

网络出版时间:2024-03-22 11:00:07 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.014

lncRNA MALAT1 通过调控 miR-181a 促进氧化应激模型中的心肌细胞损伤

郑丽华¹,王思瑶²,李鹏¹

摘要 目的 在心肌细胞氧化应激模型中探究长链非编码 RNA(lncRNA)转移相关肺腺癌转录物 1(MALAT1)与微小 RNA-181a(miR-181a)的表达及作用机制。方法 qRT-PCR 检测 30 例急性心肌梗死患者(AMI 组)和 30 例健康对照组(Normal 组)外周血中 MALAT1 与 miR-181a 的表达, Pearson 相关性分析明确 MALAT1 与 miR-181a 在 AMI 中的相关性; lncBase 在线预测数据库预测 MALAT1 与 miR-181a 之间的结合位点,并利用双荧光素酶基因报告实验进行验证;采用过氧化氢(H₂O₂)处理人心肌细胞株 AC16 建立心肌细胞氧化应激模型,将沉默 MALAT1 表达的 siRNA(si-MALAT1)和阴性对照 si-NC 转入 AC16 细胞中,并将细胞分为: H₂O₂ 处理(H₂O₂)组, H₂O₂ + si-NC 组, H₂O₂ + si-MALAT1 组; CCK-8 法检测各组细胞的增殖活性, TUNEL 法检测细胞凋亡情况, Western blot 实验检测各组细胞中促凋亡蛋白裂解型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase-3)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和凋亡抑制蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)的表达水平。结果 与 Normal 组相比, AMI 组患者 MALAT1 的表达水平升高,而 miR-181a 的表达水平降低($P < 0.05$),且 MALAT1 和 miR-181a 表达呈负相关。lncBase 在线预测数据库预测和双荧光素酶基因报告实验表明 MALAT1 可靶向调控 miR-181a 表达。与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂ + si-MALAT1 组细胞活力升高($P < 0.05$), TUNEL 阳性率降低($P < 0.05$), cleaved caspase-3 和 Bax 表达水平降低($P < 0.05$),而 Bcl-2 的表达水平升高($P < 0.05$), H₂O₂ + si-NC 组均无明显改变($P > 0.05$)。结论 lncRNA MALAT1 在 AMI 患者中表达升高,可通过靶向抑制 miR-181a 促进氧化应激诱导的心肌细胞损伤。

关键词 MALAT1; microRNA-181a; 急性心肌梗死; 细胞凋亡; 细胞增殖; 心肌细胞损伤

中图分类号 R 542.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0445-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.014

2024-02-27 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2021D01C439)

作者单位:新疆医科大学第五附属医院¹ 心血管内科、² 内分泌科,乌鲁木齐 830011

作者简介:郑丽华,女,主治医师;

李鹏,男,副主任医师,责任作者, E-mail: 49278630@qq.com

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是一种以持续严重的心肌缺血所引起的心肌坏死为特征的缺血性心脏病^[1-2]。众所周知,氧化应激在 AMI 的发生和进展中起着重要作用,其不仅能够影响心肌细胞内钙离子浓度,还能导致线粒体膜电位的降低和线粒体呼吸链的受损,进而导致细胞损伤甚至凋亡^[3]。转移相关肺腺癌转录物 1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)是一种长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA),最初作为肺癌转移的预后标志被发现^[4]。研究^[5-8]表明, MALAT1 在多种肿瘤组织中高表达,并且可通过调控包括微小 RNA-181a(miRNA-181a, miR-181a)在内的多种 miRNAs 参与肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和扩散等生物学行为。此外, MALAT1 可通过调控内皮细胞功能、血管生长和氧化应激反应,参与多种心脏疾病的发展^[8-12]。因此,该研究旨在探究 MALAT1 在 AMI 患者中的表达,并通过建立心肌细胞的氧化应激模型进一步揭示 MALAT1 对心肌细胞损伤的具体保护机制,以期阐明 MALAT1 作为治疗 AMI 生物靶点的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床样本来源 收集 2021 年 5 月—2022 年 10 月至新疆医科大学第五附属医院心血管内科进行冠状动脉造影术以评估胸痛的 30 例 AMI 患者和 30 例健康的体检者的血清样本。联合使用胸前区疼痛、心电图 ST 段改变、血清肌钙蛋白 I 含量以及冠状动脉造影结果进行 AMI 诊断。纳入标准为:① AMI 组患者需符合 AMI 诊断标准;② 两组患者临床资料完整,且对本实验研究方法及其目的知情同意。排除标准:① 合并有严重感染、肝炎、肝衰竭、终末期肾病、心肌病、先天性心脏及免疫、代谢系统疾病者;② 合并肿瘤或恶性疾病史者;③ 72 h 内接受抗凝或溶栓治疗者;④ 未取得患者及其家属知情同意者。抽取两组人群肘静脉血 7 ml, 1 500 r/min

离心 10 min 后取上层血清,保存于 -20 °C 下以备后续使用。本研究经新疆医科大学第五附属医院医学伦理委员会审批(审批号:XJYK2021-37),所有患者均签署知情同意书。

1.1.2 细胞系和主要试剂 人心肌细胞株 AC16 购自上海同科生物科技有限公司(货号 TK2074); DMEM 培养基,青-链霉素混合液,胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号 10704022、10335516、10403725); 沉默 MALAT 表达的 siRNA (si-MALAT) 和阴性对照序列 (si-NC),过表达或抑制 miR-181a 的 miR-181a mimic 和 miR-181a inhibitor 及其阴性对照序列 miR-NC,野生型和突变型 MALAT1 片段(广州锐博生物技术有限公司,货号 SIGS0010925-1、SIGS0016181-1、SIGS0017642-0、SIGW0026531-1、SIGW0026530-1);细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒(美国 Abcam 公司,货号:ab214730);RNA 提取试剂盒、过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂)、反转录试剂盒(北京天根生物技术有限公司,货号:DP209、DP015、DP1129); Lipofectamine 2000 试剂(美国 Invitrogen 公司,货号:A24019);二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid assay, BCA) 蛋白检测试剂盒, DAPI 试剂, 蛋白酶抑制剂和 RIPA 缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C11573、C01824、C11206、C13739);兔抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2), 抗 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax), 抗裂解型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved caspase-3) 和 GAPDH 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:10119-1-AP、24197-1-AP、02197-1-AP、21495-1-AP)。HRP 标记的山羊抗兔 IgG, SYBR-Green qRT-PCR 试剂盒, 增强型 ECL 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号:P805、P316、P720); Triton X-100 试剂(北京雅安达生物技术有限公司,货号:9002-93-1); TUNEL 试剂盒(瑞士 Roche 公司,货号:900127); pmirGLO 质粒, 荧光素酶报告系统(美国 Promega 公司,货号:E2269、G7901)。

