doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.16.002

LncRNA Terc 在心肌纤维化过程中的功能研究 *

吕忠英[1] 李 鹏[1] 张 颖[1] 吴 敏[1] 郑丽华[1] 王 娟[2△]

（1 新疆医科大学第五附属医院 高血压科 新疆 乌鲁木齐 830001；
2 新疆医科大学第五附属医院 心内科 新疆 乌鲁木齐 830001）

摘要 目的：探讨 lncRNA 端粒酶 RNA 组分（Terc）在心肌纤维化（MF）过程中的作用。**方法：**使用不同浓度的 TGF-β1 诱导心肌成纤维细胞（CFs）转分化，通过免疫荧光染色、western blot 检测 α-SMA、Vimentin、Collagen I、Collagen III 蛋白的表达水平，qRT-PCR 检测 lncRNA Terc 表达水平。过表达和敲减 Terc 后，通过 western blot、CCK-8 和流式细胞术观察模型细胞的胞外基质产生、细胞增殖、凋亡和 Smads 信号传导情况。皮下注射异丙肾上腺素（ISO）构建小鼠心肌纤维化模型，并使用 Terc 敲低慢病毒干预，其后多普勒超声仪检测小鼠的心脏射血分数（EF）和左室短轴缩短率（FS），称量小鼠心脏湿重，HE、Masson 染色检测小鼠心脏的病理改变，IHC 检测 α-SMA、Vimentin 蛋白的表达水平，qRT-PCR 检测 lncRNA Terc 表达水平。**结果：**TGF-β1 处理增加 CFs 的 α-SMA、Vimentin、Collagen I、Collagen III 的蛋白表达以及 Terc 水平；过表达 Terc 促进 α-SMA、Vimentin、Collagen I、Collagen III 的蛋白表达以及 Smad2/3 的磷酸化水平，同时还可促进 CFs 的增殖、抑制 CFs 的凋亡；敲减 Terc 则起相反的作用；动物模型中，ISO 可抑制 EF 和 FS，增加心脏湿重，加重心肌的病理损伤，而敲减 Terc 可有效缓解上述过程。**结论：**LncRNA Terc 可通过促进 Smads 信号传导，加速心肌成纤维细胞转分化和心肌纤维化进展。

关键词：心肌纤维化；心肌成纤维细胞；长链非编码 RNA；端粒酶 RNA 组分；转化生长因子 -β

中图分类号：R-33；R542.23 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2023）16-3008-08

Functional Study of lncRNA Terc during Myocardial Fibrosis*

LÜ Zhong-ying[1], LI Peng[1], ZHANG Ying[1], WU Min[1], ZHENG Li-hua[1], WANG Juan[2△]

(1 Department of Hypertension, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830001, China;
2 Department of Cardiology, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of telomerase RNA component (lncRNA Terc) in myocardial fibrosis(MF). **Methods:** TGF-β1 was used to induce cardiac fibroblasts (CFS) fibrosis cell model. The protein expression level was detected by immunofluorescence staining, Western blot and IHC staining, meanwhile the expression level of TERC was detected by qRT-PCR; CCK-8 and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis, respectively; the myocardial fibrosis model of mice was established by subcutaneous injection of isoproterenol (ISO). The ejection fraction (EF) and left ventricular short axis shortening (FS) of the mice were measured by Doppler ultrasound. The wet weight of the mouse heart was also weighed. The pathological changes of the mouse heart were detected by HE and Masson staining; the expression levels of α-SMA and Vimentin detected by IHC; the expression level of TERC was detected by qRT-PCR. **Results:** TGF-β1 treated CFs have a higher expression of α-SMA, vimentin, collagen I and collagen III and mRNA level of Terc. Overexpression of TERC promoted the expression of α-SMA, vimentin, collagen I and collagen III and the phosphorylation level of Smad2/3, and also promoted the proliferation of CFs and inhibit the apoptosis of CFs. Knockdown of Terc had the opposite effect. In animal models, ISO can inhibit EF and FS, increase cardiac wet weight, and aggravate the pathological damage of myocardium; while Terc knockdown with shRNA can effectively alleviate the above process. **Conclusion:** TERC in CFs promotes the phosphorylation of Smad2/3 after myocardial fibrosis, which aggravates the pathological changes of myocardial fibrosis.

