

基于 lncRNA-UCA1-miR-143-Notch1 轴的自噬通路调控体外循环后心肌细胞缺血 / 再灌注损伤的机制研究

江玲芝¹ 汪明珊² 沈晔¹

¹ 浙江省人民医院(杭州医学院附属人民医院)康复中心康复医学科,浙江省康复与运动医学研究所,杭州 310014; ² 浙江省人民医院(杭州医学院附属人民医院)全科医学中心感染病科,杭州 310014

通信作者:汪明珊, Email: wang1802@hotmail.com

【摘要】 目的 观察体外循环(CPB)致心肌缺血 / 再灌注(I/R)损伤大鼠心肌细胞损伤程度及自噬水平变化,探讨长链非编码 RNA-尿路上皮癌相关基因 1-微小 RNA-143-Notch1 轴(lncRNA-UCA1-miR-143-Notch1 轴)在 CPB 致心肌 I/R 损伤中的调控作用。**方法** 将健康雄性 SD 大鼠按随机数字法分为假手术(Sham)组、心肌 I/R 损伤模型组(模型组)、空载慢病毒组、lncRNA-UCA1 上调组、miR-143 下调组、lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组,每组 9 只。采用体外循环支持下开胸主动脉结扎法构建 CPB 致心肌 I/R 损伤大鼠模型;Sham 组仅穿线但不结扎,其他操作一致。建模前 72 h, lncRNA-UCA1 上调组经尾静脉注射 lncRNA-UCA1 的心肌组织特异性腺相关病毒(AAV)过表达载体 100 μ L, miR-143 下调组经尾静脉注射 miR-143 的 AAV 短发夹 RNA(shRNA)载体 100 μ L, lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组经尾静脉注射 lncRNA-UCA1 的心肌组织特异性 AAV 过表达载体 100 μ L 和 miR-143 的 AAV 过表达载体 100 μ L,空载慢病毒组注射 AAV 空载体 100 μ L(病毒滴度均为 1×10^9 TU/mL);Sham 组和模型组注射等量生理盐水。干预后 24 h 处死动物取心脏组织标本,苏木素-伊红(HE)染色后,光镜下观察心肌细胞受损情况及肌纤维组织变化;醋酸铀-柠檬酸铅双染后,透射电镜下观察心脏组织超微结构损伤情况;采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测心肌组织中 lncRNA-UCA1、miR-143、Notch1 mRNA 的表达;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测心肌组织中微管蛋白 1 轻链 3-II/I(LC3-II/I)和 Notch1 蛋白表达。**结果** 与 Sham 组相比,模型组大鼠心肌细胞肥大且细胞间隙增大,自噬小体增加,心肌纤维排列紊乱,线粒体增生且变形, lncRNA-UCA1 和 Notch1 mRNA 表达及 LC3-II/I、Notch1 蛋白表达水平均显著升高, miR-143 表达水平显著降低。与模型组相比, lncRNA-UCA1 上调组和 miR-143 下调组大鼠心肌细胞损伤程度均明显减轻,Notch1 mRNA、LC3-II/I 和 Notch1 蛋白表达水平均显著升高[Notch1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 为 2.66 ± 0.24 、 2.03 ± 0.23 比 1.45 ± 0.13 , LC3-II/I 为 2.10 ± 0.21 、 1.92 ± 0.19 比 1.39 ± 0.14 , Notch1 蛋白(Notch1/GAPDH)为 1.72 ± 0.16 、 1.57 ± 0.16 比 1.34 ± 0.13 , 均 $P < 0.05$], miR-143 表达水平显著下降($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.50 ± 0.06 、 0.52 ± 0.06 比 0.71 ± 0.06 , $P < 0.05$); lncRNA-UCA1 表达水平在 lncRNA-UCA1 上调组较模型组显著升高($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 2.47 ± 0.22 比 1.43 ± 0.14 , $P < 0.05$),而在 miR-143 下调组则与模型组差异无统计学意义($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.50 ± 0.16 比 1.43 ± 0.14 , $P > 0.05$)。空载慢病毒组和 lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组大鼠心肌细胞损伤程度与模型组无明显差异, miR-143、Notch1 mRNA 及自噬水平与模型组差异均无统计学意义, lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组仅 lncRNA-UCA1 表达水平显著高于模型组($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 2.47 ± 0.20 比 1.43 ± 0.14 , $P < 0.05$)。**结论** 细胞自噬参与 CPB 致心肌 I/R 损伤的病理过程, lncRNA-UCA1-miR-143-Notch1 轴可能通过调控细胞自噬水平参与 I/R 损伤过程。

【关键词】 体外循环; 缺血 / 再灌注损伤; 自噬; 长链非编码 RNA-尿路上皮癌相关基因 1; 微小 RNA-143; Notch1

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY041)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240329-00298

LncRNA-UCA1-microRNA-143-Notch1 regulates autophagy in myocardial ischemia reperfusion injury induced by cardiopulmonary bypass

Jiang Lingzhi¹, Wang Mingshan², Shen Ye¹

¹ Department of Rehabilitation Medicine, Center for Rehabilitation Medicine, Zhejiang Provincial People's Hospital (Affiliated People's Hospital, Hangzhou Medical College), Rehabilitation & Sports Medicine Research Institute of Zhejiang Province, Hangzhou 310014, Zhejiang, China; ² Department of Infectious Diseases, Center for General Practice Medicine, Zhejiang Provincial People's Hospital (Affiliated People's Hospital, Hangzhou Medical College), Hangzhou 310014, Zhejiang, China
Corresponding author: Wang Mingshan, Email: wang1802@hotmail.com

