减轻心肌细胞的凋亡及相关损伤。

为了解miRNA-134-5p/BDNF对心肌细胞损伤和凋亡的影响机制，Minichiello<sup>[43]</sup>对其下游信号分子进行了筛选，着重关注PI3K/Akt信号通路。辐射可通过调节PI3K/Akt蛋白表达及其磷酸化参与多种细胞凋亡<sup>[44-45]</sup>。Akt磷酸化后作用于下游靶基因Bad使其发生磷酸化，阻断Bad与Bcl2结合，保持Bcl2的抗凋亡作用<sup>[46]</sup>。有研究表明，miRNA可通过激活PI3K/Akt通路调控Bcl2的表达进而抑制心肌细胞凋亡，发挥心脏保护功能<sup>[47-50]</sup>。本实验发现，X线照射能够上调大鼠心肌细胞内miRNA-134-5p水平，进而抑制BDNF蛋白表达。进一步检测下游相关指标发现，受miRNA-134-5p调控的BDNF表达下降后下游Akt信号通路会受到抑制，导致p-Akt水平降低，下游Bcl2蛋白表达减少、Bax蛋白表达升高，细胞凋亡比例上升。而转染miRNA-134-5p抑制剂后受X线照射细胞的BDNF表达上调、p-Akt/Akt比值增加，Akt信号通路被激活，抑制下游Bax活化并提高Bcl2/Bax比值，从而使心肌细胞凋亡率下降。

综上所述，X线照射可促进心肌细胞损伤，其发生机制与心肌细胞氧化应激、DNA和线粒体损伤、细胞凋亡等有关。本实验初步观察到DNA损伤、线粒体损伤、氧化应激损伤均可能参与X线辐射引起H9C2心肌细胞凋亡，相关机制与miRNA-134-5p/BDNF/Akt信号通路有关。

## [参考文献]

- [1] ŠTEINER I. Pathology of radiation induced heart disease[J]. Rep Pract Oncol Radiother, 2020, 25(2): 178-181. DOI: 10.1016/j.rpor.2019.12.015.
- [2] MA C X, ZHAO X K, LI Y D. New therapeutic insights into radiation-induced myocardial fibrosis[J]. Ther Adv Chronic Dis, 2019, 10: 2040622319868383. DOI: 10.1177/2040622319868383.
- [3] XIA P, LIU Y, CHENG Z. Signaling pathways in cardiac myocyte apoptosis[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 9583268. DOI: 10.1155/2016/9583268.
- [4] SKOMMER J, RANA I, MARQUES F Z, et al. Small molecules, big effects: the role of microRNAs in regulation of cardiomyocyte death[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(7): e1325. DOI: 10.1038/cddis.2014.287.
- [5] SHAN Z X, LIN Q X, DENG C Y, et al. MiR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes[J].

