DOI:10.16016/j.1000-5404.202004065

过表达 LncRNA LOC100360491 对缺氧复氧诱导 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

郭鸿浩,邓文文,龙禹哲,杨双亚,赵永超,石 蓓 563000 贵州 遵义,遵义医科大学附属医院心内科

[摘要] **目的** 观测长链非编码 RNA(long noncoding RNA,LncRNA)LOC100360491(后简称 LOC100360491)对缺氧复氧诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响,探讨其潜在作用机制。**方法** ①通过慢病毒转染大鼠 H9c2 心肌细胞构建过表达及抑制 LOC100360491 的心肌细胞系,分为 4 组:空白对照组、过表达 LOC100360491 组、抑制 LOC100360491 组及空载体组,qRT-PCR 检测各组 LOC100360491 的表达。②将慢病毒转染的大鼠 H9c2 心肌细胞进行缺氧 24 h 复氧 6 h 处理以观察 LOC100360491 对该细胞凋亡的影响,分为 5 组:空白对照组、缺氧复氧组、过表达 LOC100360491 组、抑制 LOC100360491 组及空载体组。采用流式细胞术检测各组细胞凋亡早期磷脂酰丝氨酸外翻与凋亡中期线粒体活性氧释放情况;Western blot 检测各组细胞中凋亡效应蛋白 procaspase3、cleaved-caspase3、促凋亡蛋白 Bax 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。③采用 qRT-PCR 检测各组 PAK3 及 CNNM2 基因的表达以探讨 LOC100360491 的潜在调控机制。**结果** ① qRT-PCR 结果显示:与空载体组相比,过表达 LOC100360491 组 LOC100360491 表达显著上调($P<0.05$),抑制 LOC100360491 组 LOC100360491 表达显著下调($P<0.05$)。表明细胞系构建成功。②流式细胞术及 Western blot 结果显示,与缺氧复氧组相比,过表达 LOC100360491 组 H9c2 细胞早期凋亡、活性氧的释放均显著下降($P<0.05$),cleaved-caspase3、Bax 表达显著下调,Bcl-2 表达显著上调($P<0.05$);而抑制 LOC100360491 组则与之相反,但差异无统计学意义。③qRT-PCR 结果显示:与空白对照组相比,过表达 LOC100360491 组 PAK3 表达显著上升($P<0.05$),而 CNNM2 则无明显变化($P>0.05$)。抑制 LOC100360491 组 PAK3 及 CNNM2 表达显著下降($P<0.05$)。**结论** LOC100360491 可通过线粒体活性氧途径抑制缺氧复氧诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞凋亡的发生,可能与其在转录水平上调控 PAK3 的表达有关。

[关键词] 长链非编码 RNA;LncRNA LOC100360491;心肌细胞;缺氧复氧;细胞凋亡
[中图法分类号] R322.11;R329.28;R394.2 [文献标志码] A

LncRNA LOC100360491 overexpression inhibits hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis of H9c2 cells by upregulating PAK3 transcription

GUO Honghao, DENG Wenwen, LONG Yuzhe, YANG Shuangya, ZHAO Yongchao, SHI Bei Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of long noncoding RNA (LncRNA) LOC100360491 on apoptosis of H9c2 cardiomyocytes induced by hypoxia-reoxygenation injury and explore the possible mechanism. **Methods** H9c2 cells were infected with lentiviral vectors carrying LOC100360491 gene or its inhibitor (shLncRNA) or with a negative control vector, and the changes in LOC100360491 expression in the cells were detected by qRT-PCR. The infected H9c2 cells were exposed to hypoxia for 24 h followed by reoxygenation for 6 h, and early apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production of the cells were analyzed by flow cytometry. The expression of pro-caspase-3, cleaved caspase-3, Bax, and Bcl-2 proteins in the cells were detected using Western blotting; the cellular expression levels of PAK3 and CNNM2 mRNA were detected using qRT-PCR. **Results** The results of qRT-PCR confirmed successful overexpression or

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金(81560041)
[通信作者] 石 蓓,E-mail:shibei2147@163.com

inhibition of LOC100360491 in H9c2 cells ($P<0.05$). Compared with the cells infected with the control lentiviral vector, the cells with lentivirus-mediated LOC100360491 overexpression showed significantly decreased early apoptosis and ROS production with obviously down-regulated expressions of cleaved caspase-3 and Bax and up-regulated Bcl-2 expression following hypoxia-reoxygenation ($P<0.05$). Inhibition of LOC100360491 in H9c2 cells resulted in the opposite changes, which were not significant compared with negative control group. Compared with the cells infected with the negative control vector, the cells with LOC100360491 suppression showed significantly down-regulated expressions of PAK3 and CNNM2 mRNA ($P<0.05$), while LOC100360491 overexpression resulted in obviously up-regulated PAK3 expression ($P<0.05$) without significantly affecting CNNM2 expression. **Conclusion** Overexpression of LOC100360491 inhibits apoptosis of H9c2 cells induced by hypoxia-reoxygenation possibly by inhibiting mitochondrial release of ROS through upregulating the transcription of PAK3.