【Abstract】 Objective To observe the degree of myocardial cell injury and the changes in autophagy

level in rats with myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury induced by cardiopulmonary bypass (CPB), and to explore the regulatory role of the long non-coding RNA-urothelial carcinoma antigen 1-microRNA-143-Notch1 axis (lncRNA-UCA1-miR-143-Notch1 axis) in myocardial I/R injury induced by CPB. **Methods** Healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into the following groups using the random number method: Sham operation (Sham) group, myocardial I/R injury model group (model group), empty lentivirus group, lncRNA-UCA1 upregulation group, miR-143 downregulation group, and lncRNA-UCA1 upregulation+miR-143 upregulation group, with 9 rats in each group. The rat model of myocardial I/R injury induced by CPB was established by thoracotomy aortic ligation under cardiopulmonary bypass support; in the Sham group, only threading was performed without ligation, and other procedures were the same. Seventy-two hours before modeling, the lncRNA-UCA1 upregulated group was injected with 100 μ L of myocardial tissue-specific adeno-associated virus (AAV) overexpression vector of lncRNA-UCA1 via tail vein, the miR-143 downregulated group was injected with 100 μ L of AAV short hairpin RNA (shRNA) vector of miR-143 via tail vein, the lncRNA-UCA1 upregulation+miR-143 upregulation group was injected with 100 μ L of myocardial tissue-AAV overexpression vector of lncRNA-UCA1 and 100 μ L of AAV overexpression vector of miR-143 via tail vein, and the empty vector lentivirus group was injected with 100 μ L of AAV empty vector (virus titers were 1×10^9 TU/mL); the Sham group and the model group were injected with equal amounts of normal saline. The animals were euthanized 24 hours after intervention and cardiac tissue specimens were collected. After hematoxylin eosin (HE) staining, the damage of myocardial cells and the changes of muscle fiber tissue were observed under a light microscope; after dual staining with uranyl acetate and lead citrate, the ultrastructural damage of heart tissue was observed under a transmission electron microscopy; the expression of lncRNA-UCA1, miR-143, and Notch1 mRNA in myocardial tissue was detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); the expression of microtubule 1 light chain 3-II/I (LC3-II/I) and Notch1 protein in myocardial tissue was detected by Western blotting. **Results** Compared with the Sham group, the myocardial cells of rats in the model group were enlarged, the intercellular space increased, autophagosomes increased, the arrangement of myocardial fibers was disordered, mitochondrial proliferated and deformed. The expression levels of lncRNA-UCA1 and Notch1 mRNA, as well as the protein expression levels of LC3-II/I and Notch1 were significantly increased, while the expression level of miR-143 was significantly decreased. Compared with the model group, the degree of myocardial cell injury in the lncRNA-UCA1 upregulation group and miR-143 downregulation group was significantly alleviated, the expression levels of Notch1 mRNA, LC3-II/I, and Notch1 protein were significantly increased [Notch1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.66 ± 0.24 , 2.03 ± 0.23 vs. 1.45 ± 0.13 , LC3-II/I: 2.10 ± 0.21 , 1.92 ± 0.19 vs. 1.39 ± 0.14 , Notch1 protein (Notch1/GAPDH): 1.72 ± 0.16 , 1.57 ± 0.16 vs. 1.34 ± 0.13 , all $P < 0.05$], and the expression level of miR-143 was significantly decreased ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.50 ± 0.06 , 0.52 ± 0.06 vs. 0.71 ± 0.06 , $P < 0.05$). The expression level of lncRNA-UCA1 in the lncRNA-UCA1 upregulated group was significantly higher than that in the model group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 2.47 ± 0.22 vs. 1.43 ± 0.14 , $P < 0.05$), while there was no significant difference in the miR-143 downregulation group compared with the model group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.50 ± 0.16 vs. 1.43 ± 0.14 , $P > 0.05$). There was no significant difference in the degree of myocardial cell injury in the empty load lentivirus group and the lncRNA-UCA1 upregulation+miR-143 upregulation group compared to the model group. There were no significant differences in the expression of miR-143, Notch1 mRNA, and the autophagy level in these two groups compared to the model group. The expression level of lncRNA-UCA1 in the lncRNA-UCA1 upregulation+miR-143 upregulation group was significantly higher than that in the model group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 2.47 ± 0.20 vs. 1.43 ± 0.14 , $P < 0.05$). **Conclusions** Autophagy is involved in the pathological process of myocardial I/R injury induced by CPB. The lncRNA-UCA1-microRNA-143-Notch1 axis may regulate the autophagy level to participate in the I/R injury process.

【Key words】 Cardiopulmonary bypass; Ischemia/reperfusion injury; Autophagy; Long non-coding RNA-urothelial carcinoma antigen 1; microRNA-143; Notch1

Fund program: Zhejiang Medicine Scientific and Technology Project (2020KY041)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240329-00298

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)是心脏直视手术的一种重要辅助手段,可以提供清晰的手术视野,并为各器官提供心脏停搏期间的保护。CPB过程中主动脉的阻断和开放会造成难以避免的心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[1-2]。I/R引起的细胞损伤可以导致细胞凋亡、自噬、坏死和程序性死亡^[3]。自噬是指细胞在外界环境因素影响下,对其内部受损的细胞器、错误折叠的蛋白质和入侵其内的病原体在溶酶体中进行降解的生物学过程,对于细胞存活、分化及保持稳态意义重大^[4]。自噬的调控是一个非常复杂的过程,且与I/R损伤密切相关,许多信号通路涉及其中^[5]。

