

lncRNA PWAR5 通过靶向 miR-30a-5p/SOCS3 分子轴降低 心肌炎心肌细胞的损伤

卢英红, 迟伟峰, 谭玉婷, 王春筱, 纪文岩, 吴 赛

摘要 目的 研究长链非编码(lncRNA) PWAR5 在脂多糖诱导心肌炎时对心肌细胞的保护作用及分子机制。方法 分离培养大鼠原代心肌细胞, 分别采用载有 PWAR5 序列的慢病毒(PWAR5 组) 和空载慢病毒(Control 组) 进行感染, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测感染效率。采用脂多糖诱导心肌炎后, MTS 法检测 PWAR5 对大鼠原代心肌细胞活力的影响, ELISA 法检测上清液中白细胞介素(IL)-1 β 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的含量, 流式细胞术分别检测 PWAR5 对大鼠原代心肌细胞凋亡的影响。分别采用生物信息学方法和双荧光素酶报告基因实验预测和验证 PWAR5 的靶基因。qRT-PCR 检测靶基因的表达。Western blot 法检测靶基因蛋白及凋亡相关蛋白的表达。结果 与 Control 组相比, PWAR5 组细胞中 PWAR5 表达增加($P < 0.01$)。脂多糖处理后, 与 Control 组相比, PWAR5 组细胞活力增加($P < 0.01$), 上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量下降(均 $P < 0.01$), PWAR5 组细胞凋亡比例下降($P < 0.01$)。PWAR5 的靶基因可能是 miR-30a-5p, PWAR5 可与 miR-30a-5p 互补结合($P < 0.01$)。与 Control 组相比, PWAR5 组细胞中 miR-30a-5p 的表达下降($P < 0.01$), 细胞因子信号传导抑制因子 3(SOCS3) mRNA 的表达增加($P < 0.01$)。与 Control 组相比, PWAR5 组细胞中 SOCS3 和 Bcl-2 蛋白表达上升, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达下降。结论 PWAR5 可通过靶向调控 miR-30a-5p/SOCS3 分子轴, 降低心肌炎导致的心肌细胞损伤。
关键词 心肌炎; PWAR5; miR-30a-5p; SOCS3; 细胞凋亡
中图分类号 R 542.2
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)12-1955-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.020

心肌炎是指心肌受累导致心肌细胞病变的炎症性疾病, 由多种病因如免疫损伤、细菌感染、病毒感染等引起^[1]。心肌炎可引起心律失常, 导致心脏收缩和舒张功能障碍^[2]。心肌炎临床表现为胸闷、心悸、心律不齐甚至心力衰竭等症状, 严重者可导致患

者心源性猝死^[3]。心肌炎的病理过程尚不完全明确, 临床治疗主要是对症治疗^[4]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 是一类大于 200 个核苷酸的内源性非编码 RNA, 广泛存在于细胞质或细胞核中^[5]。lncRNA 在转录水平、转录后水平以表观遗传的方式调控基因的表达, 影响细胞分化、增殖、凋亡等功能^[6]。研究^[7-8]表明, lncRNA 的异常表达与各种心脏疾病的发生和发展相关。近年来 PWAR5 是 lncRNA 研究的热点, 其在甲状腺癌、胶质瘤中发挥的抑癌基因作用。PWAR5 在心脏疾病特别是心肌炎中的功能及作用机制尚不明确。本研究旨在观察 PWAR5 在脂多糖诱导心肌炎时对大鼠原代心肌细胞的保护作用及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料 空载慢病毒(含绿色荧光蛋白 GFP)、载有 PWAR5 序列的慢病毒(含绿色荧光蛋白 GFP)、miR-30a-5p、miR-NC、PWAR5 荧光报告载体(野生型 WT 和突变型 MT) 购自上海碧云天生物科技有限公司。用于解离原代心肌细胞的 3 d 新生 SD 大鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司。293T 细胞购自中国典型培养物保藏中心。MTS 试剂盒、ELISA 试剂盒和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。qRT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司。转染试剂 LipofectamineTM 3000 购自美国 Invitrogen 公司。DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京威格拉斯生物技术有限公司。胶原酶 I 购自美国 Sigma 公司。一抗和二抗购自美国 BD 公司。

1.2 细胞解离、培养及分组 采用胶原酶 I 将大鼠心脏组织解离成单细胞悬液, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下, 采用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。分别载有 PWAR5 序列的慢病毒和空载慢病毒, 定义为 PWAR5 组和 Control 组, 24 h 后在荧光显微镜下拍照。每组分别滴加 100 μ l 脂多糖(浓度为 10 μ mol/L) 孵育 24 h 进行后续实验。

