

本文引用: 谭珍妮, 吕春美, 邹海林. lncRNA NEAT1 通过调节 miR-27b-3p/SP1 轴对心房颤动大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(8): 668-676. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.08.004.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2023)31-08-0668-09

lncRNA NEAT1 通过调节 miR-27b-3p/SP1 轴对心房颤动大鼠心肌纤维化的影响

谭珍妮, 吕春美, 邹海林

(邵阳学院附属第一医院心血管内科, 湖南省邵阳市 422000)

[摘要] [目的] 探讨 lncRNA NEAT1 通过调节 miR-27b-3p/特异性蛋白 1 (SP1) 轴对心房颤动 (AF) 大鼠心肌纤维化的影响。[方法] 54 只大鼠按照随机数字表法分成 6 组 ($n=9$): 假手术组、AF 组、AF+shControl 组、AF+shNEAT1 组、AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组、AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组。转染上述慢病毒载体 2 周后, 采用连续 7 天尾静脉注射乙酰胆碱-氯化钙的方法进行 AF 大鼠造模。AF 的发生率、持续时间采用心电图记录; RT-qPCR 检测心房组织内 NEAT1、miR-27b-3p、SP1 及纤维化相关基因 (TGF- β 1、CTGF、COL I、COL III) 的表达水平; 荧光素酶报告基因检测 miR-27b-3p 与 NEAT1、miR-27b-3p 与 SP1 的靶向关系; TUNEL 染色观察心房组织心肌细胞凋亡; Masson 染色观察心房组织心肌纤维化; Western blot 检测心房组织中 SP1、纤维化相关基因的蛋白表达水平。[结果] 与 AF 组比较, AF+shNEAT1 组 AF 的发生率和持续时间降低, 心肌纤维化和细胞凋亡减轻, TGF- β 1、CTGF、COL I、COL III 的 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$)。NEAT1 负调控 miR-27b-3p 水平。沉默 miR-27b-3p 可逆转 shNEAT1 对 AF 大鼠心肌细胞凋亡和心肌纤维化的抑制作用。miR-27b-3p 直接靶向 SP1 并抑制其 mRNA 和蛋白表达 ($P<0.05$)。NEAT1 通过下调 miR-27b-3p 促进 SP1 的表达。[结论] NEAT1 下调可缓解 AF 和 AF 诱导的心肌纤维化, 其调控机制与调节 miR-27b-3p/SP1 轴有关。

[关键词] lncRNA NEAT1; miR-27b-3p/SP1 轴; 心房颤动; 心肌纤维化

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Effect of lncRNA NEAT1 on myocardial fibrosis in rats with atrial fibrillation by regulating miR-27b-3p/SP1 axis

TAN Zhenni, LÜ Chunmei, ZOU Hailin

(Department of Cardiovascular Medicine, First Affiliated Hospital of Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of lncRNA NEAT1 on myocardial fibrosis in rats with atrial fibrillation (AF) by regulating miR-27b-3p/specific protein 1 (SP1) axis. **Methods** 54 rats were divided into six groups ($n=9$) according to the random number table method: sham group, AF group, AF+shControl group, AF+shNEAT1 group, AF+shNEAT1+anti-miR-Control group and AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p group. After 2 weeks of transfection with the above lentiviral vector, AF rats was established by tail vein injection of acetylcholine-CaCl₂ for 7 days. The incidence and duration of AF were recorded by electrocardiogram; the expression levels of NEAT1, miR-27b-3p, SP1 and fibrosis-related genes (TGF- β 1, CTGF, COL I, COL III) in atrial tissue were detected by RT-qPCR; the luciferase report gene confirmed the targeting relationship between miR-27b-3p and NEAT1, and miR-27b-3p and SP1; cardiomyocyte apoptosis in atrial tissue was observed by TUNEL staining; myocardial fibrosis in atrial tissue was observed by Masson staining; and the protein expression levels of SP1 and fibrosis-related genes in atrial tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the AF group, the incidence and duration of AF, myocardial fibrosis, apoptosis and the mRNA and protein expression of TGF- β 1, CTGF, COL I and COL III were significantly decreased in AF+shNEAT1 group ($P<0.05$). NEAT1 negatively regulates the expression of miR-27b-3p. Silencing miR-27b-3p reversed the inhibitory effects of shNEAT1 on myocardial apoptosis and fibrosis in AF rats. miR-27b-3p directly targeted SP1 and inhibited its mRNA and protein ex-

[收稿日期] 2022-10-26

[修回日期] 2023-04-03

[基金项目] 湖南省自然科学基金区域联合基金项目 (2023JJ50278)

[作者简介] 谭珍妮, 硕士, 副主任医师, 研究方向为心脏起搏与心脏电生理, E-mail: tanzhenni2002@163.com。

pression. NEAT1 promoted SP1 expression by down-regulating miR-27b-3p. **Conclusion** Down-regulation of NEAT1 can alleviate AF and AF-induced myocardial fibrosis, and its regulatory mechanism is related to the regulation of miR-27b-3p/SP1 axis.

[**KEY WORDS**] lncRNA NEAT1; miR-27b-3p/SP1 axis; atrial fibrillation; myocardial fibrosis

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是一种临床上比较常见的心律失常,且发病率随着年龄的增长而逐渐上升,并伴有心脏病的发生^[1]。近年来,AF的发病率和死亡率不断上升,主要与血栓性疾病(脑卒中)和心肌纤维化疾病(心力衰竭)有关^[2]。心肌纤维化是AF发病机制的中心因素,被认为是触发心脏结构重塑的发生和维持的重要过程^[3]。目前AF还没有有效的预防措施。因此,进一步阐明AF的发病机制十分重要。核富集丰富转录本1(nuclear-enriched abundant transcript 1, NEAT1)是近期发现的一种长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA),已被证实影响肝、肾等器官纤维化^[4-5]。最近的研究表明,NEAT1在AF患者心房组织中表达上调,且敲除NEAT1可改善血管紧张素II引起的小鼠心房纤维化^[6]。然而,NEAT1在AF和AF诱导的心肌纤维化中的具体作用机制还有待阐明。既往研究显示miR-27b-3p是NEAT1的作用靶点,还有研究表明miR-27b-3p能改善心功能,减轻AF大鼠心房纤维化^[7-8]。本研究前期的生物信息学分析显示,特异性蛋白1(specificity protein 1, SP1)3'UTR序列中存在miR-27b-3p结合位点,提示SP1基因是miR-27b-3p作用的一个候选靶基因。据报道,SP1在AF患者心房肌组织中高表达,可能是AF的诊断标志物^[9]。然而,miR-27b-3p与NEAT1或SP1的具体关系及其在AF和AF诱导的心肌纤维化中的作用尚不清楚。因此,本研究通过建立大鼠AF模型,探讨NEAT1调节miR-27b-3p/SP1轴对AF诱导的心肌纤维化的影响,为AF的治疗提供新的思路,也可揭示NEAT1促进AF大鼠心肌纤维化的新机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