Notch1 是 Notch 蛋白的家族成员之一,为一种细胞表面蛋白受体,广泛表达于心脏等器官,内源性 Notch1 激活可维持心肌细胞存活、抑制心肌细胞凋亡, Notch1 抑制则会加重 I/R 损伤过程中的氧化应激损伤^[6]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类转录本长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA 分子,能从表观遗传调控、转录调控及转录后调控等多层面调控基因的表达水平,参与基因沉默、基因组印迹、染色体修饰、转录激活、转录干扰及核内运输等,最终参与生物学行为,与多种疾病的发生发展有关^[7]。微小 RNA (microRNA, miR) 是一类短链非编码 RNA,可与其靶基因 mRNA 的 3' 非

翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)互补结合,实现对靶基因 mRNA 翻译的抑制^[7]。lncRNA 可通过碱基互补的形式与部分 miR 分子结合。当 lncRNA 与 miR 分子结合后,这些 miR 不能再与其靶基因 mRNA 结合,具有抑制功能的游离 miR 相对减少,这样靶基因水平就会相对升高,最终导致相应生物学表型(如受损心肌细胞凋亡、自噬、对氧化应激的承受能力等)的变化^[8]。目前自噬在 CPB 致心肌 I/R 损伤中的作用及机制尚不明确。本研究旨在通过建立 CPB 大鼠心肌 I/R 损伤模型,从 miR 调控的角度研究 I/R 损伤时心肌细胞自噬的调控机制,探讨 lncRNA-尿路上皮癌相关基因 1(urothelial carcinoma antigen 1, UCA1)和 miR-143 通过调控 Notch1 导致心肌细胞自噬水平及组织损伤程度的变化,为开发新的治疗干预措施提供坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及伦理:SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体重质量(220±20)g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0008。饲养条件:恒温[(22±2)℃],湿度 50%~60%,光照 12 h 明暗交替,换风频率 15~20 次/h,实验饲养室许可证号:SYXK(浙)2018-0012。本研究所有操作符合动物伦理学要求,并经浙江省人民医院实验动物福利伦理委员会批准(审批号:20230621132430828856)。

1.2 动物分组及模型建立:将大鼠按随机数字法分为假手术(Sham)组、心肌 I/R 损伤模型组(模型组)、空载慢病毒组[注射腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)空载体]、lncRNA-UCA1 上调组(注射 lncRNA-UCA1 的 AAV 过表达载体)、miR-143 下调组[注射 miR-143 的 AAV 短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)载体]、lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组,每组 9 只。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉大鼠,分离出颈静脉(右锁骨中点上方 0.5~1.0 cm 处,连接储血器、蠕动泵和大鼠膜式氧合器)、右侧股动脉(连接 CPB 管道)和左侧股动脉(持续监测血压),建立 CPB 模型。于胸骨正中(第 2 肋水平)开胸暴露心脏,游离主动脉并穿线。Sham 组建立 CPB,开胸后主动脉仅穿线但不结扎,在 CPB 下转机 90 min;模型组结扎主动脉全心停跳 30 min 后,开放主动脉立即行 30 s 再灌注和钳闭主动脉行 30 s 再缺血,共 3 个循环后,再转机 57 min。

1.3 动物分组处理:在构建模型前 72 h,经大鼠尾静脉注射心肌组织特异性 AAV 改变 lncRNA-UCA1、

miR-143 水平。lncRNA-UCA1 上调组经尾静脉注射 lncRNA-UCA1 的心肌组织特异性 AAV 过表达载体 100 μL(病毒滴度为 1×10^9 TU/mL);miR-143 下调组经尾静脉注射 miR-143 的 AAV shRNA 载体 100 μL(病毒滴度为 1×10^9 TU/mL)下调 miR-143 的表达;lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组经尾静脉注射 lncRNA-UCA1 的心肌组织特异性 AAV 过表达载体 100 μL 和 miR-143 的 AAV 过表达载体 100 μL(病毒滴度均为 1×10^9 TU/mL);空载慢病毒组注射 AAV 空载体 100 μL(病毒滴度为 1×10^9 TU/mL);Sham 组和模型组注射等量生理盐水。干预后 24 h 处死实验动物,收集心脏组织标本,低温保存用于后续研究。

1.4 心脏组织损伤情况观察:取部分心脏组织样本置于 4% 多聚甲醛溶液中,常规脱水、包埋、固定切片,进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光镜下观察心肌细胞受损情况及肌纤维组织变化,并进行 HE 半定量评分^[9]。

1.5 心肌组织超微结构损伤情况观察:取部分心脏组织标本,用 2.5% 戊二醛固定液低温(0~4℃)固定 2 h 以上,经过漂洗、固定、脱水后,利用包埋模具包埋。将装有心脏组织样品的试管放入聚合箱中,等待 12 h,取出并倒放试管,取出样品。将切成厚度 50~70 nm 的切片经过醋酸铀-柠檬酸铅双染后,使用透射电镜观察心脏组织超微结构的变化,包括自噬小体的形成、线粒体受损情况及心肌纤维排列。

1.6 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测心肌组织中 lncRNA-UCA1、miR-143、Notch1 mRNA 的表达:用 TRIzol 提取大鼠心肌组织 RNA,并制备成 cDNA,PCR 循环条件:预变性 95℃ 10 min,变性 95℃ 15 s,退火 60℃ 60 s,40 次循环。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参基因进行标准化,以校正不同样本间的上样量差异。通过实时荧光定量 PCR 仪收集扩增过程中的荧光信号,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算并分析目的基因的表达式。