Key words: Myocardial fibrosis; Cardiac Fibroblasts; Long noncoding RNA; Telomerase RNA Component; Transforming growth factor-β

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.23 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2023)16-3008-08

前言

心肌纤维化是一种广泛存在于心血管的疾病，如高血压、糖尿病性心肌病、急性心肌梗死的病理过程[1]，其中心肌成纤维

* 基金项目：国家自然科学基金地区科学基金项目（81960052）；
省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题（SKL-HIDCA-2020-JZ5）
作者简介：吕忠英（1983-），女，硕士，副主任医师，研究方向：高血压治疗研究，E-mail: zhong9834@126.com
△ 通讯作者：王娟（1982-），女，博士，副主任医师，研究方向：心血管心肌重构基础研究，E-mail: 15160991696@163.com
（收稿日期：2023-02-12 接受日期：2023-03-07）

细胞(cardiac fibroblasts, CFs)的增殖及转分化是其主要病理基础[2,3]。尽管一定程度的纤维化可对心脏起到一定的保护作用,但非心肌细胞的过度增殖将导致心肌细胞的收缩和舒张紊乱,在临床上可发展为心律失常甚或心力衰竭。CFs 在受到刺激后,转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFs)并过度合成胶原[4],除引起心肌僵硬,顺应性下降外,还会干扰电信号的正常传导,引发心律失常[5,6]。因此,抑制 CFs 分化为 MFs 是治疗心肌纤维化的有效途径。

长链非编码 RNA(long non-coding RNAs, lncRNA)是长度大于 200 个核苷酸的 RNA 片段,缺乏蛋白质编码能力,近年来,越来越多的研究表明,lncRNA 的表达与心脏纤维化的发生、进展和治疗密切相关[7,8]。众所周知,转化生长因子 -β(TGF-β)是迄今为止最有效的促纤维化细胞因子,也是患病心脏中成纤维细胞活化和纤维化的关键介质[9]。同时,许多 lncRNA 及其底物又可靶向 TGF-β 受体或其下游 Smad 蛋白对其进行调节[10]。因此,本研究通过对 NCBI 中的 GSE51824[11](大鼠左心室 CFs 和转化后的 MFs 差异表达芯片数据)和 GSE54022[12](TGF-β 诱导的小鼠 CFs 转分化芯片数据)进行筛选发现 lncRNA Terc 在不同物种 CFs 转分化后均存在上调。因此,本研究拟以 lncRNA Terc 作为研究对象,探究其在心肌纤维化过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

心肌成纤维细胞 HCFCs 购自武汉原生原代生物医药科技有限公司,使用含 10%胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)的 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)的培养基培养,培养箱设定为 5% CO_2,37 ℃恒温,本实验选用第 2-4 代的细胞进行功能实验。

1.2 主要试剂

DMEM、FBS、胰蛋白酶、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白上样缓冲液、Trizol、Triton X-100 等均购自碧云天生物技术有限公司;逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自 Roche Diagnostics;CCK-8 试剂盒购自 GLPBIO;凋亡流式检测试剂盒购自联科生物;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen;α-SMA 单克隆抗体、Vimentin 单克隆抗体、Collagen I 单克隆抗体、Collagen III 单克隆抗体、GAPDH 单克隆抗体、Smad2 单克隆抗体、Smad3 多克隆抗体、磷酸化 Smad2(p-Smad2)单克隆抗体、磷酸化 Smad3(p-Smad3)单克隆抗体均购自 Cell Signaling Technology;二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或抗鼠 IgG、DyLight™ 488)、DAPI 荧光染料购自 Proteintech;免疫组化试剂盒购自中杉金桥;其他试剂为国产分析纯;qRT-PCR 所使用引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 主要方法

1.3.1 免疫荧光染色 将接种在爬片上的细胞使用 4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 漂洗 3 遍;0.2% Triton X 透膜 10 min,PBS 漂洗 3 遍;5%山羊血清封闭 30 min;加入 α-SMA 抗体(1:200)于 4℃冰箱中孵育过夜;次日取出后用 PBS 漂洗 3 遍后,加入 DyLight™ 488 室温孵育 2 h,PBS 漂洗 3 遍后加入 DAPI 荧光染料(1:5000)染核 30 s,PBS 漂洗 3 遍后使用防淬灭剂封片、拍照。

1.3.2 Western Blot 使用 RIPA 裂解液裂解细胞,获得蛋白样品;测量蛋白浓度后,取相应体积的蛋白加入上样缓冲液混匀,沸水浴加热 5 min,使蛋白变性。电泳、转模结束后将膜放入封闭液中室温封闭 60 min;摇床上孵育一抗(4℃孵育过夜);次日使用 TBST 洗涤 3 次。转入二抗(1:5000)中,室温下孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次。在膜上滴加显影液后,利用化学发光成像系统(Bio-rad)进行检测。

1.3.3 qRT-PCR 收集细胞、组织样品,使用 Trizol 提取总 RNA。利用逆转录试剂盒进行逆转录,所有操作按试剂盒的使用说明进行。使用荧光定量 PCR 仪检测基因的表达,反应条件按荧光定量 PCR 试剂盒的操作说明进行。定量 PCR 每个反应设置 3 个重复,内参用 GAPDH。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,即 ΔΔCt= 实验组(Ct 目标基因 -Ct 内参)- 对照组(Ct 目标基因 -Ct 内参)。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物列表