1.1.3 主要仪器 超净工作台(美国 Thermo 公司,型号:51029704);凝胶电泳仪、qRT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:X005-1、IO5);流式细胞仪 FACS-Calibur (美国 BD 公司,型号:FACSC- II);分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司,型号:752N);荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号:CZ51)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 使用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 AC16 细胞。采用 H₂O₂ 处理 AC16 细胞建立心肌细胞氧化应激模型。使用不同浓度(0、50、150 和 200 μmol/L)的 H₂O₂ 处理 AC16 细胞 12 h 以筛选最佳处理浓度。采用筛选出的最佳处理浓度(200 μmol/L)的 H₂O₂ 处理 AC16 细胞 0、4、8 和 12 h 以筛选最佳处理时间。

1.2.2 细胞转染和分组 取生长状态良好的 AC16 细胞分为:正常培养的对照 (ctl) 组, H₂O₂ 处理 AC16 细胞 (H₂O₂ 组), H₂O₂ 处理转染 si-NC 或 si-MALAT 细胞的 H₂O₂ + si-NC 组和 H₂O₂ + si-MALAT 组, H₂O₂ 处理 si-MALAT 和 miR-NC 共转染的 H₂O₂ + si-MALAT + miR-NC 组, H₂O₂ 处理 si-MALAT 和 miR-181a inhibitor 共转染的 H₂O₂ + si-MALAT + miR-181a inhibitor 组。将 si-MALAT 或 miR-181a inhibitor 及其相应的阴性对照序列参考 Lipofectamine 2000 试剂说明书转染入细胞中,转染 24 h 后,用 200 μmol/L 的 H₂O₂ 处理 AC16 细胞 12 h,随后进行后续检测。

1.2.3 qRT-PCR 检测 MALAT 和 miR-181a 的表达水平 按照 RNA 提取试剂盒说明书方法提取两组患者血清和上述各组 AC16 细胞中的总 RNA。采用分光光度计在 260/280 nm 处检测提取的 RNA 的浓度与纯度。使用反转录试剂盒将上述 RNA 逆转录为 cDNA,再采用 SYBR-Green 试剂盒进行 qRT-PCR 反应。以 GAPDH 或 U6 为内参,2^{-ΔΔC_T}方法计算待测细胞中 MALAT 和 miR-181a 的表达。本研究使用的引物序列如表 1 所示。

表 1 RT-PCR 引物序列

| 基因名称 | 引物序列(5'-3') |
|----------|---|
| MALAT | F:GAATTGCGTCATTTAAAGCCTAGTT R:ACGUGACACGUUCGAGAATT |
| miR-181a | F:GGGAACATTCAACGCTGTCC R:GTGCGTGTCTGGAGTCC |
| GAPDH | F:AGTTCGGTGTGAACGGATTG R:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA |
| U6 | F:GCTGGTGGAGCTGAAGAATG R:GCAGTACTTGTGCTGCTG |

1.2.4 荧光素酶基因报告实验 使用 lncBase 在线预测数据库 (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=lncBase/index>) 预测 MALAT1 与 miR-181a 之间可能的结合位点。为探究 MALAT1 与 miR-181a 之间的相关性,将野生型和

突变型 MALAT1 片段分别插入 pmirGLO 质粒的 Nhe I 和 Sal I 之间,简称 MALAT1-WT 和 MALAT1-MUT,并将其与 miR-181a mimic 或 miR-NC 共转染入 AC16 细胞。转染 48 h 后裂解细胞,用荧光素酶报告分析系统检测各组 AC16 细胞中荧光素酶活性。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖活力 取各组 AC16 细胞,按 2×10^4 /孔接种至 96 孔板中,置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱孵育 24 h 后,每孔加入 $10 \mu\text{l}$ 的 CCK-8 试剂,继续孵育 4 h 后,在分光光度计 450 nm 处测定每孔吸光度值。

1.2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡 取各组 AC16 细胞,采用 0.1% Triton X-100 透化细胞载玻片,按照 TUNEL 试剂盒说明书方法加入 TUNEL 试剂, 37°C 避光孵育 30 min 后加入 DAPI 试剂染核,再次避光孵育 5 min 后,在荧光显微镜下进行观察,并在高倍视野下拍照。TUNEL 阳性细胞率 = TUNEL 染色阳性数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.7 Western blot 实验检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase-3 的表达 取各组 AC16 细胞,采用蛋白酶抑制剂和 RIPA 缓冲液提取细胞内总蛋白。BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。利用 SDS-PAGE 将蛋白样品进行分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上。5% 脱脂奶粉阻断抗体后加入稀释后的一抗,具体为:Bcl-2 (1 : 2 000), Bax (1 : 2 000), cleaved caspase 3 (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 5 000), 4°C 孵育过夜后,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 10 000) 作为二抗,室温下孵育 2 h。最后采用增强型 ECL 试剂盒在凝胶成像系统中进行显影,ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析。所有数据均以均数 \pm 标准差表示。两组间比较使用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,各组间比较采用 LSD- t 检验。 $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MALAT1 与 miR-181a 在两组受试者中的表达情况及相关性分析 AMI 组平均年龄 (55.10 ± 4.22) 岁,男/女 = 19/11; Normal 组的平均年龄 (56.24 ± 3.59) 岁,男/女 = 20/10。两组患者在年龄和性别比例方面的差异均无统计学意义 ($t = 2.46, 3.52, P = 0.55, 0.71$)。qRT-PCR 检测结果显示,与 Normal 组相比,MALAT1 在 AMI 组患者外周血样本中的表达水平升高 ($t = 33.57, P = 0.019$),而 miR-181a 的表达水平降低 ($t = 22.68, P = 0.036$) (图 1A、B)。相关分析的结果显示,在 AMI 患者外周血样本中 MALAT1 表达和 miR-181a 表达呈负相关 ($r = -0.605, P < 0.01$) (图 1C)。上述结果表明,MALAT1 和 miR-181a 可能参与 AMI 的发病机制。

