

本文引用: 孟宪杰, 刘蕊, 曹丽慧, 等. 长链非编码 RNA MIAT 在 2 型糖尿病合并冠心病患者血清中的水平及对高糖诱导的心肌细胞损伤的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(6): 481-490. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.06.004.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-06-0481-10

· 临床研究 ·

长链非编码 RNA MIAT 在 2 型糖尿病合并冠心病患者血清中的水平及对高糖诱导的心肌细胞损伤的影响

孟宪杰¹, 刘蕊², 曹丽慧³, 马宁³, 刘肖¹

(唐山市人民医院 1. 内分泌科, 2. 急诊科, 3. 心内科, 河北省唐山市 063000)

[摘要] **[目的]** 探讨长链非编码 RNA 心肌梗死相关转录本(lncRNA MIAT)在 2 型糖尿病(T2DM)合并冠心病(CHD)患者中的血清水平及其对高糖(HG)诱导的心肌细胞损伤的影响。**[方法]** 选取 2021 年 6 月—12 月于唐山市人民医院就诊的 100 例单纯 T2DM 患者作为 T2DM 组, 100 例单纯冠心病(CHD)患者作为 CHD 组, 100 例 T2DM 合并 CHD 患者作为 T2DM+CHD 组, 另外选取 100 例健康人群作为对照组。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测血液 MIAT、microRNA-150-5p(miR-150-5p)的水平。体外培养人心肌细胞系 AC16 细胞, 分为 NG 组(5.5 mmol/L 正常葡萄糖)、HG 组(30 mmol/L 高葡萄糖)、HG+MIAT 敲低阴性对照(HG+si-NC)组、HG+MIAT 敲低(HG+si-MIAT)组、HG+si-MIAT+miR-150-5p 抑制剂阴性对照(HG+si-MIAT+anti-NC)组、HG+si-MIAT+miR-150-5p 抑制剂(HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p)组, RT-qPCR 检测细胞中 MIAT 和 miR-150-5p 的表达情况; MTT 法检测细胞增殖活性; 流式细胞术检测细胞凋亡; ELISA 法检测乳酸脱氢酶(LDH)含量, Western blot 检测细胞周期蛋白 D2(CCND2)、B 淋巴细胞瘤 2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、剪切的 Caspase-3(cleaved Caspase-3)的蛋白表达, 双荧光素酶报告基因、RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)和 RNA pull down 分析 miR-150-5p 与 MIAT、CCND2 的靶向关系。**[结果]** 与对照组、CHD 组、T2DM 组相比, T2DM+CHD 组 MIAT 表达水平显著升高, 分别增加了 2.69 倍、1.71 倍、1.42 倍(均 $P < 0.05$), miR-150-5p 的表达显著降低, 分别降低了 68.63%、60.49%、46.67%(均 $P < 0.05$); 相关性分析结果显示, T2DM+CHD 患者中 MIAT 与 miR-150-5p 的表达水平呈负相关($r = -0.662, P < 0.001$)。与 NG 组相比, HG 组 AC16 细胞中 MIAT 的表达增加了 3.54 倍, 细胞凋亡率、LDH 含量、Bax 蛋白水平和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值分别增加了 5.22 倍、2.19 倍、2.90 倍和 3.83 倍, miR-150-5p 表达降低了 75.00%, 细胞增殖活性在 24、48、72 h 时分别降低了 49.02%、52.38%、49.48%, CCND2 和 Bcl-2 蛋白水平分别降低了 72.62% 和 78.26%(均 $P < 0.05$); 敲低 MIAT 使 miR-150-5p 表达增加了 3.46 倍, 减轻 HG 诱导的 AC16 细胞损伤并使细胞凋亡率降低了 65.73%(均 $P < 0.05$); 抑制 miR-150-5p 可显著减弱敲低 MIAT 对 HG 诱导的 AC16 细胞损伤的影响($P < 0.05$); MIAT 靶向负调节 miR-150-5p 表达, CCND2 是 miR-150-5p 的靶基因。**[结论]** T2DM 合并 CHD 患者血清 MIAT 水平升高; MIAT 敲低可能通过调节 miR-150-5p 来拮抗 HG 诱导的人心肌细胞的损伤。

[关键词] 冠心病; 2 型糖尿病; 心肌梗死相关转录本; microRNA-150-5p; 心肌细胞

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Serum levels of long non-coding RNA MIAT in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease and its effect on high glucose-induced cardiomyocyte injury

MENG Xianjie¹, LIU Rui², CAO Lihui³, MA Ning³, LIU Xiao¹

(1. Department of Endocrinology, 2. Department of Emergency, 3. Department of Cardiology, Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the serum level of long non-coding RNA myocardial infarction-associated transcript (lncRNA MIAT) in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and coronary heart disease (CHD) and its effect on high glucose (HG)-induced myocardial cell injury. **Methods** From June 2021 to December 2021, 100 patients

[收稿日期] 2022-09-21

[修回日期] 2023-01-10

[基金项目] 河北省医学科学研究课题计划(20221812)

[作者简介] 孟宪杰, 副主任医师, 主要从事冠心病合并糖尿病研究, E-mail: 412805412@qq.com。

with uncomplicated T2DM who visited Tangshan People's Hospital were regarded as the T2DM group, 100 patients with uncomplicated coronary heart disease (CHD) were regarded as the CHD group, and 100 T2DM patients with CHD were selected as T2DM+CHD group, in addition, 100 healthy people were regarded as the control group. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was applied to detect the levels of blood MIAT and microRNA-150-5p (miR-150-5p). The human cardiomyocyte line AC16 cells were cultured *in vitro* and grouped into NG group (5.5 mmol/L normal glucose), HG group (30 mmol/L high glucose), HG+MIAT knockdown negative control (HG+si-NC) group, HG+MIAT knockdown (HG+si-MIAT) group, HG+si-MIAT+miR-150-5p inhibitor negative control (HG+si-MIAT+anti-NC) group, and HG+si-MIAT+miR-150-5p inhibitor (HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p) group. RT-qPCR was performed to detect the expression of MIAT and miR-150-5p in cells; MTT assay was performed to detect cell proliferation viability; Flow cytometry was performed to detect apoptosis; ELISA method was implemented to detect lactate dehydrogenase (LDH) content; Western blot was performed to detect protein expressions of cyclin D2 (CCND2), B cell-lymphoma-2 gene (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cysteine protease-3 (Caspase-3), cleaved Caspase-3; Dual-luciferase reporter, RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) and RNA pull down were performed to analyze the targeting relationship of miR-150-5p to MIAT and CCND2.