Table 1 qRT-PCR primer

Name	Sequence(5'-3')
terc	CCGCCTTCCACCGTTCATTC
	ACTCGCTCCGTTCCTCTTCCTG
GAPDH	ACAGCCTCAAGATCATCAGC
	GGTCATGAGTCCTTCCACGAT
mmuTerc	TGTGGGTTCTGGTCTTTTGTTCT
	TTTGTTTTTGAGGCTCGGGA
mGAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 收集培养皿内所有细胞,用 PBS 清洗一遍后弃去上清,空白对照管和单染管按凋亡检测试剂盒的说明书进行操作,各处理组细胞加入荧光标记的 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,避光孵育 5 min 后上机检测。

1.3.5 Terc 相关质粒构建及转染 使用 pcDNA3.1 构建 Terc 过表达质粒(Forward:ctagcgtttaaacttaagcttGGGTTGCGGAGGGTGGGC;Reverse:tgctggatatctgcagaattcGCATGTGTGAGCCGAGTCCT);使用 pLKO.1 载体构建 sh-Terc 质粒(靶序列:AACCCTAACTGAGAAGGCTCG)。细胞在六孔板中长到 70~80%融合度时按说明书进行转染。转染 48 h 后,进行功能实验以及提取细胞 RNA 及总蛋白。

1.3.6 小鼠心肌纤维化动物模型 SPF 级雄性昆明鼠 20 只,22-25 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。造模组小鼠皮下注射按 5 mg/kg 剂量注射异丙肾上腺素(Isoproterenol,ISO),次日起以 2.5 mg/kg 剂量维持至 30 d;对照组皮下注射等量的溶媒。根据不同处理将小鼠分为四组:(1)Control 组:皮下注射溶媒组;(2)ISO 组:ISO 造模组;(3)ISO+Lv-shNC 组:ISO 造模并尾静脉注射 Lv-shNC;(4)ISO+Lv-shTerc 组:ISO 造模并尾静脉注射 Lv-shTerc。

1.3.7 多普勒超声检测心功能指标 取材日用 4%的水合氯醛

麻醉小鼠后，使用多普勒超声仪检测小鼠的心功能，记录左心室收缩末期内径（left ventricular diameter in systole, LVDS）、左心室舒张末期内径（left ventricular end-diastolic internal diameter, LVEDD）、心室舒张末容积（ventricular end-diastolic volume, VEDV）、心室收缩末容积（ventricular end-systolic volume, VESV），根据以上参数计算小鼠心脏射血分数（Ejection fraction，EF）和左室短轴缩短率（fractional shortening, FS）。

1.3.8 HE 染色　动物模型取材后将组织送医院病理科进行石蜡包埋、切片，使用 HE 自动染色机进行 HE 染色。

1.3.9 Masson 染色　石蜡切片经脱蜡、复水后，PBS 洗净，用 1:1 混合配制的 Weigert 铁苏木精染液染色 10 min；酸性酒精分化液分化 5-15 s，自来水冲洗；Masson 蓝化液反蓝 3 min，自来水冲洗；丽春红品红染色液染色 5-10 min，弱酸工作液冲洗 1 min；磷钼酸溶液洗 1-2 min，弱酸工作液冲洗 1 min；苯胺蓝染色液染色 1-2 min，弱酸工作液洗 1 min；分别过 95%和无水乙醇；二甲苯透明后使用中性树脂封片、拍照。

1.3.10 IHC 染色　将切片使用脱蜡、复水后，使用免疫组化试剂盒分别经过抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭非特异性结合位点后，加入抗体于 4℃中孵育过夜，使用中杉金桥 pv-9000 通用二步法检测试剂盒和 DAB 显色液完成后续步骤。染色完成后的结果判定：显微镜下观察并根据表 2 判定结果。将每个组织的两组得分相乘即是该组织免疫组化结果最后得分。

表 2 免疫组化评分表

Table 2 Immunohistochemical Evaluation Criteria

Percentage of positive cells %	Value	Dying Intensity	Value
0-10	0	Void	0
10-25	1	Weak (light yellow)	1
25-50	2	Medium (brownish-yellow)	2
50-100	3	Strong (tan)	3Q

1.4 统计学方法

使用 Graphpad Prism 8.0 软件对本实验的数据进行统计学分析，实验结果以均数± 标准差（means± SD）的形式呈现。两组间采用 t 检验，多组间采用 One-Way ANOVA 进行比较，当 $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF-β1 诱导成纤维细胞分化及对 lncRNA Terc 表达的影响