2021-08-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81900310)

作者单位: 青岛大学附属青岛市海慈医院心内科, 青岛 266000

作者简介: 卢英红, 女, 副主任医师;

王春筱, 男, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: tttying@163.com

1.3 qRT-PCR 检测 PWAR5、miR-30a-5p 和 SOCS3 mRNA 的表达 每组细胞加入 TRIzol 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA 后, 配制 qRT-PCR 反应体系。PWAR5 和 SOCS3 mRNA 的相对表达以 α -Tubulin 为内参, miR-30a-5p 的相对表达以 U6 为内参。引物序列如下, miR-30a-5p 正向引物: ACACTC-CAGCTGGGTGTAACATCCTCGAC, 反向引物: CAGTGCCTGTCGTGGAGT; U6 正向引物: CGCGCT-TCGGCAGCACATATACT, 反向引物: ACGCT-TCACGAATTTGCGTGTC。 α -Tubulin 正向引物: CCAAGCTGGAGTTCTCTA, 反向引物: CAATCA-GAGTGCTCCAGG; PWAR5 正向引物: TGATGT-GGGTGTGATAAC, 反向引物: ACTCAAAG-GCAAGAACTA; SOCS3 正向引物: CCTGCGCCT-CAAGACCTTC, 反向引物: GTCAGTGCCTCCAG-TAGAA。反应参数: 95 °C 预变性 6 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 25 s, 72 °C 延伸 25 s, 40 个循环, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 PWAR5、miR-30a-5p 和 SOCS3 mRNA 的相对表达。

1.4 MTS 法检测大鼠原代心肌细胞活力 将脂多糖处理的大鼠原代心肌细胞接种于 96 孔板, 每孔 2×10^3 个细胞。24 h 后, 避光条件下加 20 μ l/孔 MTS 溶液, 培养箱内培养 3 h。通过酶标仪检测每孔在 450 nm 波长处的吸光度(A)值, 代表各组大鼠原代心肌细胞的活力。

1.5 ELISA 法检测上清液中白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF)- α 的含量 收集脂多糖处理后的各组细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 通过酶标仪检测每孔在 450 nm 波长处的吸光度(A)值, 比较各组上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡比例 消化、离心收集脂多糖处理后的大鼠原代心肌细胞, 采用缓冲液进行重悬。每组取 100 μ l 细胞悬液至流式管, 分别

加 Annexin V-FITC 溶液和 PI 溶液各 5 μ l, 充分混匀后在冰箱内静置 20 min。上机前, 每管加 100 μ l 缓冲液, 采用流式细胞仪检测每组细胞的凋亡比例。

1.7 生物信息学方法预测和双荧光素酶报告基因实验验证 PWAR5 的靶基因 采用 starBase V 3.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 预测 PWAR5 结合的微小(miRNA)。将 PWAR5-WT 和 PWAR5-MT 荧光报告载体分别与 miR-NC 或 miR-30a-5p 共转染 293T 细胞, 48 h 后通过双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测萤火虫荧光素酶活性和海參荧光素酶活性, 相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值/海參荧光素酶活性值。

1.8 Western blot 法检测 SOCS3 蛋白及凋亡相关蛋白表达 胰酶消化各组大鼠原代心肌细胞, 细胞裂解液裂解细胞, 离心提取总蛋白。加入上样缓冲液, 100 °C 水浴 8 min, 进行十二烷基聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜至硝酸纤维素膜。采用 5% 脱脂牛奶封闭 3 h, 与一抗在 4 °C 冰箱孵育过夜。加入二抗孵育 3 h, 滴加 ECL 化学发光试剂, 通过凝胶成像系统观察蛋白条带。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计学软件对实验数据进行统计, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠原代心肌细胞中 PWAR5 的相对表达水平 荧光显微镜显示, Control 组和 PWAR5 组大鼠原代心肌细胞均表达绿色荧光蛋白, 表明细胞慢病毒感染成功。见图 1。

qRT-PCR 结果显示, Control 组和 PWAR5 组大鼠原代心肌细胞中 PWAR5 相对表达分别为 (1.03 ± 0.15) 和 (9.71 ± 1.20) , PWAR5 组 PWAR5 相对表达高于 Control 组 ($t = 7.199, P < 0.01$)。见图 2。