2.2 H_2O_2 对心肌细胞中 MALAT1 和 miR-181a 表达的影响 qRT-PCR 检测结果显示,与 $0 \mu\text{mol/L}$ 组相比,在不同浓度 H_2O_2 处理下,AC16 细胞中 MALAT1 的表达水平明显升高,且呈浓度和时间依赖性 ($F = 73.09, P < 0.05$),且当以 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 AC16 细胞时,MALAT1 表达水平呈升高趋势 ($F = 63.29, P < 0.05$) (图 2A、B)。而 AC16 细胞中 miR-181a 的表达水平则随着 H_2O_2 处理浓度与时间的增加呈降低趋势 ($F = 55.60, P < 0.05$) (图 2C、D)。

2.3 MALAT1 靶向调控 miR-181a 表达 lnc-Base 在线预测数据库预测显示,MALAT1 与 miR-181a 之间存在潜在结合位点(图 3A)。双荧光素酶基因报告实验结果显示,与共转染 miR-NC 和 MALAT1-WT 的 AC16 细胞相比,共转染 miR-181a mimic 和 MALAT1-WT 的细胞中荧光素酶活性降低 (LSD- $t = 3.41, P < 0.05$);而转染 MALAT1-MUT 后,共转

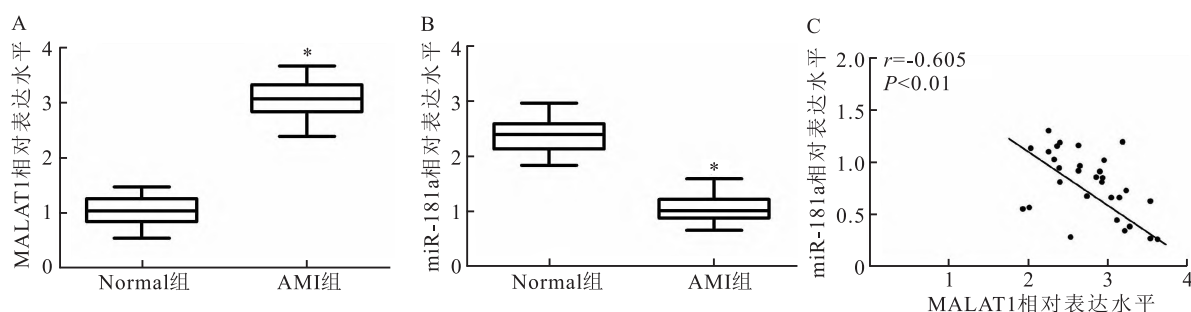


图1 两组受试者中 MALAT1 与 miR-181a 表达水平的比较以及 AMI 患者 MALAT1 与 miR-181a 的相关性分析

A、B: qRT-PCR 检测 MALAT1 和 miR-181a 在两组受试者中的表达水平; C: Pearson 相关性分析分析 MALAT1 与 miR-181a 在 AMI 中的相关性; 与 Normal 组比较: * $P < 0.05$

染 miR-NC 或 miR-181a mimic 的细胞中荧光素酶活性差异均无统计学意义 ($LSD-t = 1.67, P > 0.05$) (图 3B)。qRT-PCR 检测结果显示,与ctl 组相比, H_2O_2 组、 $H_2O_2 + si-NC$ 组和 $H_2O_2 + si-MALAT1$ 组中 MALAT1 表达均升高 ($LSD-t = 44.59, 27.31, 30.15, P < 0.05$), 而 miR-181a 表达均降低 ($LSD-t = 11.26, 19.83, 10.34, P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, $H_2O_2 + si-MALAT1$ 组中 MALAT1 表达降低 ($LSD-t = 38.60, P < 0.05$), miR-181a 表达升高 ($LSD-t = 71.25, P < 0.05$), 而 $H_2O_2 + si-NC$ 组中 MALAT1 与 miR-181a 表达均无明显改变 ($LSD-t = 1.29, 2.25, P > 0.05$) (图 3C、D)。上述实验结果表明,在心肌细胞中 MALAT1 可靶向调控 miR-181a 表达。

2.4 下调 MALAT1 对 H_2O_2 诱导的心肌细胞损伤的影响

CCK-8 法检测结果显示,与ctl 组相比,

H_2O_2 组、 $H_2O_2 + si-NC$ 组和 $H_2O_2 + si-MALAT1$ 组中 AC16 细胞的细胞活力均降低 ($LSD-t = 36.71, 27.35, 7.29, 均 P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, $H_2O_2 + si-MALAT1$ 组细胞活力升高 ($LSD-t = 6.74, P < 0.05$), 而 $H_2O_2 + si-NC$ 组无明显改变 ($LSD-t = 0.52, P > 0.05$) (图 4)。TUNEL 染色结果显示,与ctl 组相比, H_2O_2 组、 $H_2O_2 + si-NC$ 组和 $H_2O_2 + si-MALAT1$ 组中 AC16 细胞的 TUNEL 阳性率均增加 ($LSD-t = 20.12, 17.48, 44.10, P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, $H_2O_2 + si-MALAT1$ 组的 TUNEL 阳性率降低 ($LSD-t = 13.19, P < 0.05$), $H_2O_2 + si-NC$ 组无明显改变 ($LSD-t = 2.17, P > 0.05$) (图 5); Western blot 检测结果显示,与ctl 组相比, H_2O_2 组、 $H_2O_2 + si-NC$ 组和 $H_2O_2 + si-MALAT1$ 组 AC16 细胞中促凋亡蛋白 cleaved caspase-3 和 Bax 表达水平均升高