使用不同浓度 0、5、10、20 ng/mL 的 TGF-β1 诱导 HCFCs 转分化，处理细胞后，可见 HCFCs 由纺锤梭型状平铺开来，细胞形态与 TGF-β1 呈一定的剂量依赖性（图 1A）。免疫荧光染色检测 α-SMA 的表达水平，western blot 检测 α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 的表达水平，qRT-PCR 检测 lncRNA Terc 的表达水平。结果显示，随着 TGF-β1 的浓度升高，α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 及 lncRNA Terc 的表达水平均显著上调（$P<0.01$）。本研究将使用 10 ng/mL 浓度进行后续的实验。

2.2 过表达 lncRNA Terc 对 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞转分化模型的影响

qRT-PCR 检测 lncRNA Terc 过表达质粒的转染效率，结果显示，Terc 过表达质粒转染效率良好（图 2A），可用于后续实验。上调 lncRNA Terc 后使用 TGF-β1 诱导 HCFCs 转分化，western blot 检测 α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 的蛋白水平及 Smad2/3 的磷酸化水平，CCK-8 检测细胞活力，流式细胞术检测细胞凋亡率。结果显示，与 Blank 组相比，Vector 组的 α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 的蛋白水平、细胞活力、细胞凋亡率及 Smad2/3 的磷酸化水平差异无统计学意义（$P>0.05$），Terc 组 α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 的蛋白水平、细胞活力及 Smad2/3 的磷酸化水平显著升高，细胞凋亡率显著下调（$P<0.01$）。

2.3 敲低 lncRNA Terc 对 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞转分化模型的影响

qRT-PCR 检测 lncRNA Terc 小干扰 RNA（siRNA）的转染效率，结果显示，siRNAs 转染效率良好（图 3A），其中 si-Terc 2 的敲减效果最好，因此选用 si-Terc 2 用于后续实验。敲低 lncRNA Terc 后使用 TGF-β1 诱导 HCFCs 转分化，western blot 检测 α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 的蛋白水平及 Smad2/3 的磷酸化水平，CCK-8 检测细胞活力，流式细胞术检测细胞凋亡率，western blot 检测 Smad2/3 的磷酸化水平。结果显示，与 si-NC 组相比，si-Terc 组 α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 的蛋白水平、细胞活力及 Smad2/3 的磷酸化水平显著降低，细胞凋亡率显著升高（$P<0.01$）。

2.4 小鼠心肌纤维化动物模型中探讨 lncRNA Terc 的作用

通过皮下注射 ISO 对小鼠进行心肌纤维化造模，并通过尾静脉注射慢病毒敲低 lncRNA Terc 水平，使用多普勒超声仪检测小鼠的 EF 和 FS，取材日当天称量心脏的湿重，HE 和 Masson 染色检测小鼠病理变化，IHC 检测 α-SMA、Vimentin 的表达水平，qRT-PCR 检测 Terc 的表达水平。结果显示，与 Control 组相比，ISO 组 EF 和 FS 显著降低，湿重、α-SMA、Vimentin、Terc 的表达水平显著上调，可见明显的心肌肥厚与胶原沉积（蓝色部分）（$P<0.01$）；与 ISO 组相比，ISO+Lv-sh Terc 组 EF 和 FS 显著升高，湿重、α-SMA、Vimentin、Terc 的表达水平显著下调，心肌肥厚及胶原沉积程度显著缓解（$P<0.01$）。