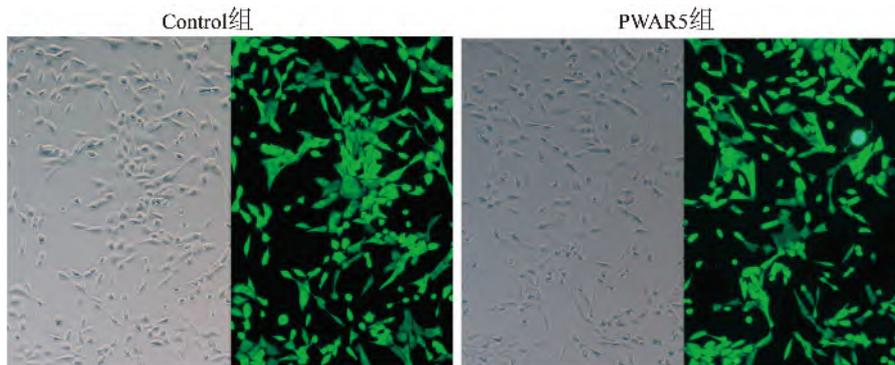


图1 Control 组和 PWAR5 组大鼠原代心肌细胞绿色荧光蛋白表达 $\times 100$

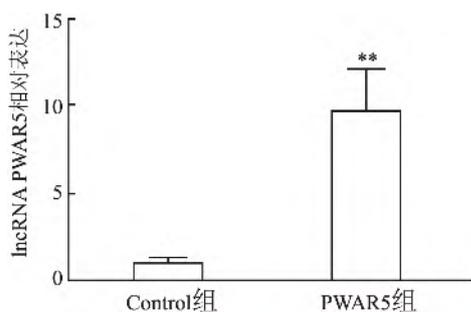


图2 Control组和PWAR5组大鼠原代心肌细胞中PWAR5的相对表达与Control组比较: ** $P < 0.01$

2.2 高表达PWAR5对大鼠原代心肌细胞活力的影响 MTS法结果显示,脂多糖处理后的Control组和PWAR5组大鼠原代心肌细胞活力分别为(1.02 ± 0.10)和(5.35 ± 0.48),与Control组相比,PWAR5组大鼠原代心肌细胞的活力增加($t = 8.795, P < 0.01$)。

2.3 高表达PWAR5对上清液IL-1 β 和TNF- α 含量的影响 ELISA法结果显示,脂多糖处理后的Control组和PWAR5组上清液中IL-1 β 含量分别为(25.13 ± 2.03) pg/ml和(10.28 ± 1.68) pg/ml,差异有统计学意义($t = 5.631, P < 0.01$);Control组和PWAR5组上清液中TNF- α 含量分别为(32.26 ± 3.71) pg/ml和(14.26 ± 1.95) pg/ml,差异有统计学意义($t = 4.297, P < 0.01$);与Control组相比,PWAR5组上清液中IL-1 β 和TNF- α 含量均下降。

2.4 高表达PWAR5对大鼠原代心肌细胞凋亡比例的影响 流式细胞术显示(图3),脂多糖处理24h后,PWAR5组和Control组大鼠原代心肌细胞凋亡比例分别为(12.61 ± 2.05)%和(29.25 ± 2.46)%,与Control组相比,高表达PWAR5抑制大鼠原代心肌细胞的凋亡,差异有统计学意义($t = 5.191, P < 0.01$)。

2.5 生物信息学方法预测PWAR5的靶基因 采用生物信息学软件starBase V 3.0预测PWAR5可靶向结合miR-30a-5p。见图4。

2.6 PWAR5与miR-30a-5p的靶向关系 双荧光素酶报告基因检测结果显示,PWAR5-WT/miR-NC组、PWAR5-WT/miR-30a-5p组、PWAR5-MT/miR-NC组和PWAR5-MT/miR-30a-5p组的相对荧光素酶活性分别为(1.03 ± 0.12)、(0.33 ± 0.05)、(0.96 ± 0.04)和(0.99 ± 0.10),PWAR5-WT/miR-30a-5p组较PWAR5-WT/miR-NC组降低($t = 5.350, P < 0.01$)。结果显示PWAR5与miR-30a-5p之间可靶向结合。见图5。

