

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.10.003

LncRNA Kcnq1ot1/miR-214-3p/caspase-1 通路调控高糖处理的成纤维细胞焦亡*

杨帆¹ 吕杰² 王月秋² 李洋² 王丽宏^{2Δ}

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院内分泌科 江苏 南京 210008;

2 哈尔滨医科大学附属第二医院内分泌科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨长链非编码 RNA Kcnq1ot1 在高糖处理的成纤维细胞中调控焦亡的作用及具体机制。方法:培养 C57BL/6 小鼠原代心脏成纤维细胞,分别用 5.5 mM 和 30 mM 葡萄糖培养,用免疫荧光、qRT-PCR 和 western blot 方法检测 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 的表达。高糖处理的成纤维细胞抑制 Kcnq1ot1,检测 caspase-1 的表达。生物信息学和荧光素酶报告基因检测验证与 Kcnq1ot1 和 caspase-1 存在共同互补结合位点的 microRNA。应用 qRT-PCR 和 western blot 方法检测高糖诱导的心脏成纤维细胞干扰 Kcnq1ot1 后 miR-214-3p 的表达,以及过表达或干扰 miR-214-3p 后 caspase-1 的表达水平。高糖诱导的细胞单独干扰 Kcnq1ot1 或同时抑制 Kcnq1ot1 和 miR-214-3p,检测 caspase-1、NLRP3 和 IL-1 β 的表达水平。结果:高糖诱导的成纤维细胞中焦亡激活,Kcnq1ot1 表达明显升高;抑制 Kcnq1ot1 后 caspase-1 表达显著下调。生物信息学和荧光素酶报告基因检测发现 miR-214-3p 与 Kcnq1ot1 和 caspase-1 存在共同互补结合位点。高糖诱导的心脏成纤维细胞干扰 Kcnq1ot1 后 miR-214-3p 表达升高;过表达 miR-214-3p 后 caspase-1 表达降低,抑制 miR-214-3p 后 caspase-1 表达升高。同时抑制 Kcnq1ot1 和 miR-214-3p 可逆转干扰 Kcnq1ot1 对 caspase-1 的降低作用。结论:干扰 Kcnq1ot1 能够通过抑制 miR-214-3p/caspase-1 信号转导通路,抑制高糖诱导的心脏成纤维细胞焦亡。

关键词:长链非编码 RNA;Kcnq1ot1;高糖;焦亡;成纤维细胞

中图分类号:R-33;R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)10-1811-07

LncRNA Kcnq1ot1/miR-214-3p/caspase-1 Pathway Regulates Pyroptosis of High Glucose-Treated Cardiac Fibroblasts*

YANG Fan¹, LV Jie², WANG Yue-qiu², LI Yang², WANG Li-hong^{2Δ}

(1 Department of Endocrinology, Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu, 210008, China;

2 Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role and mechanism of long non-coding RNA Kcnq1ot1 in regulating pyroptosis in high glucose-treated cardiac fibroblasts. **Methods:** Primary cardiac fibroblasts of C57BL/6 mice were divided into the control group (5.5 mM glucose) and the high glucose group (HG group, 30 mM glucose). The expression levels of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β were detected by immunofluorescence, qRT-PCR and western blot. Si-Kcnq1ot1 was transfected into high glucose-treated cardiac fibroblasts and the expression levels of caspase-1 were detected. Bioinformatics and luciferase assay were used to forecast the microRNAs that have the common complementary binding sites with both Kcnq1ot1 and caspase-1. The expression of miR-214-3p after silencing Kcnq1ot1 and the expression of caspase-1 after transfection of miR-214-3p mimimics or AMO-214-3p in high glucose-treated cardiac fibroblasts were detected by qRT-PCR and western blot. The HG-treated fibroblasts were respectively transfected with si-NC+AMO-NC, si-Kcnq1ot1+AMO-NC and si-Kcnq1ot1+AMO-214-3p. The expression levels of caspase-1, NLRP3, IL-1 β were detected. **Results:** Pyroptosis was activated and the expression of Kcnq1ot1 was elevated in high glucose-treated primary cardiac fibroblasts. Caspase-1 was downregulated after silencing Kcnq1ot1. Bioinformatics and luciferase assay reveal that miR-214-3p has common complementary binding sites with both Kcnq1ot1 and caspase-1. MiR-214-3p was increased after inhibiting Kcnq1ot1 in HG-treated cardiac fibroblasts, while caspase-1 was decreased after overexpression of miR-214-3p and was increased after inhibiting miR-214-3p. Reverse experiments showed that Kcnq1ot1 regulated caspase-1 through miR-214-3p. **Conclusions:** Silencing Kcnq1ot1 can alleviate high glucose-induced cardiac fibroblast pyroptosis by inhibiting miR-214-3p/caspase-1 signal pathway.

Key words: Long non-coding RNA; Kcnq1ot1; High glucose; Pyroptosis; Cardiac fibroblasts

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)10-1811-07

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81770809)

作者简介:杨帆(1989-),女,博士研究生,主要研究方向:糖尿病心血管并发症,E-mail: yagnfan_0210@126.com

Δ 通讯作者:王丽宏(1973-),女,博士生导师,教授,主要研究方向:糖尿病心血管并发症,E-mail: nd6688@163.com,电话:18646366188

(收稿日期:2021-01-06 接受日期:2021-01-28)

前言

糖尿病心血管并发症是导致糖尿病患者死亡的主要原因^[1,2]。糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是长期慢性糖尿病的重要并发症之一,严重威胁着人类的健康,其主要病理特点是心肌纤维化和心肌肥厚^[3,4],心脏成纤维细胞在心肌纤维化过程中发挥关键作用,但是具体机制尚不清楚。