[**Key words**] long noncoding RNA; LancRNA LOC100360491; myocardial cells; hypoxia reoxygenation; apoptosis

Supported by the Regional Science Research Program of National Natural Science Foundation of China (81560041). Corresponding author: SHI Bei, E-mail: shibei2147@163.com

随着经皮冠状动脉支架植入术(percutaneous coronary intervention,PCI)的普及,冠心病心肌梗死患者病死率显著降低,但不少患者在PCI术后出现心律失常、心力衰竭等。研究表明,心肌梗死患者PCI术后,缺血缺氧的心肌细胞恢复血流供氧,在氧自由基的爆发、钙超载、炎症及线粒体活性氧的释放等因素相互作用下,引起心肌细胞凋亡的增加,导致心肌组织结构及功能损害,即心肌缺血再灌注损伤[1]。

长链非编码RNA(long noncoding RNA,LncRNA)作为长度大于200个核苷酸分子的非编码RNA,在冠心病[2]、高血压[3]、糖尿病心肌病[4]、心力衰竭[5]等多种心血管疾病中起重要调控作用。但LncRNA在心肌缺血再灌注损伤中对心肌细胞凋亡的影响及调控机制仍不明确。本课题组前期通过对缺氧24 h复氧6 h与常氧状态的大鼠H9c2心肌细胞进行LncRNA芯片分析,发现LOC100360491在缺氧复氧组的心肌细胞中表达显著下调(未发表),提示其可能参与缺氧复氧心肌细胞的生物学行为,同时采用编码-非编码RNA共表达网络、GO/pathway、KEGG分析得出在转录水平与其相邻且差异性表达明显的mRNA为PAK3与CNNM2。这表明LOC100360491/PAK3/CNNM2信号轴可能参与缺氧复氧诱导的大鼠H9c2心肌细胞凋亡的调控。本研究以慢病毒为载体构建过表达/抑制LOC100360491的大鼠H9c2心肌细胞系[6],探讨LOC100360491对缺氧复氧诱导大鼠H9c2心肌细胞凋亡的影响及其可能调控机制,为阐明LOC100360491在心肌缺血再灌注损伤中的作用及其分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠H9c2心肌细胞株购自上海中国科学院细胞库;慢病毒购自汉恒生物公司;Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、Dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DC)试剂盒购自Sigma公司;procaspase3、cleaved-caspase3、Bax及Bcl-2等兔来源抗大鼠的一抗均购自博士德生物公司;PAK3、CNNM2相关逆转录及扩增试剂盒均购自TaKaRa生物公司;流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司;倒置荧光显微镜购自德国Olympus公司;酶标仪购自美国Thermo公司;电泳槽、配胶架、Western bolt转膜仪、图像分析系统、PCR仪均购自美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 过表达/抑制LOC100360491的大鼠H9c2心肌细胞系的构建 大鼠H9c2心肌细胞采用含10%胎牛血清、1%青-链霉素、1%谷氨酰胺的DMEM高糖培养基,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,细胞生长至80%以上时进行后续实验,选取生长状态良好的细胞,分为4组:空白对照组(不做处理)、过表达LOC100360491组(转染过表达LOC100360491慢病毒)、抑制LOC100360491组(转染抑制LOC100360491慢病毒)、空载体组(转染空载体)。参照慢病毒转染说明书转染慢病毒,按300感染复数(nultiplicity of infection, MOI)转染大鼠H9c2心肌细胞24 h后通过倒置显微镜观察荧光变化,RT-PCR检测LOC1003 60491的表达以验证转染效率。实验重复3次。

1.2.2 qRT-PCR检测转染效率 转染慢病毒48 h

后,按照 RNA 抽提试剂盒提取各组细胞中总 RNA。以 GAPDH 为内参,采用 RT-PCR 试剂盒对 LOC100360491 进行逆转录及扩增,使用 20 μL 体系,反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环检测 LOC100360491 表达量。LOC100360491 引物序列上游:5′-CAAGAAAATGGCACGCACC-3′,下游:5′-TCTTCAGCAGAACTGTCTCCCT-3′。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析,计算实验组、对照组的 ΔCt 后即可计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$(ΔCt=Ct 靶基因-Ct 内参基因,ΔΔCt=ΔCt 实验组-ΔCt 对照组)。实验重复 3 次。

1.2.3 建立 H9c2 心肌细胞缺氧复氧模型 将转染过表达/抑制 LOC100360491 慢病毒的大鼠 H9c2 心肌细胞进行缺氧复氧处理用于后续实验。分为 5 组:空白对照组、缺氧复氧组(缺氧 24 h 复氧 6 h)、过表达 LOC100360491 组(过表达 LOC100360491 后对大鼠 H9c2 心肌细胞进行缺氧复氧处理)、抑制 LOC100360491 组(抑制 LOC100360491 后对大鼠 H9c2 心肌细胞进行缺氧复氧处理)、空载体组(转染空载体慢病毒后对大鼠 H9c2 心肌细胞进行缺氧复氧处理)。采用 37 ℃、5% CO_2、94% N_2、1% O_2 不含胎牛血清的 DMEM 低糖完全培养基培养大鼠 H9c2 心肌细胞 24 h 作为缺氧培养条件;37 ℃、5% CO_2、95% 空气,含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基培养 6 h 作为复氧培养条件。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 检测各组细胞早期凋亡