2.7 高表达PWAR5对大鼠原代心肌细胞中miR-30a-5p和SOCS3 mRNA表达的影响 qRT-PCR结果显示,PWAR5组和Control组大鼠原代心肌细胞miR-30a-5p的表达分别为(0.29 ± 0.05)和(1.02 ± 0.12),高表达PWAR5可抑制miR-30a-5p的表达($t = 5.80, P < 0.01$)。PWAR5组和Control组大鼠原代心肌细胞SOCS3 mRNA的表达分别为(5.82 ± 0.79)和(1.05 ± 0.08),高表达PWAR5可促进SOCS3 mRNA的表达($t = 6.081, P < 0.01$)。

2.8 高表达PWAR5对SOCS3蛋白和凋亡相关蛋白表达的影响 Western blot结果显示,与Control组相比,PWAR5组大鼠原代心肌细胞中SOCS3蛋白的表达增加,抗凋亡蛋白Bcl-2表达上升,促凋亡蛋白Bax、Caspase-3表达降低。见图6。

3 讨论

心肌炎诱发炎症渗出,导致心肌细胞的耗氧量增加,心肌细胞的活力下降,心肌细胞凋亡比例增加^[9]。心肌炎的发病机制复杂,组织病理学及免疫组织化学是目前心肌炎的主要诊断方式^[10]。寻找新的分子靶点对心肌炎的诊断、治疗及预后具有重

