

网络出版时间: 2020-9-24 13:13 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200923.1151.019.html>

## 长链非编码 RNA NRON 促进 NFATc3 磷酸化减轻心房纤维化的机制研究

王 泽 郭志祥 葛圣林

**摘要** 目的 探讨长链非编码 RNA(LncRNA) NRON 在心房纤维化过程中的作用。方法 使用 qRT-PCR 检测 NRON 在心房组织中的表达水平。通过蛋白质印迹法测定胶原蛋白 I、胶原蛋白 III、NFATc3 和 pNFATc3 的蛋白水平。再进行免疫组织化学测定以观察心房组织中胶原 I 的表达和分布。通过波形蛋白/肌钙蛋白免疫荧光染色对心房成纤维细胞进行鉴定。继而用 CCK-8 分析检测成纤维细胞增殖。通过 HE 染色观察心脏组织的形态变化,最后 Masson 染色检测心肌纤维化。结果 NRON 可以抑制成纤维细胞增殖与胶原 I 和胶原 III 的表达,激活 NFATc3 和核素导入。过表达 NRON 可以促进 NFATc3 的磷酸化,从而抑制小鼠心脏纤维化进程。结论 LncRNA NRON 促进 NFATc3 磷酸化,抑制活化 T 细胞因子(NFAT) 的活性,从而抑制心房组织的纤维化进程。

**关键词** 长链非编码 RNA; NRON; 房颤; 心脏纤维化; 活化 T 细胞因子; 磷酸化

**中图分类号** R 541.75

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2020)11-1740-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.019

心房纤颤(atrial fibrillation, AF) 是目前最常见的心律不齐之一,AF 发作会造成血流动力学改变,极易引起血栓的形成。所以 AF 是引发中风、心力

2020-07-24 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金( 编号: 1808085MH279)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院心脏大血管外科, 合肥 230022

作者简介: 王 泽 男, 硕士研究生;

葛圣林 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aydgs@ sina. com

the proliferation of Ca Ski and C4-1 cells and C33a, as well as the expression of mRNA and protein in YAP, TGF- $\alpha$ , and EGFR. **Results** The expressions of YAP, TGF- $\alpha$  and EGFR in HPV-16 (+) Ca Ski and HPV-18 (+) C4-1 human cervical cancer cells were higher than that of HPV (-) C33a cells; after Vertepofin intervention, the cell proliferation rate decreased. At the same time that YAP was inhibited, the expression of mRNA and protein in TGF- $\alpha$  and EGFR also appeared to be inhibited. **Conclusion** The Hippo / YAP signaling pathway for EGFR and TGF- $\alpha$  expression in HPV-infected cervical cancer cells can play a positive regulatory role.

**Key words** human papillomavirus; cervical cancer; transforming growth factor alpha; epidermal growth factor receptor; YES related protein

衰竭和死亡的重要危险因素。由于 AF 对医疗系统带来的负担持续上升,因此临床医师准确鉴别出高风险的 AF 患者并及时采取预防和治疗手段已变得至关重要。活化 T 细胞因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT) 是一种受  $\text{Ca}^{2+}$  调节以控制基因表达的转录因子家族。越来越多的数据表明钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN) / NFAT 信号通路在心脏肥大和纤维化中起重要作用<sup>[1-2]</sup>。长链非编码 RNA(long non-coding ribonucleic acid, LncRNA) 是一组非蛋白质编码的 RNA 分子,长度大于 200 个核苷酸。现国外尚未有研究结果证实 NRON 对于 NFAT 的具体作用机制,该研究探讨 LncRNA NRON 影响 NFAT 的具体机制及其对心肌纤维化进程的影响,从而为临床预测和治疗 AF 提供了新的可行性。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取 2018~2019 年安徽医科大学第一附属医院心脏大血管外科包括心脏瓣膜置换术在内的 34 例 AF 患者(AF 组)和 20 例窦性心律(sinus rhythm, SR) 患者(SR 组)。排除标准如下:服用抗心律失常药物( $\beta$  受体阻滞剂除外)的 AF 患者或有其他心律不齐病史的患者;植入永久起搏器的患者;既往或计划进行 Cox 迷宫手术的患者;中重度二尖瓣疾病患者;有二尖瓣置换术手术史患者;先天性心脏畸形患者;急诊手术患者;全身性炎症或癌症患者;人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV) 感染或营养不良患者。在收集入组患者组织样本时,所有患者未接受过皮质类固醇或非类