NEAT1小发夹RNA或过表达载体(shNEAT1/LV-NEAT1)及其阴性对照(shControl/LV-Control)、miR-27b-3p模拟物或抑制物(miR-27b-3p/anti-miR-27b-3p)及其对照(miR-Control/anti-miR-Control)购自上海Gene Pharma公司。RNAeasy Mini Kit、Re-

vertAid FirstStrand cDNA Synthesis Kit(杭州沃森生物);miRcute Plus miRNA qPCR检测试剂盒、miRcute miRNA分离试剂盒(北京天根生化);Fast SYBR Green Master Mix Kit(北京优尼康生物科技有限公司);原位细胞凋亡检测试剂盒(上海恒斐生物);Masson试剂盒、BCA试剂盒(北京索莱宝);双荧光素酶报告系统(美国Promega);抗体SP1、转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、I型胶原(collagen I, COL I)、III型胶原(collagen III, COL III)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)(美国Abcam)。NanoDrop 2000分光光度计(美国Thermo Scientific),ABI 7500 Real-Time(RT)PCR系统(美国ABI),CKX41光学显微镜(日本奥林巴斯)。

1.2 实验动物

雄性SD大鼠,体质量200~250 g,8周龄,购自杰思捷(上海)实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(沪)2018-0004。大鼠在标准实验条件下饲养,20~25℃,55%相对湿度,12 h光照/12 h黑暗,自由饮水和饮食。本研究设计的动物实验通过本院实验动物伦理委员会核查批准。

1.3 动物分组、建模及干预

将54只大鼠随机分为6组,每组9只。假手术组:大鼠连续7天经尾静脉注射1 mL/kg 0.9%的生理盐水,每天1次;AF组:大鼠AF模型参照文献^[10]进行,连续7天经尾静脉注射1 mL/kg 乙酰胆碱-CaCl₂(60 mg/L 乙酰胆碱和10 g/L CaCl₂),每天1次;AF+shControl组^[8]:大鼠经尾静脉注射shControl后14天,AF造模同前;AF+shNEAT1组:大鼠经尾静脉注射shNEAT1后14天,AF造模同前;AF+shNEAT1+anti-miR-Control组:大鼠经尾静脉注射shNEAT1和anti-miR-Control后14天,AF造模同前;AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p组:大鼠经尾静脉注射shNEAT1和anti-miR-27b-3p后14天,AF造模同前。

1.4 心电图记录与分析

实验前,用戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠。将12导联心电图的肢体导联插入动物的四肢,记录并排除非窦性心律。造模7天后再次进行心电图检

测,记录 AF 发生及持续时间。

1.5 样本收集

实验结束后,对大鼠实施安乐死,取心脏,分离左心房组织,然后将其分成两份:一份用于 Western blot、RT-qPCR 检测;另一份组织经固定(4%多聚甲醛)后进行 TUNEL 和 Masson 染色。

1.6 RT-qPCR 检测心房组织内 NEAT1、miR-27b-3p、SP1 及纤维化相关基因表达

利用 RNAeasy Mini Kit 和 miRcute miRNA 分离试剂盒分别提取心房组织总 RNA 和 miRNA,并采用 NanoDrop 2000 进行定量。使用 RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit 将 RNA 反转录为 cDNA,然后使用 miRcute Plus miRNA qPCR 检测试剂盒和 Fast SYBR Green Master Mix Kit 检测 NEAT1、miR-27b-3p、SP1 及纤维化相关基因(TGF- β 1、CTGF、COL I、COL III)的表达,PCR 扩增按照 ABI 7500 Real-Time (RT) PCR 系统制造商的说明进行。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对分析,内参为 U6 或 GAPDH。引物序列:NEAT1 上游为 5'-GGGAAGGGTGACATTGAAA-3',下游为 5'-CTCCCCAGCTTCACTTCTTG-3'; miR-27b-3p 上游为 5'-CGCGTTCACAGTGGCTAAG-3',下游 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; SP1 上游为 5'-ATGCCTAATATTCAGTATCAAGTA-3',下游为 5'-CCCTGAGGTGACAGGCTGTGA-3'; TGF- β 1 上游为 5'-AACAATTCCTGGCGTTACCT-3',下游为 5'-GCCCTGTATTCCGTCTCCTT-3'; CTGF 上游为 5'-GTCTTCGGTGGGTCCGTGTA-3',下游为 5'-GCGGTCCTTGGGCTCATCAC-3'; COL I 上游为 5'-TCCTGCCGATGTCGCTATCC-3',下游为 5'-TCGTGCAGCCATCCA-CAAGC-3'; COL III 上游为 5'-GCCTTCTACACCTGCTCCTG-3',下游为 5'-AGCCACCCATTCCTCCGACT-3'; U6 上游为 5'-TGGAACGCTTCACGAATTTGCCG-3',下游为 5'-AGACTGCCGCCTGGTAGTTGT-3'; GAPDH 上游为 5'-AGAATCATCCCTGCATCC-3',下游为 5'-GGTCCCTCAGTGTAGCCCAAG-3'。

1.7 靶基因预测和荧光素酶报告基因检测

使用 Starbase 预测和分析 miR-27b-3p 与 NEAT1、SP1 的结合位点。将含有与 miR-27b-3p 互补的结合位点的野生型 NEAT1、SP1 序列和突变型 NEAT1、SP1 序列构建至 pmirGLO 载体上,形成 NEAT1 或 SP1 的野生型(wild type, WT)和突变型(mutant, MUT)报告载体。将 HEK 293T 细胞(2×10^4 个/孔)置于 96 孔细胞板上。细胞在 37 °C 和 5% CO₂ 的培