1.7 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测心肌组织中 Notch1、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)的蛋白表达:使用 RIPA 裂解液提取心肌组织总蛋白,使用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid assay, BCA)试剂盒测定蛋白浓度;使用 5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis, SDS-PAGE) 分离后,转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜;加入 5% 脱脂奶粉封闭液,摇床振荡 1.5~2.0 h;加入对应的一抗,4℃摇床振荡孵育过夜;次日用含吐温 20 的 Tris 缓冲液(Tris buffered saline with Tween 20, TBST)洗涤 3 次,每次 10 min;5% 脱脂奶粉封闭液稀释二抗,室温摇床振荡反应 1~2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5~10 min。采用增强型化学发光试剂显色液曝光显影。GAPDH 作为内参,用于校正上样量差异和蛋白表达的标准化。利用图像分析软件对显影后的蛋白条带进行灰度值测定。将目的蛋白(Notch1、LC3)条带和内参蛋白(GAPDH)条带分别进行灰度值测量,每个样品的目的蛋白条带测量 3 次,取平均值作为该样品目的蛋白条带的灰度值;内参蛋白条带同样测量 3 次,取平均值作为该样品内参蛋白条带的灰度值。计算每个样品目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值,以此比值作为该样品中目的蛋白的表达量。

1.8 统计学分析:应用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析。计量资料均符合正态分布,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用 SNK 分析;方差不齐者采用非参数检验的 Kruskal-Wallis H 检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 心肌细胞损伤情况(图 1~2): Sham 组大鼠心肌细胞排列整齐、致密。与 Sham 组相比,模型组大鼠心肌组织受损较为明显,肌纤维排列紊乱,心肌细胞肥大且细胞间隙增大,HE 半定量评分显著上升($P < 0.05$)。与模型组相比,空载慢病毒组和 lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组心肌细胞形态无明显变化,HE 半定量评分差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);而 lncRNA-UCA1 上调组和 miR-143 下调组心肌组织受损程度较模型组明显减轻,肌纤维排列较整齐,仅部分细胞间隙增大,HE 半定量评分显著下降(均 $P < 0.05$)。

2.2 心肌细胞自噬及心肌组织超微结构变化(图 3): Sham 组大鼠心肌细胞自噬小体较少,肌原纤维清晰,线粒体大小形状正常,间质纤维无增生;与 Sham 组相比,模型组、空载慢病毒组和 lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组大鼠心肌细胞自噬小体增加,肌原纤维模糊,排列较为紊乱,线粒体增生且变形;lncRNA-UCA1 上调组和 miR-143 下调组心肌自噬水平较模型组更高。

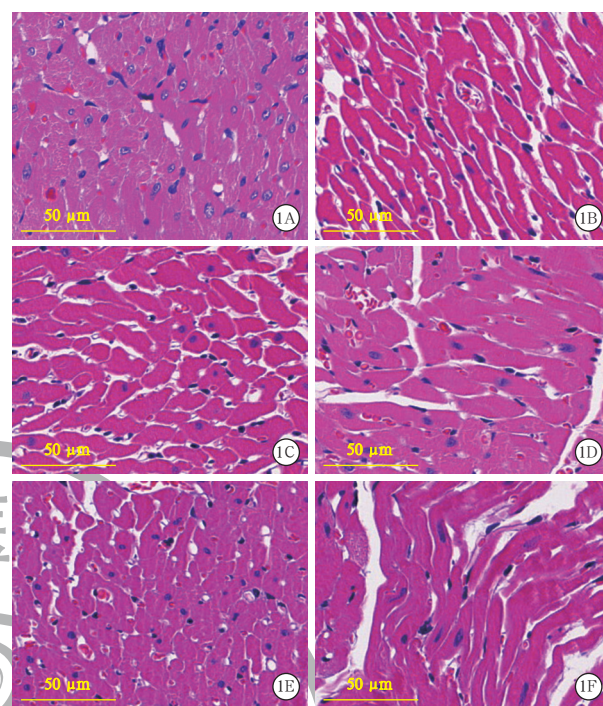
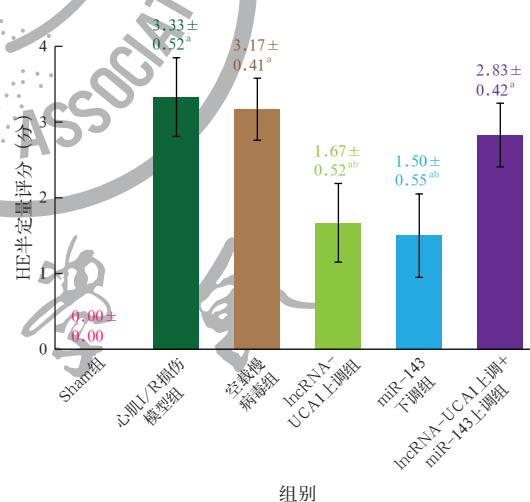


图1 光镜下观察各组大鼠心肌细胞病理学改变 假手术(Sham)组(A)心肌细胞排列整齐、致密,染色均匀;心肌缺血/再灌注(I/R)损伤模型组(B)和空载慢病毒组(C)肌纤维排列紊乱,心肌细胞肥大,细胞间隙增大;长链非编码RNA-尿路上皮癌相关基因1(lncRNA-UCA1)上调组(D)和微小RNA-143(miR-143)下调组(E)肌纤维排列整齐,仅部分细胞间隙增大;lncRNA-UCA1上调+miR-143上调组(F)心肌细胞病理学改变与模型组和空载慢病毒组无显著差异 苏木素-伊红(HE)染色 高倍放大