固醇抗炎药治疗。本研究得到安徽医科大学第一附属医院人类伦理委员会的批准,严格遵守《赫尔辛斯基宣言》实施试验,并获得了所有入组患者或其直系家属的书面知情同意。

**1.2 主要试剂** 胎牛血清(上海斯信生物科技有限公司);DMEM 培养基(美国 R&D Systems 公司);ECL 发光试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);troponin IF 一抗、vimentin IF 一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司);IF 二抗(武汉三鹰生物技术有限公司);vimentin 免疫印迹一抗、troponin 免疫印迹一抗(武汉莫纳生物科技有限公司),GAPDH 免疫印迹一抗、免疫印迹二抗(上海斯信生物科技有限公司),引物(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);其它生化试剂均为进口分装或国产分析纯化。

### 1.3 主要方法

**1.3.1 细胞分离、培养和转染** 术中从 SR 患者中取出心脏组织,并在 PBS 培养基中洗涤。胶原酶和蛋白酶消化后,将原发性心房成纤维细胞进行原代培养。3 次传代后,收集细胞,更换培养基培养 24 h。之后将 pcDNA-NRON 和 si-NRON 转染至原代心房成纤维细胞。培养 48 h 后,收集细胞用于进一步实验。

**1.3.2 qRT-PCR 提取总 RNA。** 对 High Capacity cDNA 进行逆转录。然后在 PCR 检测仪上进行 qRT-PCR 反应,选择 GAPDH 作为内参。数据是针对每个 cDNA 标准化为参考基因 GAPDH 样品。本研究中使用的引物序列包括: NRON forward: 5'-AC GTTCCTTAATGTACGCCCTTGCG-3', reverse: 5'-TTGG CCGTGTCCCTGAGTCCTT-3'; Collagen I forward: 5'-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3', reverse: 5'-CCACGT CTCACCATTGGGG-3'; Collagen III forward: 5'-TTTG CAGTGATATGTGATGTT-3', reverse: 5'-GGATGGTGG TTTTCAGTTA-3'。

**1.3.3 免疫组织化学** 将组织分离物制成 4 μm 石蜡切片,然后进行脱蜡并通过分级乙醇水化。孵育切片并用 PBS 冲洗后进行抗原恢复。然后加入胶原蛋白 I 一抗(1:200),在 4 °C 下孵育过夜并用 PBS 冲洗,然后添加第二种抗体在 37 °C 下孵育 2 h 并用 PBS 冲洗。染色后用水洗涤。将它们在梯度乙醇系列和二甲苯中脱水,然后覆盖。最后用显微镜观察免疫组织化学结果。

**1.3.4 Western blot** 使用 RIPA 裂解缓冲液从成纤维细胞中提取总蛋白,并用 BCA 套件进行定量检

测。将等体积的蛋白质进行 SDS-PAGE,经过转膜、封闭、洗膜,孵育一抗(1:500),4 °C 摆床过夜。二抗(1:5 000) 孵育,洗膜,ECL 发光法显影。

**1.3.5 免疫荧光染色** 首先用 PBS 处理成纤维细胞,在室温下用 0.5% Triton X-100 处理 20 min,再冲洗 3 次,1% BSA 封闭过夜,波形蛋白抗体(1:100)和肌钙蛋白抗体(1:100)在 4 °C 孵育过夜,用 PBS 冲洗 3 次,每次 2 min。将制剂在 37 °C 下温育 30 min,然后将 PBS 漂洗 3 次。将 DAPI: 缓冲液按 1:1 000 配置 DAPI 工作液,在每张玻璃片上都滴加 DAPI 工作液,室温下避光孵育 5 min,对细胞爬片进行核染,然后使用激光扫描共聚焦显微镜观察并拍照。

**1.3.6 CCK-8 增殖实验** 常规消化与不同来源的成纤维细胞,接种于 96 孔板,每孔 3 000 个细胞,CCK-8 法检测转染 pcDNA-NRON 和 si-NRON 后的成纤维细胞增殖能力,使用未参与转染的成纤维细胞作为对照。将对数生长期细胞用胰蛋白酶消化,配制成细胞悬液接种于 96 孔板,每组的样本设 5 个重复,置于培养箱中培养,待检测前每孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,将培养板放入培养箱中孵育 1~4 h。使用酶标仪测定 450 nm 吸光度值,以溶剂处理的细胞为对照组,不含细胞的培养基为空白组,按公式计算细胞的增殖率。细胞增殖率(%)=(OD<sub>实验组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)/(OD<sub>对照组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)×100%。

**1.3.7 HE 染色和 Masson 染色** 收集入组样本组织并固定在 4% 中性多聚甲醛中,进行石蜡包埋。常规使用苏木精/伊红(HE) 染色以进行组织学检查。同时,使用 Masson 三色染色法,对心房组织内的纤维组织进行定位。使用 Image-Pro plus 分析系统对纤维化进行半定量评估。