焦亡是一种与炎症相关的细胞程序性死亡^[5,6]。高糖情况下,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)可促进含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1(cysteiny aspartate specific proteinase-1, caspase-1)的前体(pro-caspase-1)裂解产生活化的 caspase-1,进而将 IL-1 β 和 IL-18 的前体转化为成熟体。另一方面, caspase-1 活化后可剪切消皮素 D(gasdermin D, GSDMD),产生的氨基末端使细胞膜成孔并释放炎症因子^[7]。以往研究表明, DCM 与心肌细胞的焦亡密切相关^[8],但焦亡在高糖诱导的心脏成纤维细胞中的作用少有报道。

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可参与多种病理生理过程^[9]。我们前期的研究发现, lncRNA Kcnq1ot1 在糖尿病小鼠左心室组织中表达升高,抑制 Kcnq1ot1 表达可抑制心脏焦亡发生,改善心肌纤维化和心脏功能。然而其在高糖诱导的心脏成纤维细胞中的调控机制尚不明确。本研究的主要目的是阐明 lncRNA Kcnq1ot1 对高糖诱导的心脏成纤维细胞焦亡的调控机制,为 DCM 提供了新的思路 and 潜在的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

出生 1-3 天的 C57BL/6 乳鼠购于哈尔滨医科大学实验动物中心(许可证号 SCXK(黑)2019-001),用于提取并培养原代心脏成纤维细胞。实验通过哈尔滨医科大学伦理委员会批准; RIPA 裂解液(美国 Thermo);蛋白酶和磷酸酶抑制剂(瑞士 Roche);蛋白 Marker(美国 Thermo);PVDF 膜(美国 Millipore);ECL 显色液(中国 Tanon);TRIzol(美国 Invitrogen);ReverTra Ace qPCR RT kit(日本 Toyobo);SYBR qPCR Mix(日本 Toyobo);山羊抗兔、抗鼠 IgG 二抗(美国 Invitrogen);NLRP3、caspase-1、IL-1 β 、GSDMD-N 抗体(美国 CST);GAPDH 抗体(中国 ZSGB-BIO)。台式低速冷冻离心机(中国奥盛仪器);转移电泳槽和电泳仪(美国 Bio-Rad);7500 Fast 实时定量 PCR 仪(美国 ABI);Odyssey 成像系统(美国 LICOR)。

1.2 方法

1.2.1 原代心脏成纤维细胞培养 取出生后 1-3 天的 C57BL/6 乳鼠,取出乳鼠心脏,胰酶消化,震荡后吸上清于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中终止消化,再次加入胰酶消化液直至组织完全消化,过滤离心,用培养液将细胞沉淀混匀,分装细胞悬液,37℃ 孵育 90 min 差速,贴壁细胞为成纤维细胞,48 h 后换液,继续培养原代心脏成纤维细胞。

1.2.2 细胞高糖模型的建立 细胞饥饿处理,弃去细胞原培养液,高糖组(High glucose, HG 组)用终浓度为 30 mM 葡萄糖的 DMEM 培养液培养,6 孔板每孔加入 1 mL 培养液,对照组(Control 组)加入等体积的低糖 DMEM 培养,37℃、5% CO₂

的孵箱中孵育 24 h 后进行后续实验。

1.2.3 细胞转染 按照 X-treme GENE siRNA 转染试剂操作步骤进行操作。Kcnq1ot1 的小干扰 RNA(si-Kcnq1ot1)、miR-NA-214-3p 拟似物(miR-214-3p mimic)、miRNA-214-3p 的拮抗剂寡聚核苷酸(AMO-214-3p)和对应的阴性对照(si-NC、NC 和 AMO-NC)均由广州锐博生物有限公司合成。序列如下:

si-Kcnq1ot1: GGTAAGAATAGTTCTGTCTT;

miR-214-3p mimics: forward, 5'-ACAGCAGGCACA-GACAGGCAGU-3',

reverse, 3'-UGUCGUCCGUGUCUGUCCGUCA-5';

miR-214-3p inhibitor, 5'-mAmCmUmGmCmCmUmGmUmC-mUmGmUmGm CmCmUmGmCmUmGmU-3'。

1.2.4 RNA 提取和实时定量 PCR TRIzol 提取细胞总 RNA 并测浓度,将 RNA 逆转录为 cDNA,反应程序为 37℃ 15 min, 98℃ 5 min, 4℃ Holding。应用 Toyobo SYBR qPCR Mix 试剂盒进行 qRT-PCR。miRNA 以 U6 作为内参,其余基因以 GAPDH 为内参。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time quantitative PCR

Gene	Primer sequence
Kcnq1ot1	Forward 5'-GCACTCTGGGTCTGTCTC-3'
	Reverse 5'-CACTTCCCTGCCTCCTACAC-3'
NLRP3	Forward 5'-GTGGAGATCCTAGGTTTCTCTG-3'
	Reverse 5'-CAGGATCTCATTCTCTTGGATC-3'
caspase-1	Forward 5'-ACACGTCTTGCCCTCATTATCT-3'
	Reverse 5'-ATAACCTTGGGCTTGTCTTTCA-3'
IL-1 β	Forward 5'-CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGG-3'
	Reverse 5'-TGTGCTCTGCTTGAGAGGTGCT-3'
GAPDH	Forward 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'
	Reverse 5'-TTTCTAGACGGCAGGTCAGG-3

1.2.5 蛋白质印迹分析 用 RIPA 裂解液提取心脏成纤维细胞蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,并上样、电泳、转膜,分别加入 NLRP3(1:800)、caspase-1(1:500)、IL-1 β (1:800)、GSDMD-N(1:500)、GAPDH(1:2000)一抗,4℃ 过夜, TBST 洗膜加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:2500)二抗,37℃ 孵育 1 h, E-CL 显色。

