

lncRNA NEAT1 调控 miR-206 对缺氧复氧大鼠心肌细胞氧化应激损伤和凋亡的影响

邴艳萍, 宋璇, 姜楠, 宋丽杰
(青岛市立医院, 山东省青岛市 266000)

[关键词] 缺氧复氧; 心肌细胞; 氧化应激损伤; 细胞凋亡; lncRNA NEAT1; miR-206

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)NEAT1 调控 miR-206 对缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激损伤和凋亡的影响和机制。**方法** 体外培养 H9c2 心肌细胞, 构建心肌细胞缺氧复氧模型。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测缺氧复氧诱导后 lncRNA NEAT1 和 miR-206 的表达水平。将 lncRNA NEAT1 小干扰 RNA (si-lncRNA NEAT1)、miR-206 模拟物 (miR-206 mimics) 分别转染 H9c2 细胞, 缺氧复氧诱导后, 检测细胞中丙二醛 (MDA) 和活性氧 (ROS) 含量以及细胞上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性, MTT 法检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 检测含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved Caspase-3) 和 cleaved Caspase-9 蛋白表达。利用荧光素酶报告基因实验以及 RT-qPCR 验证 lncRNA NEAT1 和 miR-206 的靶向结合关系。**结果** 缺氧复氧诱导后 H9c2 细胞中 lncRNA NEAT1 的表达显著升高, miR-206 的表达显著降低 ($P < 0.05$)。转染 si-lncRNA NEAT1 或 miR-206 mimics 处理缺氧复氧 H9c2 细胞, 细胞存活率显著升高, MDA、ROS 含量以及 LDH 活性显著降低, cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达显著降低, 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。lncRNA NEAT1 靶向 miR-206 并负调控 miR-206 表达。抑制 miR-206 部分逆转沉默 lncRNA NEAT1 对缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化损伤和凋亡的影响 ($P < 0.05$)。**结论** 沉默 lncRNA NEAT1 通过上调 miR-206 可减轻缺氧复氧诱导的心肌细胞氧化应激损伤和细胞凋亡, 进而发挥心肌保护作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of lncRNA NEAT1 on oxidative stress injury and apoptosis of hypoxic-reoxygenated rat cardiomyocytes by regulating miR-206

BING Yanping, SONG Xuan, JIANG Nan, SONG Lijie

(Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong 266000, China)

[KEY WORDS] hypoxia/reoxygenation; cardiomyocytes; oxidative stress injury; cell apoptosis; lncRNA NEAT1; miR-206

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of lncRNA NEAT1 on hypoxia/reoxygenation induced oxidative stress injury and apoptosis of cardiomyocytes by regulating miR-206. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were cultured in vitro to construct cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation model. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of lncRNA NEAT1 and miR-206 after hypoxia/reoxygenation induction. lncRNA NEAT1 small interference RNA (si-lncRNA NEAT1) and miR-206 mimics (miR-206 mimics) were transfected into H9c2 cell, respectively. After hypoxia/reoxygenation induction, the kit was used to detect the content of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in the cell and the content of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell supernatant, MTT assay was used to detect cell activity, flow cytometry was used to detect cell apoptosis, and Western blot was used to detect the expression of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 proteins. The luciferase reporter assay and RT-qPCR were used to verify the targeted binding relationship between lncRNA NEAT1 and miR-206. **Results** After the induction of hypoxia/reoxygenation, the expression of lncRNA NEAT1 in H9c2 cell was significantly increased, while the expression of

[收稿日期] 2019-12-12

[修回日期] 2020-02-26

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(2019WS376)

[作者简介] 邴艳萍, 主管检验师, 研究方向为医学检验, E-mail 为 moufz670@sina.com。通信作者宋丽杰, 主管技师, 研究方向为医学检验, E-mail 为 huishanrh2@126.com。

miR-206 was significantly decreased ($P < 0.05$). After transfection with si-lncRNA NEAT1 or miR-206 mimics, the survival rate of H9c2 cell was significantly increased, MDA, ROS contents and LDH activity were significantly reduced, and the expression of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 proteins were significantly reduced, and the apoptosis rate was significantly reduced ($P < 0.05$). lncRNA NEAT1 targets miR-206 and negatively regulates miR-206 expression. Inhibition of miR-206 partially reversed the effects of silencing lncRNA NEAT1 on oxidative damage and apoptosis of cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing lncRNA NEAT1 could reduce hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress injury and apoptosis of cardiomyocytes by up-regulating miR-206, and then exert myocardial protection.