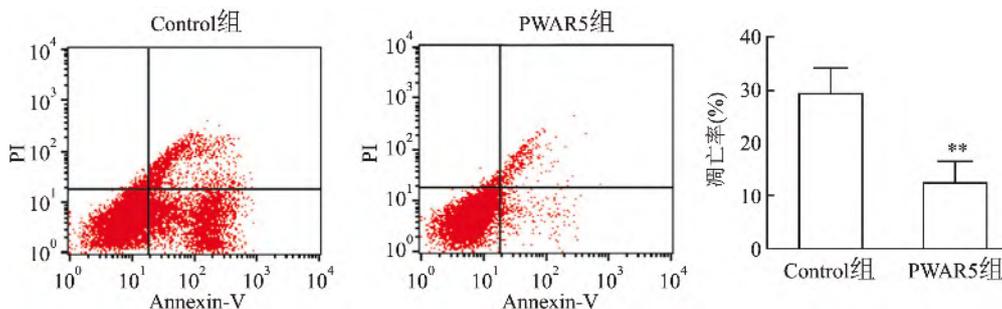


图3 流式细胞术检测PWAR5对大鼠原代心肌细胞凋亡比例的影响与Control组比较: ** $P < 0.01$

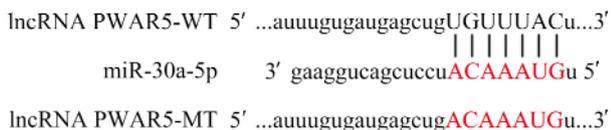


图4 生物信息学方法预测 PWAR5 的靶基因

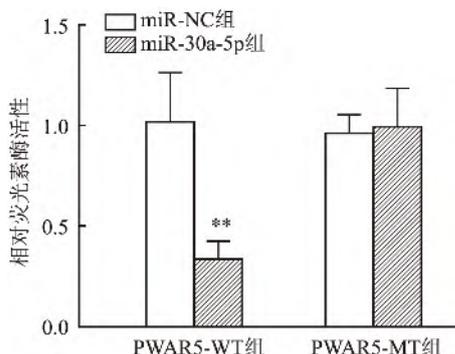


图5 双荧光素酶报告基因实验验证 PWAR5 与 miR-30a-5p 的靶向关系
与 miR-NC 组比较: ** P < 0.01

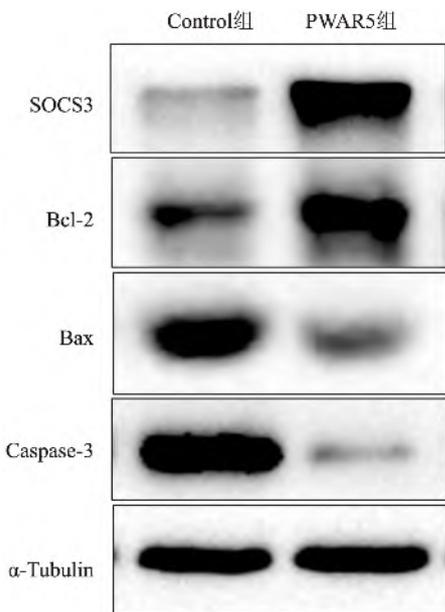


图6 Western blot 法检测 SOCS3 蛋白和凋亡相关蛋白的表达

要临床意义。lncRNA 广泛参与调控各种心血管疾病的发生、发展。Cao et al^[11] 报道 ,lncRNA HIF1A-AS1 在柯萨奇病毒 B3 诱导的心肌炎中表达上升 ,下调 lncRNA HIF1A-AS1 表达可有效抑制心肌细胞的凋亡 ,miR-138 是 lncRNA HIF1A-AS1 的靶基因。Zhang et al^[12] 报道 ,lncRNA ROR 通过影响 C-Myc 蛋白的表达 ,促进病毒性心肌炎大鼠心肌的纤维化。研究^[7-8] 表明 ,PWAR5 在胶质瘤、甲状腺癌中发挥抑癌基因作用 ,可抑制肿瘤的增殖和进展 ,与肿瘤患者的预后密切相关。PWAR5 对心肌炎时心肌细胞的作用及分子机制并不明确。

该研究结果显示 ,脂多糖处理后 ,过表达 PWAR5 可抑制炎症因子 IL-1β、TNF-α 的渗出 ,降低炎症反应。同时 ,PWAR5 可增强大鼠原代心肌细胞的活力 ,抑制心肌细胞的凋亡 ,降低心肌细胞的损伤。lncRNA 发挥作用的主要方式是“海绵作用” ,即互补结合 miRNA ,降低 miRNA 对其下游靶基因的干扰作用 ,从而上调 miRNA 下游靶基因的表达^[13]。该研究通过 starBase V 3.0 预测显示 ,PWAR5 可能互补结合的 miRNA 是 miR-30a-5p。双荧光素酶报告基因检测进一步表明 ,PWAR5 可互补结合 miR-30a-5p。研究显示 ,急性病毒性心肌炎患者血清外泌体中 miR-30a-5p 的含量增加 ,miR-30a-5p 通过靶向干扰细胞因子信号传导抑制因子 3 (suppressor of cytokine signaling 3 ,SOCS3) 促进心肌炎症反应的发生 ,诱导心肌细胞的不可逆损伤^[14]。SOCS3 基因位于染色体 17q25.3 ,SOCS3 蛋白在细胞因子信号通路中发挥负反馈调控作用 ,可抑制心肌炎的进展^[14-15]。该研究结果显示 ,上调 PWAR5 表达后 ,大鼠原代心肌细胞中 miR-30a-5p 表达下降 ,SOCS3 mRNA 表达增加 ,表明 PWAR5 可通过靶向结合 miR-30a-5p 上调 SOCS3 mRNA 的表达。Western blot 检测进一步显示 ,与 Control 组相比 ,高表达 PWAR5 后 ,SOCS3、Bcl-2 蛋白表达上调 ,Bax、Caspase-3 蛋白表达下调 ,表明 PWAR5 可抑制大鼠原代心肌细胞的凋亡。

综上所述 ,PWAR5 可有效降低脂多糖诱导的炎症反应 ,增强大鼠原代心肌细胞的活力并抑制其凋亡 ,其分子机制是 PWAR5 通过靶向结合 miR-30a-5p 上调 SOCS3 基因的表达。该研究表明 PWAR5 在心肌炎心肌细胞中发挥保护作用 ,可能为心肌炎的靶向治疗提供了新的思路。

参考文献

[1] Daba T M , Zhao Y , Pan Z. Advancement of mechanisms of coxsackie virus B3-induced myocarditis pathogenesis and the potential therapeutic targets [J]. Curr Drug Targets , 2019 , 20(14) : 1461 - 73.

[2] Zhu K , Miao C , Tian Y , et al. lncRNA MIR4435-2HG promoted clear cell renal cell carcinoma malignant progression via miR-513a-5p/KLF6 axis [J]. J Cell Mol Med , 2020 , 24(17) : 10013 - 26.

[3] Bonaca M P , Olenchock B A , Salem J E , et al. Myocarditis in the setting of cancer therapeutics: proposed case definitions for emerging clinical syndromes in cardio-oncology [J]. Circulation , 2019 , 140(2) : 80 - 91.