**1.3.8 动物实验** 将小鼠随机分为 4 组,每组 6 只:正常对照组(control 组)、血管紧张素Ⅱ诱导的纤维化组(Ang-Ⅱ组)、Ang-Ⅱ+pcDNA 组和 Ang-Ⅱ+pcDNA-NRON 组。经腹膜注射 Ang-Ⅱ 1.5 μg/g/d,持续 4 周,同时对 Ang-Ⅱ+pcDNA 组和 Ang-Ⅱ+pcDNA-NRON 组小鼠经尾静脉注射 pcDNA 和 pcDNA-NRON。2 周后,将小鼠麻醉并取出心脏组织进行进一步分析。所有动物实验均得到安徽医科大学附属第一医院动物伦理委员会批准。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS 21.0 进行所有的数据分析,定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。*t* 检验用于分析两组之间的差异。多组数据之间的差异采用单因素方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 AF 患者心房组织中 LncRNA NRON 的表达和心房纤维化蛋白的表达** 为了研究 lncRNA NRON 在 AF 患者中的表达, 收集了 AF 组和 SR 组患者的心房组织。与 SR 患者比较, AF 的心房组织中 NRON 表达明显降低, 见图 1A。根据纽约心脏协会(NYHA)制定标准, 将 34 例 AF 患者分为不同的病理等级(I ~ II、III、IV)(图 1B)。AF 患者心房组织中 NRON 的 mRNA 水平显著降低。检测心房纤维化相关蛋白的表达, AF 心房中胶原 I 和胶原 III 表达水平明显上调(图 1C~E), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。免疫组织化学结果显示 AF 心房组织中胶原 I 在心肌间质、血管内皮细胞和血管基底膜中的表达和分布比 SR 心房组织中更广泛(图 1F)。

### 2.2 LncRNA NRON 过表达对心房纤维化的影响

从 SR 患者的心房组织中分离出了心房成纤维细胞, 并在体外进行传代培养, 通过免疫荧光染色得出的结果表明波形蛋白(vimentin)高表达和肌钙蛋白(troponin)低表达(图 2A)。用 pcDNA-NRON 或 siRNA NRON 转染心房成纤维细胞, 转染效率如图 2B 所示, 用 pcDNA-NRON 转染的成纤维细胞中

NRON 的表达高于用 pcDNA-vector 质粒转染的成纤维细胞, NRON 在 si-NRON 中的表达较低。使用 Ang-II 诱导纤维化后使用 CCK-8 进行增殖能力检测, 结果显示 NRON 过表达抑制了成纤维细胞增殖, 而 si-NRON 促进了增殖(图 2C)。过度表达的 NRON 明显抑制了 Ang-II 诱导的成纤维细胞中 I 型胶原和 III 型胶原的表达, 而 si-NRON 组与 pcDNA 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 2D)。NRON 明显诱导 NFATc3 磷酸化, 从而导致 Ang-II 诱导的成纤维细胞中 p-NFATc3 / NFATc3 的比例升高(图 2D、E)。如图 2F 所示, 蓝绿色重叠表示成纤维细胞核中的 NFATc3 表达, Ang-II 处理组的 NFATc3 表达比对照组多, NRON 过表达抑制了 NFATc3 从细胞质向细胞核的转运。

**2.3 过表达 LncRNA NRON 对 Ang-II 诱导的小鼠心脏纤维化影响** 在动物实验结束时测试了小鼠的心脏功能水平和相关的血液动力学指标, 结果表明 NRON 过表达组显著抑制了 Ang-II 诱导的左室舒张末期直径(left ventricular end diastolic dimension, LVDd)、左室收缩末期直径(left ventricular end-systolic dimension LVDs)、室间隔舒张末期厚度(inter-ventricular septal thickness at diastole IVSd)、室间