缺血性心脏病是以心肌缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤为主要临床表现的心血管疾病,是导致人类死亡和残疾的重要原因^[1]。在心肌缺血期间,缺氧可引起细胞凋亡,及时再灌注恢复氧气供应对细胞存活十分重要,然而过量活性氧的生成促进氧化应激,促进线粒体通透性转变孔的开放以及细胞色素 C 的释放,最终导致线粒体依赖性细胞凋亡^[2]。因此,减少氧化应激损伤和凋亡水平是心肌 I/R 损伤的重要治疗策略。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的新型非编码 RNA,大量研究表明 lncRNA 在细胞增殖、分化和代谢等多种病理生理过程中发挥着重要作用^[3]。核富含丰富的转录本 1 (nuclear enriched abundant transcript 1, NEAT1) 是近年发现的新型 lncRNA,研究显示 I/R 心肌和缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 心肌细胞 lncRNA NEAT1 显著上调,lncRNA NEAT1 的上调可促进心肌细胞凋亡和自噬,加重心肌细胞 I/R 损伤,敲除 lncRNA NEAT1 对 H/R 诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用^[4-5]。然而,lncRNA NEAT1 在 H/R 诱导的心肌细胞氧化应激损伤和凋亡中的作用机制并未完全阐明。生物信息学预测显示 miR-206 与 lncRNA NEAT1 之间存在相互作用。miR-206 是 miR-206/133b 簇成员之一,研究显示 I/R 大鼠心肌 miR-206 的表达水平显著降低,上调 miR-206 可明显缩小梗死面积,减轻 I/R 心肌损伤^[6]。因此,本研究拟探讨 lncRNA NEAT1 靶向 miR-206 对心肌细胞 H/R 氧化应激损伤和凋亡的影响和分子机制,以期 lncRNA NEAT1/miR-206 在防治缺血性心脏病 I/R 损伤中的应用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

大鼠心肌细胞 H9c2 购于中国科学院典型培养物保藏中心;DMEM 培养基和胎牛血清购于美国

Hyclone 公司;Trizol 试剂、RIPA 裂解液、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid disodium, BCA) 试剂盒购于上海碧云天生物科技有限公司;SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒、反转录试剂盒购于大连宝生物科技有限公司;小干扰 RNA 对照 (si-Con)、lncRNA NEAT1 小干扰 RNA (si-lncRNA NEAT1)、miRNA 模拟物对照 (miR-Con)、miR-206 模拟物 (miR-206 mimics)、miRNA 抑制物对照 (anti-miR-Con)、miR-206 抑制物 (anti-miR-206)、空载体 (pcDNA)、lncRNA NEAT1 过表达载体 (pcDNA-lncRNA NEAT1)、四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂盒由上海生工生物工程有限公司提供;乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量检测试剂盒、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所;膜联蛋白 V 异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/PI) 细胞凋亡检测试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司;兔源 β -actin 抗体、兔源活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved Caspase-3) 抗体、兔源 cleaved Caspase-9 抗体购于美国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔 IgG 二抗购于北京百奥莱博科技有限公司。

1.2 细胞培养和模型构建

采用含 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 H9c2 细胞,3 天后换液,当细胞融合度达到 50% 时,胰酶消化后,进行传代培养。将 H9c2 细胞置于细胞培养箱中缺氧 24 h (95% N₂、5% CO₂),更换新鲜培养基,然后将 H9c2 细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中复氧 6 h。RT-qPCR 检测 H/R 后 lncRNA NEAT1 和 miR-206 的表达水平。

1.3 RT-qPCR 检测 lncRNA NEAT1 和 miR-206 的表达

细胞按照上述分组进行干预后收集各组细胞,采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA,随后按照 SYBR Premix Ex Taq

II 试剂盒说明书对 lncRNA NEAT1 和 miR-206 进行 PCR 扩增。miR-206 的检测以 U6 为内参, lncRNA NEAT1 的检测以 β -actin 为内参。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-206 和 lncRNA NEAT1 的相对表达水平。

1.4 实验分组

采用脂质体转染法将 si-Con、si-lncRNA NEAT1、miR-Con、miR-206 转染 H9c2 细胞 48 h 后, H/R 处理细胞, 实验分为以下几组: 空白组(正常培养的 H9c2 细胞)、H/R 组、H/R+si-Con 组(转染)、H/R+si-lncRNA NEAT1 组、H/R+miR-Con 组、H/R+miR-206 组。各组细胞进行相应处理后, 按照下述方法检测细胞存活、凋亡以及氧化应激损伤变化。为证实 si-lncRNA NEAT1 是通过调控 miR-206 进而影响 H/R 诱导的心肌细胞氧化应激损伤和凋亡, 将 si-lncRNA NEAT1 分别与 anti-miR-Con、anti-miR-206 共转染至 H9c2 细胞, H/R 处理后, 记为 H/R + si-lncRNA NEAT1+anti-miR-Con 组、H/R + si-lncRNA NEAT1 + anti-miR-206 组, 按照下述方法检测细胞存活、凋亡以及氧化应激损伤变化。

1.5 MTT 法检测细胞存活率

将 H9c2 细胞按照 1×10^4 个/孔, 200 μ L/孔接种到 96 孔板, 根据实验分组进行干预后, 每孔加入 20 μ L 的 MTT 试剂, 培养箱避光孵育 4 h, 弃去上清液, 加入 150 μ L 的 DMSO 溶解, 振荡 10 min, 以仅加培养基孔调零, 使用酶标仪检测 490 nm 波长处各孔的光密度(OD)值, 计算细胞存活率。细胞存活率 = $\frac{\text{OD 值}_{\text{实验组}}}{\text{OD 值}_{\text{空白组}}}$ 。