3 讨论

心肌纤维化是由多种原因导致的心肌纤维持续或反复加重缺血缺氧，进而产生成纤维细胞异常增殖、胶原过度沉积的

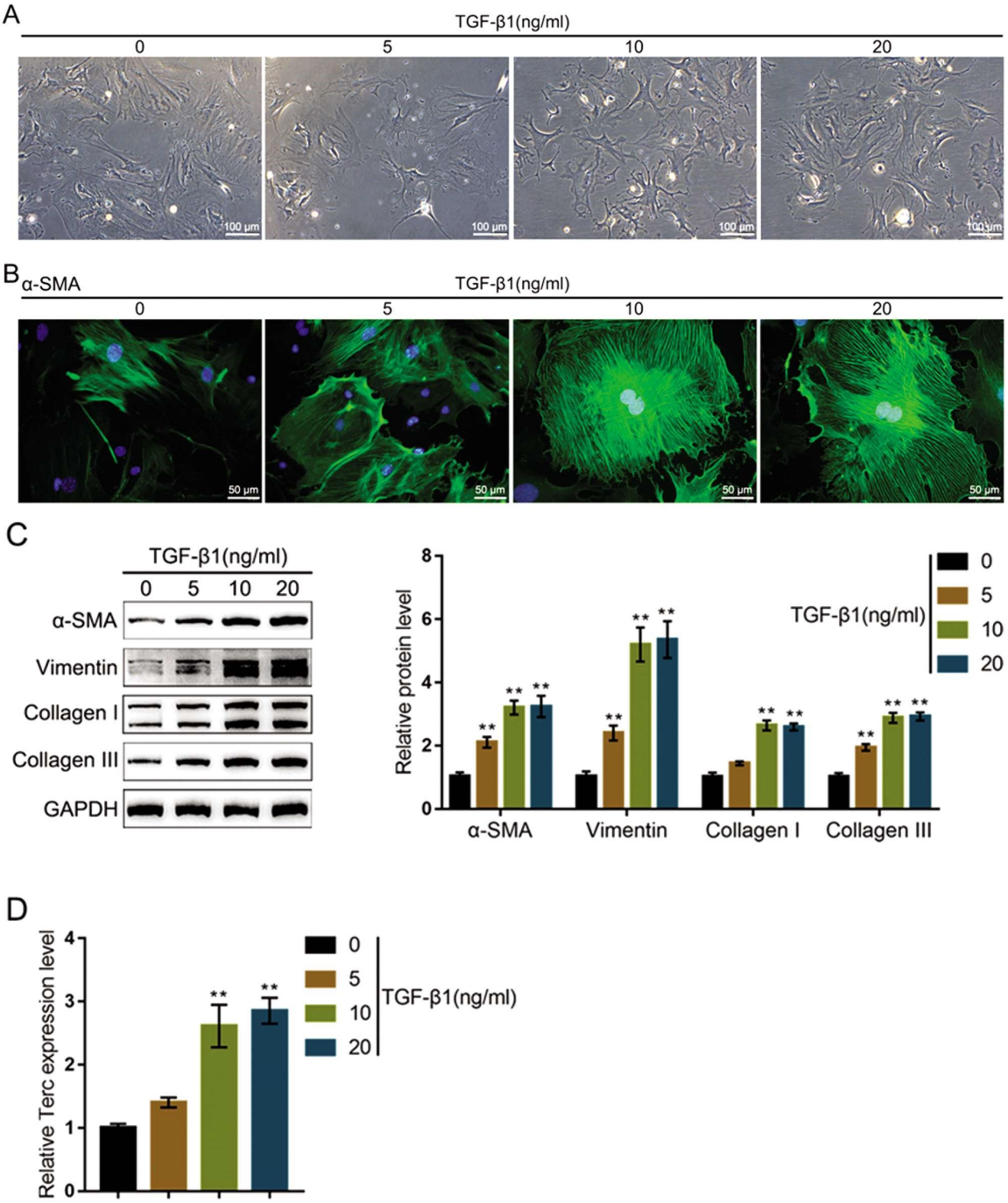

图 1 TGF-β1 诱导成纤维细胞分化及对 lncRNA Terc 表达的影响 A:显微镜下观察 HCFCs 形态;(B)免疫荧光染色检测 α-SMA 的表达水平;(C)western blot 检测α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 的表达水平;(D)qRT-PCR 检测 lncRNA Terc 的表达水平。

Fig.1 TGF-β1 induces fibroblast differentiation and its effect on lncRNA Terc expression. A: Observation of the morphology of HCFCs by the microscope; B: The expression of α-SMA was detected by Immunofluorescence. C: The protein expression of α-SMA, Vimentin, Collagen I and III was detected by western blot. D: The mRNA expression of Terc was detected by qRT-PCR.

病理现象。心肌纤维化是心肌重塑的重要过程,如治疗不及时,可逐步发展为慢性缺血性心脏病,严重影响患者生命安全[13-15]。目前,针对心肌纤维化的机制研究众多,但尚未十分明确[16,17]。有研究表明,lncRNA 在心肌结构重塑中也起着重要的作用[18]。因此,本研究基于公共数据挖掘的方式,通过对多个心肌纤维化相关数据集进行取交集,在 GTex 的左心室组织表达中对相关差异表达基因进行交叉筛选, 在候选基因中选定 Terc 作为研究对象。Terc 是位于 3 号染色体长臂,编码端粒酶的核心功能组分,该基因的异常表达,可导致端粒酶的功能异常,进而影响细胞周期的稳定性、增殖、凋亡等正常生理过程,诱导疾病的发生 [18,19]。有研究发现,Terc 可以非端粒酶依赖性方式刺激 NF-κB 通路来增强炎性细胞因子的表达和分泌,提示其可能是抗炎疗法的新靶点[20]。

