

LncRNA SNHG1/miR-760/Notch1 调控心肌缺血再灌注损伤的作用和机制研究

詹俊峰¹ 喻灵芝² 桂绍涛³

(1. 江西省人民医院心血管内科 南昌医学院第一附属医院 江西 南昌 330000)

(2. 南昌县中医院内科 江西 南昌 330200)

(3. 进贤县人民医院内科 江西 南昌 331700)

【摘要】长链非编码 RNA (lncRNA) 在心脏病中起关键作用, 而 lncRNA 小核仁 RNA 宿主基因 1Snhg1 (SNHG1) 的作用却很少被提及。因此, 本研究旨在探讨 lncRNA HIF1A-AS1 通过充当 microRNA-760 (miR-204) 海绵的作用, 对心肌缺血再灌注的动物模型的影响。下调 SNHG1 和上调 miR-760 可以通过调节 Notch1 来减轻小鼠心肌 I/R 损伤后心室重构, 并改善心功能。为心肌缺血再灌注的治疗提供新的研究方向。

【关键词】LncRNA SNHG1; miR-760; 心肌缺血再灌注损伤; 炎症; Notch1

Effects and Mechanisms of LncRNA SNHG1/miR-760/Notch1 on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury

Junfeng Zhan¹ Lingzhi Yu² Shaotao Gui³

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Jiangxi Provincial People's Hospital (The First Affiliated Hospital of Nanchang Medical College), Nanchang, Jiangxi, 330000)

(2. Department of Internal Medicine, Nanchang County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi, 330200)

(3. Internal Medicine of Jinxian County People's Hospital, Nanchang, Jiangxi, 331700)

[Abstract] Long non-coding RNAs (lncRNAs) play a key role in heart disease, while the role of lncRNA small nucleolar RNA host gene 1Snhg1 (SNHG1) has rarely been mentioned. Therefore, this study aims to investigate the effect of lncRNA HIF1A-AS1 on animal models of myocardial ischemia-reperfusion by acting as a microRNA-760 (miR-204) sponge. Down-regulation of SNHG1 and up-regulation of miR-760 can reduce ventricular remodeling after myocardial I/R injury and improve cardiac function in mice by regulating Notch1. It provides a new research direction for the treatment of myocardial ischemia reperfusion.

[Key words] LncRNA SNHG1; MiR-760; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Inflammation; Notch1

引言

心肌缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 可损伤心肌, 导致心肌组织结构、功能和代谢严重受损, 甚至导致严重的心力衰竭和死亡^[1]。在 I/R 损伤的缺血组织中, 白细胞的聚集在遇到失血性休克时会导致器官的最终损伤, 最终导致器官衰竭^[2-3]。由于靶点模糊和细胞膜通透性差, 现有药物减少 I/R 损伤的临床疗效有限。因此, 迫切需要探索治疗靶点以改善疾病的预后。长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) 是一类非编码 RNA, 长度超过 200 个核苷酸, 缺乏蛋白质编码功能。研究发现 lncRNA SNHG1 还通过 Notch1 信号通路抑制胃癌细胞增殖并促进细胞凋亡。此外, lncRNA SNHG1 对心肌有保护作用机制上通过 lncRNA SNHG1/miR-450b-5p/IGF 轴激活 PI3K/Akt 信号通路可抑制 I/R 诱导的 AC16 细胞的凋亡和氧

化应激水平。但是 lncRNA SNHG1 具体在 I/R 中对于心功能的改善作用还尚未见报道。通过生物学方法, 我们首次发现 SNHG1 可以与 miR-76 启动子序列互补, 因此, 我们推测抑制 SNHG1 和上调 miR-760 可能会减轻小鼠心肌 I/R 损伤后的心室重构并改善心功能。

1 主要实验方法

1.1 动物模型的制备和分组

建立 I/R 小鼠模型: 造模前小鼠禁食 8h, 用 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉。取仰卧位, 消毒后切除小鼠颈部前区皮肤, 分离组织和肌肉, 暴露气管; 插入气管导管并与呼吸机 (上海医疗器械) 连接。在小鼠第五肋间隙表皮左侧纵切约 2cm, 逐层分离胸大肌和胸小肌, 暴露第四肋间隙。心脏通过刺穿第四肋间隙并穿过左侧纵隔而被挤压。在左耳廓 0.5cm 下, 用 6-0 缝线结扎左冠状动脉, 然后打结计时。当左心室前壁变

白或心电监护显示 ST 段抬高时，提示结扎成功。缺血 30 分钟后，松开松散的结并重新计时。5min 内 ST 段恢复或与前次波形有明显差异，记录再灌注成功。最后将心脏送回胸腔，消除气胸，缝合皮肤。假手术组采用相同的开胸手术，但不打结左冠状动脉。该模型的验证指标是心脏超声和血流动力学监测指标。