1.6 细胞中 MDA、ROS 含量以及细胞上清液中 LDH 活性检测

(1)MDA 含量检测: 细胞按照上述分组进行相应干预后, 收集各组细胞至离心管, 离心后弃上清, 加入适量提取液, 超声破碎细胞, 8 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 收集上清液, 按照 MDA 含量试剂盒步骤进行检测。

(2)ROS 水平检测: 细胞按照上述分组进行相应干预后, 去除细胞培养液, 按照 ROS 检测试剂盒步骤进行操作, 最后采用荧光分光光度计测定荧光强度。

(3)LDH 活性检测: 细胞培养结束后, 收集细胞上清液, 按照 LDH 试剂盒使用说明检测细胞上清液中 LDH 活性。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞按照上述分组进行干预后, 每组收集 10^6 个细胞, 用预冷的 PBS 液洗涤细胞 2 次后, 离心收

集细胞, 加入 100 μ L 结合缓冲液重悬细胞。分别加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和 5 μ L 的 PI 染色, 室温避光孵育 15 min, 1 h 上机检测 H9c2 细胞凋亡情况。

1.8 Western blot 检测凋亡关键蛋白 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白表达

收集各组细胞, 采用 RIPA 裂解液提取细胞蛋白, BCA 法测定蛋白浓度和纯度。将各组蛋白样品浓度调整到同一水平按照每泳道 30 μ g 行聚丙烯酰胺凝胶电泳。按照常规湿法转膜-封闭-一抗孵育-二抗孵育-化学发光显色步骤进行显影。采用 Image J 分析软件测定各目的条带的灰度值, 以样品目的蛋白的灰度值与 β -actin 灰度值比值表示 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达水平。

1.9 双荧光素酶报告基因实验

采用 DINAN 在线分析软件进行靶基因预测, 发现 miR-206 和 lncRNA NEAT1 之间存在部分连续结合的核苷酸序列, 于是采用双荧光素酶报告基因实验验证 lncRNA NEAT1 和 miR-206 的靶向结合关系。含有 miR-206 结合位点的野生型荧光素酶报告质粒(WT-lncRNA NEAT1)及含有 miR-206 结合位点突变序列的突变型荧光素酶报告质粒(MUT-lncRNA NEAT1)由上海吉凯基因公司完成。将 H9c2 细胞接种到 6 孔板, 利用脂质体转染法将 WT-lncRNA NEAT1、MUT-lncRNA NEAT1 分别与 miR-Con、miR-206 mimics 共转染至 H9c2 细胞, 6 h 后更换为完全细胞培养液, 培养 48 h 后测定各组细胞荧光素酶活性。为验证 lncRNA NEAT1 对 miR-206 的调控作用, 将 si-Con、si-lncRNA NEAT1、pcDNA、pcDNA-lncRNA NEAT1 分别转染至 H9c2 细胞, 转染 48 h 裂解细胞, 按照 RT-qPCR 步骤检测 miR-206 的表达。

1.10 统计学分析

采用 SPSS18.0 进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H/R 影响心肌细胞 lncRNA NEAT1 和 miR-206 的表达

心肌 H9c2 细胞 H/R 处理后, RT-qPCR 检测 lncRNA NEAT1 和 miR-206 表达发现, 相较于空白组,

H/R 组 H9c2 细胞 lncRNA NEAT1 的表达显著增加, miR-206 的表达显著降低($P < 0.05$, 表 1)。

表 1. H/R 影响心肌细胞 lncRNA NEAT1 和 miR-206 的表达($n=9$)

Table 1. Hypoxia/reoxygenation affect the expression of lncRNA NEAT1 and miR-206 in cardiomyocytes ($n=9$)

| 分组 | lncRNA NEAT1 | miR-206 |
|-------|------------------------|------------------------|
| 空白组 | 1.04±0.08 | 0.98±0.14 |
| H/R 组 | 3.18±0.48 ^a | 0.29±0.05 ^a |

a 为 $P < 0.05$, 与空白组比较。

表 2. 沉默 lncRNA NEAT1 对 H/R 致心肌细胞氧化应激和细胞存活的影响($n=9$)

Table 2. Effects of silencing lncRNA NEAT1 on oxidative stress and cell survival of cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation ($n=9$)

| 分组 | lncRNA NEAT1 | MDA/($\mu\text{mol/L}$) | ROS/MFI | LDH/(U/L) | 细胞存活率/% |
|-----------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 空白组 | 1.02±0.07 | 4.89±0.31 | 467.34±32.86 | 356.27±46.58 | 86.56±5.28 |
| H/R 组 | 3.31±0.45 ^a | 17.64±1.08 ^a | 1361.52±113.78 ^a | 721.33±64.97 ^a | 62.64±6.37 ^a |
| H/R+si-Con 组 | 3.08±0.49 | 16.83±1.56 | 1382.66±123.37 | 878.42±58.77 | 63.87±6.89 |
| H/R+si-lncRNA NEAT1 组 | 1.39±0.12 ^b | 7.64±0.95 ^b | 797.15±82.86 ^b | 581.64±63.15 ^b | 83.54±8.31 ^b |
| <i>F</i> | 105.347 | 324.752 | 200.040 | 127.735 | 73.203 |
| <i>P</i> | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

a 为 $P < 0.05$, 与空白组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R+si-Con 组比较。