缺氧复氧后,收集细胞培养液并用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,均移至 50 mL 离心管中,以获取缺氧复氧后的细胞。1 000 r/min,离心 5 min,弃上清,PBS 重悬细胞,再次离心,弃上清。用 1× Binding Buffer 重悬细胞,调整细胞数为 1×10^6 个/mL。将调整好的细胞每管 100 μL 加入空白对照管、Annexin V-FITC 单染管、PI 单染管、Annexin V-FITC+PI 双染管。其中,Annexin V-FITC+PI 双染管中,Annexin V-FITC 阳性+PI 阴性即 FITC(+)+PE(-)表示凋亡早期磷脂酰丝氨酸外翻细胞所在象限。按分组分别加入 5 μL Annexin V-FITC,避光孵育 10 min,5 μL PI,避光室温孵育 5 min。PBS 补足至 500 μL,混匀后立即上机检测。

1.2.5 2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯 2′,7′-Dichlordihydroofluorescein diacetate(DCFH-DA)检测线粒体活性氧的释放情况 根据说明书用无血清高糖 DMEM 培养基配制 10 μmol/L DCFH-DA 工作液。缺氧复氧后,弃培养基,PBS 清洗 3 次,加入 2 mL DCFH-DA 工作液,37 ℃ 5% CO_2 培养箱培养 30 min。PBS 清洗 3 次,去除未进入细胞的 DCFH-DA 探针。胰酶消化细胞,收集细胞悬液,PBS 调整细胞浓度为 1×10^6/mL 后取 100 μL 单细胞悬液加入到 2 mL EP 管中。PBS 补足至 500 μL,混匀后流式细胞仪上机检测。

1.2.6 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达 按照分组处理细胞后收集细胞沉淀,RAPI 裂解液裂解细胞,裂解 30 min 后,将裂解液移至 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 20 min,取上清,BCA 法定量后,SDS-PAGE 电泳分离,转膜,5% 脱脂奶粉溶液中室温封闭 1 h,加入 procaspase3(1∶500)、cleaved-caspase3(1∶500)、Bcl-2(1∶1 000)、Bax(1∶2 000)等蛋白的兔抗大鼠一抗,4 ℃ 过夜;TBST 洗膜 4 次,每次 10 min;加入羊抗兔 HRP 标记的二抗(1∶2 000),室温孵育 1 h。TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。ECL 化学发光试剂盒检测,用凝胶成像系统拍照,Image J 软件分析条带的灰度,以 GAPDH 为内参,测定 procaspase3、cleaved-caspase3、Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量。

1.2.7 qRT-PCR 检测 PAK3、CNNM2 基因表达

转染慢病毒 48 h 后,按照 RNA 抽提试剂盒提取各组总 RNA。以 GAPDH 为内参,逆转录及扩增 PAK3、CNNM2。使用 20 μL 体系,反应条件:95 ℃ 30 s,95℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环检测空白对照组、过表达 LOC100360491 组、抑制 LOC100360491 组及空载体组中 PAK3、CNNM2 的表达量。PAK3 引物序列上游:5′-CGTGAAGCGAGAGAGCCAGT-3′,下游:5′-GGGTAAGGGATTTTGAAAGAGGTT-3′;CNNM2 引物序列上游:5′-GCCCGTAGACTACTTCGTCC-3′,下游:5′-AACAAAGGTGCGAGACAGGG-3′。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析,计算实验组、对照组的 ΔCt,然后即可计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$(ΔCt=Ct 靶基因-Ct 内参基因,ΔΔCt =ΔCt 实验组-ΔCt 对照组)。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件包进行分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验,相关分析采用直线相关分析。

2 结果

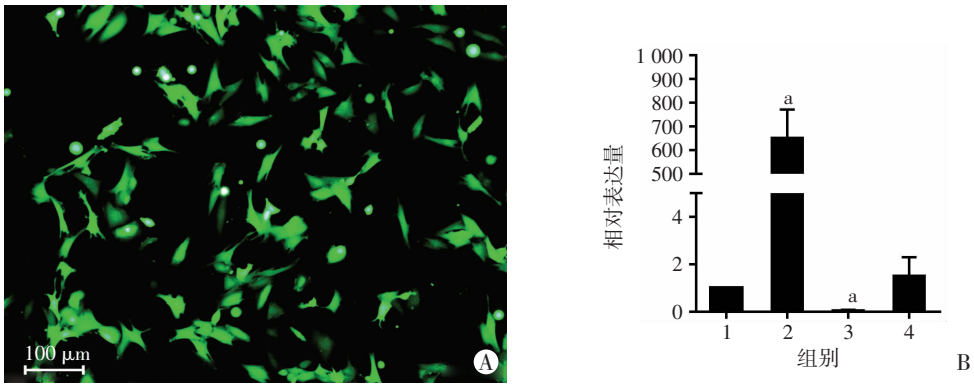
2.1 慢病毒转染大鼠 H9c2 心肌细胞后 LOC100360491 的表达

将携带有绿色荧光且过表达/抑制 LOC100360491 的慢病毒及空载体按照 300 MOI 转染大鼠 H9c2 心肌细胞,24 h 后即可在荧光显微镜下观察到被转染慢病毒的 H9c2 心肌细胞呈现绿色荧光(图 1A)。慢病毒转染大鼠 H9c2 心肌细胞 48 h 后,采用 qRT-PCR 检测细胞中 LOC100360491 的表达,结果显示:与空载体组相比,过表达 LOC100360491 组中 LOC100360491 表达显著上调($P<0.05$),抑制 LOC100360491 组中 LOC100360491 表达显著下调($P<0.05$,图 1B)。提示

慢病毒转染大鼠 H9c2 心肌细胞 48 h 后成功构建过表达/抑制 LOC100360491 的心肌细胞系。在 48~72 h 后,细胞融合至 80%以上后传代,传至 P2~3 代后用于后续试验。