养室中培养。根据 Lipofectamine 3000 转染试剂的用户手册,转染 miR-27b-3p 或 miR-Control,48 h 后检测荧光素酶活性。

1.8 HEK 293T 细胞转染与分组

将 HEK 293T 细胞(2×10^4 个/孔)置于 96 孔细胞板上,根据 Lipofectamine 3000 转染试剂的用户手册,转染 LV-NEAT1、LV-Control、shControl、shNEAT1、miR-Control、miR-27b-3p、anti-miR-Control 和 anti-miR-27b-3p,另将正常培养的细胞作为对照组,通过 RT-qPCR 检测细胞转染情况。

1.9 TUNEL 染色观察心房组织心肌细胞凋亡

参考文献^[11]中的染色方法观察心房组织心肌细胞凋亡情况,得到的左心房组织用石蜡包埋,制备 5 μ m 切片,脱蜡,再水化,并与 Triton X-100 孵化液渗透。用 3% 过氧化氢水溶液封闭切片,参考原位细胞凋亡检测试剂盒使用方法用 TUNEL 反应液孵育心房组织切片,显微镜下观察心肌细胞凋亡。

1.10 Masson 染色观察心房组织心肌纤维化

将石蜡切片常规脱蜡至水,用 Masson 试剂盒染色,显微镜下呈红染的为心肌组织,呈蓝染的为心肌胶原纤维。结果用 ImagePro 6.0 软件进行分析。

1.11 Western blot 检测心房组织中 SP1、纤维化相关蛋白表达

参考文献^[12]中的方法检测心房组织中 SP1、纤维化相关蛋白表达,采用组织裂解液(使用前加入 PMSF)提取等量左心房组织总蛋白,定量后,SDS-PAGE 将其分离,随后进行转膜,5% 脱脂牛奶阻断后,将膜与抗体 SP1、TGF- β 1、CTGF、COL I、COL III 和 GAPDH 稀释液孵育过夜。次日,将二抗与膜在室温环境下共同孵育 2 h。用 ECL 试剂观察蛋白表达。

1.12 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间显著性比较,多重比较后的 Bonferroni 检验采用 Prism 6.0 进行。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NEAT1 调节 miR-27b-3p 对大鼠 AF 的影响

假手术组心电图表现为规则的 P 波,而 AF 组 P 波消失,代之以不规则的 f 波,R-R 间期呈现不规则变化,且心律不齐,说明 AF 造模成功(图 1)。与

假手术组相比,AF 组大鼠 AF 的发生率和持续时间均显著增高,NEAT1 的表达水平升高,miR-27b-3p 的表达水平降低(均 $P < 0.05$);与 AF 组和 AF+shControl 组相比,AF+shNEAT1 组大鼠 AF 的发生率和持续时间降低,NEAT1 的表达水平降低,

miR-27b-3p 的表达水平升高(均 $P < 0.05$);与 AF+shNEAT1 组和 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组相比,AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组大鼠 AF 的发生率和持续时间增高,NEAT1 的表达水平升高,miR-27b-3p 的表达水平降低(均 $P < 0.05$;图 2)。



图 1. 大鼠造模前后的心电图变化

Figure 1. Electrocardiographic changes in rats before and after modeling

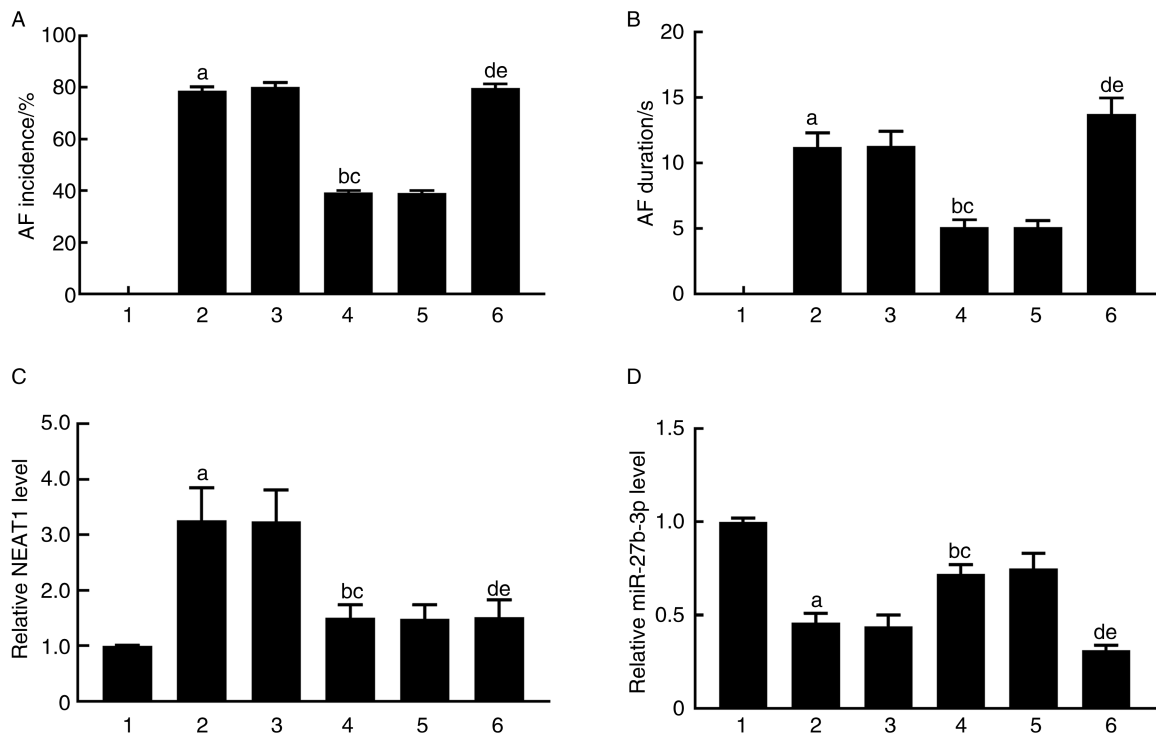


图 2. NEAT1 调节 miR-27b-3p 对大鼠 AF 的影响

A 为 AF 发生率比较,B 为 AF 持续时间比较,C 为 NEAT1 的表达比较,D 为 miR-27b-3p 的表达比较。

1 为假手术组,2 为 AF 组,3 为 AF+shControl 组,4 为 AF+shNEAT1 组,5 为 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组,