Results Compared with control group, CHD group and T2DM group, the expression level of MIAT was obviously increased in T2DM+CHD group by 2.69 times, 1.71 times and 1.42 times ($P < 0.05$), and the expression of miR-150-5p was obviously decreased by 68.63%, 60.49% and 46.67% ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that the expression level of MIAT were negatively correlated with miR-150-5p in T2DM+CHD patients ($r = -0.662$, $P < 0.001$). Compared with NG group, MIAT expression in AC16 cells was increased in HG group by 3.54 times, cell apoptosis rate, LDH activity, Bax protein level, and cleaved Caspase-3/Caspase-3 ratio were increased by 5.22 times, 2.19 times, 2.90 times, and 3.83 times, respectively; The expression of miR-150-5p was decreased by 75.00%, and the proliferative activity of cells at 24, 48 and 72 h was decreased by 49.02%, 52.38%, 49.48%, and the protein levels of CCND2 and Bcl-2 were decreased by 72.62% and 78.26%, respectively (all $P < 0.05$). MIAT knockdown increased the expression of miR-150-5p by 3.46 times, alleviated HG-induced AC16 cell damage and reduced cell apoptosis by 65.73% (all $P < 0.05$); Inhibition of miR-150-5p significantly weakened the effect of MIAT knockdown on HG-induced AC16 cell damage ($P < 0.05$). MIAT targeted and negatively regulated miR-150-5p expression, and CCND2 was a target gene of miR-150-5p.

Conclusion Serum MIAT level increased in T2DM patients with CHD. MIAT knockdown may antagonize HG-induced human cardiomyocyte injury by regulating miR-150-5p.

[**KEY WORDS**] coronary heart disease; type 2 diabetes mellitus; myocardial infarction-related transcript; microRNA-150-5p; cardiomyocyte

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是世界上常见的代谢性疾病之一。由于发病率和死亡率的上升,它已成为一个全球性的健康问题。长期的糖代谢异常会引起血脂、水电解质代谢紊乱,对心血管系统造成损伤^[1-2]。据报道,T2DM患者合并冠心病(coronary heart disease, CHD)的发病风险是非糖尿病人群的3~5倍^[3],且CHD是T2DM患者死亡的主要原因^[4]。目前,关于T2DM合并CHD的病理生理机制还未完全阐明,探究预测其发生的生物标志物有着重要意义。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)参与CHD和T2DM的发病机制,具有作为诊断生物标志物的潜力^[5-6]。已有证据表明lncRNA心肌梗死相关转录本(myocardial infarction-related transcript, MIAT)在CHD患者和T2DM患者的外周血中水平升高,具有临床诊断意义^[7-8],可作为预测T2DM合并CHD的生物标志物^[9]。然而,MIAT参与T2DM合并CHD的发病机制尚不清楚。

lncRNA通过抑制microRNA(miRNA)调节mRNA的合成来影响基因表达。microRNA-150-5p(miR-150-5p)参与多种心血管疾病的发生和发展过程,与CHD患者的心血管死亡风险增加相关^[10-11]。据报道,敲低MIAT可通过靶向上调miR-150-5p来改善糖尿病视网膜病变^[12]。此外,在高葡萄糖(high glucose, HG)处理的心肌细胞中miR-150-5p可通过靶向上调细胞周期蛋白D2(cyclin D2, CCND2)调节心肌细胞的增殖,增强心肌修复,改善糖尿病心肌病^[13]。生物信息学分析预测显示MIAT具有miR-150-5p的潜在结合位点,并且CCND2是miR-150-5p的靶基因。基于以上研究,笔者推测MIAT可能通过miR-150-5p参与T2DM合并CHD的发病进展。因此,本研究检测了MIAT、miR-150-5p在T2DM合并CHD患者外周血中的水平,探索MIAT和miR-150-5p之间的相互作用,阐明MIAT的可能作用机制。

1 资料和方法

1.1 临床样本

选取 2021 年 6 月—12 月期间接受冠状动脉造影 (coronary angiography, CAG) 和口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 以确定是否存在 CHD 和/或 T2DM 的 400 例患者。其中 100 例为在医院进行体检的健康受试者设为对照组, CHD 患者 100 例为 CHD 组, T2DM 患者 100 例为 T2DM 组, T2DM 合并 CHD 患者 100 例为 T2DM+CHD 组。从参与者肘正中静脉采集空腹静脉血 6 mL, 4 °C、1 000×g 离心 10 min, 收集血清并在 -80 °C 保存备用。

T2DM 诊断标准^[14]: 当满足以下标准之一时, 诊断为 T2DM。(1) 空腹血糖 ≥ 6.9 mmol/L; (2) OGTT 期间 2 h 后血糖 ≥ 11.1 mmol/L。排除标准: (1) 肝或肾功能不全; (2) 自身免疫性疾病; (3) 恶性肿瘤; (4) 任何其他临床急性或慢性炎症性全身性疾病; (5) 不受控制的高血压; (6) 除 T2DM 外, 其他内分泌疾病; (7) 有急性心肌梗死、经皮冠状动脉介入治疗或冠状动脉旁路移植术病史。

1.2 主要试剂与仪器

MIAT 小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) (MIAT siRNA, si-MIAT) 和 siRNA 阴性对照 (si-NC) 购自上海 GenePharma 公司; miR-150-5p mimic 和 miR-150-5p inhibitor 及相应的阴性对照 (miR-NC, inhibitor-NC) 购自广州 RiboBio 公司; MTT 细胞增殖/毒性检测试剂盒 (C0009S)、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC)/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡检测试剂盒 (C1062S) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 兔源一抗 CCND2 (#3741)、B 淋巴细胞瘤 2 基因 (B cell-lymphoma-2 gene, Bcl-2) (#4223)、

Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) (#2772) 和半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) (#9662)、剪切的 Caspase-3 (cleaved Caspase-3) (#9661) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。ABI Prism® 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); UV-1600PC 紫外/可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司); iMark680 多功能酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司); Eclipse Ti-S 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司)。

1.3 细胞培养

人心肌细胞系 AC16 细胞 (上海酶研生物科技有限公司, A3137) 在含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中于 37 °C 和 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。细胞每 2~3 天传代一次, 用于后续实验。将 AC16 细胞分为两组: (1) 正常葡萄糖 (NG) 组: 细胞在正常葡萄糖浓度 (5.5 mmol/L) 下孵育; (2) HG 组: 细胞在高葡萄糖浓度 (30 mmol/L) 下孵育, 直至约 70%~80% 的融合^[15]。