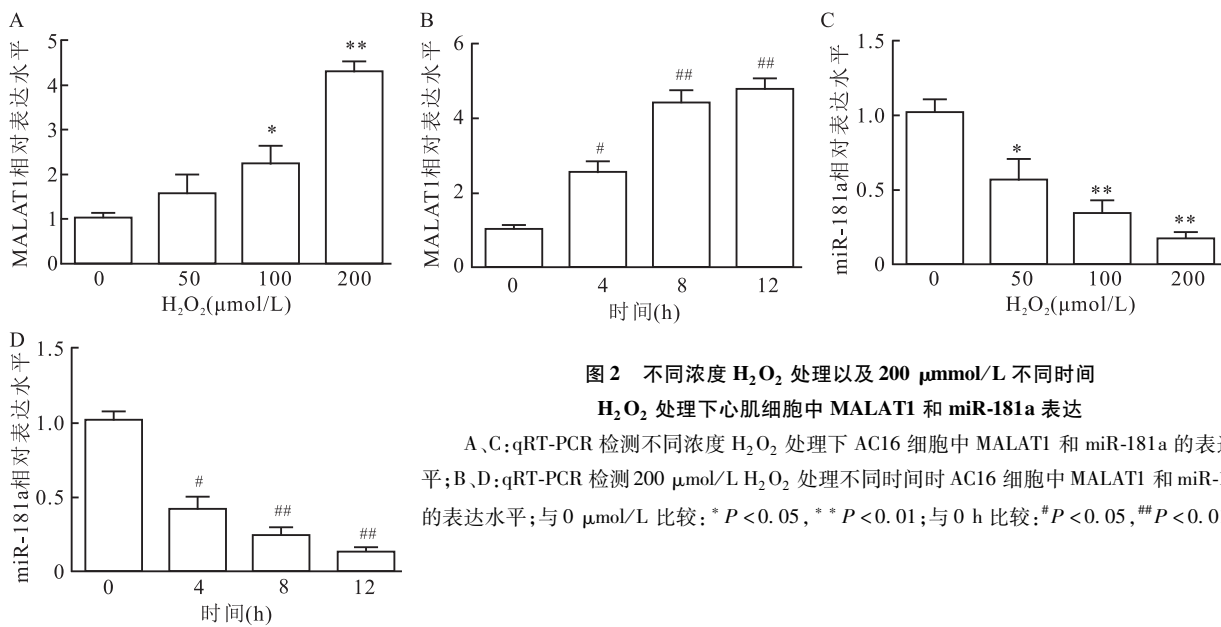


图2 不同浓度 H_2O_2 处理以及 200 $\mu\text{mol/L}$ 不同时间 H_2O_2 处理下心肌细胞中 MALAT1 和 miR-181a 表达

A、C: qRT-PCR 检测不同浓度 H_2O_2 处理下 AC16 细胞中 MALAT1 和 miR-181a 的表达水平; B、D: qRT-PCR 检测 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理不同时间时 AC16 细胞中 MALAT1 和 miR-181a 的表达水平; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 0 h 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

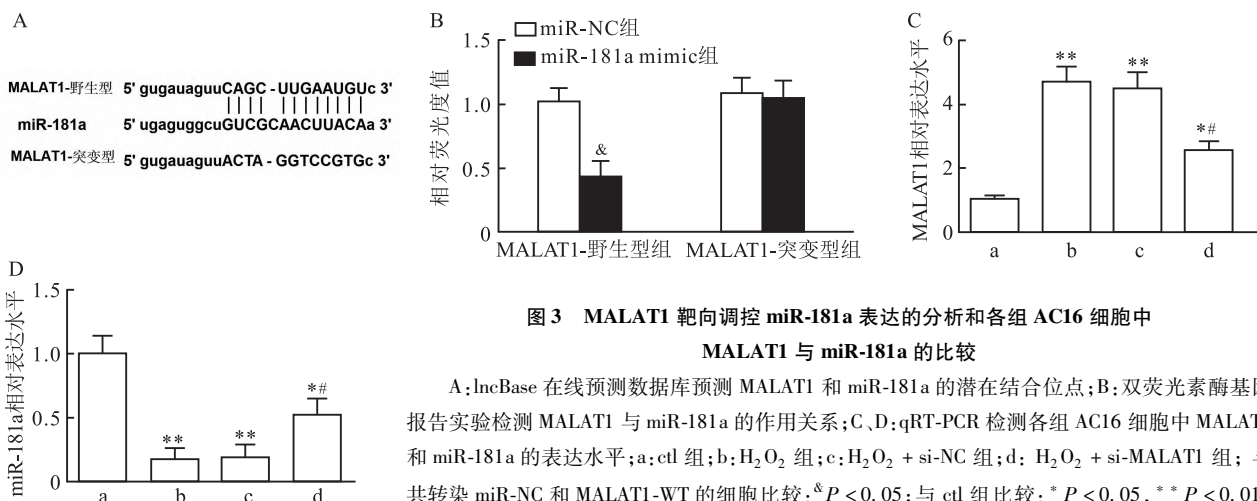


图3 MALAT1 靶向调控 miR-181a 表达的分析 and 各组 AC16 细胞中 MALAT1 与 miR-181a 的比较

A: IncBase 在线预测数据库预测 MALAT1 和 miR-181a 的潜在结合位点; B: 双荧光素酶基因报告实验检测 MALAT1 与 miR-181a 的作用关系; C、D: qRT-PCR 检测各组 AC16 细胞中 MALAT1 和 miR-181a 的表达水平; a:ctl 组; b: H_2O_2 组; c: $H_2O_2 + si-NC$ 组; d: $H_2O_2 + si-MALAT1$ 组; 与共转染 miR-NC 和 MALAT1-WT 的细胞比较: & $P < 0.05$; 与ctl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 H_2O_2 组比较: # $P < 0.05$

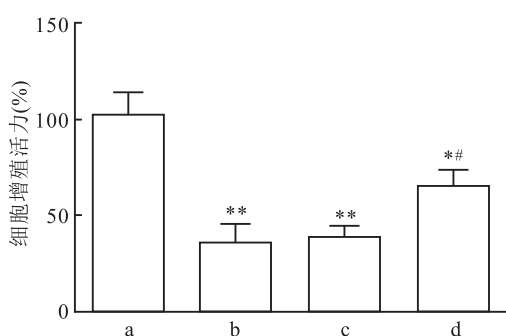


图4 各组心肌细胞的增殖活力的比较

a:ctl 组;b:H₂O₂ 组;c:H₂O₂ + si-NC 组;d: H₂O₂ + si-MALAT1 组;与ctl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与H₂O₂ 组比较: # $P < 0.05$

(LSD- $t = 38.64, 20.41, 41.73, 22.10, 10.52, 14.23, P < 0.05$), 凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达水平降低 (LSD- $t = 13.14, 13.49, 7.59, P < 0.05$);与H₂O₂ 组

相比,H₂O₂ + si-MALAT1 组中 cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平降低 (LSD- $t = 26.05, 19.41, P < 0.05$), 而 Bcl-2 的蛋白表达水平升高 (LSD- $t = 15.22, P < 0.05$), H₂O₂ + si-NC 组中上述蛋白表达均无明显改变 (LSD- $t = 1.17, 0.62, 2.58, P > 0.05$) (图6)。上述结果提示沉默 MALAT1 可以部分逆转 H₂O₂ 作用下的心肌细胞损伤。

2.5 抑制 miR-181a 表达对下调 MALAT1 在 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤中的作用

与ctl 组相比,转染 miR-181a inhibitor 的 AC16 细胞中 miR-181a 的表达水平降低 (LSD- $t = 16.49, P < 0.01$), 而转染 miR-NC 的细胞中 miR-181a 的表达水平差异无统计学意义 (LSD- $t = 2.10, P > 0.05$) (图7A)。与ctl 组相比,H₂O₂ 组、H₂O₂ + si-MALAT1 组、H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-NC 组和 H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组中的 AC16 细胞活力均降低