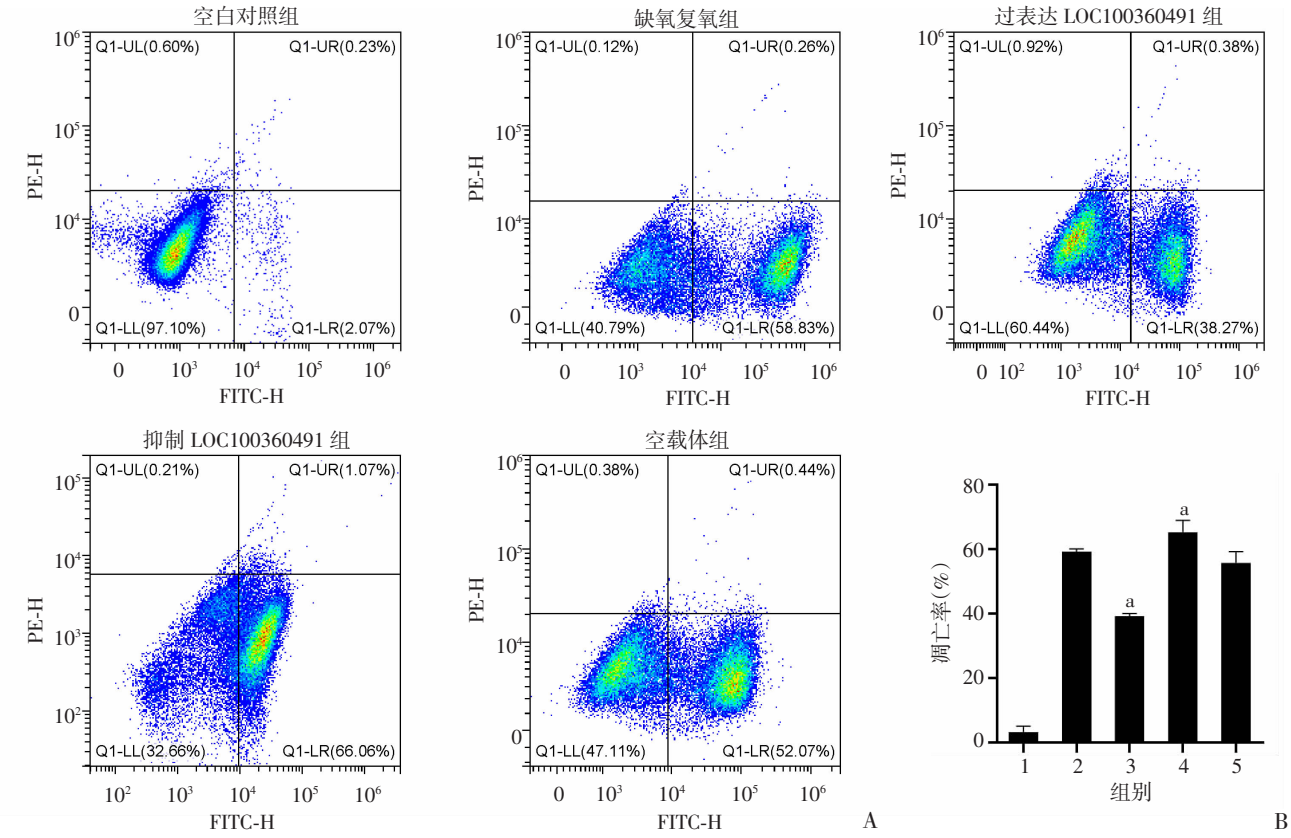
2.2　过表达 LOC100360491 抑制缺氧复氧后大鼠 H9c2 心肌细胞的早期凋亡

缺氧复氧组 H9c2 心肌细胞凋亡率达(61.32±1.07)%,较空白对照组显著升高($P<0.05$,图 2)。与缺氧复氧组相比,过表达 LOC100360491 组 H9c2 心肌细胞凋亡率[(34.24±0.71)%]显著降低($P<0.05$,图 2),抑制 LOC100360491 组凋亡率[(65.16±0.69)%]显著升高($P<0.05$,图 2),而空载体组无明显变化($P>0.05$)。因此,过表达 LOC100360491 可显著抑制缺氧复氧后 H9c2 心肌细胞的早期凋亡。



A:荧光显微镜观察慢病毒转染大鼠 H9c2 心肌细胞 24 h 后的荧光表达;B:RT-PCR 检测各组细胞处理 48 h 后 LOC100360491 的相对表达量($n=3$)　1:空白对照组;2:过表达 LOC100360491 组;3 抑制 LOC100360491 组;4:空载体组;a:$P<0.05$,与空载体组比较

图 1　慢病毒转染大鼠 H9c2 心肌细胞荧光表达及 qRT-PCR 验证转染效率



A:流式细胞术检测结果;B:各组 H9c2 心肌细胞凋亡率($n=3$)　1:空白对照组;2:缺氧复氧组;3:过表达 LOC100360491 组;4:抑制 LOC100360491 组;5:空载体组;a:$P<0.05$,与缺氧复氧组比较