- FEBS Lett, 2010, 584(16): 3592-3600. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.07.027.
- [6] LIU C, ZHENG H, XIE L, et al. Decreased miR-208 induced ischemia myocardial and reperfusion injury by targeting p21[J]. Pharmazie, 2016, 71(12): 719-723. DOI: 10.1691/ph.2016.6740.
- [7] GAO Y, MA H, LV C, et al. Exosomes and exosomal microRNA in non-targeted radiation bystander and abscopal effects in the central nervous system[J]. Cancer Lett, 2021, 499: 73-84. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.10.049.
- [8] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- [9] WOJCIECHOWSKA A, BRANIEWSKA A, KOZARKAMIŃSKA K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease[J]. Adv Clin Exp Med, 2017, 26(5): 865-874. DOI: 10.17219/acem/62915.
- [10] LIN X, ZHANG S, HUO Z. Serum circulating miR-150 is a predictor of post-acute myocardial infarction heart failure[J]. Int Heart J, 2019, 60(2): 280-286. DOI: 10.1536/ihj.18-306.
- [11] YANG J, LIU S, WANG H, et al. MiR-134-5p inhibition reduces infarct-induced cardiomyocyte apoptosis via Creb1 upregulation[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020, 29(8): 104850. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasd.is.2020.104850.
- [12] LI X, WEI C, ZHANG Z, et al. MiR-134-5p regulates myocardial apoptosis and angiogenesis by directly targeting KDM2A after myocardial infarction[J]. Int Heart J, 2020, 61(4): 815-821. DOI: 10.1536/ihj.19-468.
- [13] HAO S, SUI X, WANG J, et al. Secretory products from epicardial adipose tissue induce adverse myocardial remodeling after myocardial infarction by promoting reactive oxygen species accumulation[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 848. DOI: 10.1038/s41419-021-04111-x.
- [14] 段依璠,顾静,舒亚妃,等.心肌成纤维细胞来源的外泌体miRNA 参与放射性心肌纤维化损伤[J].中国生物化学与分子生物学报,2023,39( 1 ):108-120. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.11.1330.
- [15] HANG P, ZHAO J, SUN L, et al. Brain-derived neurotrophic factor attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction through activating Akt signalling in rats[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(4): 685-696. DOI: 10.1111/jcm.13012.
- [16] 韩金晏,蒋虎刚,王新强,等.当归红芪超滤物通过调控P53 表达对H9C2 细胞凋亡的干预效应研究[J].中华中医药杂志,2023,38( 4 ):1543-1548.
- [17] 朱贝贝,畅艳娜,李应东,等.当归红芪多糖对辐射损伤心肌细胞线粒体凋亡通路的影响[J].北京中医药大学学报,2015,38( 1 ):811-816. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2015.12.004.
- [18] SOLIMAN A F, ANEES L M, IBRAHIM D M. Cardioprotective effect of zingerone against oxidative stress, inflammation, and apoptosis induced by cisplatin or gamma radiation in rats[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018, 391(8): 819-832. DOI: 10.1007/s00210-018-1506-4.
- [19] ZHANG P, YANG P, HONG L, et al. Oxidative stress in radiation-induced cardiotoxicity[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 3579143. DOI: 10.1155/2020/3579143.
- [20] WANG B, WANG H, ZHANG M, et al. Radiation-induced myocardial fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and therapeutic strategies[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(14): 7717-7729. DOI: 10.1111/jcm.15479.
- [21] HOU X, YANG S, YIN J. Blocking the REDD1/TXNIP axis ameliorates LPS-induced vascular endothelial cell injury through repressing oxidative stress and apoptosis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2019, 316(1): C104-C110. DOI: 10.1152/ajpcell.00313.2018.
- [22] VALKO M, RHODES C J, MONCOL J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer[J]. Chem Biol Interact, 2006, 160(1): 1-40. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [23] EBADI M, GOVITRAPONG P, SHARMA S, et al. Ubiquinone (coenzyme Q10) and mitochondria in oxidative stress of Parkinson's disease[J]. Biol Signals Recept, 2001, 10(3/4): 224-253. DOI: 10.1159/000046889.
- [24] KARAGÖZ A, BELER M, ALTUN B D, et al. Panoramic dental X-ray exposure leads to oxidative stress, inflammation and apoptosis-mediated developmental defects in zebrafish embryos[J]. J Stomatol Oral Maxillofac Surg, 2023, 124(6S): 101661. DOI: 10.1016/j.jormas.2023.101661.
- [25] STEPIEN K M, HEATON R, RANKIN S, et al. Evidence of oxidative stress and secondary mitochondrial dysfunction in metabolic and non-metabolic disorders[J]. J Clin Med, 2017, 6(7): 71. DOI: 10.3390/jcm6070071.
- [26] ZHAO H, ZHUANG Y, LI R, et al. Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells[J]. Oncol Lett, 2019, 17(1): 42-54. DOI: 10.3892/ol.2018.9566.
- [27] FENECH M, MORLEY A A. Measurement of micronuclei in lymphocytes[J]. Mutat Res, 1985, 147(1/2): 29-36. DOI: 10.1016/0165-1161(85)90015-9.
- [28] TERRADAS M, MARTÍN M, GENESCA À A. Impaired nuclear functions in micronuclei results in genome instability and chromothripsis[J]. Arch Toxicol, 2016, 90(11): 2657-2667. DOI: 10.1007/s00204-016-1818-4.
- [29] 张静,彭瑞云,杨蕾蕾,等.AMPK/mTOR 通路对微波辐射引起大鼠心脏损伤和心肌细胞线粒体自噬的调控作用研究[C]//中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集,武汉,2015.
- [30] ZHU H, SUN A. Programmed necrosis in heart disease: molecular mechanisms and clinical implications[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 116: 125-134. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.01.018.