1.2.6 细胞免疫荧光染色 六孔板内放置载玻片,培养原代心脏成纤维细胞。加入 4%多聚甲醛,37℃ 固定 20 min。Triton-X 穿透液穿透 1 h,加入山羊血清,37℃ 封闭 2 h。一抗 1:200 比例稀释,湿盒 4℃ 过夜。加入荧光标记二抗,常温孵育 1 h,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI),常温孵育 30 min,倒置荧光显微镜采集图片。

1.2.7 荧光素酶报告基因检测 应用 Lipofectamine™ 2000 将靶基因 3'UTR 双报告基因载体或突变载体和 miR-214-3p mimics 或 NC 转染至 293T 细胞,48 h 后加入 luciferase 底物,测定荧光值。若野生型转染 miR-214-3p mimics 后荧光下调 30%以上,突变型转染后荧光强度回升,说明 miR-214-3p 可以通过该

位点发挥调控作用。应用同样的方法验证 caspase-1 与 miR-214-3p 的靶向调控关系。

1.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 6.0 统计数据,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm$ SD)表示,两组间比较应用 t-检验(t-test),多组间比较应用单因素方差分析(ANOVA)。 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖诱导的心脏成纤维细胞中 Kcnq1ot1 表达增多,焦亡激活

培养出生 1-3 天的新生 C57BL/6 乳鼠的原代心脏成纤维细胞,分别用 5.5 和 30 mM 的葡萄糖培养细胞 24 h,分为 control 组和 HG 组。qRT-PCR 检测表明,与对照组相比,高糖处理的成纤维细胞中 Kcnq1ot1 表达增多(图 1A)。采用 qRT-PCR、免疫荧光和 western blot 方法检测焦亡的关键因子 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 表达水平,发现上述指标在高糖情况下表达增多,说明高糖处理后心脏成纤维细胞焦亡增加(图 1B-F)。

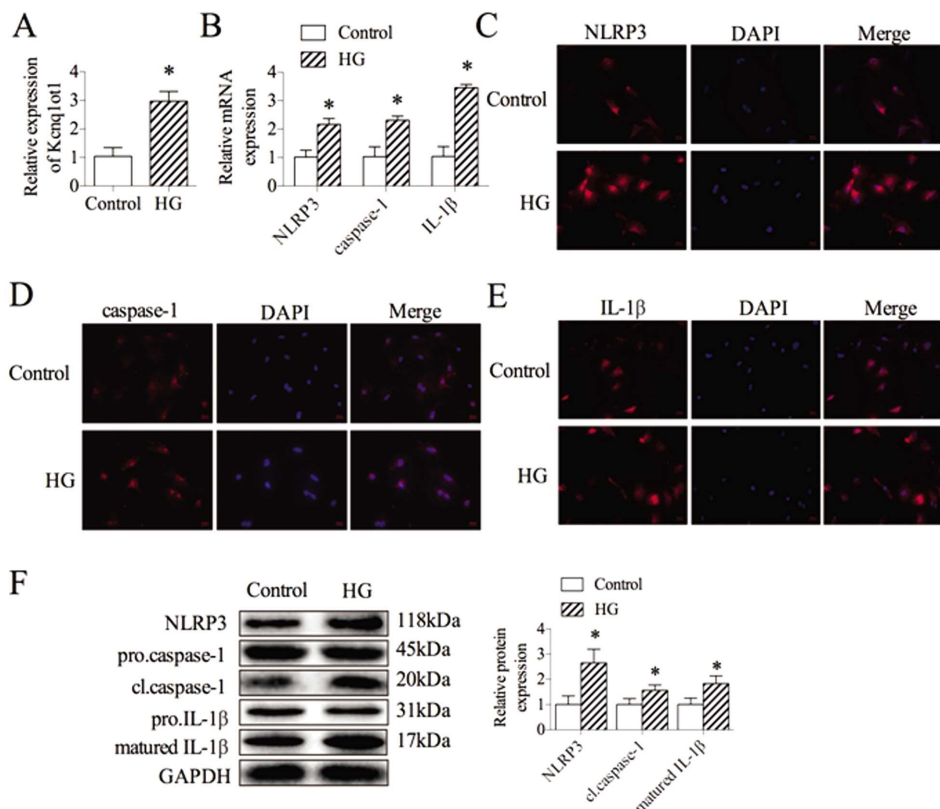


图1 高糖诱导的心肌成纤维细胞 Kcnq1ot1 表达增多和焦亡激活。(A) qRT-PCR 方法检测原代成纤维细胞中 Kcnq1ot1 的表达水平;(B) qRT-PCR 检测细胞 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β mRNA 表达水平;(C-E) 免疫荧光方法检测细胞 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 的表达水平;(F) Western blot 方法检测细胞 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达水平。与 control 组相比 $*P<0.05$, $n=3$ 。

Fig.1 Kcnq1ot1 and pyroptosis are activated in high glucose-treated cardiac fibroblasts. (A) Cardiac fibroblasts of neonatal C57BL/6 mice were incubated with 5.5 mM glucose (Control) or 30 mM (high glucose, HG) for 24 h. The expression levels of Kcnq1ot1 were detected by qRT-PCR. The expression levels of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β were determined by qRT-PCR (B) immunofluorescence (C-E) and western blot (F).

Note: Data were expressed as $\bar{x}\pm$ SD, $n=3$. $*P<0.05$, compared with group control.