图 2　流式细胞术检测各组 H9c2 心肌细胞凋亡变化情况

2.3　过表达 LOC100360491 抑制缺氧复氧后大鼠 H9c2 心肌细胞线粒体活性氧的释放

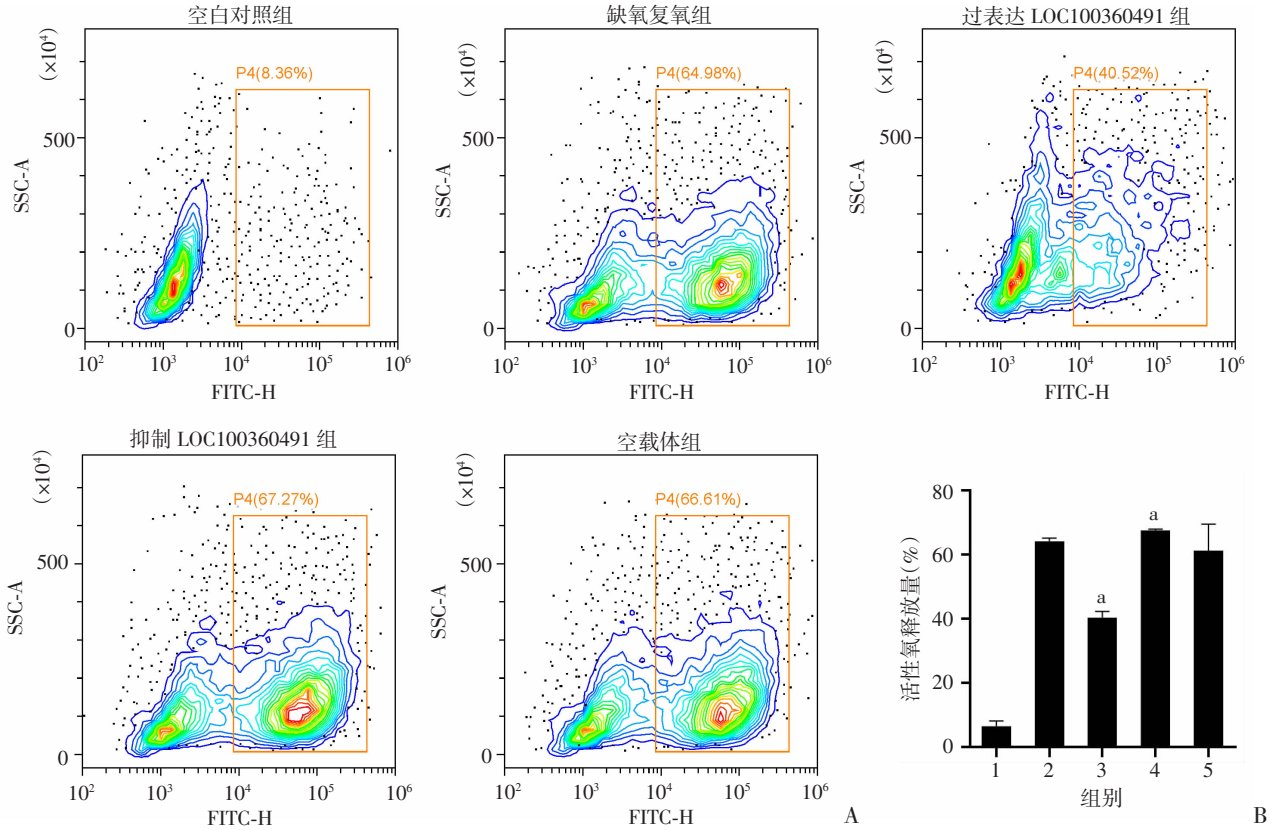
流式细胞术检测各组大鼠 H9c2 心肌细胞凋亡中期线粒体活性氧的释放情况见图 3。与缺氧复氧组[(60.97±0.47)%]相比,过表达 LOC100360491 组 H9c2 心肌细胞内活性氧释放量[(38.49±0.58)%]显著下降($P<0.05$),而抑制 LOC100360491 组 H9c2 心肌细胞内活性氧释放量[(64.13±0.54)%]则显著上升($P<0.05$);空载体组无明显变化($P>0.05$)。表明过表达 LOC100360491 可降低缺氧复氧后 H9c2 心肌细胞凋亡中期粒体活性氧的释放。

2.4　过表达 LOC100360491 调控缺氧复氧后大鼠 H9c2 心肌细胞凋亡相关蛋白的表达

Western blot 检测结果见图 4。与空白对照组相比,缺氧复氧组 cleaved-caspase3/procaspase3 比值与 Bax 均显著上调,Bcl-2 显著下调($P<0.05$);与缺氧复氧组相比,过表达 LOC100360491 组 cleaved-caspase3/procaspase3 比值、Bax 显著下调,Bcl-2 显著上调($P<0.05$)。而抑制 LOC100360491 组和空载体组上述蛋白表达与缺氧复氧组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