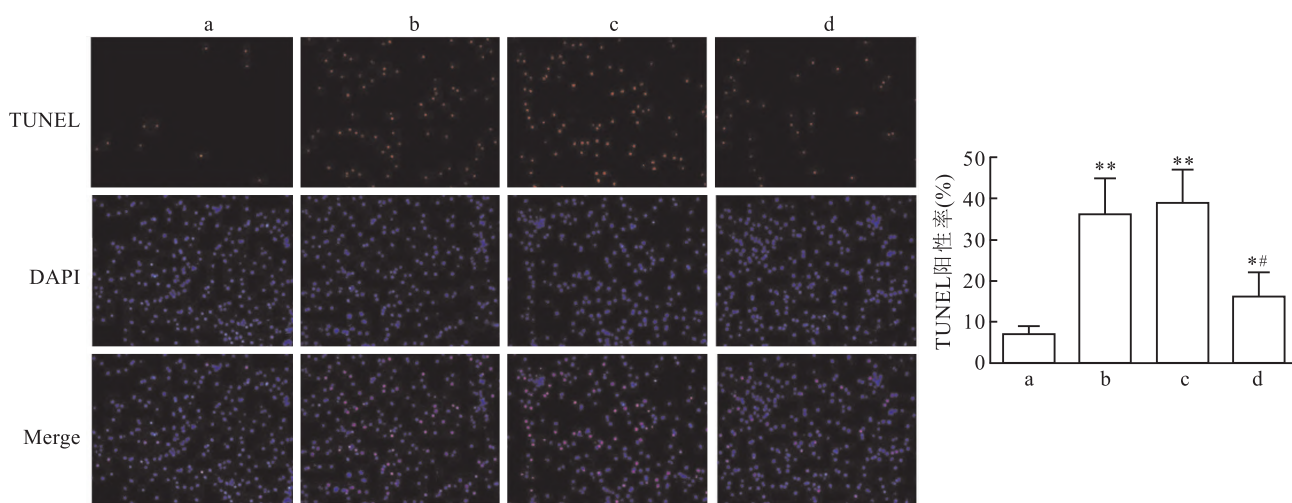


图5 各组心肌细胞凋亡的比较 ×400

a:ctl 组;b:H₂O₂ 组;c:H₂O₂ + si-NC 组;d: H₂O₂ + si-MALAT1 组;与ctl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与H₂O₂ 组比较: # $P < 0.05$

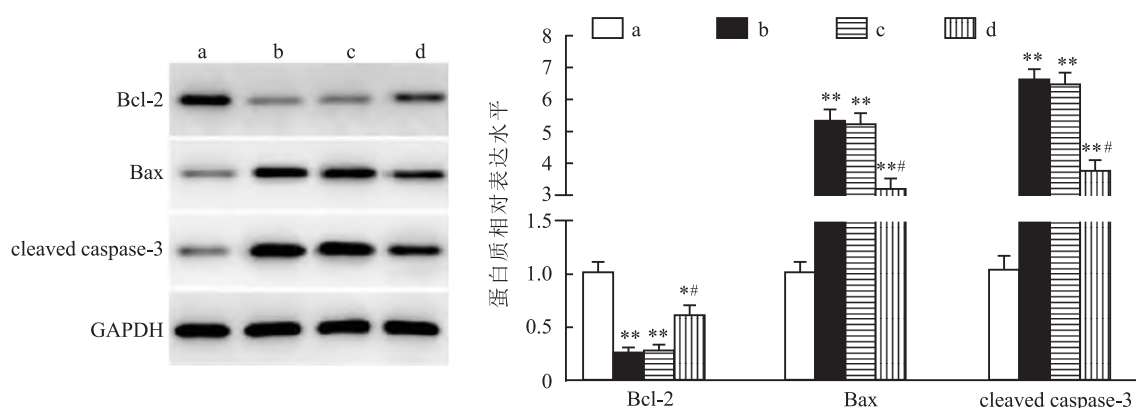


图6 各组细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平的比较

a:ctl 组;b:H₂O₂ 组;c:H₂O₂ + si-NC 组;d: H₂O₂ + si-MALAT1 组;与ctl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与H₂O₂ 组比较: # $P < 0.05$

(LSD-*t* = 19.11、8.64、7.94、20.73, *P* < 0.05), 而 TUNEL 阳性率均升高 (LSD-*t* = 19.30、9.12、8.26、17.18, *P* < 0.05); 与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂ + si-MALAT1 组和 H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-NC 组中细胞活力升高 (LSD-*t* = 8.64、8.43, *P* < 0.05), TUNEL 阳性率降低 (LSD-*t* = 7.72、8.10, *P* < 0.05), H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组差异无统计学意义 (LSD-*t* = 2.27、1.28, *P* > 0.05); 与 H₂O₂ + si-MALAT1 组相比, H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组细胞活力降低 (LSD-*t* = 9.84, *P* < 0.05), TUNEL 阳性率升高 (LSD-*t* = 10.36, *P* < 0.05), H₂O₂ + si-

MALAT1 + miR-NC 组差异无统计学意义 (LSD-*t* = 1.15、0.29, 均 *P* > 0.05) (图 7B、8); 与 ctl 组相比, H₂O₂ 组、H₂O₂ + si-MALAT1 组、H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-NC 组和 H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组细胞中 cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平均升高 (LSD-*t* = 13.04、8.51、9.60、12.46、12.25、7.14、7.19、12.90, 均 *P* < 0.05), Bcl-2 的表达水平降低 (LSD-*t* = 12.16、7.24、8.72、13.29, 均 *P* < 0.05); 与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂ + si-MALAT1 组, H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-NC 组中 cleaved caspase-3 和 Bax 表达水平降低 (LSD-*t* = 8.23、9.28、8.09、