2.2 体外干扰 Kcnq1ot1 后 caspase-1 表达下调

在高糖处理的成纤维细胞中分别转染 si-NC 和 si-Kcnq1ot1, qRT-PCR 方法检测 Kcnq1ot1 的表达水平,结果表明转染 si-Kcnq1ot1 后 Kcnq1ot1 显著下调,转染成功(图 2A)。qRT-PCR 和 western blot 方法检测两组细胞 caspase-1 的表达水平,结果表明,与 HG+si-NC 组相比, HG+si-Kcnq1ot1 组 caspase-1 的 mRNA 和蛋白水平明显下调(图 2B-C)。

2.3 miR-214-3p 与 Kcnq1ot1 和 caspase-1 存在靶向调控关系

为了进一步研究 Kcnq1ot1 调控 caspase-1 的分子生物学机制,应用生物信息学方法预测与 Kcnq1ot1 和 caspase-1 存在互补结合位点的 miRNA。结果表明, miR-214-3p 与 Kcnq1ot1 和 caspase-1 同时存在互补结合位点。miR-214-3p 与 Kcnq1ot1 的 3'UTR 区域 31761-31769 碱基处有互补结合序列(图 3A)。

为明确两者之间的靶向调控关系,采用荧光素酶报告基因检测的方法,在 Kcnq1ot1 野生型(WT)和突变型(MUT)载体转染 miR-214-3p,发现野生型载体转染 miR-214-3p 后荧光强度明显下调,然而突变型载体转染 miR-214-3p 后荧光信号强度回升,与转染 miR-NC 组无统计学差异(图 3B)。这说明 miR-214-3p 可以靶向调控 Kcnq1ot1 的表达。同时,生物信息学预测发现 miR-214-3p 与 caspase-1 的 3'UTR 区域 74-80 碱基处有互补结合序列(图 3C)。荧光素酶报告基因检测证明 miR-214-3p 可以靶向调控 caspase-1 的表达(图 3D)。

2.4 miR-214-3p 受 Kcnq1ot1 调控且参与调节 caspase-1

qRT-PCR 检测发现,与 control 组相比,高糖处理的心脏成纤维细胞中 miR-214-3p 表达明显下调(图 4A)。为了研究 Kcnq1ot1 对 miR-214-3p 的调控作用, qRT-PCR 检测成纤维细胞

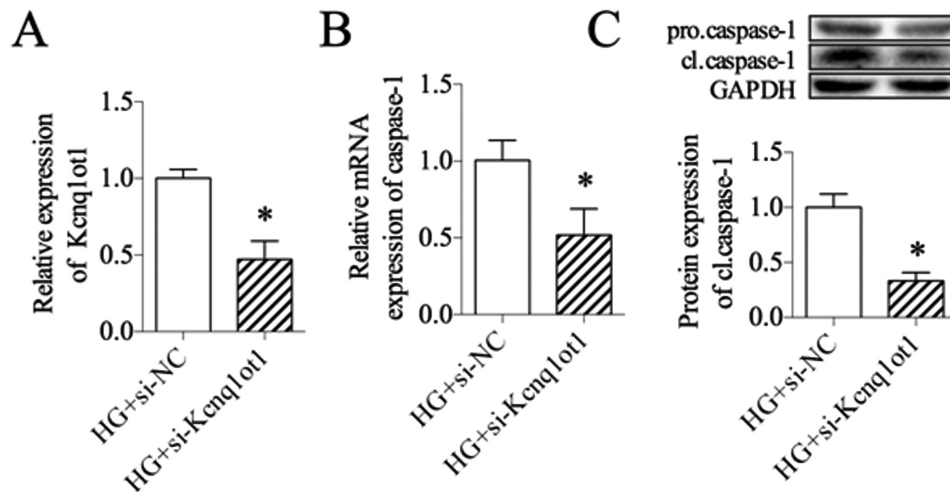


图2 体外干扰 Kcnq1ot1 后 caspase-1 表达下降。(A) 高糖处理的心肌成纤维细胞中转染 si-NC 和 si-Kcnq1ot1, qRT-PCR 方法检测两组 Kcnq1ot1 的表达水平;(B) qRT-PCR 和 (C) Western blot 方法检测细胞 caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达水平。与 HG+si-NC 组相比 * $P<0.05$, $n=3$ 。

Fig.2 Silencing Kcnq1ot1 inhibited the expression of caspase-1. (A) High glucose-treated cardiac fibroblasts were transfected with siRNA against Kcnq1ot1 and the negative control. The Kcnq1ot1 expression was detected by qRT-PCR. qRT-PCR (B) and western blot (C) were performed to determine the mRNA and protein expression levels of caspase-1.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with group HG+si-NC.