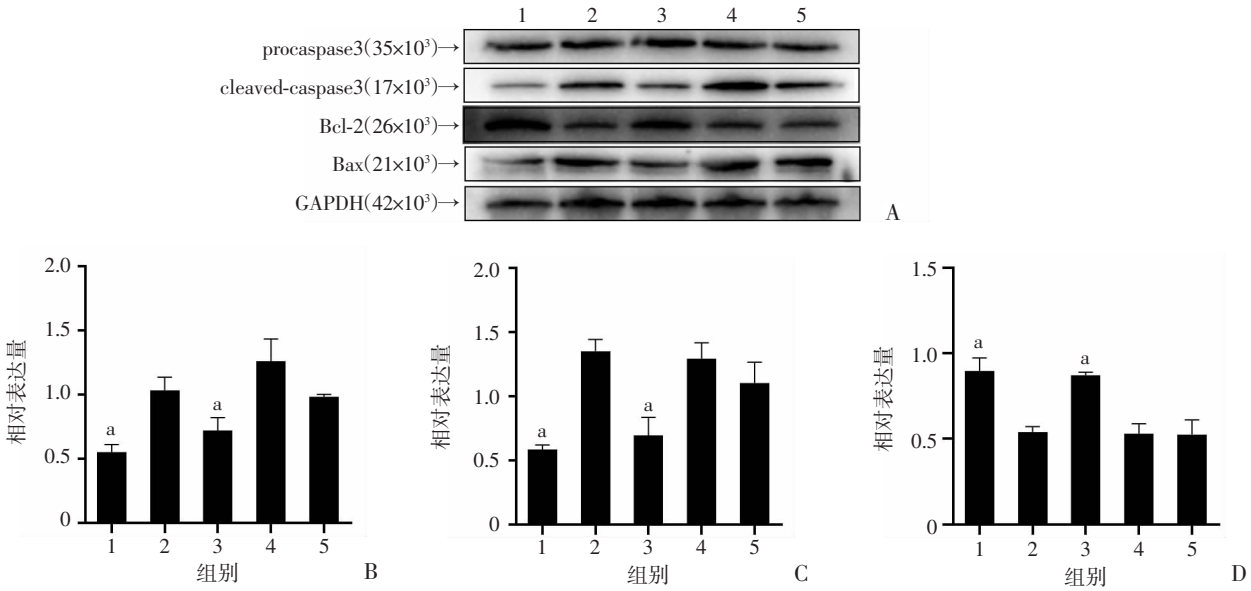
2.5　qRT-PCR 检测过表达/抑制 LOC100360491 后,大鼠 H9c2 心肌细胞中 PAK3、CNNM2 的表达

为进一步探索 LOC100360491/PAK3/CNNM2 之间是否存在潜在调控关系,在大鼠 H9c2 心肌细胞中过表达/抑制 LOC100360491 后,采用 qRT-PCR 检测 PAK3、CNNM2 的含量变化,结果见图 5。与空白对照组相比,抑制 LOC100360491 组 PAK3 及 CNNM2 表达均显著下降($P<0.05$)。而过表达 LOC100360491 组 PAK3 表达显著上升($P<0.05$),CNNM2 无明显变化($P>0.05$)。提示大鼠 H9c2 心肌细胞中 LOC100360491 可能调控 PAK3 的表达,从而参与细胞凋亡的调节。



A:流式细胞术检测结果;B:各组 H9c2 心肌细胞活性氧释放量($n=3$)　　1:空白对照组;2:缺氧复氧组;3:过表达 LOC100360491 组;4:抑制 LOC100360491 组;5:空载体组;a:$P<0.05$,与缺氧复氧组比较

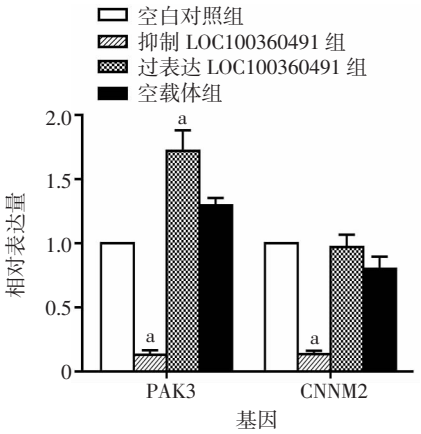
图 3　流式细胞术检测各组 H9c2 心肌细胞线粒体活性氧的释放



A:Western blot 检测结果;B:cleaved-caspase3/procaspase3 相对表达量;C:Bax 相对表达量;D:Bcl-2 相对表达量

1:空白对照组;2:缺氧复氧组;3:过表达 LOC100360491 组;4:抑制 LOC100360491 组;5:空载体组;a:$P<0.05$,与缺氧复氧组比较

图 4 Western blot 检测各分组 H9c2 心肌细胞中凋亡蛋白的表达情况



a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图 5 qRT-PCR 检测各组细胞中 PAK3、CNNM2 的表达

3 讨论

细胞凋亡是机体应对外界的有害刺激而启动的主动性程序性死亡途径。依据不同的启动途径,可分为死亡受体等介导的外源性细胞凋亡,缺氧、DNA 损伤等介导的内源性细胞凋亡。内源性细胞以线粒体外膜通透性(mitochondrialoute membrane permeabilisation,MOMP)和线粒体损伤为主要调控途径,启动 caspase3 蛋白家族发挥凋亡效应。心脏缺血再灌注损伤时[7],由于炎症因子的激活、钙超载等多种因素引起心肌细胞的死亡。细胞凋亡作为程序性细胞死亡形式之一,在缺血再灌注损伤的各个阶段均发挥一定的作用[8-9],其中内源性凋亡占据更为重要的地位[10]。本研究结果显示,在缺氧复氧处理大鼠 H9c2 心肌细胞后,线粒体释放的活性氧显著增加,内源性凋亡效应分子 cleaved-caspase3、促凋亡蛋白 Bax 的表达显著上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,证实细胞凋亡在大鼠 H9c2 心肌细胞缺氧复氧模型中具有重要作用。