6 为 AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组。a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与 AF 组比较;c 为 $P < 0.05$,

与 AF+shControl 组比较;d 为 $P < 0.05$,与 AF+shNEAT1 组比较;e 为 $P < 0.05$,与 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组比较。

Figure 2. Effect of NEAT1 on AF rats by regulating miR-27b-3p

2.2 NEAT1 抑制 miR-27b-3p 的表达

生物信息学分析显示,NEAT1 3'UTR 序列中存在 miR-27b-3p 的靶向结合位点(图 3A)。与 miR-Control+WT-NEAT1 组相比,miR-27b-3p+WT-NEAT1 组荧光素酶活性降低($P < 0.05$;图 3B)。与对照组

和 shControl 组相比,shNEAT1 组 miR-27b-3p 的表达水平升高($P < 0.05$;图 3C);与对照组和 LV-Control 组比较,LV-NEAT1 组 NEAT1 的表达水平升高,miR-27b-3p 的表达水平降低(均 $P < 0.05$;图 3D)。

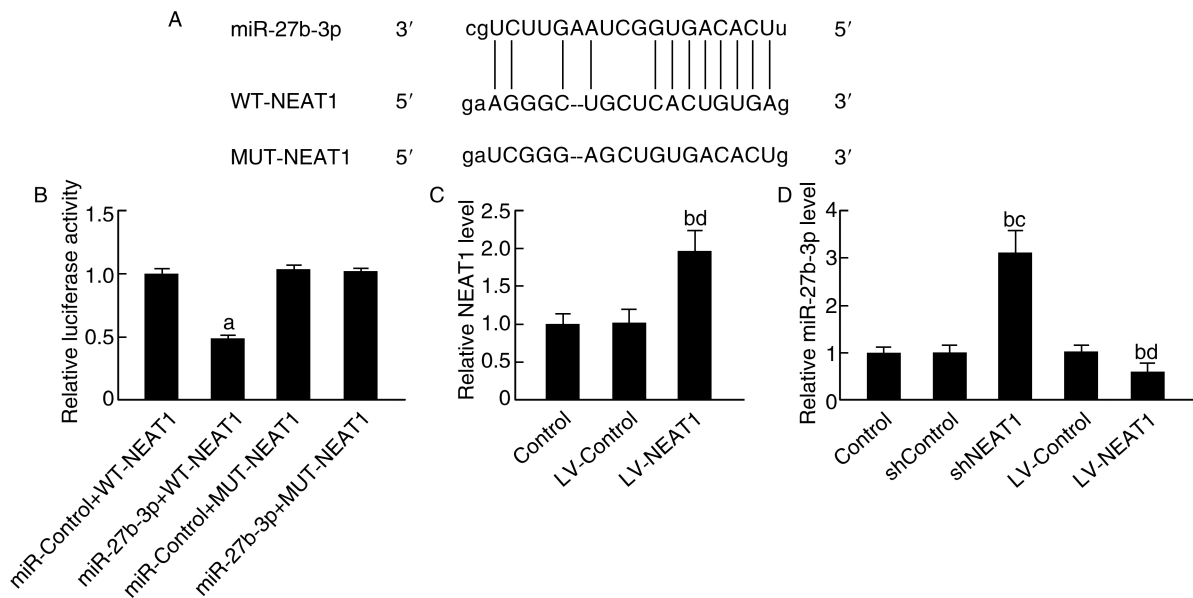


图 3. NEAT1 靶向调控 miR-27b-3p

A 为 NEAT1 与 miR-27b-3p 之间预测的结合位点示意图, B 为荧光素酶活性的定量分析, C 为 NEAT1 过表达对 NEAT1 的影响, D 为 NEAT1 沉默或过表达对 miR-27b-3p 表达的影响。a 为 $P < 0.05$, 与 miR-Control+WT-NEAT1 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 shControl 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 LV-Control 组比较。

Figure 3. NEAT1 targeted the regulation of miR-27b-3p

2.3 NEAT1 调节 miR-27b-3p 对 AF 大鼠心肌细胞凋亡的影响

假手术组几乎未见细胞凋亡, AF 组可见大量棕黄色凋亡细胞, AF+shNEAT1 组和 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组心肌细胞凋亡减轻, AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组心肌细胞凋亡加重。AF 组心肌

细胞凋亡率与假手术组相比升高 ($P < 0.05$), AF+shNEAT1 组心肌细胞凋亡率与 AF 组和 AF+shControl 组相比降低 (均 $P < 0.05$), AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组心肌细胞凋亡率与 AF+shNEAT1 组和 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组相比增高 ($P < 0.05$; 图 4)。

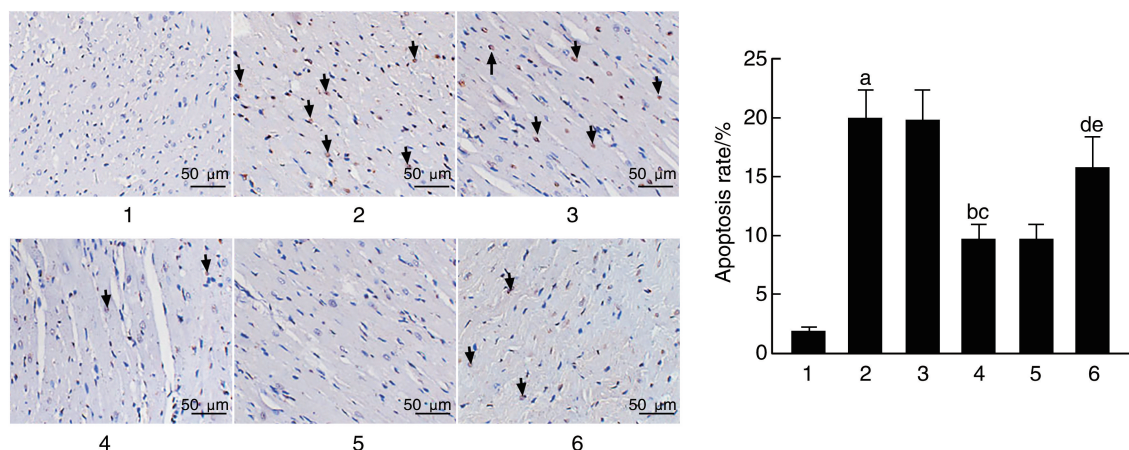


图 4. TUNEL 染色检测大鼠左心房组织心肌细胞凋亡

1 为假手术组, 2 为 AF 组, 3 为 AF+shControl 组, 4 为 AF+shNEAT1 组, 5 为 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组, 6 为 AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组。黑色箭头代表凋亡细胞。a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 AF 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 AF+shControl 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 AF+shNEAT1 组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组比较。