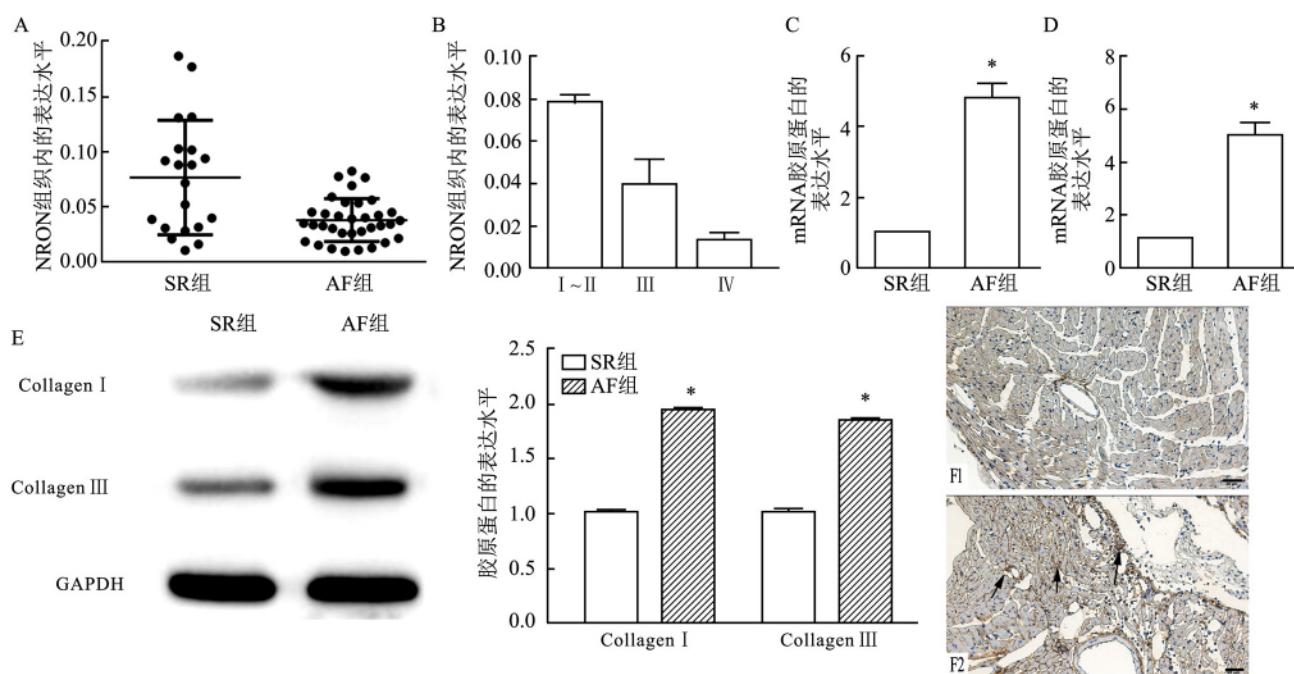


图 1 AF 中 NRON 表达和心房纤维化蛋白表达

A: AF 和 SR 组患者心房组织中 NRON 的表达水平; B: AF 患者心房组织中 NRON 的表达水平; C: 心房组织中的 collagen I 的相对 mRNA 水平; D: 心房组织中的 collagen III 的相对 mRNA 水平; E: 心房组织中 collagen I 和 collagen III 的相对蛋白表达水平; 与 SR 组比较: \*  $P < 0.05$ ; F: 心房组织中 collagen I 的免疫组织化学分析  $\times 200$ ; 1: AF 组; 2: SR 组