2.3 沉默 lncRNA NEAT1 抑制 H/R 致心肌细胞凋亡

与空白组比较, H/R 组 H9c2 细胞 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达显著升高, 细胞凋亡率显著升高; 与 H/R+si-Con 组比较, H/R+si-lncRNA NEAT1 组 H9c2 细胞 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达显著降低, 细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$, 图 1)。

2.4 lncRNA NEAT1 靶向 miR-206 调控其表达

利用 DINAN 进行靶基因预测发现 miR-206 和 lncRNA NEAT1 之间存在部分连续结合的核苷酸序列(图 2A)。双荧光素酶报告基因实验显示, 上调 miR-206 表达可降低转染 WT-lncRNA NEAT1 的 H9c2 细胞的荧光素酶活性($P < 0.05$)但对转染 MUT-lncRNA NEAT1 的 H9c2 细胞的荧光素酶活性无显著影响(图 2B)。RT-qPCR 检测显示, 与 si-Con 组比较, si-lncRNA NEAT1 组 H9c2 细胞 miR-206 的表达显著升高; 与 pcDNA 组比较, pcDNA-lncRNA NEAT1 组 H9c2 细胞 miR-206 的表达显著降低($P <$

2.2 沉默 lncRNA NEAT1 对 H/R 致心肌细胞氧化应激和细胞存活的影响

与空白组比较, H/R 组 H9c2 细胞 lncRNA NEAT1 的表达显著升高, 细胞中 MDA 含量和 ROS 水平显著升高, 细胞培养液中 LDH 活性显著升高, 细胞存活率显著降低; 相较于 H/R+si-Con 组, H/R+si-lncRNA NEAT1 组 H9c2 细胞 lncRNA NEAT1 的表达显著降低, 细胞中 MDA 含量和 ROS 水平显著降低, 细胞培养液中 LDH 活性显著降低, 细胞存活率显著升高($P < 0.05$, 表 2)。

0.05, 图 2C)。提示, lncRNA NEAT1 靶向 miR-206 并负调控 miR-206 表达。

2.5 过表达 miR-206 抑制 H/R 致心肌细胞氧化应激和细胞凋亡

与 H/R+miR-Con 组比较, H/R+miR-206 组 H9c2 细胞 miR-206 的表达显著升高, 细胞中 MDA 和 ROS 含量显著降低, 细胞培养液中 LDH 活性显著降低, 细胞存活率显著升高, cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达显著降低, 细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$, 图 3)。

2.6 抑制 miR-206 部分逆转沉默 lncRNA NEAT1 对 H/R 致心肌细胞的保护作用

与 H/R+si-lncRNA NEAT1+anti-miR-Con 组比较, H/R+si-lncRNA NEAT1+anti-miR-206 组 H9c2 细胞 miR-206 的表达显著降低, 细胞中 MDA 和 ROS 含量显著升高, 细胞培养液中 LDH 活性显著升高, 细胞存活率显著降低, cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达显著升高, 细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$, 图 4)。