注:Sham 为假手术,I/R 为缺血/再灌注,lncRNA 为长链非编码 RNA,UCA1 为尿路上皮癌相关基因 1,miR-143 为微小 RNA-143,HE 为苏木素-伊红染色;与 Sham 组比较,^{*} $P < 0.05$;与心肌 I/R 损伤模型组比较,^b $P < 0.05$

图2 各组大鼠心肌组织 HE 半定量评分比较

2.3 心肌组织中 lncRNA-UCA1、miR-143、Notch1 mRNA 表达(图 4):与 Sham 组相比,模型组大鼠心肌组织中 lncRNA-UCA1 和 Notch1 mRNA 表达水平显著升高,而 miR-143 表达水平则显著降低(均 $P < 0.05$)。空载慢病毒组大鼠心肌组织中 lncRNA-UCA1、

miR-143、Notch1 mRNA 表达水平与模型组差异均无统计学意义(均 $P>0.05$); lncRNA-UCA1 上调组大鼠心肌组织中 lncRNA-UCA1 和 Notch1 mRNA 表达水平均较模型组显著升高,而 miR-143 表达水平则

显著下降(均 $P<0.05$); miR-143 下调组大鼠心肌组织中 lncRNA-UCA1 表达水平与模型组差异无统计学意义($P>0.05$),而 Notch1 mRNA 表达水平较模型组显著升高, miR-143 表达水平较模型组显著下降

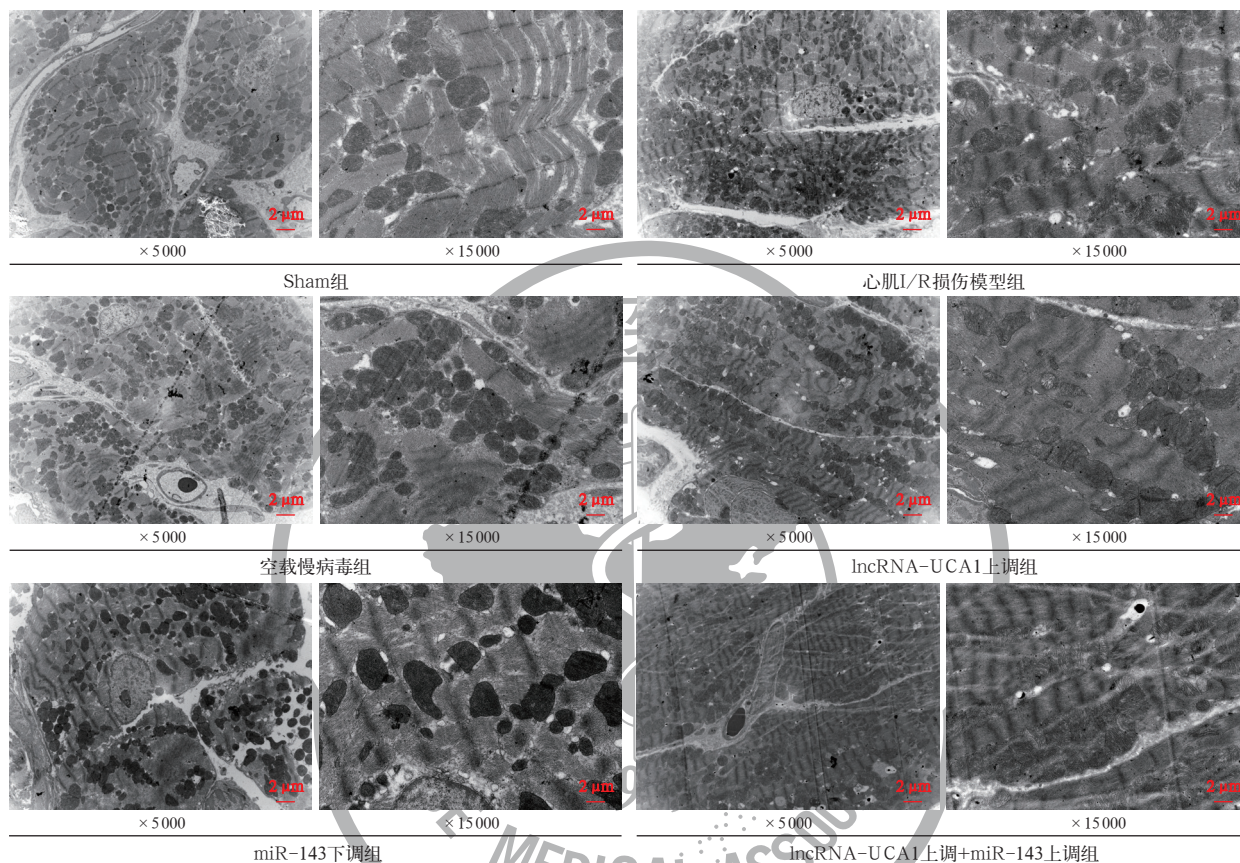
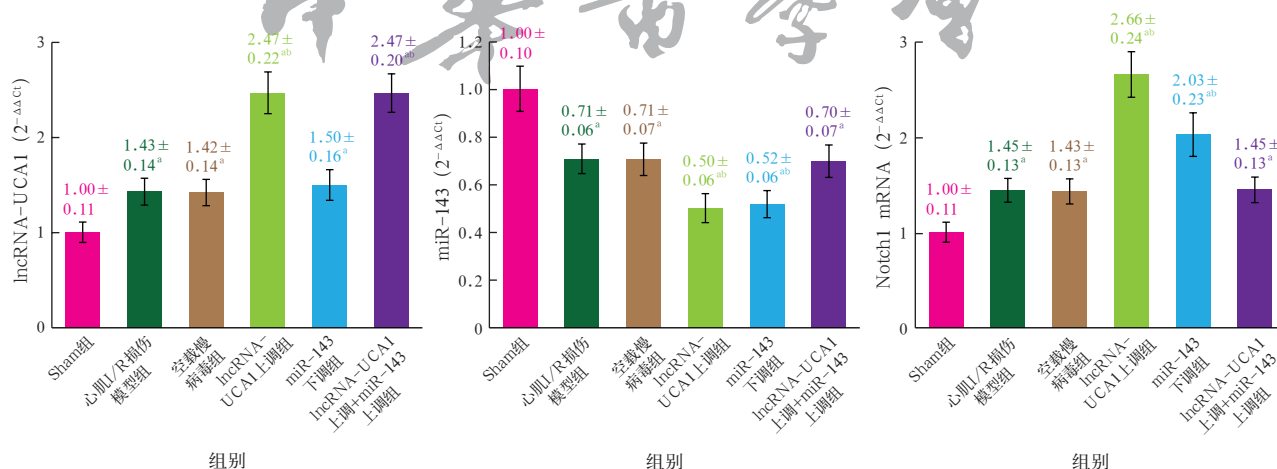