Figure 4. Myocardial cell apoptosis in rat left atrial tissue detected by TUNEL staining

2.4 NEAT1 调节 miR-27b-3p 对 AF 大鼠心肌纤维化的影响

Masson 染色显示,假手术组红色心肌细胞排列整齐,细胞间质有较少蓝色胶原纤维;AF 组和 AF+shControl 组心肌细胞排列紊乱,心肌细胞肥大,可见大量蓝色胶原纤维;AF+shNEAT1 组和 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组心肌细胞紊乱程度及细胞纤维化程度明显减轻;AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组心肌纤维化水平加重。与假手术组相比,

AF 组心肌纤维化水平升高 ($P < 0.05$), TGF- β 1、CTGF、COL I 和 COL III 的 mRNA 和蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$);与 AF 组和 AF+shControl 组相比,AF+shNEAT1 组心肌纤维化水平降低, TGF- β 1、CTGF、COL I 和 COL III 的 mRNA 和蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$);与 AF+shNEAT1 组和 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组相比,AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组心肌纤维化水平升高, TGF- β 1、CTGF、COL I 和 COL III 的 mRNA 和蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$;图 5)。

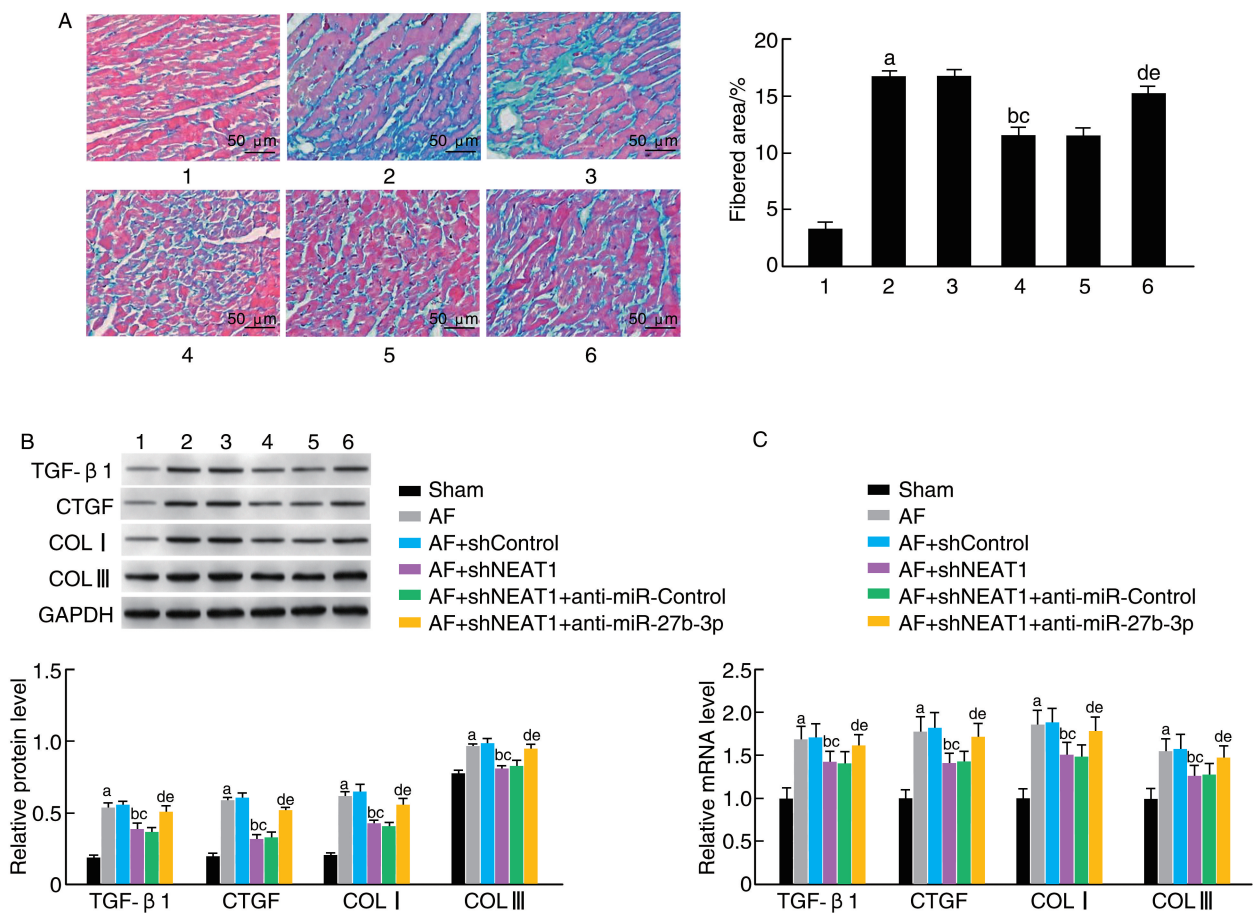


图 5. NEAT1 调节 miR-27b-3p 对 AF 大鼠心肌纤维化的影响

A 为 Masson 染色检测大鼠左心房组织心肌纤维化程度, B 为 Western blot 检测大鼠心肌纤维化相关蛋白表达,

C 为 RT-qPCR 检测大鼠心肌纤维化相关基因 mRNA 水平。1 为假手术组, 2 为 AF 组, 3 为 AF+shControl 组, 4 为 AF+shNEAT1 组,

5 为 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组, 6 为 AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组。

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 AF 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 AF+shControl 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 AF+shNEAT1 组比较;

e 为 $P < 0.05$, 与 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组比较。

Figure 5. Effects of NEAT1 on myocardial fibrosis in AF rats by regulating miR-27b-3p