TGF-β 是最具特征的纤维化生长因子,其中 TGF-β1 及其下游 Smad 通路是与该过程联系最为紧密[21]。TGF-β1/Smad 通路的激活存在于心肌纤维化全过程,该通路可以诱导心肌成纤维细胞分化、增殖,刺激细胞间质的合成,进行性向肌成纤维细胞转分化,还可以抑制胶原酶、弹性蛋白酶等的分泌,促进纤维

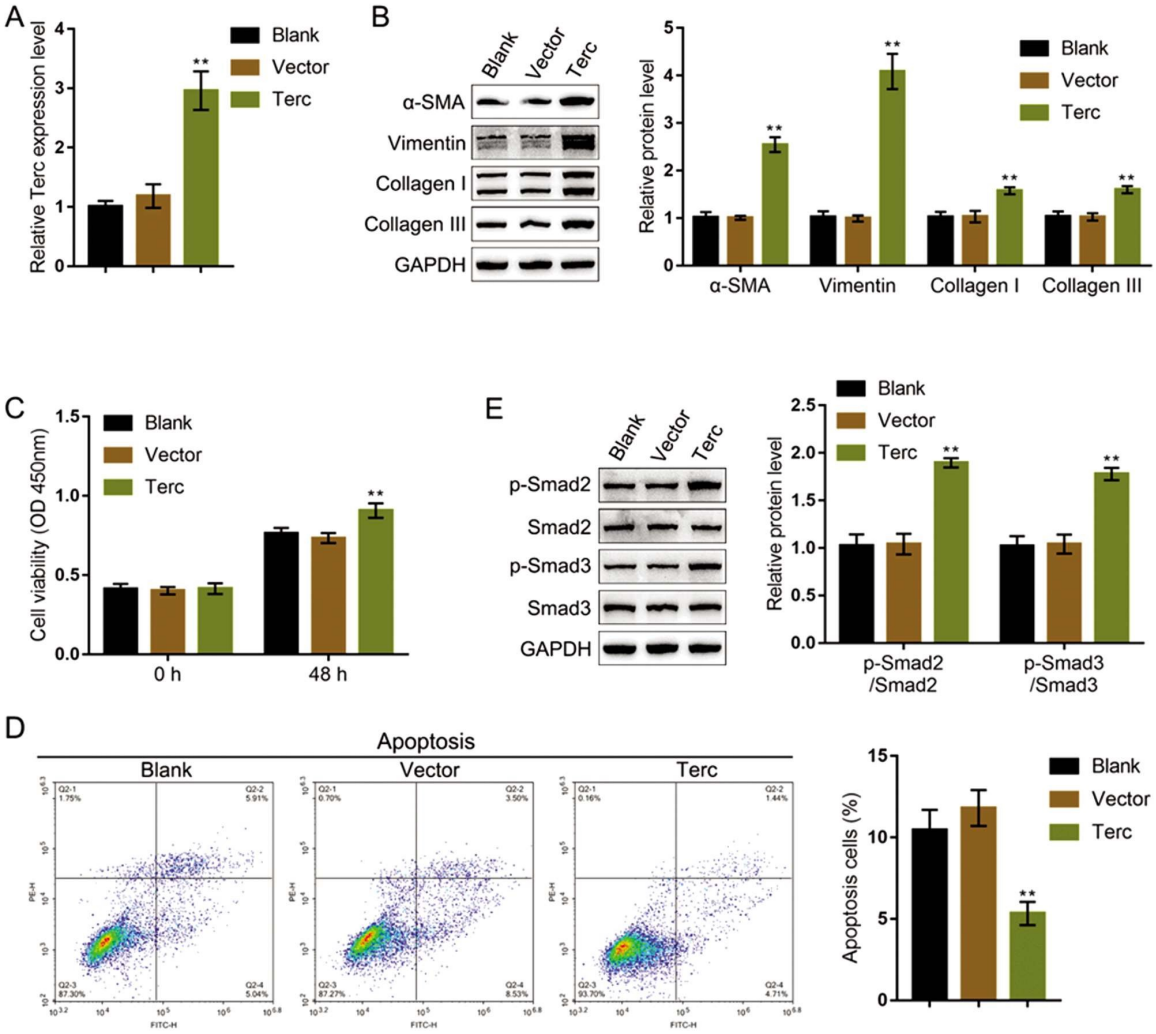

图 2 过表达 lncRNA Terc 对 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞转分化模型的影响 A:qRT-PCR 检测 lncRNA Terc 过表达质粒的转染效率;B: western blot 检测α-SMA、Vimentin、Collagen I和 III 的蛋白水平;C: CCK-8 检测细胞活力;D: 流式细胞术检测细胞凋亡率;E: western blot 检测 Smad2/3 的磷酸化水平。

Fig.2 Effects of overexpression of lncRNA Terc on TGF-β1-induced myocardial fibroblast transdifferentiation model. A: The transfection efficiency of the lncRNA Terc overexpression plasmid was detected by qRT-PCR; B: The protein levels of α-SMA, Vimentin, Collagen I and III were detected by western blot; C: The cell viability was detected by CCK-8; D: The apoptosis rate was detected by flow cytometry; E: The phosphorylation level of Smad2/3 was detected by western blot.