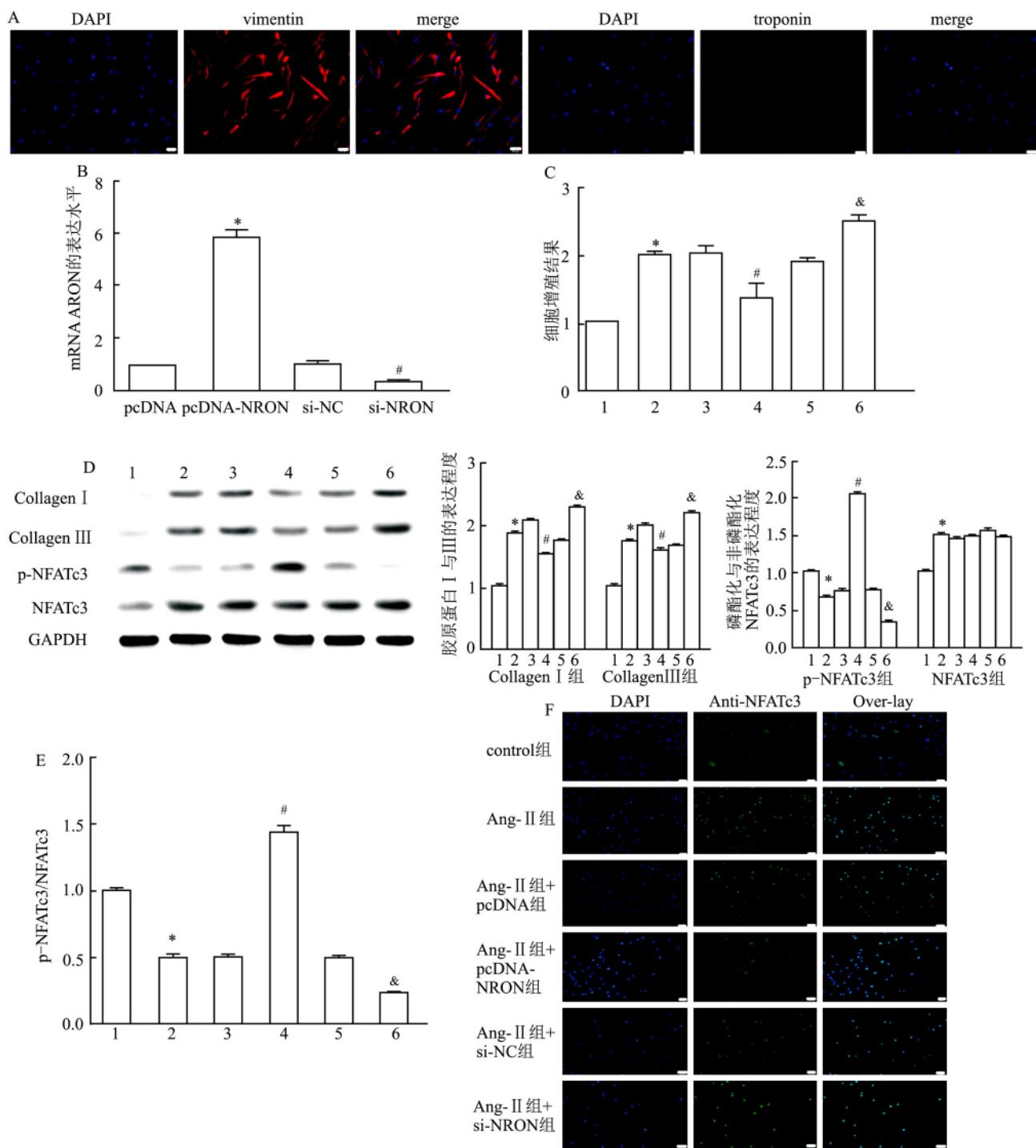


图2 过表达 NRON 对心房成纤维细胞纤维化影响

A: SR 患者分离的心房成纤维细胞的波形蛋白和肌钙蛋白免疫荧光染色鉴定  $\times 200$ ; B: 成纤维细胞中过表达的 NRON 和 si-NRON 的转染效率; C: CCK-8 检测过表达 NRON 和 si-NRON 成纤维细胞增殖的作用; D: 过表达 NRON 和 si-NRON 对 Ang-II 诱导的成纤维细胞中 collagen I、collagen III、NFATc3 和磷酸化 NFATc3 蛋白表达的影响; E: 过表达的 NRON 和 si-NRON 对 Ang-II 诱导的成纤维细胞中 NFATc3 活化的影响; F: 过表达的 NRON 和 si-NRON 对 Ang-II 诱导的成纤维细胞中核转运的影响; 1: control 组; 2: Ang-II 组; 3: Ang-II + pcDNA 组; 4: Ang-II + pcDNA-NRON 组; 5: Ang-II + si-NC 组; 6: Ang-II + si-NRON 组; 与 control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 Ang-II + pcDNA 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 Ang-II + si-NC 组比较: &  $P < 0.05$

隔收缩末期厚度 (interventricular septal thickness at end-systole IVSs) 的增加，并显著促进了 Ang-II 诱导的左室射血分数 (left ventricular ejection fraction,

LVEF) 和左室射血缩短分数 (left ventricular fraction shortening LVFS) 降低 (表 1)。HE 染色结果显示，与对照组比较，Ang-II 组心肌间质纤维紊乱的发生

表1 过表达 NRON 对小鼠心脏功能和血流动力学的影响( $n=8$   $\bar{x} \pm s$ )

变量	control 组	Ang-II 组	Ang-II + pcDNA 组	Ang-II + pcDNA + NRON 组
LVDd( mm)	3.70 $\pm$ 0.53	5.0 $\pm$ 0.99 <sup>*</sup>	5.14 $\pm$ 0.68	4.41 $\pm$ 0.55 <sup>#</sup>
LVDs( mm)	2.34 $\pm$ 0.51	4.65 $\pm$ 0.65 <sup>*</sup>	4.54 $\pm$ 0.24	3.32 $\pm$ 0.85 <sup>#</sup>
IVSd( mm)	0.64 $\pm$ 0.05	0.81 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	0.79 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>
IVSs( mm)	1.07 $\pm$ 0.01	1.22 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	1.24 $\pm$ 0.02	1.12 $\pm$ 0.01 <sup>#</sup>
LVEF(%)	81.81 $\pm$ 2.01	50.80 $\pm$ 3.59 <sup>*</sup>	52.10 $\pm$ 2.99	72.40 $\pm$ 2.14 <sup>#</sup>
LVFS(%)	40.14 $\pm$ 3.36	25.4 $\pm$ 4.10 <sup>*</sup>	25.5 $\pm$ 3.95	36.2 $\pm$ 4.16 <sup>#</sup>

与 control 组比较: <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ; 与 Ang-II + pcDNA 组比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