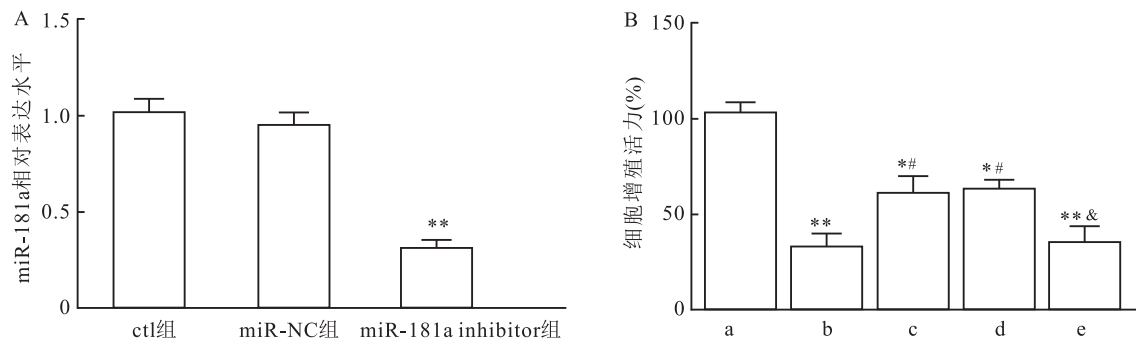


图 7 抑制 miR-181a 表达对各组心肌细胞增殖活力的影响

A: RT-PCR 检测转染后 AC16 细胞中 miR-181a 的表达水平; B: CCK-8 法检测各组 AC16 细胞的增殖活力; a: ctl 组; b: H₂O₂ 组; c: H₂O₂ + si-MALAT1 组; d: H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-NC 组; e: H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组; 与 ctl 组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与 H₂O₂ 组比较: # *P* < 0.05; 与 H₂O₂ + si-MALAT1 组比较: & *P* < 0.05

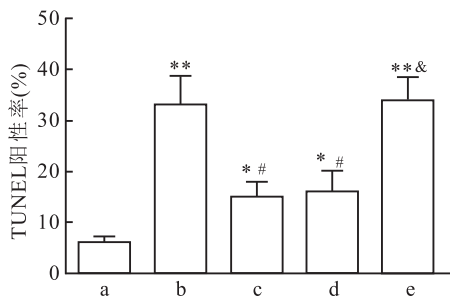
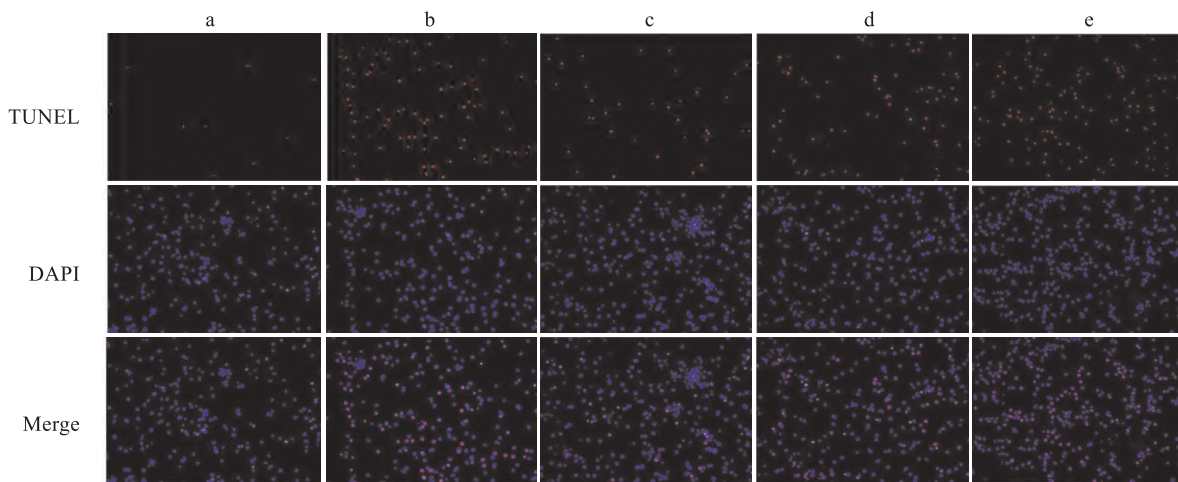


图 8 抑制 miR-181a 表达对各组心肌细胞凋亡的影响 ×400

a: ctl 组; b: H₂O₂ 组; c: H₂O₂ + si-MALAT1 组; d: H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-NC 组; e: H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组; 与 ctl 组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与 H₂O₂ 组比较: # *P* < 0.05; 与 H₂O₂ + si-MALAT1 组比较: & *P* < 0.05

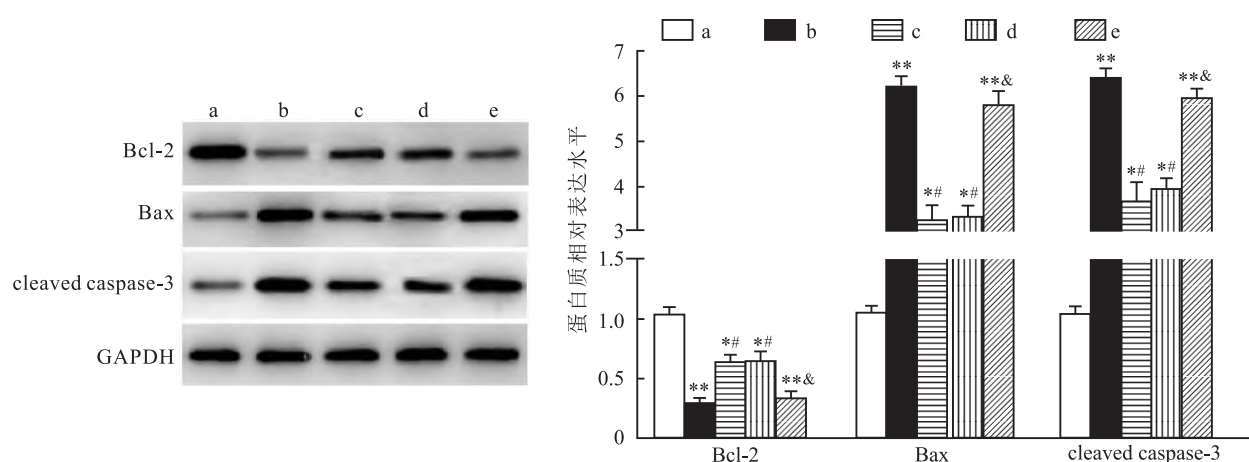


图9 抑制 miR-181a 表达对各组心肌细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase-3 表达的影响

a:ctl 组;b:H₂O₂ 组;c:H₂O₂ + si-MALAT1 组;d: H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-NC 组;e: H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组;与ctl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 H₂O₂ 组比较: # $P < 0.05$;与 H₂O₂ + si-MALAT1 组比较: & $P < 0.05$