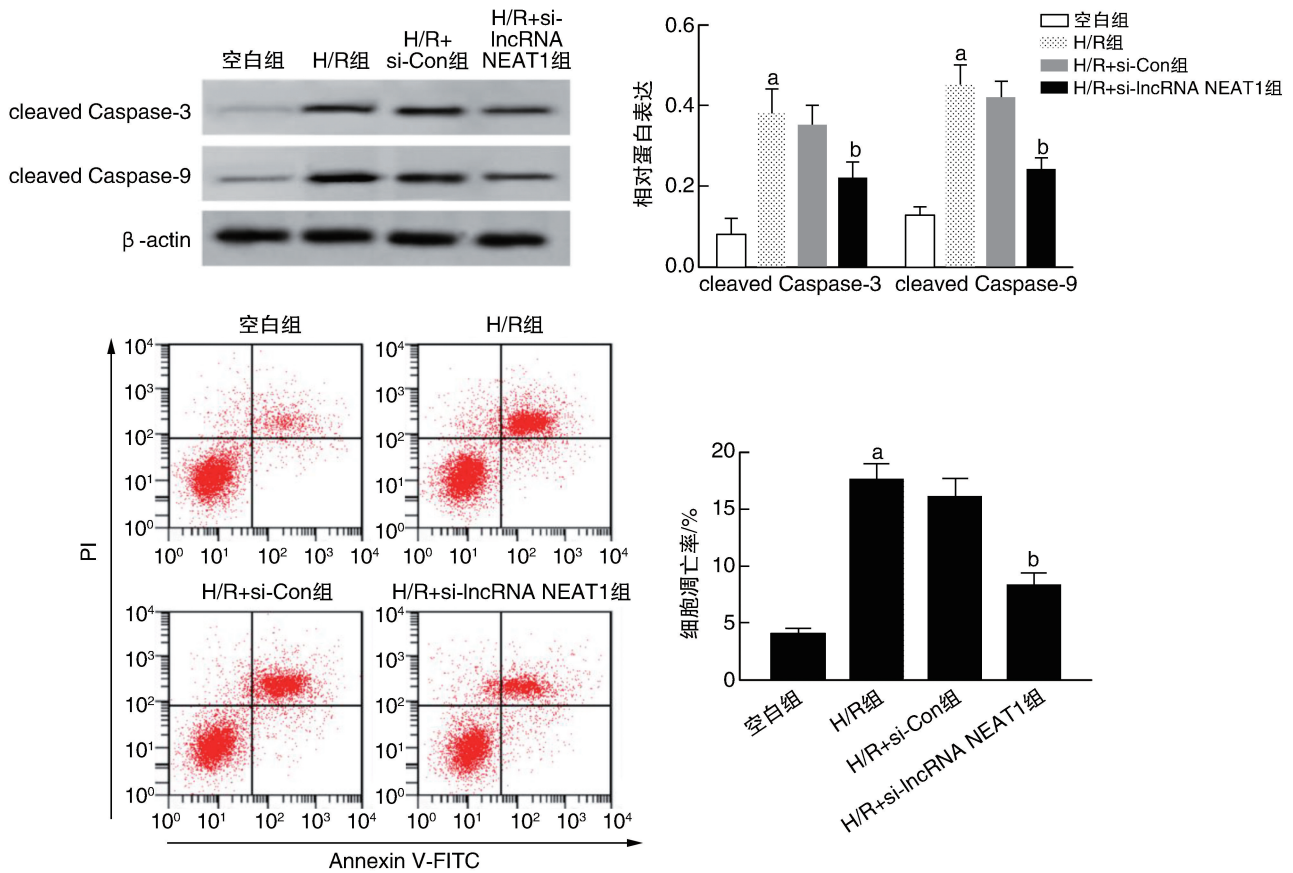


图 1. 沉默 lncRNA NEAT1 对 H/R 致心肌细胞 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白表达 (上图) 及细胞凋亡 (下图) 的影响 a 为 $P < 0.05$, 与空白组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R+si-Con 组比较。

Figure 1. Effect of silencing lncRNA NEAT1 on expression of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 proteins (top) and cell apoptosis (bottom) in cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation

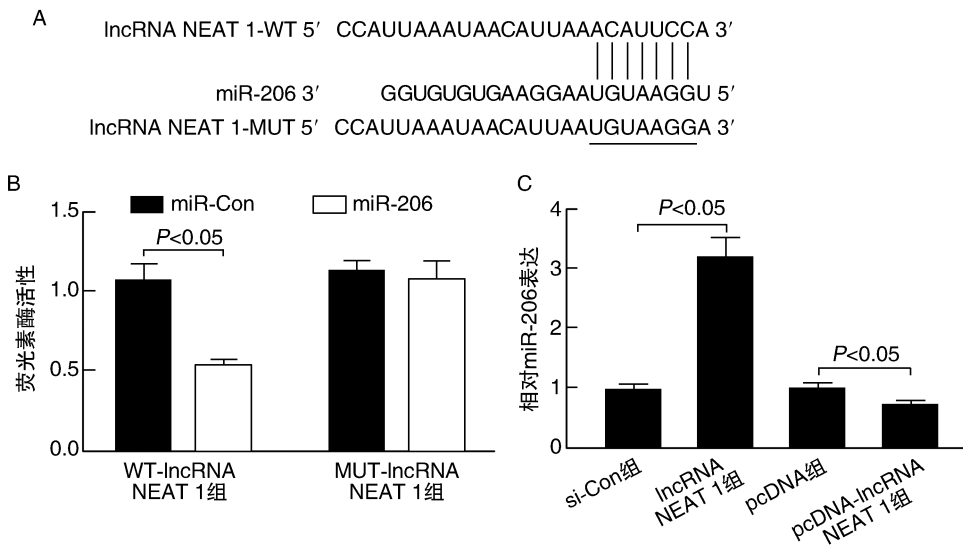


图 2. lncRNA NEAT1 靶向负性调控 miR-206 表达 A 为 NEAT1 和 miR-206 的互补序列; B 为荧光素酶活性检测; C 为相对 miR-206 的表达。