率更高,而核与核之间的距离更宽,但是 pcDNA-NRON 减轻了纤维化的发生率,使心肌间质纤维减少(图 3A)。通过 Masson 染色检测心肌纤维化的程度,结果如图 3B 所示,Ang-II 组心肌纤维明显增厚且胶原纤维沉积很多。然而,pcDNA-NRON 使心肌之间纤维减少变薄,从而改善纤维化。同时,胶原 I、胶原 III、NFATc3 和 p-NFATc3 的蛋白质水平结果显示 NRON 过表达组显着减少了 Ang-II 诱导的心房组织胶原 I 和胶原 III 和 NFATc3 的表达(图 3C、D)。此外, NRON 过表达株显著提高了 NFATc3 的磷酸化水平,导致 p-NFATc3/NFATc3 的比例增加(图 3E、F)。以上的动物实验数据显示,过表达的 NRON 抑制了小鼠的心脏纤维化。

### 3 讨论

LncRNA 已显示在许多心脏发育或心脏疾病中起关键作用<sup>[3]</sup>。LncRNA 是一组非蛋白质编码的 RNA 分子,长度大于 200 个核苷酸。LncRNA 在过去曾被认为并不具有调控基因转录及蛋白翻译的作用。但如今越来越多的证据支持 LncRNA 在健康和疾病中对基因表达调控的生物学意义<sup>[4]</sup>,它们已经参与了许多生物学过程,例如表观遗传调控、细胞周期控制、细胞分化、剪接、核/细胞质运输以及转录/翻译。最近,在心脏和血管系统中已经证明存在有几种与调节功能相关的 LncRNA,包括 Braveheart、Fendrr、CHRF、MALAT、LIPCAR 和 SENCR<sup>[5-7]</sup>。但是,还需要研究其他与 AF 相关的 LncRNA 以便更好地了解 AF 的发病机制。

NFAT 是一种受  $\text{Ca}^{2+}$  调节以控制基因表达的转录因子家族,首次被发现于 T 淋巴细胞。NFAT 的显著特征是其受  $\text{Ca}^{2+}$  和依赖  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白的丝氨酸磷酸钙调磷酸酶调节。CaN 是一种依赖  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白的磷酸酶,可将大量的磷酸蛋白去磷酸化<sup>[1]</sup>。尽管该酶在多种类型的组织和细胞中表达,但其与 NFAT 转录因子家族的核定位转导的调节密

切相关<sup>[2]</sup>。

有实验<sup>[8]</sup>表示 NRON 在心肌组织中表达水平较高,并已通过影响其核运输而被认为是 NFAT 的阻遏物。本研究,根据 qRT-PCR 分析得出结论,相对于 SR 组,AF 组患者心房组织样本 lncRNA NRON 的表达水平较低。已知 NFAT 是调节细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  稳态和基因表达的关键蛋白,在心脏疾病中其表达和活性发生了很大变化。Sharma et al<sup>[9]</sup>发现敲除 LncRNA NRON 的细胞里出现 NFAT 的去磷酸化和核易位的大量增加,这与本研究关于 AF 中 NRON 增强的 NFATc3 磷酸化的发现一致。NRON 对 NFAT 脱磷酸作用的抑制作用先前归因于其结合参与核转运的蛋白质的能力,特别是 KPNB1、importin-beta 和 CSE1L,后者将 importin-alpha 从细胞核循环到细胞质。

磷酸化的 NFAT1 存在于大的细胞质 RNA-蛋白质复合物中,该复合物包含支架蛋白,包含 GTPase 活化蛋白(IQGAP),钙调蛋白和 3 个 NFAT 激酶的 IQ 基序,酪蛋白激酶 1,糖原合酶激酶 3 和双重特异性酪氨酸磷酸化调节激酶。NRON 和 IQGAP1 的组合敲低增加了刺激后 NFAT 的去磷酸化和核输入。支架复合物不仅将 NFAT 定位在促进其在细胞质中处于失活状态的维持激酶附近,而且还可能阻碍钙调神经磷酸酶在静息细胞中接近 NFAT,并且还可以作为核转运因子和所需钙调蛋白的储库在刺激的细胞中激活钙调神经磷酸酶。此外, NRON 还通过以下途径抑制成纤维细胞增殖抑制 NFAT 活性,这一结果与肿瘤细胞的作用一致<sup>[10]</sup>。结合以上结论分析,作为 NFAT 的阻遏物, NRON 是 AF 中一种抑制纤维化的 LncRNA,并可以影响 AF 的进展过程。

本研究揭示了 NRON 与 AF 和心房心肌的纤维化进程有关。此外,验证了 NRON 抑制成纤维细胞的增殖以及 I 型和 III 型胶原的表达。临床证据和体外分析均表明 NRON 可通过促进 AF 中 NFATc3 磷酸化来减轻心房纤维化。这一发现为 AF 在分子层