8.94, 均 $P < 0.05$), Bcl-2 的表达水平升高 (LSD- $t = 10.71, 11.05, P < 0.05$), 而 H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组中上述蛋白表达均无明显改变;与 H₂O₂ + si-MALAT1 组相比, H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-181a inhibitor 组细胞 cleaved caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平升高 (LSD- $t = 47.56, 62.05, P < 0.05$), Bcl-2 的表达水平降低 (LSD- $t = 15.21, P < 0.05$), H₂O₂ + si-MALAT1 + miR-NC 组无明显改变 (图9)。上述结果提示沉默 MALAT1 可通过促进细胞中 miR-181a 表达从而降低 H₂O₂ 对心肌细胞的损伤作用。

3 讨论

本研究通过体内外实验探讨 MALAT1 在 AMI 中的作用及相关分子机制,结果表明,与正常对照人群相比, MALAT1 在 AMI 患者中的表达上调。miR-181a 在癌症的发生中具有重要作用^[13]。研究^[14]表明, miR-181a 可通过激活蛋白激酶 B, 促进其下游蛋白内皮型一氧化氮合酶的磷酸化, 从而抑制心肌细胞凋亡, 缓解缺血再灌注诱导的心肌细胞损伤。这表明 miR-181a 可能参与心肌梗死的发生。在本研究中结果显示, 与正常对照人群相比, AMI 患者中 miR-181a 的表达降低, 且在 AMI 患者中, MALAT1 与 miR-181a 表达水平呈负相关。在胃癌中的研究^[7]显示 MALAT1 可负向调控 miR-181a-5p 表达参与肿瘤的发生与进展。这提示, 在 AMI 的发病中 MALAT1 也可能通过调控 miR-181a 参与心肌细胞的损伤。研究^[1]表明, 氧化应激是 AMI 后心肌损伤的重要原因。当发生心肌缺血时, 细胞内产生大量

的自由基, 从而使心肌细胞产生氧化应激, 导致细胞受损。因此, 本研究利用 H₂O₂ 建立心肌细胞氧化应激模型进行探究, 结果显示, MALAT1 在 H₂O₂ 刺激下的 AC16 细胞中高表达, 而 miR-181a 表达下调。这进一步提示 MALAT1 和 miR-181a 可能参与心肌细胞损伤。本研究生物信息学软件预测也显示 miR-181a 与 MALAT1 的 3'UTR 区存在结合位点, 双荧光素酶基因报告实验进一步验证了它们之间的相互作用关系。此外, qRT-PCR 实验结果也表明 MALAT1 可负向调控 miR-181a 的表达。这证明 MALAT1 可与 miR-181a 相互作用来参与心肌细胞损伤。

心肌细胞凋亡是 AMI 的重要病理特征, 故降低心肌细胞的凋亡水平是治疗心肌细胞损伤的重点^[15]。本研究结果表明, 下调 MALAT1 表达可抑制心肌细胞的凋亡, 并降低促凋亡蛋白 cleaved caspase-3 和 Bax 的表达水平, 而促进凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达。功能挽救实验结果表明, 抑制 miR-181a 表达可抵消下调 MALAT1 对心肌细胞的保护作用, 促进凋亡蛋白 cleaved caspase-3 和 Bax 的表达, 抑制 Bcl-2 的表达。这一结果显示, MALAT1 对心肌细胞凋亡的影响是由 miR-181a 介导的。进一步证明 MALAT1 与 miR-181a 相互作用共同参与心肌细胞损伤。

综上所述, 本研究表明, MALAT1/miR-181a 轴在调节心肌细胞损伤中具有重要作用。MALAT1 基因敲除可能通过促进 miR-181a 表达而减轻心肌细胞损伤, 提示 MALAT1 可能是 AMI 后心肌细胞损伤的潜在靶点。然而, 本研究患者规模有限, 大多数数

制研究是在 H₂O₂ 诱导的细胞中建立的。后期仍需在大规模的患者样本中来证实 MALAT1/miR-181a 轴的作用,且需在动物模型中验证其作为 AMI 的治疗靶点的潜力。

参考文献

- [1] Murphy A, Goldberg S. Mechanical complications of myocardial infarction[J]. *Am J Med*, 2022,135(12):1401–9.
- [2] 杨显娟,王立映,王建,等.基于生物信息学分析急性心肌梗死基因表达差异及中药干预[J]. *安徽医科大学学报*,2022,57(1):15–20.
- [3] Caughey M C, Arora S, Qamar A, et al. Trends, management, and outcomes of acute myocardial infarction hospitalizations with in-hospital-onset versus out-of-hospital onset: the ARIC study[J]. *J Am Heart Assoc*,2021,10(2):e018414.
- [4] Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2003,22(39):8031–41.
- [5] Malakoti F, Targhazeh N, Karimzadeh H, et al. Multiple function of lncRNA MALAT1 in cancer occurrence and progression[J]. *Chem Biol Drug Des*,2023,101(5):1113–37.
- [6] Goyal B, Yadav S R M, Awasthee N, et al. Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of long non-coding RNA MALAT1 in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021,1875(2):188502.
- [7] Lu Z, Luo T, Pang T, et al. MALAT1 promotes gastric adenocarcinoma through the MALAT1/miR-181a-5p/AKT3 axis[J]. *Open Biol*,2019,9(9):190095.
- [8] Zhang H, Liu B, Shi X, et al. Long noncoding RNAs: potential therapeutic targets in cardiocerebrovascular diseases[J]. *Pharmacol Ther*,2021,221:107744.
- [9] Chen Y, Li S, Zhang Y, et al. The lncRNA Malat1 regulates microvascular function after myocardial infarction in mice *via* miR-26b-5p/Mfn1 axis-mediated mitochondrial dynamics[J]. *Redox Biol*,2021,41:101910.
- [10] Wang S, Yao T, Deng F, et al. LncRNA MALAT1 promotes oxygen-glucose deprivation and reoxygenation induced cardiomyocytes injury through sponging miR-20b to enhance beclin1-mediated autophagy[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*,2019,33(6):675–86.
- [11] Jia P, Wu N, Jia D, et al. Downregulation of MALAT1 alleviates saturated fatty acid-induced myocardial inflammatory injury *via* the miR-26a/HMGB1/TLR4/NF- κ B axis[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*,2019,12(7):655–65.
- [12] Zhao J, Li L, Peng L. MAPK1 up-regulates the expression of MALAT1 to promote the proliferation of cardiomyocytes through PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015,8(12):15947–53.
- [13] Sun C X, Liu B J, Su Y, et al. MiR-181a promotes cell proliferation and migration through targeting KLF15 in papillary thyroid cancer[J]. *Clin Transl Oncol*,2022,24(1):66–75.
- [14] Zhang L X, Ding F, Wang C Q, et al. MiR-181a affects myocardial ischemia-reperfusion injury in rats *via* regulating akt signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019,23(14):6292–8.
- [15] 郑扬,黄玉冰,黄文霞,等.基于MAMs探究RVD1对衰老大鼠心肌细胞自噬与凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*,2023,58(11):1890–7.