1.4 RT-qPCR 检测血清/细胞中 MIAT 和 miR-150-5p 水平

使用 TRIzol 试剂提取参与者血清或 AC16 细胞的总 RNA。使用分光光度计评估 RNA 纯度。随后, 使用 PrimeScript™ RT 试剂盒 (RR047A; TaKaRa) 将总 RNA 反转录为 cDNA。使用 SYBR Green PCR Master Mix 在 ABI Prism® 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行 RT-qPCR。热循环条件: 95 °C 初变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环。使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算靶基因的相对表达量, GAPDH 和 U6 为内参基因。引物序列见表 1。

表 1. 引物序列

Table 1. Primers sequence

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
MIAT	TACTCCCTCCTCACCTGCTC	CCATCCTTGTTCCTGTCCCC
miR-150-5p	TCTCCCAACCCTGTACC	GAATACCTCGGACCCTGC
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAA	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT	ACGCTTCACGAATTTGCGTGTG

1.5 细胞转染和分组

用 Lipofectamine 3000 在 37 °C 下转染 AC16 细胞 (2×10⁵ 个/mL) 24 h。将细胞分为 NG 组 (细胞在正常葡萄糖浓度下培养)、HG 组 (细胞在 30 mmol/L

葡萄糖浓度下培养)、HG + MIAT 敲低阴性对照 (HG+si-NC) 组 (用 50 nmol/L si-NC 转染细胞)、HG+MIAT 敲低 (HG+si-MIAT) 组 (用 50 nmol/L si-MIAT 转染细胞)、HG+si-MIAT+miR-150-5p 抑制剂

的阴性对照(HG+si-MIAT+anti-NC)组(用50 nmol/L si-MIAT和inhibitor-NC共转染细胞)、HG+si-MIAT+miR-150-5p抑制剂(HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p)组(用50 nmol/L si-MIAT和miR-150-5p inhibitor共转染细胞)。转染后24 h,对细胞进行HG处理24 h。通过RT-qPCR检测各组细胞中MIAT和miR-150-5p的表达。

1.6 MTT法检测细胞增殖活性

将转染后的各组细胞接种在96孔板中(5000个/孔),在HG条件下培养24、48和72 h后,将培养基更换为含有20 μ L MTT(5 g/L)的新鲜培养基。孵育4 h后,加入150 μ L DMSO将甲臞晶体溶解,然后使用酶标仪记录每个孔在570 nm处的吸光度(A)值。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组细胞,用冷PBS洗涤2次,重悬于100 μ L结合缓冲液中,然后用10 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI在黑暗中染色10 min。最后,在1 h内用流式细胞仪分析凋亡细胞,凋亡率以细胞百分比表示。

1.8 ELISA法检测乳酸脱氢酶含量

各组细胞培养基于4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g离心10 min,取上清。用ELISA试剂盒检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)含量。

1.9 Western blot检测CCND2、Bcl-2、Bax和Caspase-3、cleaved Caspase-3蛋白表达

使用RIPA蛋白提取试剂裂解AC16细胞,取细胞中的总蛋白质。通过SDS-PAGE分离等量的总蛋白并转移到PVDF膜上。然后将膜封闭并在4 $^{\circ}$ C下与一抗[CCND2(1:1 000)、Bax(1:500)、Bcl-2(1:1 000)、cleaved Caspase-3(1:500)、Caspase-3(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)]孵育过夜。随后,将膜与HRP偶联的二抗在室温下孵育1 h。使用增强的化学发光试剂盒观察蛋白条带。Image J软件测定蛋白条带的灰度值,GAPDH作内参。

1.10 亚细胞分布分析

使用PARIS试剂盒提取细胞质和核RNA,然后进行RT-qPCR,检查细胞质和细胞核中的MIAT水平。U6和GAPDH分别作为细胞核和细胞质的内参。

1.11 双荧光素酶报告基因检测

采用双荧光素酶报告基因检测和在线数据库StarBase v2.0(<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)预测miR-150-5p与MIAT的结合位点,以及miR-150-5p是否可以与CCND2结合。根据预测的结合位点设计和合成野生型(wt-MIAT和wt-CCND2)和突变型

(mut-MIAT和mut-CCND2)序列,将序列插入荧光素酶报告载体(pGL3-Basic)。AC16细胞在24孔板中培养并达到80%融合。然后,使用Lipofectamine 3000将wt-MIAT、mut-MIAT或wt-CCND2、mut-CCND2质粒与miR-150-5p mimic或miR-NC共转染到细胞中。48 h后,使用双荧光素酶报告分析系统检测荧光素酶活性,并将每个转染细胞样品的萤火虫荧光素酶活性标准化为海肾荧光素酶活性。

1.12 RNA结合蛋白免疫沉淀分析

使用RIPA裂解缓冲液裂解AC16细胞。将细胞提取物与结合有Ago2抗体或免疫球蛋白G抗体(IgG)的磁珠一起温育。IgG抗体为阴性对照。然后,蛋白酶K用于消化蛋白质。随后,使用TRIzol试剂提取免疫共沉淀的RNA,利用RT-qPCR检测MIAT与miR-150-5p的水平。

1.13 RNA pull down分析

为检测MIAT是否可以与miR-150-5p结合,将生物素化野生型miR-150-5p(Bio-wt-miR-150-5p)、生物素化突变体miR-150-5p(Bio-mut-miR-150-5p)或生物素化阴性对照(Bio-miR-NC)转染到AC16细胞中。转染48 h后,取出心肌细胞并裂解。随后,将M-28链霉亲和素磁珠添加到细胞裂解物中,在4 $^{\circ}$ C下孵育3 h以分离生物素偶联的RNA复合物。洗涤和富集珠/RNA复合物后,使用RT-qPCR法分析结合的RNA。

1.14 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间差异采用单因素方差分析,多重比较采用SNK- q 检验。Pearson相关用于评估MIAT表达与miR-150-5p的相关性。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究人群的临床特征比较

四组研究人群在性别、年龄、体质指数(body mass index, BMI)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)以及血清肌酐(serum creatinine, SCr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)方面无统计学差异($P>$

0.05)。与对照组相比,T2DM 组、T2DM+CHD 组患者的空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)、糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin,HbA1c)、甘油三酯(triglyceride,TG)水平分别增加了 1.66 倍、1.76 倍、1.70 倍和 1.63 倍、1.12 倍、1.14 倍(均 $P<0.05$);与对照组相比,CHD 组患者的 TG 水平增加了 1.09

倍($P<0.05$)。与 CHD 组相比,T2DM+CHD 组患者的 FBG、HbA1c、TG 水平分别增加了 1.81 倍、1.58 倍、1.05 倍(均 $P<0.05$)。与 T2DM 组相比,T2DM+CHD 组患者的糖尿病持续时间、FBG 水平分别增加了 2.00 倍、1.06 倍,HbA1c 水平降低了 3.79% (均 $P<0.05$;表 2)。