LncRNA 是细胞体内广泛存在的一种非编码 RNA,可在转录前水平、转录后水平及转录水平[11]调控其靶基因、靶蛋白的表达,从而发挥生物学作用。研究表明,LncRNA 在肿瘤[12]、神经退行性变[13]、代谢性疾病[14]、心血管疾病[15]中均发挥重要作用,但 LncRNA 在心脏缺血再灌注损伤中的具体作用及其调控机制尚不明确。本课题组前期通过生物信息学方法检测结果显示 LOC100360491/PAK3/CNNM2 信号轴可能参与缺氧复氧后大鼠 H9c2 心肌细胞凋亡的调控。为此本课题组通过慢病毒转染大鼠 H9c2 心肌细胞构建过表达/抑制 LOC100360491 的心肌细胞系,RT-PCR 检测各组 LOC100360491 含量的变化,结果显示采用 300 MOI 的过表达/抑制 LncRNA 的慢病毒转染大鼠 H9c2 心肌细胞 48 h 可显著上调/下调 LOC100360491 的表达水平。此外,与空载体组相比,过表达 LOC100360491 组的表达明显高于抑制 LOC100360491 组,提示相同 MOI 值的慢病毒转染 H9c2 心肌细胞 48 h,过表达 LOC100360491 组转染效

率显著高于抑制 LOC100360491 组。

为探索 LOC100360491 在 H9c2 心肌细胞凋亡中的作用,本研究采用缺氧 24 h 复氧 6 h 模拟心肌细胞缺血再灌注微环境。在细胞凋亡早期,膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻,可与 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白(Annexin V)结合;凋亡中期,线粒体膜电位发生改变,细胞色素 C 大量释放进入细胞质中,引发活性氧的爆发。研究表明,线粒体可通过释放的活性氧促进 procaspase3 切割成为具有活性的 cleaved-caspase3,调控细胞凋亡的发生、发展[10]。本研究结果显示:过表达 LOC100360491 显著降低缺氧复氧诱导的 H9c2 心肌细胞早期凋亡的变化及凋亡中期活性氧的释放,提示 LOC100360491 可能通过线粒体活性氧途径参与大鼠 H9c2 心肌细胞凋亡的调控。在线粒体活性氧参与的细胞凋亡途径中,Bcl-2 家族发挥重要作用[16]。Bcl-2 家族据其结构不同,在细胞凋亡中发挥不同的作用,其中 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W 等发挥抗凋亡作用;Bax、Bak、Bok 及 Bik、Bid 等发挥促凋亡作用。抗凋亡蛋白 Bcl-2 可通过与家族内部成员之间的相互作用,平衡促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白,最终影响细胞的存活与死亡[17]。线粒体释放的活性氧亦可通过抑制 Bcl-2,促进 Bax 的表达,从而调控细胞凋亡的发生、发展[18]。本研究结果显示,过表达 LOC100360491 可抑制线粒体活性氧的释放,下调凋亡效应蛋白 cleaved-caspase3 及促凋亡蛋白 Bax 的表达,同时上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。提示 LOC100360491 调控缺氧复氧后 H9c2 心肌细胞凋亡的机制可能是通过抑制线粒体活性氧的释放,上调 Bax 同时下调 Bcl-2,抑制 procaspase3 切割为其活性形式 cleaved-caspase3,最终减少细胞凋亡的发生。此外,考虑到 Bcl-2/Beclin1 复合物在凋亡和自噬的调控中起到开关的作用[19],LOC100360491 是否在自噬方面发挥作用,亦值得进一步研究。

P21 激活激酶(PAKs)是小 G 蛋白家族成员,在细胞骨架重构、细胞增殖等生理过程中发挥作用。近来研究表明,PAKs 在心血管的正常发育、心脏不良重塑中发挥重要作用[20]。在细胞凋亡方面,PAK 可通过激活 NF-κB 信号通路调控凋亡的发生、发展[21-22]。MAO 等[23]研究发现,过表达 PAK1 后,可激活 Akt 信号通路,从而抑制心肌细胞凋亡。我们前期的芯片结果亦显示 PAK3 可能参与细胞凋亡的调控(未发表)。本研究结果显示,在缺氧复氧的大鼠 H9c2 心肌细胞中过表达 LOC100360491,其 PAK3 的表达亦显著上调;同时抑制 LOC100360491 后,PAK3 表达下调。提示在缺氧复氧的大鼠 H9c2 心肌细胞中,LOC100360491 可能参与 PAK3 的调控,而 PAK 家族位于细胞质中,本身是活性氧的经典下游调控分子[24]。表明 LOC100360491 可能通过抑制线粒体活性氧的释放,上调 PAK3 的表达,从而起到抑制心肌细胞凋亡的保护作用。

综上,本研究通过体外实验证实,在大鼠 H9c2 心肌细胞中过表达 LOC100360491 可显著降低缺氧复氧诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞早期凋亡及凋亡中期线粒体活性氧的释放。LOC100360491/PAK3/Bcl-2/caspase3 为其可能的调节信号轴。本研究亦有局限之处,首先,LncRNA 可通过诱饵作用、支架分子、引导作用及信号分子参与靶基因及蛋白的调控。我们发现 LOC100360491 可能调控 PAK3 的表达,但二者间是否具有直接或间接的结合位点,具体通过何种方式进行调控尚不明确,可进一步行染色质免疫共沉淀技术对其探索研究。其次,本实验均在体外细胞模型中进行,而 LOC100360491 在体内心肌缺血再灌注损伤模型中是否具有抗凋亡的作用尚不清楚,有待进一步验证。

参考文献:

[1] SÁNCHEZHERNÁNDEZ C D, TORRESALARCÓN L A, GONZÁLEZCORTÉS A, *et al*. Ischemia/reperfusion injury: pathophysiology, current clinical management, and potential preventive approaches[J]. Mediat Inflamm, 2020, 2020: 1-13. DOI: 10.1155/2020/8405370.