LncRNA MALAT1 promoted myocardial cell damage in oxidative stress models by regulating miR-181a

Zheng Lihua¹, Wang Siyao², Li Peng¹

(¹Dept of Cardiology, ²Dept of Endocrinology, The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Abstract Objective To investigate the expression and mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) and microRNA-181a (miR-181a) in a myocardial cell oxidative stress model. **Methods** The expression of MALAT1 and miR-181a in peripheral blood of 30 patients with acute myocardial infarction (AMI group) and 30 healthy controls (Normal group) was detected by qRT-PCR. Pearson correlation analysis was performed to determine the correlation between MALAT1 and miR-181a in AMI. The binding sites between MALAT1 and miR-181a were predicted using the lncBase online prediction database and validated by dual-luciferase reporter assay. An oxidative stress model of myocardial cells was established by hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment in AC16 human myocardial cell line. siRNA targeting MALAT1 (si-MALAT) and negative control siRNA (si-NC) were transfected into AC16 cells, and the cells were divided into H₂O₂ treatment (H₂O₂) group, H₂O₂ + si-NC group, and H₂O₂ + si-MALAT group. Cell proliferation activity was detected by CCK-8 assay, cell apoptosis was assessed by TUNEL assay, and the expression levels of cleaved caspase-3, Bcl-2-

网络出版时间:2024-03-21 18:08:40 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.015

去泛素化酶 OTUB2 通过诱导 DDX54 活性增加中性粒细胞外诱捕网的形成以及促进结直肠癌细胞活力和侵袭能力

蒋良君¹, 李卫²

摘要 目的 探讨含 OTU 结构域的泛素醛结合蛋白 2 (OTUB2) 影响 RNA 解螺旋酶 54 (DDX54) 的活性及其对中性粒细胞外诱捕网 (NETs) 的形成和结直肠癌 (CRC) 细胞活力、侵袭的影响。方法 分离 CRC 患者和健康对照组的外周血中性粒细胞, 并使用佛波酯 (PMA) 或脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 刺激中性粒细胞 4 h; Western blot 检测 NETs 标记物髓过氧化物酶 (MPO) 和瓜氨酸组蛋白 H3 (Cit-H3) 的表达; 干预 SW480 细胞中 OTUB2 或 DDX54 的表达并将其和中性粒细胞共培养, 细胞分为如下组: 对照组 (不做任何处理), NETs 组、vector 组、OTUB2 组、NETs + si-OTUB2 组 (SW480 细胞、转染了 vector、OTUB2 过表达质粒和 si-OTUB2 的 SW480 细胞分别与 PMA 处理的中性粒细胞共培养), OTUB2 + DNase I 组 (转染了 OTUB2 过表达质粒的 SW480 细胞与 DNase I 处理的中性粒细胞共培养), si-OTUB2 组、OTUB2 + si-NC 组和 OTUB2 + si-DDX54 组 (转染了 si-OTUB2、OTUB2 过表达质粒和 si-NC、OTUB2 过表达质粒和 si-DDX54 的 SW480 细胞分别与中性粒细胞共培养)。ELISA 检测 SW480 细胞上清液中 MPO-DNA 复合物相对

表达量和 Cit-H3 的浓度; MTT 和 Transwell 检测 SW480 细胞活力和侵袭能力; RNA 测序筛选 OTUB2 调控的下游基因并使用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)、免疫共沉淀 (co-IP) 和谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 亲和纯化 (GST-pull-down)、His-tag pull-down 实验验证 DDX54 和 OTUB2 的相互作用。结果 与健康对照相比, CRC 患者外周血中 NETs 的形成增加。与对照组相比, NETs 组 CRC 细胞活力和侵袭增加 ($P < 0.05$)。与 vector 组比较, OTUB2 组 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 的浓度增加, 细胞活力和侵袭增加 ($P < 0.05$); 而与 OTUB2 组比较, OTUB2 + DNase I 组 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 的浓度减少, 细胞活力和侵袭减少 ($P < 0.05$)。Co-IP 实验、GST pull down 实验和 His-tag pull down 实验表明 OTUB2 和 DDX54 之间存在相互作用。与 OTUB2 + si-NC 组比较, OTUB2 + si-DDX54 组 MPO-DNA 复合物相对表达量和 Cit-H3 的浓度减少, 细胞活力和侵袭减少 ($P < 0.05$)。结论 去泛素化酶 OTUB2 可以通过上调 DDX54 的增加 NETs 的形成并促进 CRC 细胞活力和侵袭。

关键词 去泛素化; OTUB2; DDX54; 中性粒细胞外诱捕网; 结直肠癌; 中性粒细胞

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0463-10
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.015

2024-02-18 接收

基金项目: 湖南省卫生健康委卫生科研项目 (编号: D202303038378)

作者单位: 南华大学衡阳医学院附属南华医院¹ 消化内科、² 肝胆外科, 衡阳 421002

作者简介: 蒋良君, 女, 副主任医师;

李卫, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: 13875732434@163.com

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 又称大肠癌, 是一种起源于大肠上皮组织的恶性肿瘤, 其发病率

associated X protein (Bax), and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) were determined by Western blot. **Results** Compared to the Normal group, the expression of MALAT1 was upregulated and the expression of miR-181a was downregulated in the AMI group ($P < 0.05$), and there was a negative correlation between MALAT1 and miR-181a expression. The lncBase online prediction database and dual-luciferase reporter assay results had proven that MALAT1 could target and regulate the expression of miR-181a. Compared to the H₂O₂ group, the H₂O₂ + si-MALAT1 group showed increased cell viability ($P < 0.05$), decreased TUNEL-positive rate ($P < 0.05$), decreased expression levels of cleaved caspase-3 and Bax ($P < 0.05$), and increased expression level of Bcl-2 ($P < 0.05$), while the H₂O₂ + si-NC group showed no significant changes ($P > 0.05$). **Conclusion** LncRNA MALAT1 expression is elevated in AMI patients, which could promote oxidative stress-induced myocardial cell damage through targeted inhibition of miR-181a.

Key words MALAT1; microRNA-181a; acute myocardial infarction; cell apoptosis; cell proliferation; cardiomyocyte injury