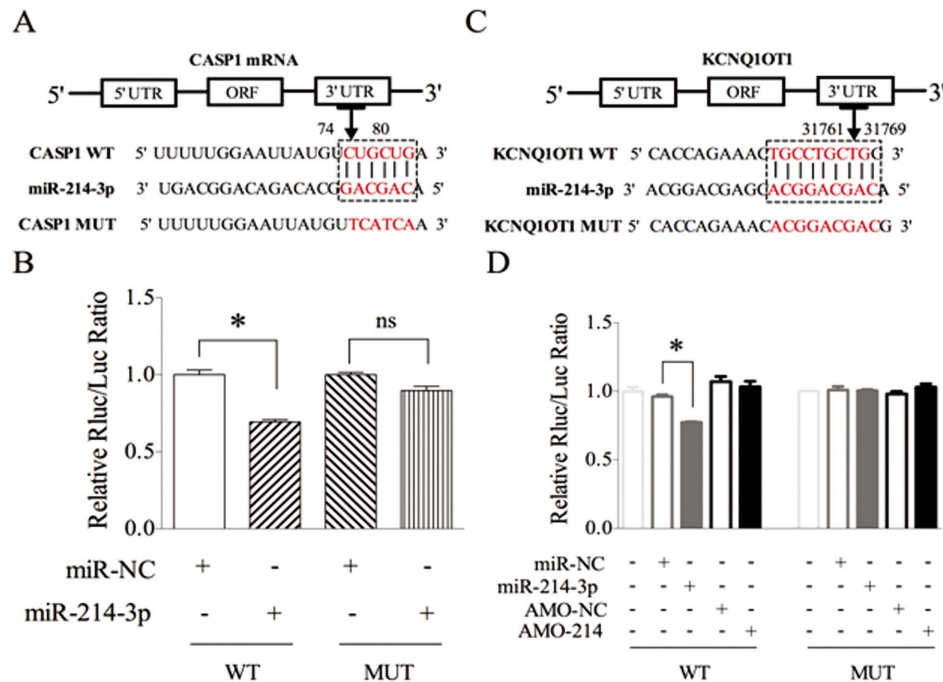


图3 miR-214-3p 与 Kcnq1ot1 和 caspase-1 存在互补结合位点。(A) 生物信息学预测 miR-214-3p 和 Kcnq1ot1 之间的互补结合位点;(B) 荧光素酶报告基因方法检测 Kcnq1ot1 野生型和突变型载体转染 miR-214-3p 后荧光信号强度的变化;(C) 生物信息学预测 miR-214-3p 和 caspase-1 之间的互补结合位点;(D) 荧光素酶报告基因方法检测 CASP1 野生型和突变型载体转染 miR-214-3p 后荧光信号强度的变化。与 miR-NC 组相比 * $P<0.05$, $n=3$ 。

Fig.3 miR-214-3p has binding sites of KCNQ1OT1 and caspase-1. (A) Bioinformatic prediction revealed that miR-214-3p contained potential binding sites for Kcnq1ot1. (B) The results of luciferase assay. (C) Bioinformatic prediction revealed that miR-214-3p contained potential binding sites for caspase-1. (D) The results of luciferase assay.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with group miR-NC.

转染 Kcnq1ot1 的干扰 RNA 后 miR-214-3p 的表达变化。结果发现,高糖情况下转染 si-Kcnq1ot1 后,miR-214-3p 表达明显升高(图 4B)。接下来在高糖诱导的原代心脏成纤维细胞中分别过表达和干扰 miR-214-3p(图 4C),qRT-PCR 和 western blot 方法检测下游靶基因 caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果表明,过表达 miR-214-3p 抑制 caspase-1 的表达,干扰

miR-214-3p 上调 caspase-1 的表达(图 4D-E)。

2.5 Kcnq1ot1 通过靶向调控 miR-214-3p 影响 caspase-1 的表达

5.5 mM 处理的小鼠原代心脏成纤维细胞中转染 si-NC 和 AMO-NC;30 mM 高糖诱导的细胞中分别转染 si-NC+AMO-NC、si-Kcnq1ot1+AMO-NC 和 si-Kcnq1ot1+AMO-214-3p, qRT-PCR、western blot 和免疫荧光方法检测 caspase-1 的表达