化发展[22-25]。DP Zankov 等发现通过敲除肌动蛋白纤丝结合蛋白基因,可上调趋化蛋白 -1 表达,从而抑制 TGF-β/Smad 通路激活，改善心肌纤维化程度 [26]。而在 CFs 转分化的研究中，Ac-SDKP 被发现可阻碍 TGF-β1/Smad 通路中的 Smad2 和 ERK 1/2 的磷酸化[27],抑制 CFs 转化为 MFs 以治疗心肌纤维化[28,29];ALDH2 激活同样被证明可介导 TGF-β1/Smad 通路抑制 CFs 转分化,缓解心肌纤维化[30-32]。

本研究结果表明,TGF-β1 可诱导 CFs 纤维化细胞模型,上调 Terc 的表达水平；过表达 Terc 可以促进纤维化相关标记蛋白 α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 Collagen III 的表达以及 Smad2/3 的磷酸化，而敲减 Terc 可一定程度上逆转上述过程，在动物模型中得到同样的结果。这与既往的研究结论一致,说明 Terc 可通过 TGF-β1/Smad 通路促进心肌纤维化的病理过程。

综上所述,本研究首次发现 lncRNA Terc 在 TGF-β1 诱导的 CFs 纤维化细胞模型中表达上调，敲减 Terc 可有效降低纤维化相关标志蛋白 α-SMA、Vimentin、Collagen I、Collagen III 的表达和 Smad2/3 的磷酸化水平;在 ISO 诱导的小鼠心肌纤维化模型中,敲减 Terc 可有效缓解心肌纤维化损伤,我们的研究表明,Terc 有望成为临床治疗心肌纤维化的潜在靶点。

参 考 文 献(Referenses)

[1] González A, Schelbert EB, Díez J, et al. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(15): 1696-1706

[2] López B, Ravassa S, Moreno MU, José GS, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(7): 479-498

[3] Li X, Yang Y, Chen S, et al. Epigenetics-based therapeutics for myocardial fibrosis[J]. Life Sci, 2021, 15; 271: 119186

[4] Liu M, López de Juan Abad B, Cheng K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 173: 504-519