[4] Jain S , Nolan S M , Singh A R , et al. Myocarditis in multisystem

- inflammatory syndrome in children associated with coronavirus disease 2019 [J]. *Cardiol Rev*, 2020, 28(6): 308–11.
- [5] 白晓静, 蒋玉梅, 张静, 等. 干扰长链非编码 RNA CCAT2 对膀胱癌细胞 J82 线粒体功能和肿瘤干细胞特性的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 221–6.
- [6] Luan Y, Xie B, Wei W. REST-repressed lncRNA NPPA-AS1 regulates cervical cancer progression by modulating miR-302e/DKK1/Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2021, 122(1): 16–28.
- [7] Wang X P, Shan C, Deng X L, et al. Long non-coding RNA PAR5 inhibits the proliferation and progression of glioma through interaction with EZH2 [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 3177–86.
- [8] You X, Yang S, Sui J, et al. Molecular characterization of papillary thyroid carcinoma: a potential three-lncRNA prognostic signature [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 4297–310.
- [9] Tschöpe C, Cooper L T, Torre-Amione G, et al. Management of myocarditis-related cardiomyopathy in adults [J]. *Circ Res*, 2019, 124(11): 1568–83.
- [10] Fei Y, Chaulagain A, Wang T, et al. MiR-146a down-regulates inflammatory response by targeting TLR3 and TRAF6 in coxsackievirus B infection [J]. *Rna*, 2020, 26(1): 91–100.
- [11] Cao H, Yang B, Zhao Y, et al. The pro-apoptosis and pro-inflammation role of lncRNA HIF1A-AS1 in coxsackievirus B3-induced myocarditis via targeting miR-138 [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(5): 1245–55.
- [12] Zhang N, Sun Y. LncRNA ROR facilitates myocardial fibrosis in rats with viral myocarditis through regulating C-Myc expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24): 10982–8.
- [13] 崔士猛, 杜渐, 罗海峰, 等. 长链非编码 RNA PVT1 通过 miR-17-5p 调控肝癌细胞增殖与迁移的机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(6): 932–6.
- [14] Fan K L, Li M F, Cui F, et al. Altered exosomal miR-181d and miR-30a related to the pathogenesis of CVB3 induced myocarditis by targeting SOCS3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(5): 2208–15.
- [15] Zhang C, Lian H, Xie L, et al. LncRNA ELFN1-AS1 promotes esophageal cancer progression by up-regulating GFPT1 via sponging miR-183-3p [J]. *Biol Chem*, 2020, 401(9): 1053–61.

lncRNA PWAR5 reduces myocarditis cardiomyocyte damage by targeting miR-30a-5p/SOCS3 molecular axis

Lu Yinghong, Chi Weifeng, Tan Yuting, et al

(Dept of Cardiology, Qingdao Haici Hospital, Qingdao University, Qingdao 266000)

Abstract Objective To study the protective effect and molecular mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) PWAR5 on cardiomyocytes in lipopolysaccharide-induced myocarditis. **Methods** The primary rat cardiomyocytes were isolated and cultured, and were infected with lentivirus carrying PWAR5 sequence (PWAR5 group) and empty lentivirus (Control group). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect infection efficiency. After lipopolysaccharide-induced myocarditis, the MTS method was used to detect the effect of PWAR5 on the viability of primary rat cardiomyocytes, and the ELISA method was used to detect the levels of interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α in the supernatant. Flow cytometry was used to detect the effect of PWAR5 on the apoptosis of primary rat cardiomyocytes. Bioinformatics methods and dual-luciferase reporter gene experiments were used to predict and verify the target gene of PWAR5. qRT-PCR was used to detect the expression of target gene. Western blot was used to detect the expression of target gene protein and apoptosis-related proteins. **Results** Compared with the Control group, the expression of PWAR5 in the PWAR5 group increased ($P < 0.01$). After lipopolysaccharide treatment, compared with the Control group, the cell viability of the PWAR5 group increased ($P < 0.01$), the contents of IL-1 β and TNF- α in the supernatant decreased ($P < 0.01$), and the percentage of apoptosis in the PWAR5 group decreased ($P < 0.01$). The target gene of PWAR5 might be miR-30a-5p, and PWAR5 could complement miR-30a-5p ($P < 0.01$). Compared with the Control group, the expression of miR-30a-5p in the cells of the PWAR5 group decreased ($P < 0.01$), and the expression of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA increased ($P < 0.01$). Compared with the Control group, the expression of SOCS3 and Bcl-2 protein in the PWAR5 group increased, while the expression of Bax and Caspase-3 protein decreased. **Conclusion** PWAR5 can reduce the damage of cardiomyocytes caused by myocarditis by targeting the miR-30a-5p/SOCS3 molecular axis.

Key words myocarditis; PWAR5; miR-30a-5p; SOCS3; cell apoptosis