[2] GUO Y, LUO F, LIU Q,*et al*. Regulatory non-coding RNAs in acute myocardial infarction[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(5): 1013-1023. DOI: 10.1111/jcmm.13032.

[3] ZHANG H N, XU Q Q, THAKUR A, *et al*. Endothelial dysfunction in diabetes and hypertension: Role of microRNAs and long non-coding RNAs[J]. Life Sci, 2018, 213: 258-268. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.10.028.

[4] PANT T, DHANASEKARAN A, FANG J,*et al*. Current status and strategies of long noncoding RNA research for diabetic cardiomyopathy[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2018, 18(1): 1-10. DOI: 10.1186/s12872-018-0939-5.

[5] MCKINSEY T A, VONDRISKA T M, WANG Y B. Epigenomic regulation of heart failure: integrating histone marks, long noncoding RNAs, and chromatin architecture[J]. F1000 Research, 2018, 7: 1713. DOI: 10.12688/f1000research.15797.1.

[6] SAHA A, NANAVATYV P, LI B B. Telomere and subtelomere R-loops and antigenic variation in trypanosomes[J]. J Mol Biol, 2019.[Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.10.025.

[7] ZHU H, SUN A J. Programmed necrosis in heart disease: Molecular mechanisms and clinical implications[J]. J Mol

Cell Cardiol, 2018, 116: 125-134. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.01.018.

[8] XU W P, ZHANG L, ZHANG Y, *et al*. TRAF1 exacerbates myocardial ischemia reperfusion injury *via* ASK1-JNK/p38 signaling[J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(21): e012575. DOI: 10.1161/JAHA.119.012575.

[9] FAN Q, TAO R, ZHANG H, *et al*. Dectin-1 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating macrophage polarization and neutrophil infiltration[J]. Circulation, 2019, 139(5): 663-678. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036044.

[10] CHEN L D, ZHU W T, CHENG Y Y, *et al*. T-cell death-associated gene 8 accelerates atherosclerosis by promoting vascular smooth muscle cell proliferation and migration[J]. Atherosclerosis, 2020, 297: 64-73. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.01.017.

[11] FERRÈ F, COLANTONI A, HELMER-CITTERICH M. Revealing protein-lncRNA interaction[J]. Brief Bioinform, 2016, 17(1): 106-116. DOI: 10.1093/bib/bbv031.

[12] JIANG M C, NI J J, CUI W, *et al*. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(7): 1354-1366.

[13] PEREIRA FERNANDES D, BITAR M, JACOBS F, *et al*. Long non-coding RNAs in neuronal aging[J]. NcRNA, 2018, 4(2): 12. DOI: 10.3390/ncrna4020012.

[14] KONG Y H, HSIEH C H, ALONSO L C. ANRIL: a lncRNA at the CDKN2A/B locus with roles in cancer and metabolic disease[J]. Front Endocrinol, 2018, 9: 405. DOI: 10.3389/fendo.2018.00405.

[15] HUANG Y. The novel regulatory role of lnc RNA-miRNA-mRNA axis in cardiovascular diseases[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(12): 5768-5775. DOI: 10.1111/jcmm.13866.

[16] MORTEZAEE K, SALEHI E, MIRTAVOOS-MAHYARI H, *et al*. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12537-12550. DOI: 10.1002/jcp.28122.

[17] CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, *et al*. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 49-63. DOI: 10.1038/nrm3722.

[18] POHL S Ö G, AGOSTINO M, DHARMARAJAN A, *et al*. Cross talk between cellular redox state and the antiapoptotic protein bcl-2[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(13): 1215-1236. DOI: 10.1089/ars.2017.7414.

[19] FAIRLIE W D, TRAN S, LEE E F. Crosstalk between apoptosis and autophagy signaling pathways[M]//International review of cell and molecular biology. Amsterdam: Elsevier, 2020: 115-158. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2020.01.003.

[20] KUMAR R, SANAWAR R, LI X D, *et al*. Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases[J]. Gene, 2017, 605: 20-31. DOI: 10.1016/j.gene.2016.12.014.

[21] FAN S J, GAO M, MENG Q H, *et al*. Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection[J]. Oncogene, 2005, 24(10): 1749-1766. DOI: 10.1038/sj.onc.1208327.

[22] HUANG J, HUANG A, POPLAWSKI A, *et al*. PAK2 activated by Cdc42 and caspase 3 mediates different cellular responses to oxidative stress-induced apoptosis[J]. BBA Mol Cell Res, 2020, 1867(4): 118645. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118645.

[23] MAO K, KOBAYASHI S, JAFFER Z M, *et al*. Regulation of Akt/PKB activity by P21-activated kinase in cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44(2): 429-434. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2007.10.016.

[24] WU W S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(4): 695-705. DOI: 10.1007/s10555-006-9037-8.

(收稿:2020-04-07;修回:2020-06-22)

(编辑 汪勤俭)