图3 透射电镜下观察各组大鼠心肌细胞自噬及心肌组织超微结构改变。红色箭头所示为自噬小体。假手术(Sham)组心肌细胞自噬小体较少,肌原纤维清晰、整齐,线粒体串珠状排列于纤维中,大小形状均正常,间质纤维无增生;心肌缺血/再灌注(I/R)损伤模型组和空载慢病毒组心肌细胞自噬小体较多,肌原纤维模糊,排列较为紊乱,横纹不清晰,线粒体增生且变形;长链非编码RNA-尿路上皮癌相关基因1(lncRNA-UCA1)上调组和微小RNA-143(miR-143)下调组心肌细胞自噬小体较模型组更多,肌原纤维排列较模型组更整齐,线粒体轻度肿胀较模型组减轻;lncRNA-UCA1上调+miR-143上调组心肌细胞自噬及心肌组织超微结构改变与模型组和空载慢病毒组无显著差异。醋酸铀-柠檬酸铅双染。

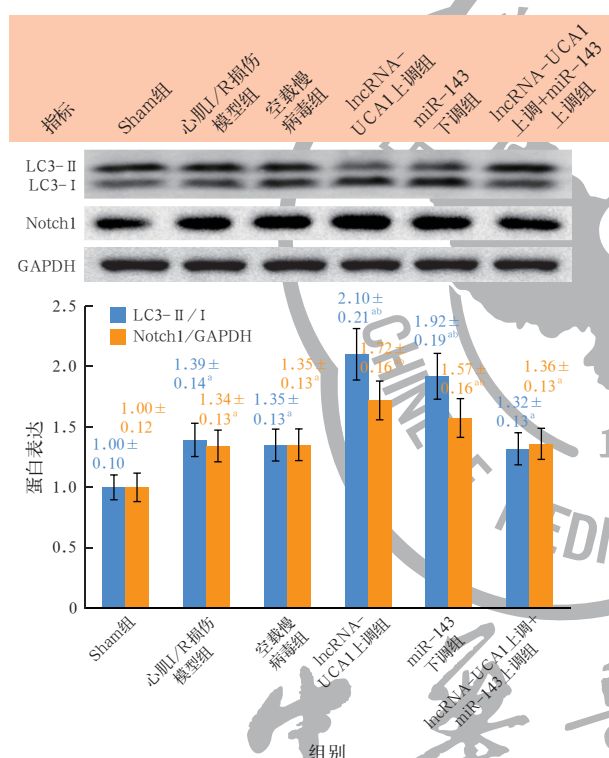


注: Sham 为假手术, I/R 为缺血/再灌注, lncRNA 为长链非编码 RNA, UCA1 为尿路上皮癌相关基因 1, miR-143 为微小 RNA-143; 与 Sham 组比较, ^a $P<0.05$; 与心肌 I/R 损伤模型组比较, ^b $P<0.05$

图4 各组大鼠心肌组织中 lncRNA-UCA1、miR-143、Notch1 mRNA 表达水平比较

(均 $P < 0.05$); lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组大鼠心肌组织中 lncRNA-UCA1 表达水平较模型组显著升高($P < 0.05$),而 miR-143 和 Notch1 mRNA 表达水平与模型组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.4 心肌组织中 Notch1 和 LC3 蛋白表达(图 5):与 Sham 组比较,模型组大鼠心肌组织中 LC3- II / I 和 Notch1 蛋白表达水平显著升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,lncRNA-UCA1 上调组及 miR-143 下调组大鼠心肌组织中 LC3- II / I、Notch1 蛋白表达水平显著升高(均 $P < 0.05$),而 lncRNA-UCA1 上调+miR-143 上调组大鼠心肌组织中 LC3- II / I 和 Notch1 蛋白表达水平与模型组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。



Sham 为假手术, I/R 为缺血 / 再灌注, lncRNA 为长链非编码 RNA, UCA1 为尿路上皮癌相关基因 1, miR-143 为微小 RNA-143, LC3- II / I 为微管相关蛋白 1 轻链 3- II / I, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$;与心肌 I/R 损伤模型组比较, ^b $P < 0.05$

图 5 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠心肌组织中 Notch1 和 LC3 的蛋白表达