表 2. 研究人群的临床特征

Table 2. Clinical characteristics of the study population

临床资料	对照组($n=100$)	CHD 组($n=100$)	T2DM 组($n=100$)	T2DM+CHD 组($n=100$)	P
男性/[例(%)]	49(49.00)	52(52.00)	45(45.00)	55(55.00)	0.780
年龄/岁	58.89±6.74	57.37±6.30	59.76±6.55	65.84±6.91	0.080
糖尿病持续时间/年			6(1,12)	12(6,16) ^c	<0.001
BMI/(kg/m ²)	24.58±2.60	24.35±2.71	23.89±2.40	24.72±2.53	0.112
SBP/mmHg	129.39±14.25	131.42±15.18	132.56±16.04	130.19±15.82	0.482
DBP/mmHg	76.45±8.08	76.36±9.21	77.50±8.59	76.14±9.80	0.711
FBG/(mmol/L)	5.40±0.59	5.27±0.64	8.96±0.87 ^{ab}	9.52±0.93 ^{abc}	<0.001
HbA1c/%	5.44±0.50	5.61±0.39	9.23±1.06 ^{ab}	8.88±1.34 ^{abc}	<0.001
TC/(mmol/L)	4.51±0.50	4.58±0.56	4.62±0.70	4.61±0.63	0.565
TG/(mmol/L)	1.53±0.18	1.67±0.20 ^a	1.72±0.21 ^a	1.75±0.22 ^{ab}	<0.001
HDLc/(mmol/L)	1.16±0.14	1.18±0.12	1.13±0.15	1.15±0.14	0.079
LDLc/(mmol/L)	2.35±0.27	2.37±0.30	2.40±0.26	2.41±0.28	0.401
SCr/(μmol/L)	63.82±9.01	62.17±10.35	65.40±9.28	62.50±9.10	0.066
BUN/(nmol/L)	5.53±0.61	5.46±0.66	5.58±0.78	5.49±0.69	0.634
ALT/(U/L)	22.02±4.15	21.99±3.80	23.19±4.06	22.83±4.21	0.090
AST/(U/L)	22.70±3.42	21.38±2.95	22.26±3.28	22.45±3.30	0.104

注:空白表示不适用。a 为 $P<0.05$,与对照组相比;b 为 $P<0.05$,与 CHD 组相比;c 为 $P<0.05$,与 T2DM 组相比。

2.2 血清 MIAT 和 miR-150-5p 表达水平

与对照组相比,CHD 组、T2DM 组和 T2DM+CHD 组血清 MIAT 水平分别增加了 1.57 倍、1.90 倍、2.69 倍(均 $P<0.05$),miR-150-5p 的水平分别降低了 20.59%、41.18%、68.63% (均 $P<0.001$);且 T2DM+CHD 组 MIAT 血清水平较 CHD 组、T2DM 组分别增加了 1.71 倍、1.42 倍,miR-150-5p 的水平分别降低了 60.49%、46.67% (均 $P<0.001$ 图 1);Pearson 相关性分析结果显示,T2DM+CHD 组患者中 MIAT 的水平与 miR-150-5p 的水平呈负相关关系($r=-0.662,P<0.001$;图 2)。

2.3 敲低 MIAT 对 HG 诱导的 AC16 细胞中 miR-150-5p 表达的影响

与 NG 组相比,HG 组 MIAT 表达水平增加了 3.54 倍,miR-150-5p 表达水平降低了 75.00% (均 $P<0.05$);与 HG 组相比,HG+si-MIAT 组 MIAT 表达水

平降低了 58.94%,miR-150-5p 表达水平增加了 3.32 倍(均 $P<0.05$);与 HG+si-NC 组相比,HG+si-MIAT 组 MIAT 表达水平降低了 60.94%,miR-150-5p 表达水平增加了 3.46 倍(均 $P<0.05$);与 HG+si-MIAT 组相比,HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 miR-150-5p 表达水平降低了 51.81% ($P<0.05$);与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比,HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 miR-150-5p 表达水平降低了 53.49% ($P<0.05$;图 3)。

2.4 敲低 MIAT 对 HG 诱导的 AC16 细胞增殖活性的影响

与 NG 组相比,HG 组在 24、48、72 h 时 AC16 细胞增殖活性分别降低了 49.02%、52.38%、49.48% (均 $P<0.05$);与 HG 组相比,HG+si-MIAT 组 AC16 细胞增殖活性分别升高了 1.54 倍、1.63 倍、1.63 倍(均 $P<0.05$);与 HG+si-NC 组相比,HG+si-MIAT 组 AC16 细胞增殖活性分别升高了 1.60 倍、1.71 倍、

1.74 倍(均 $P < 0.05$);与 HG+si-MIAT 组相比, HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 AC16 细胞增殖活性分别降低了 22.50%、21.54%、25.00% (均 $P < 0.05$);与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比, HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 AC16 细胞增殖活性分别降低了 26.19%、20.31%、22.08% (均 $P < 0.05$;图 4)。

2.5 敲低 MIAT 对 HG 诱导的 AC16 细胞凋亡水平的影响

与 NG 组相比, HG 组 AC16 细胞凋亡率升高了 5.22 倍($P < 0.05$);与 HG 组相比, HG+si-MIAT 组 AC16 细胞凋亡率降低了 65.47% ($P < 0.05$);与 HG+si-NC 组相比, HG+si-MIAT 组 AC16 细胞凋亡率降低了 65.73% ($P < 0.05$);与 HG+si-MIAT 组相比,

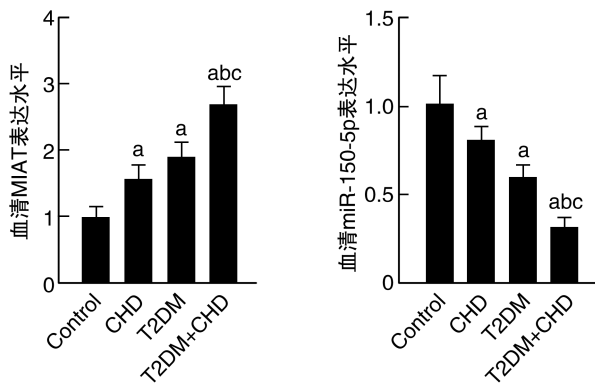


图 1. 血清中 MIAT 和 miR-150-5p 表达水平
a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 CHD 组相比;
c 为 $P < 0.05$, 与 T2DM 组相比。