1.2 心脏超声检测

灌注结束时，缝合小鼠胸部组织和皮肤，采用动物超声采集小鼠二维心脏超声图像。检测左室舒张末期直径 (LVEDD) 和左室收缩末期直径 (LVEDS)，计算左室射血分数 (LVEF) 和左室缩短率 (LVFS)。LVEF (%) = (左心室舒张末期容积 - 左心室收缩末期容积) / (左心室舒张末期容积) × 100%。

1.3 HE 染色

取出用 4% 多聚甲醛固定 24 h 的心脏组织。沿左心室长轴从心尖部至心底切开心肌组织 (0.3cm)，将左心室分成 6 片。将常规石蜡包埋切片制成 6 μm 切片，45℃ 熨烫干燥。将组织用苏木精染色 3min，然后置于 1% 盐酸乙醇中 2s。直至显微镜下观察细胞质无色，组织用 1% 氨水回蓝，伊红染色 3min，梯度酒精脱水，二甲苯透化，树脂密封，干燥 72 h 后在光学显微镜下观察心肌组织形态。

1.4 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察

将 2.5% 戊二醛固定液中的心肌组织截取 1mm³，用 1% 锇酸固定。将心肌组织逐级用酒精脱水，包埋环氧树 Epon812。通过超薄切片机对心肌组织进行切片。

用 3% 醋酸铀和柠檬酸铅染色后，通过 TEM 观察心肌细胞的超微结构。

1.5 统计分析

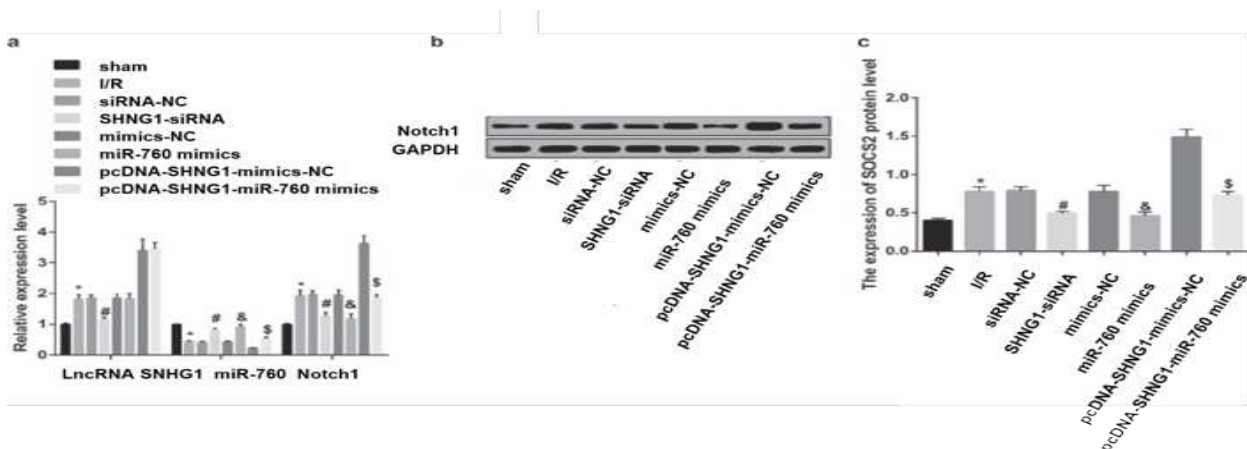
所有数据均通过 SPSS 21.0 软件 (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA) 进行分析。测量数据表示为平均值 ± 标准差。两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。通过最小显著性差 t 检验 (LSD-t) 分析 ANOVA 后的成对比较。P 值小于 0.05 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 I/R 损伤小鼠心肌组织 SNHG1、Notch1 高表达，miR-760 低表达

结果显示，I/R 组 SNHG1 和 Notch1 的表达高于假手术组，而 miR-760 的表达降低 (P < 0.05)。与 siRNA-NC 组相比，SNHG1-siRNA 组 SNHG1 和 Notch1 表达降低，而 miR-760 表达明显升高 (P < 0.05)。与 mimics-NC 组相比，miR-760 mimics 组 SNHG1 表达无明显变化 (P > 0.05)，但 Notch1 表达降低，miR-760 表达升高 (P < 0.05)。为了进一步观察 SNHG1 是否可以逆转 miR-760 对 I/R 损伤小鼠 SNHG1、miR-760 和 Notch1 表达的影响，与 pcDNA-SNHG1 中的小鼠相关 +mimics-NC 组，pcDNA-SNHG1+miR-760mimics 组 SNHG1 表达无明显变化 (P > 0.05)，但 Notch1 表达下降，miR-760 增加 (P < 0.05)。I/R 组、siRNA-NC 组、mimics-NC 组和 pcDNA-SNHG1+miR-760 mimics 组小鼠心肌组织差异无统计学意义 (P > 0.05) (图 1a)

检测蛋白表达的结果显示，I/R 组 Notch1 表达



注：*p < 0.05 与假组。#p < 0.05 与 siRNA-NC 组相比。\$p < 0.05 与模拟 -NC 组相比。§p < 0.05 与 pcDNA-SNHG1+ 模拟 -NC 组相比。N=8，测量数据被表示为均值 ± 标准差，并且使用单向方差分析和 LSD-t 检验分析数据的比较。