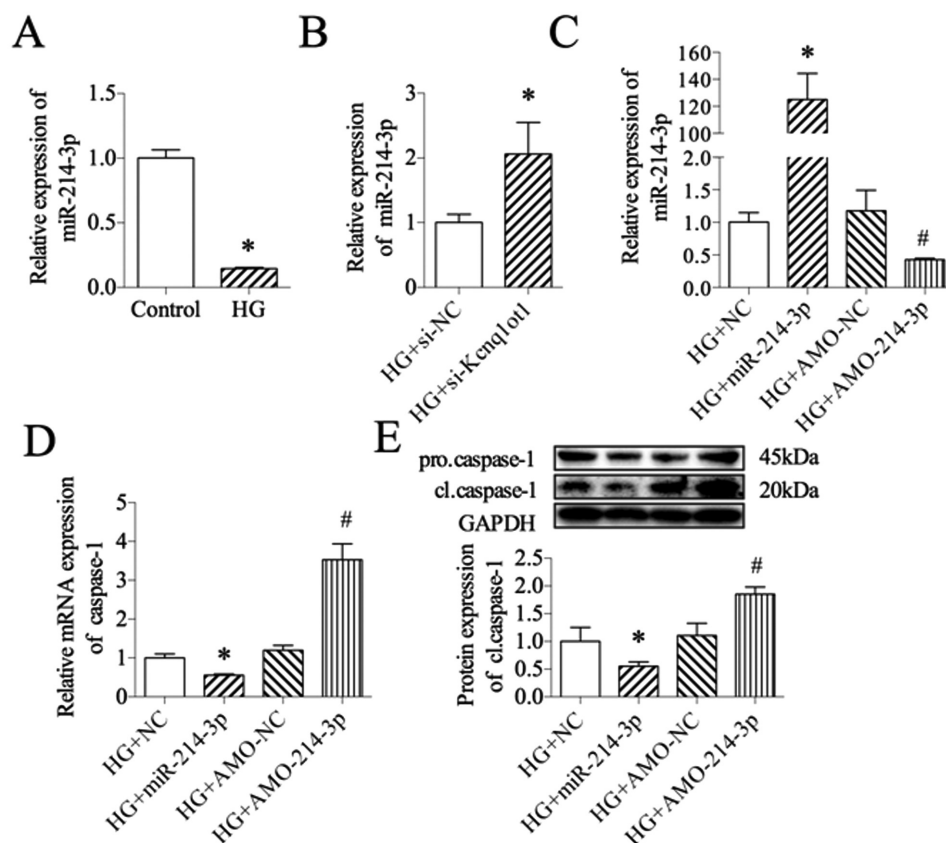


图4 miR-214-3p 参与 Kcnq1ot1 和 caspase-1 的调节。(A) qRT-PCR 方法检测 miR-214-3p 的表达水平;(B) qRT-PCR 方法检测高糖诱导的成纤维细胞转染 si-NC 和 si-Kcnq1ot1 后 miR-214-3p 的表达水平;(C) qRT-PCR 方法检测成纤维细胞过表达、干扰 miR-214-3p 后 miR-214-3p 的表达水平;(D) qRT-PCR 和 (E) Western blot 方法检测 caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达水平。与 HG+NC 组相比 * $P<0.05$,与 HG+AMO-NC 组相比 # $P<0.05$, $n=3$ 。

Fig.4 miR-214-3p is regulated by Kcnq1ot1 and participates in the regulation of caspase-1. (A) The relative expression of miR-214-3p was analyzed in cardiac fibroblasts. * $P<0.05$ compared with the control group. (B) miR-214-3p expression after transfection with si-Kcnq1ot1. (C) Fibroblasts were transfected with miR-214-3p mimics or miR-214-3p inhibitor, and the expressions of miR-214-3p were determined. (D) The mRNA expression levels of caspase-1. (E) The protein expression levels of caspase-1.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. * $P<0.05$, compared with group HG+NC; # $P<0.05$, compared with group HG+AMO-NC.

水平。结果表明,与 si-NC+AMO-NC 组相比,HG+si-NC+AMO-NC 组的 caspase-1 的表达明显升高,HG+si-Kcnq1ot1+AMO-NC 组 caspase-1 表达被抑制,HG+si-Kcnq1ot1+AMO-214-3p 组同时干扰 Kcnq1ot1 和 miR-214-3p 后,干扰 Kcnq1ot1 引起的抑制 caspase-1 的作用被取消,caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显回升(图 5A-C)。

3 讨论

流行病学调查显示,糖尿病患者发生心力衰竭的风险明显高于正常人,其中男性糖尿病患者心衰风险增加 2 倍,女性增加 5 倍,超过 50%-80% 糖尿病患者最终死于包括 DCM 在内的糖尿病心血管并发症^[1,2]。然而,DCM 的病理生理机制尚未完全阐明,目前临床上缺乏早期、准确的诊断方式,以及经济、有效的治疗方法。我们先前的研究发现,Kcnq1ot1 在 DM 小鼠左心室组织中表达显著增多,DM 小鼠体内干扰 Kcnq1ot1 后能够改善心脏功能并减轻心肌纤维化。本研究进一步探讨了 Kcnq1ot1 发挥心脏保护作用的具体机制。我们发现,在原代心脏成纤维细胞中沉默 Kcnq1ot1 可以通过靶向结合 miR-214-3p 抑制凋亡关键因子 caspase-1 的表达,从而抑制其下游炎症因子,减轻高糖诱导的炎症和纤维化,本研究首次从细胞水平上

阐明了 lncRNA Kcnq1ot1 对凋亡的作用及具体机制,为 DCM 的治疗提供了新思路和新靶点。

人类基因组中大部分基因可以发生转录,但是仅有小部分转录序列可以翻译成蛋白质,大部分以非编码 RNA(non-coding RNA,ncRNA)的形式存在,包括微小 RNA(microRNA,miRNA)、lncRNA、环状 RNA(circular RNA,circRNA)等。lncRNA 是一组转录本长度大于 200 个核苷酸的 RNA,缺乏开放性阅读框,不能编码蛋白质,但可以在表观遗传学、转录及转录后水平调控基因的表达,在基因组印记、核胞质运输、RNA 剪接、基因表达和转录调控等生物学过程中起着关键作用^[10]。值得注意的是,以往国内外研究发现 lncRNA Kcnq1ot1 在多种心脏疾病中发挥重要作用。Kcnq1ot1 通过与 miR-384 结合促进心房颤动的生物标志物 CACNA1C 的上调,调控心脏的有效不应期和传导时间,从而影响心房颤动的发生率和持续时间^[11]。Li 等^[12]发现抑制 Kcnq1ot1 对急性心肌梗死后心肌缺血/再灌注损伤有保护作用。此外,Kcnq1ot1 差异甲基化在长 QT 综合征中也发挥重要的调控作用^[13]。然而,Kcnq1ot1 对心肌肥厚和心肌纤维化是否具有调控作用目前尚不清楚。鉴于 Kcnq1ot1 在心脏疾病中的重要意义,我们进一步探讨其是否参与调控 DCM。本研究首次发现,lncRNA Kcnq1ot1 在高糖处理的肾脏