3 讨论

心脏 CPB 手术中,心脏与血液循环是隔离的,不可避免地会引起心肌缺血,再灌注时还会加重组织损伤和器官功能障碍,即心肌 I/R 损伤。心肌 I/R 损伤的机制主要包括氧化应激、高能磷酸盐的消耗、正常细胞内钙稳态的干扰、炎症损伤、内皮细胞功能障碍、线粒体不同程度的损伤、细胞凋亡等^[3, 10]。

自噬是细胞内主要的降解系统,是一种保守机制,通过维持细胞内稳态来维持细胞在各种应激条件下存活。在失血性休克致急性肺损伤模型中,自噬激活可减轻肺损伤^[11]。但过度自噬可能导致细胞成分降解过多,造成自噬性细胞死亡^[12]。心脏基础状态下自噬是活跃的,并在细胞存活中起着关键作用,但 I/R 损伤后自噬的不适当激活会导致细胞死亡。自噬在心肌 I/R 损伤中起着“双刃剑”的作用^[13]。本研究中建立了 CPB 致心肌 I/R 损伤大鼠模型,结果显示,大鼠心肌组织中 LC3- II / I 显著升高,存在自噬水平增高,提示自噬激活参与了 CPB 致心肌 I/R 损伤的发生发展。

自噬调控是一个非常复杂的过程,许多信号通路及因素涉及其中。Notch 信号通路在调节细胞生长、发育、分化、凋亡及损伤后组织重塑中发挥着重要作用^[14]。心肌 I/R 损伤过程中 Notch1 与自噬的关系已经逐渐显现。心肌 I/R 损伤小鼠 Notch1 细胞内段(Notch1 intracellular domain, Notch1 ICD)表达升高^[15];使用 Notch1 激动剂处理后,小鼠心肌组织自噬增强,对心肌 I/R 损伤的耐受性升高,激活 Notch1 通路可能通过促进自噬缓解心肌 I/R 损伤^[12, 16]。本研究显示,CPB 致心肌 I/R 大鼠模型 Notch1 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高,表明 Notch1 参与了 CPB 致心肌 I/R 损伤的过程。

miR 可调节内源基因表达,与各种疾病的发生发展有着密切的关系,是自噬的主要调控因子,在心肌 I/R 损伤自噬信号通路及自噬体形成过程中发挥着重要作用^[17]。miR-143 被证明在心脏发育和平滑肌细胞分化中起关键作用^[18]。研究表明,外源性补充来自间充质干细胞的外泌体 miR-143 有助于通过调节自噬来缓解心肌 I/R 损伤^[19];而下调 miR-143 有助于阿托伐他汀对心肌组织的抗纤维化作用^[20]。心肌 I/R 损伤小鼠缺血心脏组织中 miR-143 表达水平在再灌注后随时间延长而增加;而抑制 miR-143 可抑制 I/R 心肌细胞凋亡,并使小鼠心肌梗死面积最小化,因此 miR-143 可能在心血管疾病中发挥潜在的保护作用^[21]。本研究显示,CPB 致心肌 I/R 损伤大鼠心肌细胞中 miR-143 表达水平显著降低,下调 miR-143 表达后,大鼠心肌组织受损程度较模型大鼠明显减轻,心肌自噬水平明显升高,miR-143 表达水平显著下降,因此 miR-143 可能通过改变自噬程度起到心肌保护作用。

lncRNA 源于两个基因间或基因内,能在转录前、

转录和转录后水平通过多重机制调控基因表达。近年来,心肌损伤中 miR 调控的研究理论层出不穷,其中基于竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 理论的“lncRNA-miR-mRNA”调控模式是研究热点。lncRNA 可作为与 miR 竞争的内源性 RNA,在基因表达中发挥转录后调节作用^[22]。在心肌 I/R 损伤时,UCA1 通过下调抑癌基因 p27 参与天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 介导的心肌细胞凋亡^[23]。研究者在肿瘤组织中发现,miR-143 与 lncRNA-UCA1 的 miR 识别位点之间存在直接的相互作用,lncRNA-UCA1 可以直接与 miR-143 相互作用,下调 miR-143 表达,并削弱了 miR-143 降解其靶基因的作用,导致肿瘤细胞的增生和转移^[24]。而研究者在心肌细胞的研究中发现,lncRNA-UCA1 通过抑制 miR-143 参与心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用^[25]。本研究模型中,上调 lncRNA-UCA1 表达或下调 miR-143 表达后,心肌 I/R 损伤大鼠心肌细胞损伤程度均较模型组减轻,自噬水平明显升高;但同时上调 lncRNA-UCA1 及 miR-143 表达后,大鼠心肌细胞损伤程度和自噬水平均与模型组无显著差异。说明单独上调 lncRNA-UCA1 可竞争性吸附更多的 miR-143,但同时上调 miR-143 则减弱了 miR-143 对靶基因的抑制作用,导致 Notch1 mRNA、Notch1 蛋白及细胞自噬水平与模型组无明显差异。本研究表明,CPB 致心肌 I/R 损伤大鼠心肌细胞中 lncRNA-UCA1 与 miR-143 之间存在联系,并且参与调控 CPB 致心肌 I/R 损伤过程中 Notch1 的表达及细胞自噬水平。以上结果提示,lncRNA-UCA1-miR-143-Notch1 轴参与了 CPB 致心肌 I/R 损伤的心肌细胞自噬水平调控及对心肌细胞损伤程度的影响。