Figure 2. lncRNA NEAT1 targets and negatively regulates miR-206 expression

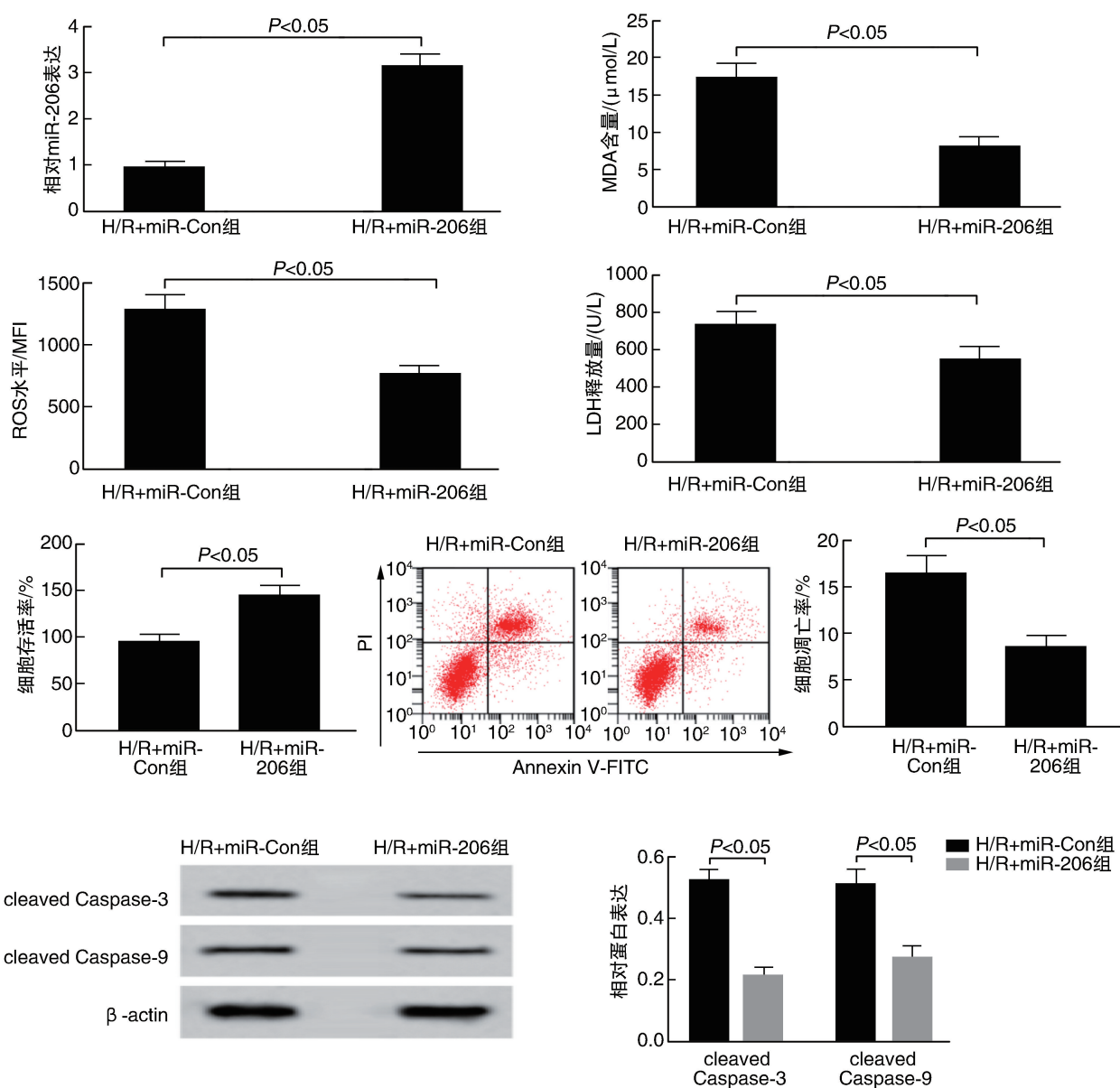


图 3. 过表达 miR-206 对 H/R 致心肌细胞氧化应激、细胞存活、凋亡及 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白表达的影响

Figure 3. Effect of overexpressing miR-206 on oxidative stress, cell survival and apoptosis, and expression of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 proteins induced by hypoxia/reoxygenation in cardiomyocytes

3 讨论

血流恢复再灌注治疗是缺血性心脏病的主要治疗手段,然而再灌注会导致缺血心肌的额外损伤。心肌细胞氧化应激损伤和凋亡是 I/R 损伤进展的关键,减轻心肌细胞氧化应激损伤和凋亡对防治心肌 I/R 损伤意义重大。

Du 等^[7]研究发现, lncRNA NEAT1 在心肌 I/R 损伤模型小鼠以及 H/R 心肌细胞中显著升高,下调其表达通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路降低肌钙蛋白

和肌酸激酶水平以及 LDH 的释放,减少心肌细胞凋亡进而保护心肌免受 I/R 损伤。lncRNA NEAT1 在 I/R 糖尿病大鼠心肌组织中也呈高表达,其高表达可促进血清心肌酶的产生,促进心肌细胞凋亡和自噬,增加心肌梗死面积,加重糖尿病大鼠心肌 I/R 损伤^[5]。与上述研究结论一致,本研究显示 H/R 诱导后 H9c2 细胞 lncRNA NEAT1 的表达显著升高,心肌细胞存活率显著降低,凋亡率显著增加。采用 RNA 干扰技术沉默 lncRNA NEAT1 后, H9c2 细胞存活率显著升高,细胞凋亡率显著降低。Caspase 是一类与凋亡密切相关的蛋白水解酶家族,其活化是细胞凋