蛋白高于假手术组 ($P < 0.05$)。SNHG1-siRNA 组 Notch1 蛋白表达较 siRNA-NC 组降低 ($P < 0.05$)。与 mimics-NC 组相比, miR-760mimics 组 Notch1 蛋白的表达降低 ($P < 0.05$)。与 pcDNA- SNHG1+mimics-NC 组相比, pcDNA- SNHG1+miR-760mimics 组 Notch1 蛋白表达降低, 而 miR-760 表达升高 ($P < 0.05$) (图 1b 和 c)

2.2 SNHG1 的下调和 miR-760 的上调降低 LVEDD、LVESD、LVEDP、LVMI 和 RVMI, 同时增加 LVEF、LVFS、dp/dt max 和 -dp/dt max

心功能相关指标结果显示, I/R 组 LVEDD、LVESD、LVEDP、LVMI 和 RVMI 表达较假手术组升高, LVEF、LVFS、dp/dt max 和 -dp/dt max 降低。 ($P < 0.05$)。与 siRNA-NC 组相比, LVEDD、LVESD、LVEDP、LVMI 和 RVMI 的表达降低, LVEF、LVFS、+dp/dt max 和 -dp/dt max 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。与 mimics-NC 组相比, LVEDD、LVESD、LVEDP、LVMI 和 RVMI 的表达明显下降, 而 LVEF、LVFS、+dp/dt max 和 -dp/dt max 在 miR-204 模拟组中的表达明显增加 ($P < 0.05$)。与 pcDNA- SNHG1+mimics-NC 组相比, pcDNA-SNHG1-AS1+miR-760mimics 组 LVEDD、LVESD、LVEDP、LVMI、RVMI 的表达降低, 而 LVEF、LVFS、dp/dt max 和 -dp/dt max 增加 ($P < 0.05$)。然而, I/R 组、siRNA-NC 组、mimics-NC 中与 pcDNA- SNHG1+miR-760 模拟组比较, LVEDD、LVESD、LVEDP、LVMI、RVMI、LVEF、LVFS、dp/dt max 和 -dp/dt max 的水平没有明显差异 ($P > 0.05$)

2.3 LncRNA SNHG1 吸附 miR-760 作为 ceRNA 抑制 miR-760 的表达并上调 Notch1 的表达

通过预测网站 <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP2>, 发现 SNHG1 可以与 miR-760 结合 (图 5a))。通过双荧光素酶报告基因检测进一步验证, oe- SNHG1 组 miR-760-WT 的荧光素酶活性低于 oe-NC 组 ($P < 0.05$), 而 miR-760-WT 的荧光素酶活性在 oe- SNHG1 组中低于 oe-NC 组 ($P < 0.05$)。两组之间的 miR-760-MUT 没有差异 ($P > 0.05$), 表明 miR-760

可能与 SNHG1 特异性结合 (图 5b)。采用 RNA pull-down 试验验证 SNHG1 可作为 ceRNA 吸附 miR-760, 结果表明 Bio-miR-760-WT 组 SNHG1 的富集度提高 ($P < 0.05$), 而 Bio-miR-760-MUT 组中 SNHG1 的富集没有明显差异 ($P > 0.05$) (图 5c)。结果表明, lncRNA SNHG1 可作为 ceRNA 吸附 miR-760, 从而影响 miR-760 的表达。

荧光素酶活性测定结果显示, Notch1-WT 和 miR-760 模拟物共转染的 HEK293 细胞的相对荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$)。虽然与 Notch1-MUT 和 miR-760 模拟物共转染不影响细胞的相对荧光素酶活性 ($P > 0.05$)。提示 Notch1 是 miR-760 的直接靶基因 (图 5d 和 e)。

结语

I/R 损伤意味着血流停止然后恢复, 这是所有临床情况下都会发生的普遍现象。本研究旨在探讨 lncRNA SNHG1 在心肌 I/R 损伤中的作用及其内在机制。我们的研究数据表明, 抑制 SNHG1 和上调 miR-760 可以减轻小鼠心肌 I/R 损伤后的心室重构并改善心功能。本文为进一步研究心肌 I/R 损伤的发病机制提供了新思路。

参考文献:

- [1]Zheng Y, Shi B, Ma M, et al. The novel relationship between Sirt3 and autophagy in myocardial ischemia-reperfusion[J]. J Cell Physiol, 2019,234(5):5488-5495
- [2]Wang Q M, Stalker T J, Gong Y, et al. Inhibition of Rho-kinase attenuates endothelial-leukocyte interaction during ischemia-reperfusion injury[J]. Vasc Med, 2012,17(6):379-385
- [3]Boag S E, Andreano E, Spyridopoulos I. Lymphocyte Communication in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury[J]. Antioxid Redox Signal, 2017,26(12):660-675