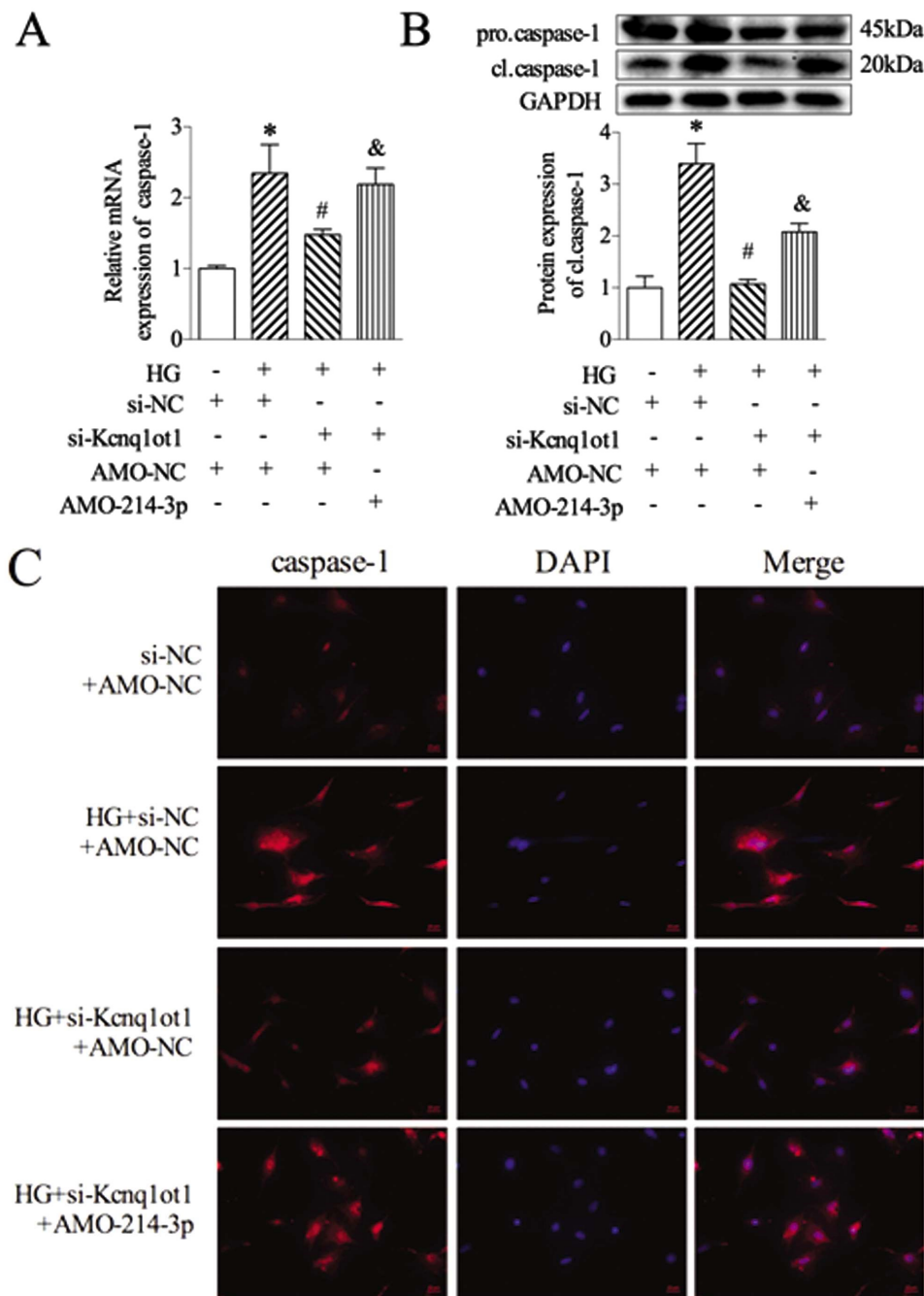


图5 Kcnq1ot1通过靶向调控miR-214-3p影响caspase-1的表达。(A) qRT-PCR方法检测心肌成纤维细胞中caspase-1的mRNA表达水平;(B) Western blot方法检测心肌成纤维细胞中caspase-1的蛋白表达水平;(C) 免疫荧光检测心肌成纤维细胞中caspase-1的表达水平。与si-NC+AMO-NC组相比 $*P<0.05$,与HG+si-NC+AMO-NC组相比 $\#P<0.05$,与HG+si-Kcnq1ot1+AMO-NC组相比 $\&P<0.05$, $n=3$ 。

Fig.5 Kcnq1ot1 silencing alleviates caspase-1 via miR-214-3p. (A) The mRNA expression of caspase-1 in each group. (B) Western blot was conducted to detect the protein expression of cleaved caspase-1. (C) The caspase-1 expression was determined by immunofluorescence.

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. $*P<0.05$, compared with group si-NC+AMO-NC; $\#P<0.05$, compared with group HG+si-NC+AMO-NC; $\&P<0.05$, compared with group HG+si-Kcnq1ot1+AMO-NC.

成纤维细胞中显著升高,并参与焦亡和纤维化的发生。

LncRNA可以通过多种机制发挥调控作用,其中竞争性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)假说是重要的机制之一,指的是lncRNA通过互补结合位点靶向调控miRNA,从而调控miRNA下游信使RNA的表达水平^[14,15]。这个RNA交互作用假说为在转录后水平了解多种疾病的发病机制提供了新途径。在本研究中,生物信息学预测发现,miR-214-3p与Kcnq1ot1和caspase-1同时存在互补结合位点。我们通过功能

获得和功能缺失以及荧光素酶报告基因检测的方法验证了miR-214-3p与Kcnq1ot1和caspase-1的靶向调控关系。在高糖处理的成纤维细胞同时干扰Kcnq1ot1和miR-214-3p进行逆转实验证明,Kcnq1ot1通过靶向调控miR-214-3p调控caspase-1的表达。本研究从细胞水平阐明了Kcnq1ot1调控焦亡的具体分子机制。