- [31] WANG H, WEI J, ZHENG Q, et al. Radiation-induced heart disease: a review of classification, mechanism and prevention[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(10): 2128-2138. DOI: 10.7150/ijbs.35460.
- [32] AN J, LI P, LI J, et al. ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity[J]. *J Mol Med*, 2009, 87(4): 401-410. DOI: 10.1007/s00109-008-0434-z.
- [33] SALATA C, FERREIRA-MACHADO S C, DE ANDRADE C B, et al. Apoptosis induction of cardiomyocytes and subsequent fibrosis after irradiation and neoadjuvant chemotherapy[J]. *Int J Radiat Biol*, 2014, 90(4): 284-290. DOI: 10.3109/09553002.2014.887869.
- [34] WANG Y, DONG C Q, PENG G Y, et al. MicroRNA-134-5p regulates media degeneration through inhibiting VSMC phenotypic switch and migration in thoracic aortic dissection[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 284-294. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.02.021.
- [35] WANG K J, ZHAO X, LIU Y Z, et al. Circulating miR-19b-3p, miR-134-5p and miR-186-5p are promising novel biomarkers for early diagnosis of acute myocardial infarction[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(3): 1015-1029. DOI: 10.1159/000443053.
- [36] OKADA S, YOKOYAMA M, TOKO H, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): 1902-1909. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.248930.
- [37] FENG N, HUKE S, ZHU G, et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(6): 1880-1885. DOI: 10.1073/pnas.1417949112.
- [38] FULGENZI G, TOMASSONI-ARDORI F, BABINI L, et al. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation[J]. *J Cell Biol*, 2015, 210(6): 1003-1012. DOI: 10.1083/jcb.201502100.
- [39] KERMANI P, RAFII D, JIN D K, et al. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB<sup>+</sup> endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 653-663. DOI: 10.1172/JCI22655.
- [40] BABY N, ALAGAPPAN N, DHEEN S T, et al. MicroRNA-134-5p inhibition rescues long-term plasticity and synaptic tagging/capture in an Aβ(1-42)-induced model of Alzheimer's disease[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(1): e13046. DOI: 10.1111/acel.13046.
- [41] ZHANG Q, XIAO X, ZHENG J, et al. Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, attenuated endothelial dysfunction through miRNAs in diabetic rats[J]. *Arch Med Sci*, 2021, 17(5): 1378-1387. DOI: 10.5114/aoms.2019.86609.
- [42] HANG P, ZHAO J, CAI B, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates TRPC3/6 channels and protects against myocardial infarction in rodents[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(5): 536-545. DOI: 10.7150/ijbs.10754.
- [43] MINICHIELLO L. TrkB signalling pathways in LTP and learning[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12): 850-860. DOI: 10.1038/nrn2738.
- [44] 赵粉琴,苟雅姣,胡芝霞,等.<sup>60</sup>Coy射线对大鼠性激素水平以及PI3K/Akt信号通路蛋白表达的影响[J].甘肃农业大学学报,2021,56(2):31-39. DOI: 0.13432/j.cnki.jgsau.2021.02.005.
- [45] ZHAO W, HU N, DING D, et al. Developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos induced by low-dose γ-ray irradiation[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26(4): 3869-3881. DOI: 10.1007/s11356-018-3893-y.
- [46] NICHOLSON K M, ANDERSON N G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy[J]. *Cell Signal*, 2002, 14(5): 381-395. DOI: 10.1016/s0898-6568(01)00271-6.
- [47] CHANG J H, JIN M M, LIU J T. Dexmedetomidine pretreatment protects the heart against apoptosis in ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activating PI3K/Akt signaling *in vivo* and *in vitro*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110188. DOI: 10.1016/j.bioph.2020.110188.
- [48] WANG X, PAN J, LIU D, et al. Nicorandil alleviates apoptosis in diabetic cardiomyopathy through PI3K/Akt pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5349-5359. DOI: 10.1111/jcmm.14413.
- [49] ZHANG Z Y, LI Y, LI R, et al. Tetrahydrobiopterin protects against radiation-induced growth inhibition in H9c2 cardiomyocytes[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129(22): 2733-2740. DOI: 10.4103/0366-6999.193455.
- [50] ZHAO Y, WANG H, HE C, et al. Protopanaxadiol and protopanaxatriol ginsenosides can protect against aconitine-induced injury in H9c2 cells by maintaining calcium homeostasis and activating the AKT pathway[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78(5): e690-e702. DOI: 10.1097/FJC.0000000000001119.

[本文编辑] 尹 茶