综上所述,自噬激活参与了 CPB 致心肌 I/R 损伤的发生发展,lncRNA-UCA1-miR-143 可能通过调控 Notch1 及细胞自噬影响心肌损伤程度,这可能是 CPB 致心肌 I/R 损伤的潜在机制,为治疗或预防 CPB 致心肌 I/R 损伤提供了理论依据及可能的新的治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] De Hert S, Moerman A. Myocardial injury and protection related to cardiopulmonary bypass [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2015, 29 (2): 137-149. DOI: 10.1016/j.bpa.2015.03.002.
- [2] Kinoshita T, Asai T. Preservation of myocardium during coronary artery bypass surgery [J]. Curr Cardiol Rep, 2012, 14 (4): 418-423. DOI: 10.1007/s11886-012-0271-0.
- [3] Wu MY, Yang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46 (4): 1650-1667. DOI: 10.1159/000489241.
- [4] Ma S, Wang YB, Chen YD, et al. The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852 (2): 271-276. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.05.010.
- [5] Du J, Li YL, Zhao W. Autophagy and myocardial ischemia [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 217-222. DOI: 10.1007/978-981-15-4272-5_15.
- [6] Sarin A, Marcel N. The NOTCH1-autophagy interaction: regulating self-eating for survival [J]. Autophagy, 2017, 13 (2): 446-447. DOI: 10.1080/15548627.2016.1268303.
- [7] Melo Z, Ishida C, Goldaraz MP, et al. Novel roles of non-coding RNAs in opioid signaling and cardioprotection [J]. Noncoding RNA, 2018, 4 (3): 22. DOI: 10.3390/ncrna4030022.
- [8] Huang Y. The novel regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in cardiovascular diseases [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22 (12): 5768-5775. DOI: 10.1111/jcmm.13866.
- [9] 吴春雪. 重组人血管紧张素转换酶 2 对脓毒症心功能障碍的保护作用及机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2023.
- [10] Zhou ML, Yu YF, Luo XX, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutics from a mitochondria-centric perspective [J]. Cardiology, 2021, 146 (6): 781-792. DOI: 10.1159/000518879.
- [11] 林雪容, 王佳, 张志斌, 等. 自噬在失血性休克小鼠急性肺损伤中的生物学作用及相关机制 [J]. 中华危重病急救医学, 2024, 36 (8): 848-852. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20231007-00844.
- [12] Zheng YT, Shi BH, Ma MQ, et al. The novel relationship between Sirt3 and autophagy in myocardial ischemia-reperfusion [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (5): 5488-5495. DOI: 10.1002/jcp.27329.
- [13] Mokhtari B, Badalzadeh R. Protective and deleterious effects of autophagy in the setting of myocardial ischemia/reperfusion injury: an overview [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49 (11): 11081-11099. DOI: 10.1007/s11033-022-07837-9.
- [14] Pei HF, Song XF, Peng CF, et al. TNF- α inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrosative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 82: 114-121. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.002.
- [15] 吕平, 李巍, 杨亚丽, 等. 激活 Notch1 通过促进自噬改善高温高湿条件下心肌缺血/再灌注损伤 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17 (9): 1623-1627. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.09.006.
- [16] Shi BH, Ma MQ, Zheng YT, et al. mTOR and Beclin1: two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (8): 12562-12568. DOI: 10.1002/jcp.28125.
- [17] Wang D, Niu ZC, Wang XL. The regulatory role of non-coding RNA in autophagy in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 822669. DOI: 10.3389/fphar.2022.822669.
- [18] Cordes KR, Sheehy NT, White MP, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity [J]. Nature, 2009, 460 (7256): 705-710. DOI: 10.1038/nature08195.
- [19] Chen CB, Lu CH, He DW, et al. Inhibition of HMGB1 alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice via suppressing autophagy [J]. Microvasc Res, 2021, 138: 104204. DOI: 10.1016/j.mvr.2021.104204.
- [20] Yu B, Yu M, Zhang HL, et al. Suppression of miR-143-3p contributes to the anti-fibrosis effect of atorvastatin on myocardial tissues via the modulation of Smad2 activity [J]. Exp Mol Pathol, 2020, 112: 104346. DOI: 10.1016/j.yexmp.2019.104346. Erratum in: Exp Mol Pathol, 2024; 104945. DOI: 10.1016/j.yexmp.2024.104945.
- [21] Lu CH, Chen DX, Dong K, et al. Inhibition of miR-143-3p alleviates myocardial ischemia reperfusion injury via limiting mitochondria-mediated apoptosis [J]. Biol Chem, 2023, 404 (6): 619-631. DOI: 10.1515/hsz-2022-0334.
- [22] Lin C, Wang Y, Wang Y, et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HOXA13 by lncRNA HOTTIP facilitates tumorigenesis and metastasis in esophageal squamous carcinoma cells [J]. Oncogene, 2017, 36 (38): 5392-5406. DOI: 10.1038/onc.2017.133.
- [23] Liu YB, Zhou DL, Li GN, et al. Long non coding RNA-UCA1 contributes to cardiomyocyte apoptosis by suppression of p27 expression [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35 (5): 1986-1998. DOI: 10.1159/000374006.
- [24] Tuo YL, Li XM, Luo J. Long noncoding RNA UCA1 modulates breast cancer cell growth and apoptosis through decreasing tumor suppressive miR-143 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19 (18): 3403-3411.
- [25] Yu SY, Dong B, Zhou SH, et al. LncRNA UCA1 modulates cardiomyocyte apoptosis by targeting miR-143 in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Int J Cardiol, 2017, 247: 31. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.05.055.

(收稿日期: 2024-03-29)
(责任编辑: 孙茜 张耘菲)