Figure 1. Expression levels of MIAT and miR-150-5p in serum

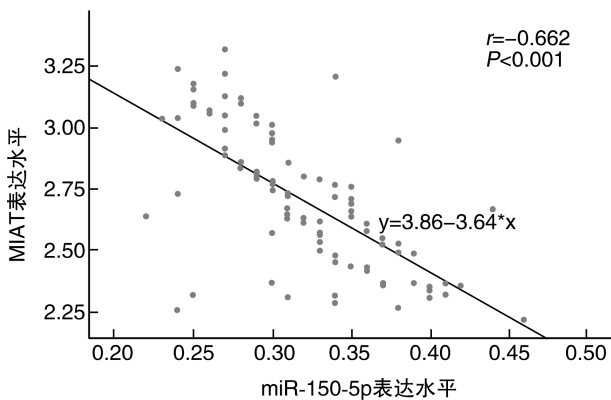


图 2. T2DM+CHD 患者中血清 MIAT 与 miR-150-5p 水平的相关性

Figure 2. Correlation between the expression levels of MIAT and miR-150-5p in T2DM+CHD patients

HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 AC16 细胞凋亡率增加了 2.13 倍($P < 0.05$);与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比, HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 AC16 细胞凋亡率增加了 2.16 倍($P < 0.05$;图 5)。

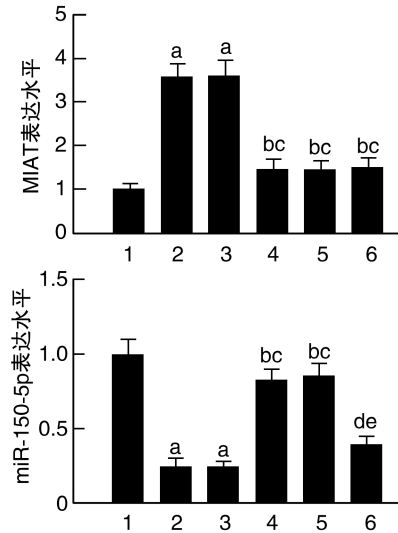


图 3. 各组 AC16 细胞中 MIAT 和 miR-150-5p 表达水平比较 ($n = 6$)

1 为 NG 组, 2 为 HG 组, 3 为 HG+si-NC 组, 4 为 HG+si-MIAT 组, 5 为 HG+si-MIAT+anti-NC 组, 6 为 HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组。a 为 $P < 0.05$, 与 NG 组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 HG 组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 HG+si-NC 组相比; d 为 $P < 0.05$, 与 HG+si-MIAT 组相比; e 为 $P < 0.05$, 与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比。

Figure 3. Comparison of MIAT and miR-150-5p expression levels in AC16 cells in each group ($n = 6$)

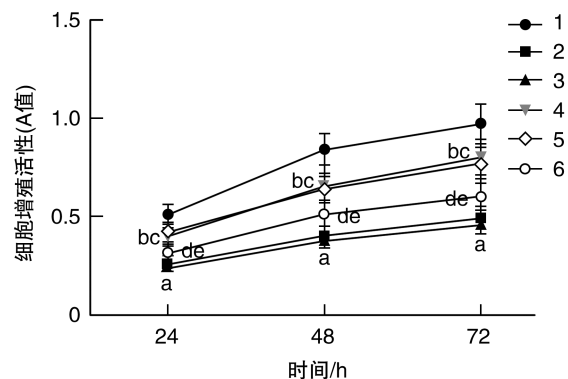


图 4. 各组 AC16 细胞增殖活性比较 ($n = 6$)

1 为 NG 组, 2 为 HG 组, 3 为 HG+si-NC 组, 4 为 HG+si-MIAT 组, 5 为 HG+si-MIAT+anti-NC 组, 6 为 HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组。a 为 $P < 0.05$, 与 NG 组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 HG 组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 HG+si-NC 组相比; d 为 $P < 0.05$, 与 HG+si-MIAT 组相比; e 为 $P < 0.05$, 与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比。

Figure 4. Comparison of proliferation activity of AC16 cells in each group ($n = 6$)

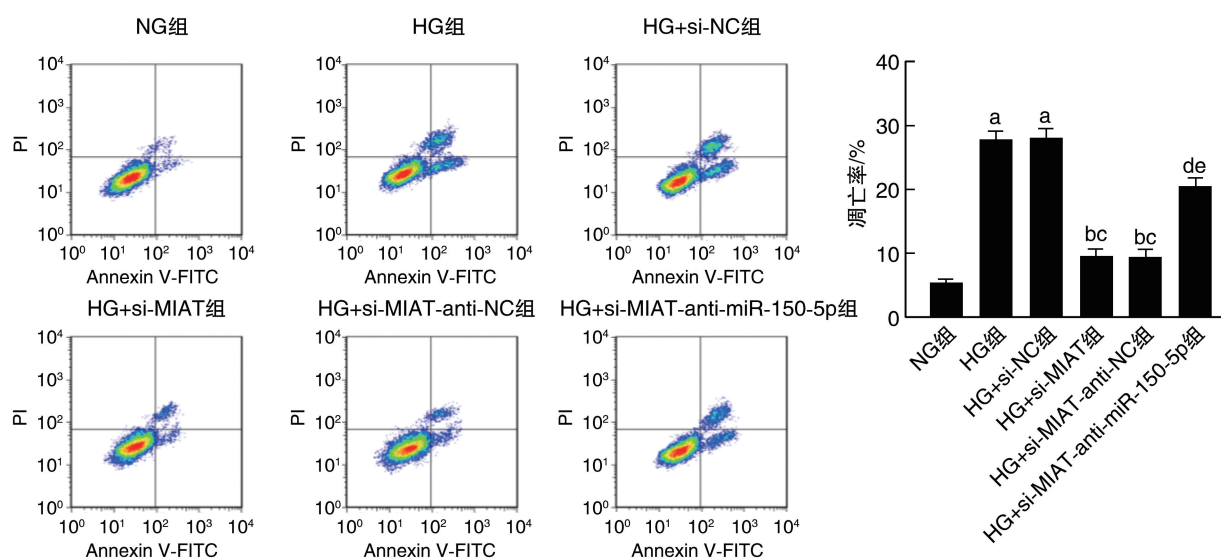


图 5. 流式细胞术检测各组 AC16 细胞凋亡水平 ($n=6$)

a 为 $P<0.05$, 与 NG 组相比; b 为 $P<0.05$, 与 HG 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 HG+si-NC 组相比; d 为 $P<0.05$, 与 HG+si-MIAT 组相比; e 为 $P<0.05$, 与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比。

Figure 5. Apoptosis level of AC16 cells was detected by flow cytometry in each group ($n=6$)