2.5 miR-27b-3p 下调 SP1 的表达

TargetScan 软件预测显示, SP1 3'UTR 序列中存在 miR-27b-3p 结合位点(图 6A)。与 miR-Control+WT-SP1 组相比, miR-27b-3p+WT-SP1 组荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$; 图 6B)。与对照组和 miR-Control

组相比, miR-27b-3p 组 SP1 mRNA 和蛋白的表达水平降低(均 $P < 0.05$); 与对照组和 anti-miR-Control 组相比, anti-miR-27b-3p 组 SP1 mRNA 和蛋白的表达水平升高(均 $P < 0.05$; 图 6C 和 6D)。

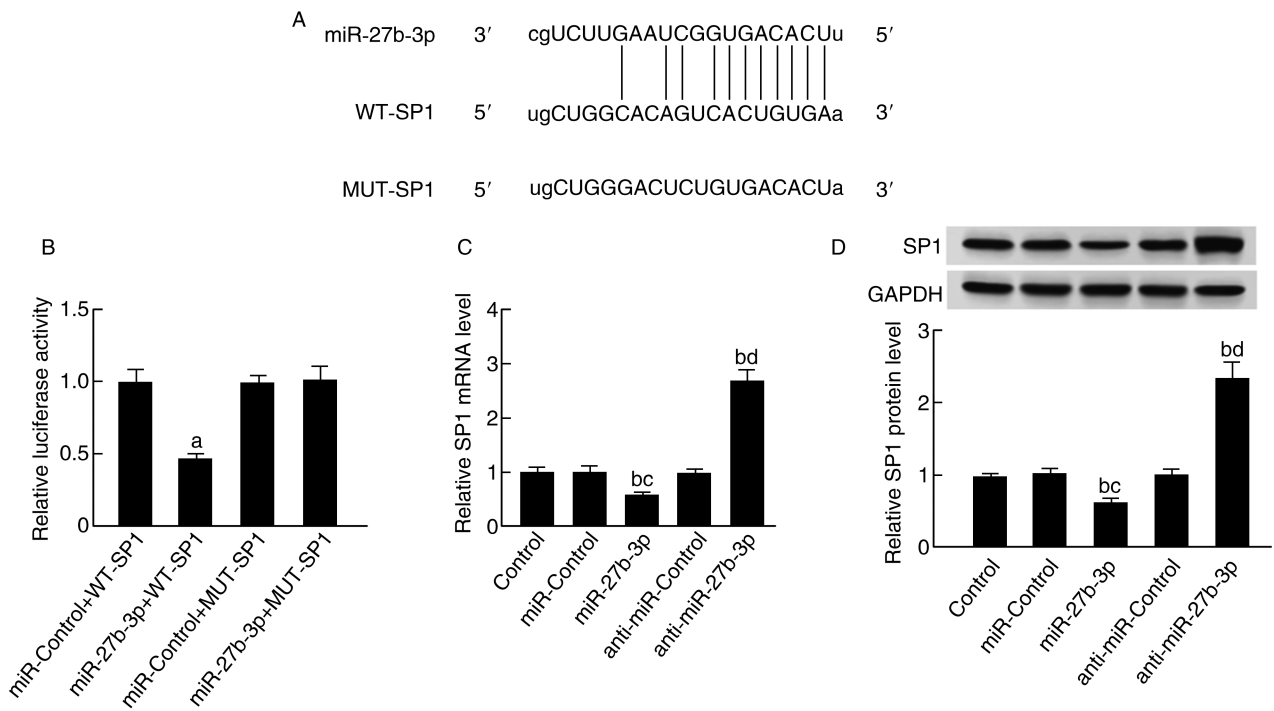


图 6. miR-27b-3p 靶向调控 SP1

A 为 SP1 和 miR-27b-3p 的结合位点, B 为荧光素酶活性分析, C 为上调或抑制 miR-27b-3p 对 SP1 mRNA 表达的影响, D 为上调或抑制 miR-27b-3p 对 SP1 蛋白表达的影响。a 为 $P < 0.05$, 与 miR-Control+WT-SP1 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 miR-Control 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 anti-miR-Control 组比较。

Figure 6. miR-27b-3p targeted the regulation of SP1

2.6 NEAT1 通过下调 miR-27b-3p 正向调控 SP1 的表达

与假手术组相比, AF 组 SP1 mRNA 和蛋白的表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 AF 组、AF+shControl 组相比, AF+shNEAT1 组 SP1 mRNA 和蛋白的表达水平

降低 ($P < 0.05$); 与 AF+shNEAT1 组、AF+shNEAT1+anti-miR-Control 相比, AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组 SP1 mRNA 和蛋白的表达水平升高 ($P < 0.05$; 图 7)。

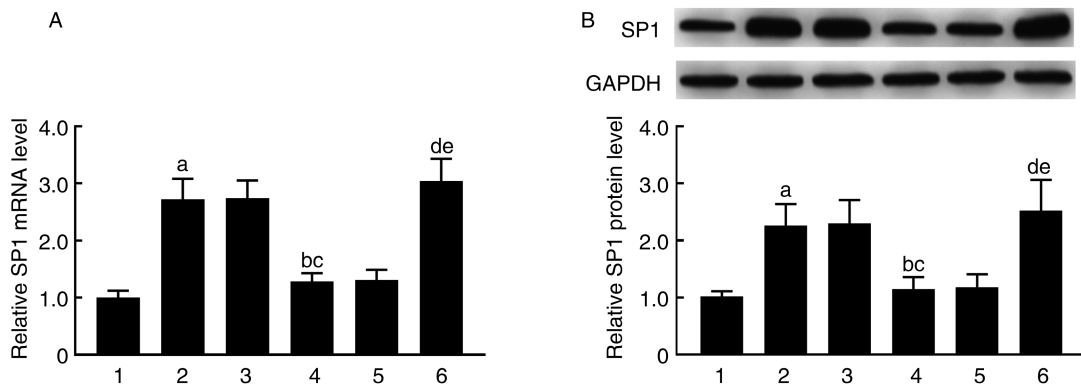


图 7. NEAT1 通过下调 miR-27b-3p 的表达影响 SP1 表达

A 为 RT-qPCR 检测 SP1 mRNA 表达, B 为 Western blot 检测 SP1 蛋白表达及量化图。1 为假手术组, 2 为 AF 组, 3 为 AF+shControl 组, 4 为 AF+shNEAT1 组, 5 为 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组, 6 为 AF+shNEAT1+anti-miR-27b-3p 组。a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 AF 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 AF+shControl 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 AF+shNEAT1 组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 AF+shNEAT1+anti-miR-Control 组比较。