亡的中心环节。cleaved Caspase-9 是线粒体细胞凋亡途径的启动者,其激活通过一系列级联反应导致细胞凋亡执行蛋白 cleaved Caspase-3 的激活,诱导细胞凋亡^[8-9]。本研究显示沉默 lncRNA NEAT1 可抑制 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达,与功能分析实验结果一致。ROS 的产生和消除失衡引起的氧化损伤是心肌细胞损伤的一个重要因素,当 ROS 过量产生超出心肌细胞的抗氧化防御系统,ROS 积累最终导致心肌损伤,导致膜脂过

氧化终产物 MDA 产生,抑制心脏功能恢复^[10]。心肌损伤时,培养液中 LDH 释放增加,这是反应心肌细胞损伤程度的重要指标^[11]。本研究显示 H/R 诱导后 H9c2 细胞中 ROS 水平以及 MDA 含量显著升高,培养液中 LDH 活性显著升高,而沉默 lncRNA NEAT1 可减轻 H/R 处理对 H9c2 细胞 ROS、MDA 水平以及 LDH 活性的影响。以上研究表明沉默 lncRNA NEAT1 可降低心肌细胞氧化应激损伤,抑制细胞凋亡,对 H/R 心肌细胞损伤具有保护作用。

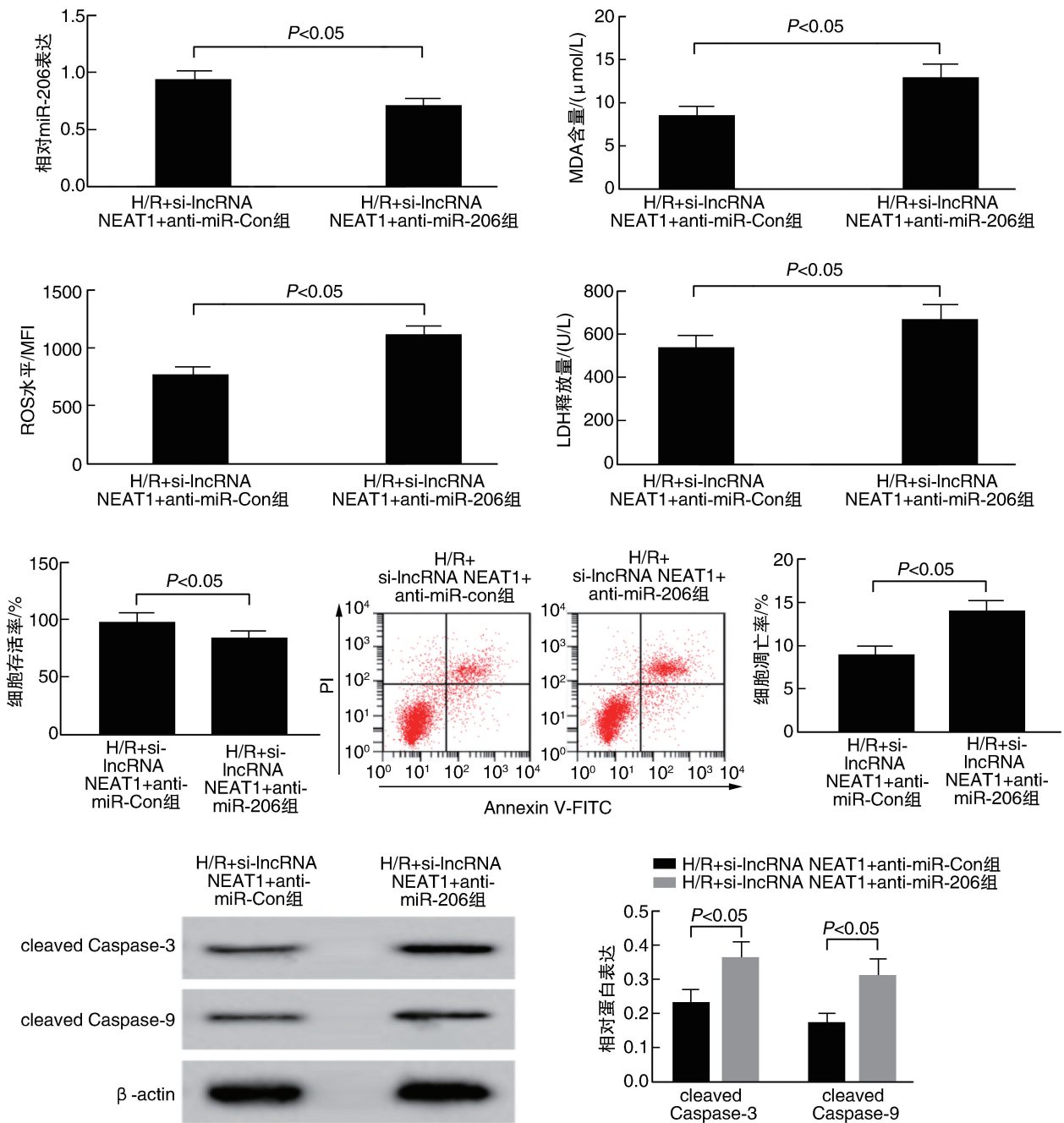


图 4. 抑制 miR-206 部分逆转沉默 lncRNA NEAT1 对 H/R 致心肌细胞的保护作用

Figure 4. Inhibition of miR-206 partially reverses the protective effect of silencing lncRNA NEAT1 on cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation

lncRNA 发挥 miRNA 分子海绵作用是其参与心肌 I/R 损伤调控的重要机制^[12-13]。为探究 NEAT1 在心肌细胞 I/R 损伤中的作用机制,采用 DINAN 进行靶基因预测发现 miR-206 与 NEAT1 之间存在结合位点,并通过双荧光素酶报告基因实验、RT-qPCR 证实 NEAT1 对 miR-206 靶向负性调控作用。miR-206 是一种肌源性 miRNA,在心脏发育和心血管疾病中发挥重要作用。循环 miR-206 水平可预测左心疾病患者肺动脉高压的严重程度^[14]。miR-206 还参与 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)诱导的心肌肥大和心肌细胞存活^[15]。miR-206 过表达还会导致实验小鼠心率和 PR 间期异常,缩短寿命^[16]。Ding 等^[17]研究显示 miR-206 通过抑制自噬相关基因表达,抑制细胞自噬和凋亡,减轻心脏损伤。本研究显示,H/R 诱导后 H9c2 细胞中 miR-206 的表达水平显著降低。过表达 miR-206 可促进细胞存活,抑制细胞凋亡,降低 ROS、MDA 水平以及 LDH 活性,减轻 H/R 诱导的 H9c2 细胞氧化应激损伤和凋亡。此外,抑制 miR-206 表达还可部分逆转 lncRNA NEAT1 对 H/R 诱导后 H9c2 细胞氧化应激损伤和凋亡的保护作用。提示,沉默 lncRNA NEAT1 通过上调 miR-206 表达对 H/R 诱导后心肌细胞损伤和凋亡发挥保护作用。

综上所述,H/R 诱导后心肌细胞中 lncRNA NEAT1 的表达显著增加,miR-206 的表达显著降低。沉默 lncRNA NEAT1 通过靶向 miR-206 可抑制 H/R 诱导的心肌细胞氧化应激损伤和凋亡。因此,lncRNA NEAT1/miR-206 分子轴有望成为防治缺血性心脏病 I/R 损伤的新靶点。

[参考文献]

- [1] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [2] Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, et al. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 78(2): 23-34.
- [3] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs [J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6): 904-914.
- [4] Wu HJ, Tang GM, Shao PY, et al. Long non-coding RNA NEAT1 modulates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury via targeting microRNA-520a [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(3): 2199-2206.
- [5] Ma M, Hui J, Zhang QY, et al. Long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1 inhibition blunts myocardial ischemia reperfusion injury via autophagic flux arrest and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 277(1): 113-122.
- [6] Zhai C, Qian Q, Tang G, et al. microRNA-206 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by targeting Gadd45 β [J]. *Mol Cells*, 2017, 40(12): 916-924.
- [7] Du XJ, Wei J, Tian D, et al. NEAT1 promotes myocardial ischemia-reperfusion injury via activating the MAPK signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18773-18780.
- [8] Wen X, Lin ZQ, Liu B, et al. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer [J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(3): 217-224.
- [9] 韩坤, 王丹萍, 袁磊. 胡芦巴碱对缺氧/复氧乳鼠心肌细胞的保护作用 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(31): 4333-4335.
- [10] Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117(3): 76-89.
- [11] 李雪惠, 张阳, 吉世禹, 等. 红参对 H₂O₂ 诱导 H9c2 大鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. *吉林中医药*, 2019, 39(6): 772-776.
- [12] Xiong W, Qu Y, Chen H, et al. Insight into long noncoding RNA-miRNA-mRNA axes in myocardial ischemia-reperfusion injury: the implications for mechanism and therapy [J]. *Epigenomics*, 2019, 11(15): 1733-1748.
- [13] Chen J, Hu Q, Zhang BF, et al. Long noncoding RNA UCA1 inhibits ischemia/reperfusion injury induced cardiomyocytes apoptosis via suppression of endoplasmic reticulum stress [J]. *Genes Genomics*, 2019, 41(7): 803-810.
- [14] Jin P, Gu W, Lai Y, et al. The circulating microRNA-206 level predicts the severity of pulmonary hypertension in patients with left heart diseases [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(6): 2150-2160.
- [15] Yang Y, Del Re DP, Nakano N, et al. miR-206 mediates YAP-induced cardiac hypertrophy and survival [J]. *Circ Res*, 2015, 117(10): 891-904.
- [16] Jin Y, Zhou TY, Cao JN, et al. microRNA-206 downregulates connexin43 in cardiomyocytes to induce cardiac arrhythmias in a transgenic mouse model [J]. *Heart Lung Circ*, 2019, 28(11): 1755-1761.
- [17] Ding S, Abudupataer M, Zhou Z, et al. Histamine deficiency aggravates cardiac injury through miR-206/216b-Atg13 axis-mediated autophagic-dependant apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 694-704.

(此文编辑 许雪梅)