2.6 敲低 MIAT 对 HG 诱导的 AC16 细胞培养基中 LDH 含量的影响

与 NG 组相比, HG 组 AC16 细胞培养基中 LDH 含量增加了 2.19 倍 ($P<0.05$); 与 HG 组相比, HG+si-MIAT 组 LDH 含量降低了 38.26% ($P<0.05$); 与 HG+si-NC 组相比, HG+si-MIAT 组 LDH 含量降低了 39.51% ($P<0.05$); 与 HG+si-MIAT 组相比, HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 LDH 含量增加了 1.45 倍 ($P<0.05$); 与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比, HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 LDH 含量增加了 1.50 倍 ($P<0.05$; 表 3)。

表 3. 各组 AC16 细胞中 LDH 含量比较 ($n=6$)

Table 3. Comparison of LDH content of AC16 cells in each group ($n=6$) 单位: U/L

分组	LDH 含量
NG 组	129.60±15.17
HG 组	284.25±26.30 ^a
HG+si-NC 组	290.14±25.72 ^a
HG+si-MIAT 组	175.50±21.06 ^{bc}
HG+si-MIAT+anti-NC 组	169.42±19.35 ^{bc}
HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组	254.73±23.81 ^{de}

注: a 为 $P<0.05$, 与 NG 组相比; b 为 $P<0.05$, 与 HG 组相比; c 为 $P<0.05$, 与 HG+si-NC 组相比; d 为 $P<0.05$, 与 HG+si-MIAT 组相比; e 为 $P<0.05$, 与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比。

2.7 敲低 MIAT 对 HG 诱导的 AC16 细胞中 CCND2、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

与 NG 组相比, HG 组 AC16 细胞中 CCND2 和 Bcl-2 蛋白水平分别降低了 72.62%、78.26%, Bax 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值分别增加了 2.90 倍、3.83 倍 (均 $P<0.05$); 与 HG 组相比, HG+si-MIAT 组 CCND2 和 Bcl-2 蛋白水平分别增加了 2.78 倍、3.53 倍, Bax 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值分别降低了 46.55%、52.17% (均 $P<0.05$); 与 HG+si-NC 组相比, HG+si-MIAT 组 CCND2 和 Bcl-2 蛋白水平分别增加了 3.05 倍、3.79 倍, Bax 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值分别降低了 47.46%、55.10% (均 $P<0.05$); 与 HG+si-MIAT 组相比, HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 CCND2 和 Bcl-2 蛋白水平分别降低了 40.63%、58.49%, Bax 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值分别增加了 1.52 倍、1.64 倍 ($P<0.05$); 与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比, HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组 CCND2 和 Bcl-2 蛋白水平分别降低了 43.28%、60.00%, Bax 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值分别增加了 1.57 倍、1.71 倍 (均 $P<0.05$; 图 6)。

2.8 MIAT 在 AC16 细胞中调控 miR-150-5p 表达

亚细胞定位分析结果显示, 在 AC16 细胞的胞质中, MIAT 的比例较高, 而在细胞核中 MIAT 的比例较低 (图 7A)。生物信息学分析显示 MIAT 和

miR-150-5p 存在靶向结合序列(图 7B)。双荧光素酶酶检测结果显示,与转染 miR-NC 相比,转染 miR-150-5p mimic 后,wt-MIAT 的相对荧光素酶活性降低了 62.75% ($P < 0.05$),而 mut-MIAT 的荧光素酶活性无显著变化 ($P > 0.05$,图 7C)。RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA-binding protein immunopre-

cipitation, RIP) 检测结果显示,相对于 IgG, MIAT 和 miR-150-5p 在 Ago2 免疫沉淀中显著富集,分别增加了 9.25 倍、6.48 倍(均 $P < 0.05$,图 7D)。生物素标记的 RNA pull-down 结果显示,MIAT 被 Bio-wt-miR-150-5p 拉下,而不是 Bio-mut-miR-150-5p (图 7E)。

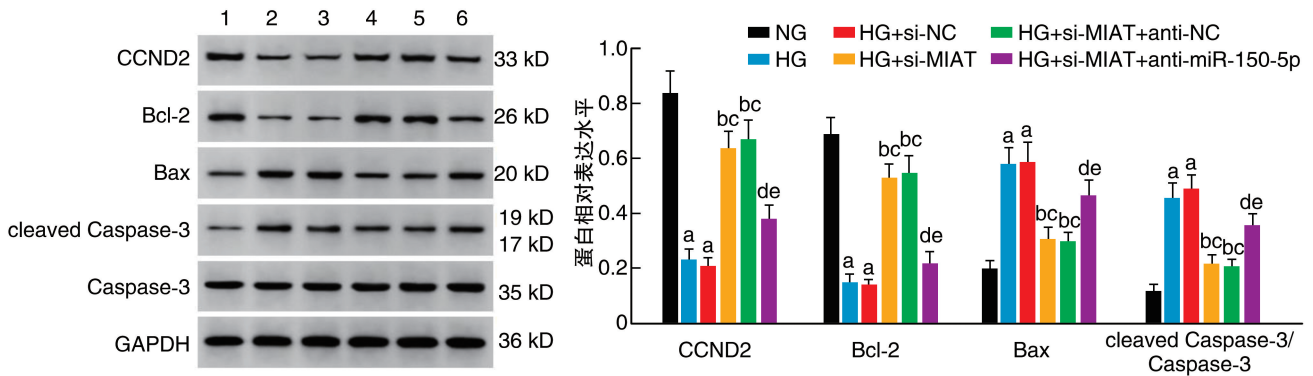


图 6. 各组 AC16 细胞中 CCND2、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达 ($n = 6$)

1 为 NG 组,2 为 HG 组,3 为 HG+si-NC 组,4 为 HG+si-MIAT 组,5 为 HG+si-MIAT+anti-NC 组,6 为 HG+si-MIAT+anti-miR-150-5p 组。
a 为 $P < 0.05$,与 NG 组相比;b 为 $P < 0.05$,与 HG 组相比;c 为 $P < 0.05$,与 HG+si-NC 组相比;
d 为 $P < 0.05$,与 HG+si-MIAT 组相比;e 为 $P < 0.05$,与 HG+si-MIAT+anti-NC 组相比。

Figure 6. Expression of CCND2, Bcl-2, Bax, Caspase-3 and cleaved Caspase-3 in AC16 cells of each group ($n = 6$)