Figure 7. NEAT1 affects SP1 expression by down-regulating the expression of miR-27b-3p

3 讨论

近年来的功能性研究表明, lncRNA 和 miRNA 在包括 AF 在内的肝脏相关疾病的病理生理学中发挥重要作用, 但这些参与 AF 的 lncRNA 分子机制还不清楚^[13-14]。本研究成功构建了乙酰胆碱-CaCl₂ 诱导的 AF 大鼠模型, 首次为 NEAT1 通过调节 miR-27b-3p/SP1 轴在 AF 和 AF 诱导的心肌纤维化中发挥重要作用提供了实验证据。

越来越多的研究表明, 心房纤维化参与了 AF 的病理过程, 抑制心房纤维化是预防和治疗 AF 的合理途径^[15]。NEAT1 作为一种新型 lncRNA, 已有研究发现沉默其表达可以减轻缺氧复氧心肌细胞氧化损伤, 减少心肌细胞凋亡^[16]。最近的研究表明 lncRNA NEAT1 在 AF 患者中上调, 敲除后抑制心脏成纤维细胞的胶原生成及小鼠心房纤维化, 提示 NEAT1 在 AF 及 AF 诱导的心肌纤维化中发挥重要作用^[6]。本研究通过生物信息学分析筛选出 NEAT1 的候选靶基因 miR-27b-3p。为了评估 NEAT1 和 miR-27b-3p 在 AF 中的生物学功能, 本研究成功建立了 AF 大鼠模型, 发现 AF 大鼠左心房组织中 NEAT1 表达升高, miR-27b-3p 表达降低, 与 Dai 等^[6] 和 Lv 等^[8] 的结果基本一致。此外, 本研究发现, 下调内源性 NEAT1 可显著缓解大鼠 AF, 表现为 AF 易感性和持续时间降低。然而, 抑制 miR-27b-3p 可逆转 NEAT1 下调的这些效应。这些发现为 NEAT1 和 miR-27b-3p 可能的靶点关系以及 NEAT1 通过调节 miR-27b-3p 在 AF 中的关键作用提供了证据。本研究证实, 抑制 NEAT1 的表达可上调 AF 大鼠左心房组织中 miR-27b-3p 的表达, 且荧光素酶活性检测和 RT-qPCR 检测结果证实 NEAT1 对 miR-27b-3p 的靶向负性调控作用。AF 持续存在的基础是心房纤维化, 心房纤维化是由心肌细胞凋亡导致的^[17]。此外, 心肌细胞凋亡和细胞外基质的生成和转换可能有助于结构重塑和 AF 易感^[18]。之前的研究表明, 沉默 miR-27b 削弱了缺氧复氧刺激的心肌细胞凋亡, miR-27b-3p 是 miR-27b 成熟体 miRNA 之一^[19]。与此相反, 本研究发现, 抑制 miR-27b-3p 显著增加 NEAT1 敲低所减弱的心肌细胞凋亡, 这可能是疾病类型不同或 miRNA 前体和成熟体的差异导致的, 提示 AF 大鼠中存在一种新的 NEAT1/miR-27b-3p 轴调控因子。

考虑到心房纤维化的发生和发展是 AF 心房结构重塑的突出表现, 并被认为是 AF 延续的关键底

物点^[18], 故本研究还探讨了 NEAT1/miR-27b-3p 轴对 AF 大鼠心肌纤维化的影响。胶原含量的测定是心脏纤维化研究的一个重要指标。本研究发现, AF 大鼠胶原含量显著增加, 敲低 NEAT1 可显著减轻 AF 纤维化, 而 anti-miR-27b-3p 显著逆转下调 NEAT1 对 AF 纤维化的缓解作用。NEAT1/miR-27b-3p 轴显著影响 AF 纤维化。值得注意的是, 在 AF 大鼠中心肌组织主要基质蛋白 COL I、COL III 过度表达, 胶原积累, 最终导致 AF 纤维化^[20]。另一种有效的促纤维化因子 CTGF 与 AF 的病理生理条件有关, 通常被认为是 AF 复发的重要预测因子^[21]。本研究发现, NEAT1/miR-27b-3p 轴显著影响 AF 大鼠纤维化及纤维化相关基因 COL III、CTGF、TGF- β 1 的表达, 其中 TGF- β 1 参与心脏重构, 促进胶原合成, 均可诱导心房纤维化。总之, 这些发现为 NEAT1/miR-27b-3p 轴是 AF 心房纤维化的一种新的调节因子提供了证据。

TGF- β 1 可与 SP1 结合, 并可被 SP1 激活^[22]。前期研究显示, 在大鼠模型中阻断 SP1 表达能够抑制子宫内皮纤维化, 提示 SP1 在纤维化调节中发挥作用^[23]。lncRNA 可将 miRNA 与靶 mRNA 分离, 通过作为一种竞争性内源 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) 来发挥调控作用。例如, NEAT1 通过在胸主动脉瘤中作为 miR-324-5p 的 ceRNA 来促进 RAN 表达^[24]。基于这些发现, 本研究猜测 NEAT1 可能通过 ceRNA 机制参与调控 SP1 的表达。本研究中, 生物信息学分析显示 miR-27b-3p 与 SP1 存在靶向结合位点, 并且证实 NEAT1 可通过抑制 miR-27b-3p 的表达促进 SP1 的表达。重要的是, 沉默 miR-27b-3p 均可显著消除 NEAT1 下调对 AF 大鼠心肌细胞凋亡、纤维化和 TGF- β 1 等纤维相关基因表达的抑制作用。本研究结果揭示了 NEAT1 在 AF 中促纤维化作用的 ceRNA 机制。然而, 沉默 SP1 能否消除 NEAT1 过表达对 AF 大鼠心肌纤维化的促进作用还不清楚, 需要进一步研究。

综上所述, lncRNA NEAT1、miR-27b-3p、SP1 参与 AF 的发生, 沉默 lncRNA NEAT1 通过促进 miR-27b-3p 的表达下调 SP1 水平, 进而抑制 AF 大鼠心肌细胞凋亡和纤维化, 为 AF 的分子靶向治疗提供新思路。