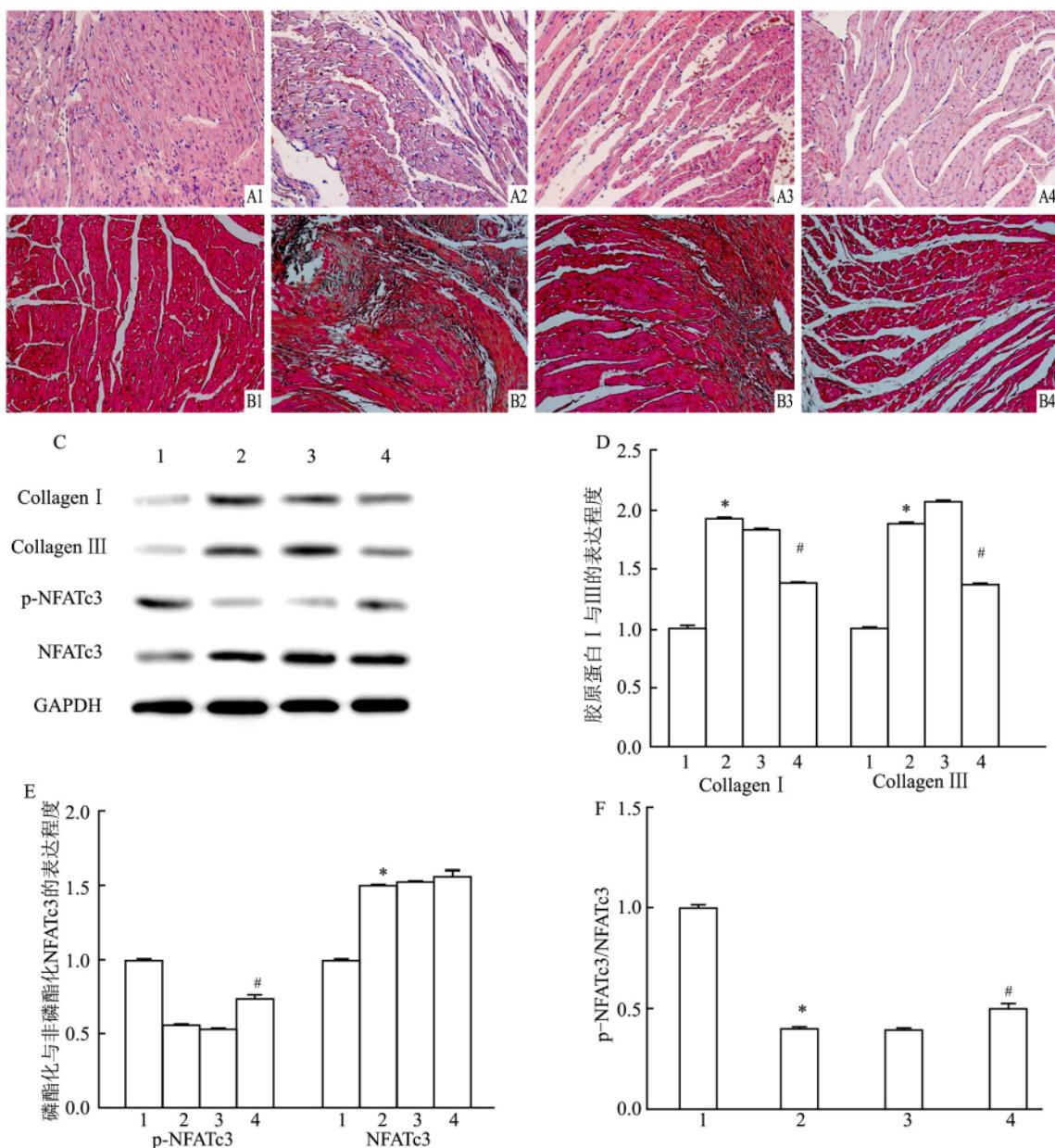


图 3 过表达 NRON 对 Ang-II 诱导的小鼠心脏纤维化影响

A: 通过 HE 染色观察小鼠心脏组织的形态变化  $\times 200$ ; B: 通过 Masson 染色检测小鼠心肌纤维化程度  $\times 200$ ; C: 小鼠心房组织中胶原 I、胶原 III、NFATc3 和 p-NFATc3 的免疫蛋白质印迹结果; D: 小鼠心房组织中 collagen I、collagen III 的表达程度; E: 小鼠心房组织中 NFATc3 和磷酸化 NFATc3 蛋白的表达; F: p-NFATc3 /NFATc3 的比例; 1: control 组; 2: Ang-II 组; 3: Ang-II + pcDNA 组; 4: Ang-II + pcDNA-NRON 组; 与 control 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 Ang-II + pcDNA 组比较: #  $P < 0.05$

面的发展机制提供了新的见解,有望为 AF 治疗提供新的干预靶点。

## 参考文献

- [1] Wang J, Wang Y, Zhang W, et al. Phenylephrine promotes cardiac fibroblast proliferation through calcineurin-NFAT pathway [J]. *Front Biosci ( Landmark Ed )* 2016; 21: 502–13.
- [2] Nieves-Cintrón M, Hirenallur-Shanthappa D, Nygren P J, et al. AKAP150 participates in calcineurin/NFAT activation during the

down-regulation of voltage-gated K(+) currents in ventricular myocytes following myocardial infarction [J]. *Cellular Signalling*, 2016, 28(7): 733–40.