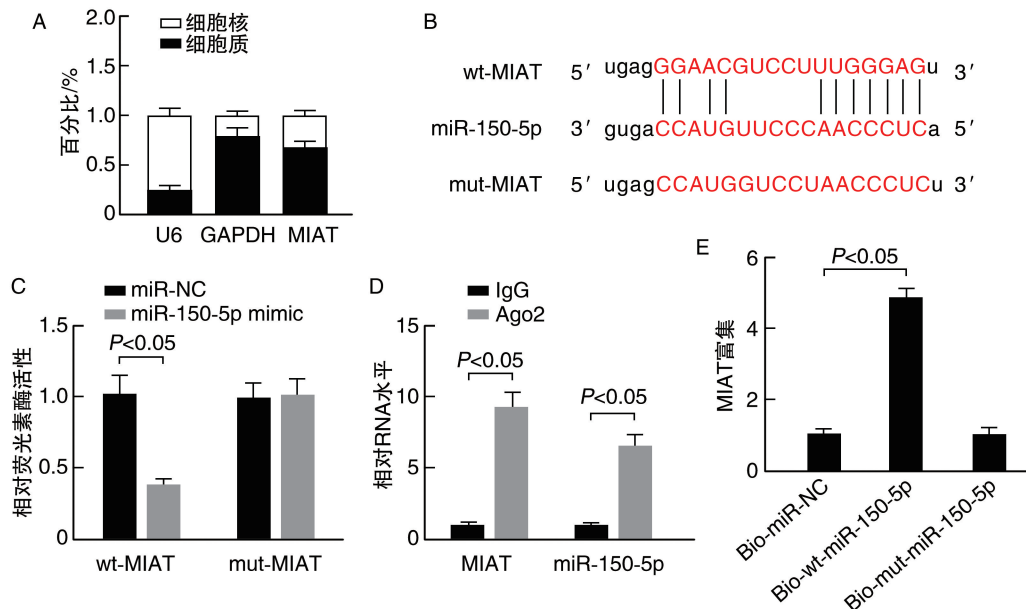


图 7. MIAT 靶向调节 miR-150-5p 表达 ($n = 6$)

A 为 RT-qPCR 显示 MIAT 在 AC16 细胞的细胞质和细胞核中的分布;B 为 StarBase 数据库中预测的 MIAT 和 miR-150-5p 的靶向结合序列;
C 为用于验证 MIAT 和 miR-150-5p 之间关系的双荧光素酶酶检测结果;D 为 RIP 实验证实 MIAT 和 miR-150-5p 可以被 Ago2 抗体沉淀;
E 为 RNA pull-down 结合 RT-qPCR 在由生物素化 miR-150-5p 探针拉下的样品中检测 MIAT 富集。

Figure 7. MIAT specifically regulates miR-150-5p expression ($n = 6$)

2.9 CCND2 是 miR-150-5p 的靶基因

生物信息学分析显示 CCND2 序列包含 miR-

150-5p 的结合位点(图 8A)。双荧光素酶酶检测结果显示,与转染 miR-NC 相比,转染 miR-150-5p mimic

后, wt-CCND2 的相对荧光素酶活性降低了 60.40% ($P < 0.05$), 而含有 mut-CCND2 的荧光素酶活性无显著变化 ($P > 0.05$; 图 8B)。

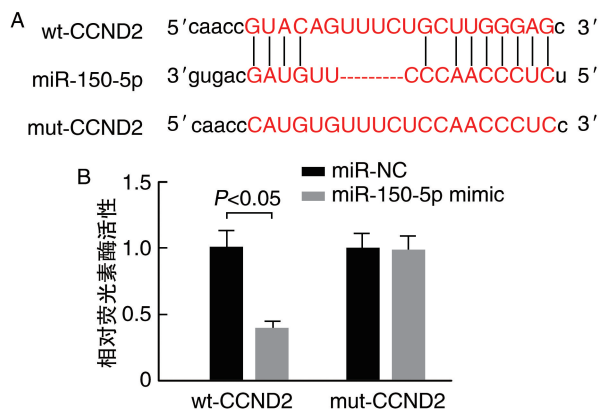


图 8. CCND2 是 miR-150-5p 的靶标 ($n=6$)

A 为 StarBase 数据库中预测的 miR-150-5p 和 CCND2 的靶向结合序列; B 为用于验证 miR-150-5p 和 CCND2 之间关系的双荧光素酶检测结果。

Figure 8. CCND2 is a target of miR-150-5p ($n=6$)

3 讨论

CHD 和 T2DM 的高发病率和死亡率在全球范围内造成了较大的社会和经济负担, 严重降低了患者的生活质量^[16]。研究显示, T2DM 合并 CHD 的患者更容易出现心力衰竭、心律失常和心源性猝死^[17]。因此, 寻找有效的生物标志物和干预靶点是当前研究的重点。

目前, 有关 lncRNA 作为潜在生物标志物的研究已成为分子医学中广受欢迎的领域之一。据报道, MIAT 在 CHD 患者和 T2DM 患者中均上调, 且在 T2DM 合并 CHD 患者中血清 MIAT 的水平显著高于非糖尿病 CHD 患者, 是 T2DM 合并 CHD 的潜在生物标志物^[9]。本研究发现, 与对照组相比, CHD 组、T2DM 组和 T2DM+CHD 组中血清 MIAT 水平显著升高, 并且 T2DM+CHD 组高于 CHD 组和 T2DM 组, 这与以往的研究结果一致; 再次证实了 MIAT 作为预测 T2DM 合并 CHD 生物标志物的潜力。功能研究结果表明, 敲低 MIAT 可增强 HG 处理的 AC16 细胞的增殖活性, 并通过调节抗(促)凋亡蛋白来保护 AC16 细胞拮抗 HG 诱导的细胞凋亡, 减轻 HG 诱导的心肌细胞损伤。另有研究证实, MIAT 沉默可减轻糖尿病心肌病的心肌细胞焦亡^[18]。以上研究结果提示, MIAT 是高糖环境下心肌细胞损伤的有效干预靶点。

lncRNA 可以作为竞争性内源性 RNA 与 miRNA

相互作用^[19]。亚细胞分离和 RT-qPCR 分析表明 MIAT 主要定位于 AC16 细胞的胞质中, 这为 MIAT 和 miRNA 之间的相互作用提供了先决条件。通过 StarBase 数据库, 发现 miR-150-5p 可能与 MIAT 结合。为了验证预测, 本研究进行了双荧光素酶报告基因检测, 结果表明, 在 wt-MIAT 载体和 miR-150-5p mimic 共转染的 AC16 细胞中, 相对荧光素酶活性被显著抑制, 但是这种抑制作用被结合位点的突变所消除。RIP 和 RNA pull down 检测结果进一步证实 miR-150-5p 和 MIAT 可以在 AC16 细胞中结合, 表明 MIAT 可以靶向结合 AC16 细胞中的 miR-150-5p。此外, 在 T2DM 合并 CHD 患者中 miR-150-5p 的血清水平显著降低, 且 miR-150-5p 水平与 MIAT 的水平呈负相关关系。在 HG 处理的 AC16 细胞中 miR-150-5p 表达的降低被 si-MIAT 转染阻断, 而 miR-150-5p 的下调也减弱了 MIAT 敲低对 HG 处理的 AC16 细胞增殖的促进作用, 增加了 HG 诱导的细胞凋亡和 Bax、cleaved Caspase-3 表达, 降低了 Bcl-2 表达。提示, MIAT 可能通过与 miR-150-5p 竞争性结合来参与 T2DM 合并 CHD 的病情进展。