[参考文献]

- [1] JOHN R M, MICHAUD G F, STEVENSON W G. Atrial fibrillation hospitalization, mortality, and therapy[J]. Eur Heart J, 2018, 39 (44): 3958-3960.
- [2] BOERSMA L V A. Biventricular pacing after AV-node ablation for atrial fibrillation with heart failure: something old and something new, future standard, or just for the few[J]. Eur Heart J, 2018,

- 39(45): 4009-4011.
- [3] 马宗宾, 赵永辉, 刘倩玲. 心房颤动合并心力衰竭的治疗进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(6): 535-540.
MA Z B, ZHAO Y H, LIU Q L. Progress in treatment of atrial fibrillation complicated with heart failure [J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(6): 535-540.
- [4] JIN S S, LIN X F, ZHENG J Z, et al. lncRNA NEAT1 regulates fibrosis and inflammatory response induced by nonalcoholic fatty liver by regulating miR-506/GLI3 [J]. Eur Cytokine Netw, 2019, 30(3): 98-106.
- [5] HUANG S, XU Y, GE X, et al. Long noncoding RNA NEAT1 accelerates the proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy through activating Akt/mTOR signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11200-11207.
- [6] DAI H, ZHAO N, LIU H, et al. LncRNA nuclear-enriched abundant transcript 1 regulates atrial fibrosis via the miR-320/NPAS2 axis in atrial fibrillation [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(1): 647124-647133.
- [7] WANG X, XU Y, ZHU Y C, et al. LncRNA NEAT1 promotes extracellular matrix accumulation and epithelial-to-mesenchymal transition by targeting miR-27b-3p and ZEB1 in diabetic nephropathy [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12926-12933.
- [8] LV X, LI J, HU Y, et al. Overexpression of miR-27b-3p targeting Wnt3a regulates the signaling pathway of Wnt/ β -catenin and attenuates atrial fibrosis in rats with atrial fibrillation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019(1): 5703764-5703778.
- [9] CAO F, LI Z, DING W M, et al. LncRNA PVT1 regulates atrial fibrosis via miR-128-3p-SP1-TGF- β 1-Smad axis in atrial fibrillation [J]. Mol Med, 2019, 25(1): 7-18.
- [10] ZOU D, GENG N, CHEN Y, et al. Ranolazine improves oxidative stress and mitochondrial function in the atrium of acetylcholine-CaCl₂ induced atrial fibrillation rats [J]. Life Sci, 2016, 156(1): 7-14.
- [11] 钟小兰, 班努·库肯, 景江新. 过表达 Bax 抑制剂 1 通过抑制线粒体通透性转换孔开放及细胞凋亡减轻心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(3): 222-231.
ZHONG X L, BANNU K K, JING J G. Overexpression of Bax inhibitor-1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening and apoptosis [J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(3): 222-231.
- [12] 舒礼良, 黄功成, 郝爽, 等. 紫草素抑制 ERK1/2-NF- κ B 通路对大鼠心房颤动的改善作用 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(8): 757-762.
SHU L L, HUANG G C, HAO S, et al. Effect of shikonin on improving atrial fibrillation of rats by inhibiting ERK1/2-NF- κ B pathway [J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(8): 757-762.
- [13] WEI R, ZHANG L, HU W, et al. Long non-coding RNA AK038897 aggravates cerebral ischemia/reperfusion injury via acting as a ceRNA for miR-26a-5p to target DAPK1 [J]. Exp Neurol, 2019, 314(1): 100-110.
- [14] CHANG S H, YEH Y H, LEE J L, et al. Transforming growth factor- β -mediated CD44/STAT3 signaling contributes to the development of atrial fibrosis and fibrillation [J]. Basic Res Cardiol, 2017, 112(5): 58-74.
- [15] 张韩, 刘枫, 鲁雪丽, 等. miR-27b 靶向 BNIP3 对缺氧复氧心肌细胞 Wnt/ β -catenin 通路及自噬的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(4): 830-835.
ZHANG H, LIU F, LU X L, et al. Effect of miR-27b targeting BNIP3 on Wnt/ β -catenin pathway and autophagy in hypoxia/reoxygenation cardiomyocyte [J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(4): 830-835.
- [16] 邴艳萍, 宋璇, 姜楠, 等. 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 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(12): 1034-1041.
BING Y P, SONG X, JIANG N, et al. Effects of lncRNA NEAT1 on oxidative stress injury and apoptosis of hypoxic-reoxygenated rat cardiomyocytes by regulating miR-206 [J]. Chin J Arterioscler, 2020, 28(12): 1034-1041.
- [17] YAO L, ZHOU B, YOU L, et al. LncRNA MIAT/miR-133a-3p axis regulates atrial fibrillation and atrial fibrillation-induced myocardial fibrosis [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(4): 2605-2617.
- [18] TRAPPE K, THOMAS D, BIKOU O, et al. Suppression of persistent atrial fibrillation by genetic knockdown of caspase 3: a pre-clinical pilot study [J]. Eur Heart J, 2013, 34(2): 147-157.
- [19] JALIFE J. Mechanisms of persistent atrial fibrillation [J]. Curr Opin Cardiol, 2014, 29(1): 20-27.
- [20] SUN Y, HUANG Z Y, WANG Z H, et al. TGF- β 1 and TIMP-4 regulate atrial fibrosis in atrial fibrillation secondary to rheumatic heart disease [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 406(1-2): 131-138.
- [21] SONG Z P, LIU X, ZHANG D D. Connective tissue growth factor: a predictor of recurrence after catheter ablation in patients with nonparoxysmal atrial fibrillation [J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2014, 37(5): 630-637.
- [22] MARTIN-GALLAUSIAUX C, BÉGUET-CRESPEL F, MARINELLI L, et al. Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF- β 1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9742-9755.
- [23] LI J, DU S, SHENG X, et al. MicroRNA-29b inhibits endometrial fibrosis by regulating the SP1-TGF- β 1/Smad-CTGF axis in a rat model [J]. Reprod Sci, 2016, 23(3): 386-394.
- [24] GAO C, SUN J, ZHANG Z, et al. NEAT1 boosts the development of thoracic aortic aneurysm through targeting miR-324-5p/RAN [J]. Arch Med Res, 2022, 53(1): 93-99.
- (此文编辑 文玉珊)