- [3] Taft R J, Pang K C, Mercer T R, et al. Non-coding RNAs: regulators of disease [J]. *J Pathol* 2010; 220: 126–39.
- [4] 程涛, 张宁坤, 陈宇. 长链非编码 RNA 对心血管疾病发展的研究概述 [J]. 安徽医科大学学报 2017; 52(10): 1578–81.
- [5] Wang K C, Chang H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs [J]. *Mol Cell* 2011; 43(6): 904–14.

(下转第 1753 页)

664b-5p increased in esophageal cancer cells EC9706 and TE-1 ( $P < 0.05$ ) , while the transfection of miR-664b-5p inhibitor was the opposite ( $P < 0.05$ ) ; The results of cell proliferation assay showed that the ability of the cell proliferation and the number of colony formation decreased in the miR-664b-5p mimic group compared with the mimic NC group ( $P < 0.05$ ) , and the ability of the cell proliferation and the number of colony formation in the miR-664b-5p inhibitor group was higher than the inhibitor NC group ( $P < 0.05$ ) ; The results of transwell assay showed that the number of migration cells and invasive cells of esophageal cancer in the miR-664b-5p mimic group was lower than that of the mimic NC group ( $P < 0.05$ ) , while the number of migration cells and invasive cells in the miR-664b-5p inhibitor group was higher than that of the inhibitor NC group ( $P < 0.05$ ) ; The results of Western blot showed that the expression of Bax increased and Bcl-2 reduced in the miR-664b-5p mimic group( $P < 0.05$ ) , but the expression of Bax reduced and Bcl-2 increased in the miR-664b-5p inhibitor group ( $P < 0.05$ ) . **Conclusion**

miR-664b-5p can inhibit cell proliferation ,migration and invasion and promote the apoptosis of esophageal cancer cells EC9706 and TE-1 ,which provides the foundation to further study the molecular mechanism of miR-664b-5p in Kazakh patients with esophageal squamous cell carcinoma.

**Key words** miR-664b-5p; esophageal squamous cell carcinoma; proliferation; migration; invasion; apoptosis

(上接第1745页)

- [6] Tao H , Cao W , Yang J J , et al. Long noncoding RNA H19 controls DUSP5/ERK1/2 axis in cardiac fibroblast proliferation and fibrosis [J]. *Cardiovasc Pathol* 2016 , 25(5) : 381 – 9.
- [7] Frade A F , Laugier L , Ferreira L R , et al. Myocardial infarction-associated transcript , a long noncoding RNA , is overexpressed during dilated cardiomyopathy due to chronic chagas disease [J]. *Infect Dis* 2016 , 214(1) : 161 – 5.
- [8] Xuan L , Sun L , Zhang Y , et al. Circulating long non-coding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure [J]. *Cell Mol Med* 2017 , 21(9) : 1803 – 14.
- [9] Sharma S , Findlay G M , Bandukwala H S , et al. Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells ( NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 , 108(28) : 11381 – 6.
- [10] Yao Z , Xiong Z , Li R. Long non-coding RNA NRON is downregulated in HCC and suppresses tumour cell proliferation and metastasis [J]. *Biomed Pharmacother* 2018 , 104: 102 – 9.

## LncRNA NRON alleviates atrial fibrosis via promoting NFATc3 phosphorylation

Wang Ze ,Guo Zhixiang ,Ge Shenglin

( Dept of Cardiovascular Surgery ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the specific mechanism of LncRNA NRON affecting NFAT activity and progression of atrial fibrosis. **Methods** The expression level of NRON in atrial tissue was detected by qRT-PCR. Western blot was used to determine the protein levels of collagen I ,collagen III ,NFATc3 and pNFATc3. Immunohistochemistry was performed to observe the expression and distribution of collagen I in atrial tissue. Atrial fibroblasts were identified by vimentin/troponin immunofluorescence staining. Then the proliferation of fibroblasts was detected by CCK-8 analysis. HE staining was used to observe the morphological changes of cardiac tissue ,and finally the myocardial fibrosis was detected by Masson staining. **Results** NRON inhibited fibroblast proliferation ,and the expression of collagen I and collagen III ,activated NFATc3 and nuclide entry. Overexpression of NRON inhibited the cardiac fibrosis induced by NFAT in mice. **Conclusion** The data from this study suggest that NRON alleviates atrial fibrosis by promoting NFATc3 phosphorylation.

**Key words** long non-coding RNA; NRON; atrial fibrillation; cardiac fibrosis; NFAT; phosphorylation