此外, 本研究结果显示, CCND2 为 AC16 细胞中 miR-150-5p 的直接靶标。CCND2 是细胞周期调控蛋白, 在细胞凋亡中起关键作用。此前有报道称, miR-150-5p 可以通过靶向上调 CCND2 来促进 HG 处理的心肌细胞增殖, 增强心肌修复能力^[13]。与此一致, 本研究发现, CCND2 在 HG 处理的心肌细胞中表达降低, 当 miR-150-5p 表达上调后, CCND2 的表达也随之增加。而抑制 miR-150-5p 表达后, CCND2 的表达降低, 同时 AC16 细胞的增殖活性降低, 凋亡增加。StarBase 数据库预测到 miR-150-5p 和 CCND2 之间存在结合位点, 提示 CCND2 可能是 miR-150-5p 的直接靶标。双荧光素酶报告实验进一步证实了 CCND2 是 miR-150-5p 的靶基因。这些结果表明 MIAT 可能作为 miR-150-5p 的竞争性内源性 RNA 抑制 miR-150-5p 的表达, 从而降低 miR-150-5p 对 HG 处理的 AC16 细胞中 CCND2 表达的激活作用。

综上所述, MIAT 可作为预测 T2DM 合并 CHD 的潜在生物标志物; MIAT 敲低可能通过调节 miR-150-5p 来拮抗 HG 诱导的人心肌细胞损伤。因此, 靶向 MIAT 可能是一种干预 T2DM 合并 CHD 发展的新治疗策略, 其机制有待进一步探索。

[参考文献]

[1] KRISTENSEN S L, RØRTH R, JHUND P S, et al. Cardi-

- ovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a systematic review and Meta-analysis of cardiovascular outcome trials [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(10): 776-785.
- [2] KELSEY M D, NELSON A J, GREEN J B, et al. Guidelines for cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes: JACC guideline comparison [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79(18): 1849-1857.
- [3] 张玉花, 王霞, 王丽娜. 利拉鲁肽联合二甲双胍在2型糖尿病合并冠心病患者治疗中的应用[J]. *糖尿病新世界*, 2021, 24(9): 80-83.
ZHANG Y H, WANG X, WANG L N. Application of liraglutide and metformin in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease [J]. *Diabetes New World*, 2021, 24(9): 80-83.
- [4] TIAN X, GAO Y, ZHONG M, et al. The association between serum Sestrin2 and the risk of coronary heart disease in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2022, 22(1): 281.
- [5] TIBAUT M, NAJI F, PETROVIĆ D. Association of myocardial infarction with CDKN2B antisense RNA 1 (CDKN2B-AS1) rs1333049 polymorphism in slovenian subjects with type 2 diabetes mellitus [J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(3): 526.
- [6] 王念, 刘骏, 王忠. 长链非编码RNA在冠心病发生发展过程中的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(10): 1358-1361.
WANG N, LIU J, WANG Z. Research progress of long non-coding RNA in development of coronary heart disease [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2020, 36(10): 1358-1361.
- [7] YAN Z S, ZHANG N C, LI K, et al. Upregulation of long non-coding RNA myocardial infarction-associated transcription is correlated with coronary artery stenosis and elevated inflammation in patients with coronary atherosclerotic heart disease [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(12): 1038-1047.
- [8] ZENG H, HU F, DUAN Y, et al. Expression of lncRNA APF in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction caused by coronary heart disease and its clinical significance [J]. *Int Heart J*, 2022, 63(4): 742-748.
- [9] SOHRABIFAR N, GHADERIAN S M H, ALIPOUR PARSA S, et al. Variation in the expression level of MALAT1, MIAT and XIST lncRNAs in coronary artery disease patients with and without type 2 diabetes mellitus [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2022, 128(5): 1308-1315.
- [10] SILVERMAN M G, YERI A, MOORTHY M V, et al. Circulating miRNAs and risk of sudden death in patients with coronary heart disease [J]. *JACC Clin Electrophysiol*, 2020, 6(1): 70-79.
- [11] PEDERSEN O B, HVAS A M, GROVE E L, et al. Association of whole blood microRNA expression with platelet function and turnover in patients with coronary artery disease [J]. *Thromb Res*, 2022, 211: 98-105.
- [12] YAN B, YAO J, LIU J Y, et al. lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1143-1156.
- [13] NI T J, HUANG X X, PAN S L, et al. Inhibition of the long non-coding RNA ZFAS1 attenuates ferroptosis by sponging miR-150-5p and activates CCND2 against diabetic cardiomyopathy [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(21): 9995-10007.
- [14] 《中国老年2型糖尿病防治临床指南》编写组. 中国老年2型糖尿病防治临床指南(2022年版) [J]. *中国糖尿病杂志*, 2022, 30(1): 2-51.
Compiling Group of Clinical Guidelines for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes in the Elderly in China. Clinical guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes in the elderly in China (2022 edition) [J]. *Chin J Diabetes*, 2022, 30(1): 2-51.
- [15] WU A S, SUN W L, MOU F Y. lncRNA-MALAT1 promotes high glucose-induced H9c2 cardiomyocyte pyroptosis by downregulating miR-141-3p expression [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(4): 259.
- [16] 王冲, 李月红, 王贵松. 血清淀粉样蛋白A与冠心病合并糖尿病患者高密度脂蛋白胆固醇外流能力的相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(5): 417-422.
WANG C, LI Y H, WANG G S. Correlation between the serum amyloid A protein and the cholesterol efflux capacity in patients with coronary heart disease and diabetes mellitus [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(5): 417-422.
- [17] KATSIKI N, TENTOLOURIS N, MIKHAILIDIS D P. Dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus: bad for the heart [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2017, 32(4): 422-429.
- [18] XIAO W J, ZHENG D Z, CHEN X, et al. Long non-coding RNA MIAT is involved in the regulation of pyroptosis in diabetic cardiomyopathy via targeting miR-214-3p [J]. *iScience*, 2021, 24(12): 103518.
- [19] 黄柳, 崔坤, 贾妍, 等. lncRNA PVT1通过靶向miR-761对缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(4): 295-300.
HUANG L, CUI K, JIA Y, et al. Effect of lncRNA PVT1 on cardiomyocyte damage induced by hypoxia/reoxygenation by targeting miR-761 [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(4): 295-300.

(此文编辑 许雪梅)