焦亡是与炎症相关的细胞程序性死亡,其特征是孔隙形成、质膜破裂和细胞肿胀^[16,17]。以往研究表明,焦亡在DCM中

激活,抑制焦亡后糖尿病动物模型心脏形态和功能明显改善。Luo 等^[18]在 2 型糖尿病大鼠模型的心脏组织和高糖诱导的 H9C2 心肌细胞系中发现焦亡明显激活,表现为 caspase-1 激活、细胞质肿胀和细胞核 DNA 损伤,NLRP3-siRNA 慢病毒处理后 caspase-1 活化减少,心肌细胞焦亡减轻。Jeyabal 等^[19]发现 miR-9 可以通过靶向 ELAVL1 抑制高糖诱导的心肌细胞焦亡。Li 等^[20]研究表明 miR-30d 通过互补结合 Foxo3a 影响糖尿病心肌细胞焦亡。这些研究均证明,在 DCM 的发病机制中,焦亡是关键性的调控机制。IL-1 β 和 IL-18 是 DCM 中 ROS 介导的 NLRP3 炎性体激活的主要效应物,是抑制心肌收缩力、促进心肌肥大和诱导心肌细胞凋亡的重要细胞因子,其激活可以加重 DCM^[21,22]。IL-1 β 和 IL-18 在 DCM 的心肌细胞凋亡和成纤维细胞活化中具有重要作用,其被认为是 DCM 结构改变的起始原因^[23]。与以往研究一致的是,我们同样证实高糖处理的成纤维细胞中焦亡激活。本研究中发现 Kcnq1ot1 能够通过激活 caspase-1 表达促进高糖处理的成纤维细胞的焦亡,加重 DCM。干扰 Kcnq1ot1 后,caspase-1 和其下游的炎症因子 IL-1 β 被显著抑制。同时干扰 miR-214-3p 后,这种抑制作用被解除,说明 Kcnq1ot1 对 caspase-1 的调控是通过靶向调控 miR-214-3p 发挥作用的。而 Kcnq1ot1 影响心肌纤维化是否存在其他的调控机制仍有待于进一步探讨。

综上所述,本研究通过细胞实验,提出了一个新的调控网络:Kcnq1ot1/miR-214-3p/caspase-1 通路,该通路在调节 DCM 心肌纤维化中发挥重要调控作用,进一步阐明了 DCM 的发病机制,并为治疗 DCM 提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Flowers E, Lin F, Kandula NR, et al. Body composition and diabetes risk in south asians: findings from the MASALA and MESA studies [J]. Diabetes Care, 2019, 42(5): 946-953
- [2] Zannad F, Ferreira JP, Pocock SJ, et al. SGLT2 inhibitors in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a meta-analysis of the EMPEROR-Reduced and DAPA-HF trials [J]. Lancet, 2020, 396 (10254): 819-829
- [3] Dillmann WH. Diabetic cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2019, 124(8): 1160-1162
- [4] Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease [J]. Diabetologia, 2018, 61(1): 21-28
- [5] Karmakar M, Minns M, Greenberg EN, et al. N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 β release independently of plasma membrane pores and pyroptosis [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2212
- [6] Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(1): 99-114
- [7] Pi S, Nie G, Wei Z, et al. Inhibition of ROS/NLRP3/Caspase-1 mediated pyroptosis attenuates cadmium-induced apoptosis in duck renal tubular epithelial cells[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 208: 111528
- [8] Zhou W, Chen C, Chen Z, et al. NLRP3: A novel mediator in cardiovascular disease[J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 5702103
- [9] Zhao Z, Sun W, Guo Z, et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis[J]. Life Sci, 2020, 254: 116900
- [10] Ferrè F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction[J]. Brief Bioinform, 2016, 17(1): 106-116
- [11] Shen C, Kong B, Liu Y, et al. YY1-induced upregulation of lncRNA KCNQ1OT1 regulates angiotensin II-induced atrial fibrillation by modulating miR-384b/CACNA1C axis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(1): 134-140
- [12] Li X, Dai Y, Yan S, et al. Down-regulation of lncRNA KCNQ1OT1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(4): 1026-1033
- [13] Coto E, Calvo D, Reguero JR, et al. Differential methylation of lncRNA KCNQ1OT1 promoter polymorphism was associated with symptomatic cardiac long QT[J]. Epigenomics, 2017, 9(8): 1049-1057
- [14] Zhu J, Zhang X, Gao W, et al. lncRNA/circRNA/miRNA/mRNA ceRNA network in lumbar intervertebral disc degeneration [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3160-3174
- [15] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. Nature, 2014, 505(7483): 334-352
- [16] Fu F, Bao R, Yao S, et al. Aberrant spinal mechanical loading stress triggers intervertebral disc degeneration by inducing pyroptosis and nerve ingrowth[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 772
- [17] Fang Y, Tian S, Pan Y, et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109595
- [18] Xu Y, Fang H, Xu Q, et al. lncRNA GAS5 inhibits NLRP3 inflammasome activation-mediated pyroptosis in diabetic cardiomyopathy by targeting miR-34b-3p/AHR [J]. Cell Cycle, 2020, 19 (22): 3054-3065
- [19] Jeyabal P, Thandavarayan RA, Joladarashi D, et al. MicroRNA-9 inhibits hyperglycemia induced cardiac pyroptosis in human ventricular cardiomyocytes by targeting ELAVL1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 471(4): 423-429
- [20] Li X, Du N, Zhang Q, et al. MicroRNA-30d regulates cardiomyocyte pyroptosis by directly targeting foxo3a in diabetic cardiomyopathy[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(10): e1479
- [21] Alexopoulos GS. Mechanisms and treatment of late-life depression [J]. Transl Psychiatry, 2019, 9(1): 188
- [22] Ridker PM, MacFadyen JG, Glynn RJ, et al. Inhibition of interleukin-1 β by canakinumab and cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71 (21): 2405-2414
- [23] Wang Y, Li H, Li Y, et al. Coriolus versicolor alleviates diabetic cardiomyopathy by inhibiting cardiac fibrosis and NLRP3 inflammasome activation[J]. Phytother Res, 2019, 33(10): 2737-2748