[5] Nunez-Toldra R, Kirwin T, Ferraro E, et al. Mechanosensitive

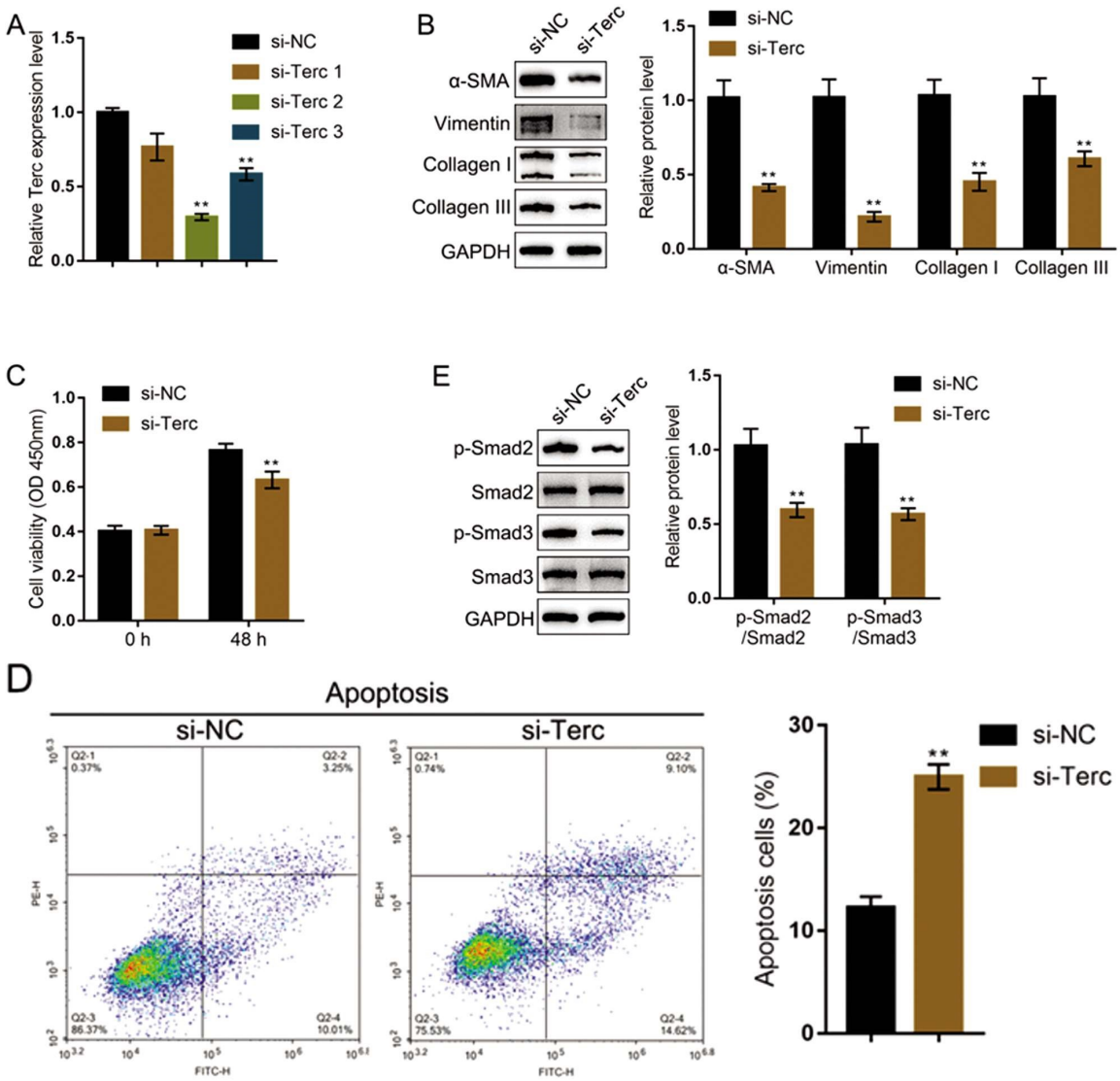

图 3 敲低 lncRNA Terc 对 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞转分化模型的影响 A:qRT-PCR 检测 siRNA 的转染效率;B:western blot 检测α-SMA、Vimentin、Collagen I 和 III 的蛋白水平;C: CCK-8 检测细胞活力;D: 流式细胞术检测细胞凋亡率;E: western blot 检测 Smad2/3 的磷酸化水平。

Fig.3 Effects of Knockdown of lncRNA Terc on TGF-β1-induced myocardial fibroblast transdifferentiation model. A: Detection of siRNA transfection efficiency by qRT-PCR; B: The protein levels of α-SMA, Vimentin, Collagen I and III were detected by western blot; C: The cell viability was detected by CCK-8; D: The The apoptosis rate was detected by flow cytometry; E: The phosphorylation level of Smad2/3 was detected by western blot.

molecular mechanisms of myocardial fibrosis in living myocardial slices[J]. ESC Heart Fail, 2022, 9(2): 1400-1412

[6] Tuleta I, Frangogiannis NG. Fibrosis of the diabetic heart: Clinical significance, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 176: 113904

[7] Huang Y. The novel regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in cardiovascular diseases[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(12): 5768-5775

[8] Xie L, Huang G, Gao M, et al. Identification of Atrial Fibrillation-Related lncRNA Based on Bioinformatic Analysis[J]. Dis Markers, 2022, 2022: 8307975

[9] Zhu B, Zhang L, Liang C, et al. Stem Cell-Derived Exosomes Prevent Aging-Induced Cardiac Dysfunction through a Novel Exosome/lncRNA MALAT1/NF-κB/TNF-α Signaling Pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 9739258

[10] 尹玉洁, 张倩, 旷湘楠, 等. 内皮间质转分化在心肌纤维化中的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(001): 12-16

[11] 黄思, 张圳, 万静静, 等. 长链非编码 RNA 在心力衰竭中的作用及临床意义 [J]. 第二军医大学学报, 2021, 42(4): 9

[12] Li C, Wang N, Rao P, et al. Role of the microRNA-29 family in myocardial fibrosis[J]. J Physiol Biochem, 2021, 77(3): 365-376

[13] Cao F, Li Z, Ding WM, et al. LncRNA PVT1 regulates atrial fibrosis via miR-128-3p-SP1-TGF-β1-Smad axis in atrial fibrillation [J]. Mol Med, 2019, 25(1): 7

[14] Yang L, Deng J, Ma W, et al. Ablation of lncRNA Miat attenuates pathological hypertrophy and heart failure [J]. Theranostics, 2021, 11 (16): 7995-8007

[15] Ifkovits JL, Addis RC, Epstein JA, et al. Inhibition of TGFβ signaling increases direct conversion of fibroblasts to induced cardiomyocytes [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89678

[16] López B, Ravassa S, Moreno MU, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(7): 479-498

[17] Yang F, Qin Y, Lv J, et al. Silencing long non-coding RNA Kcnq1ot1 alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy [J]. Cell

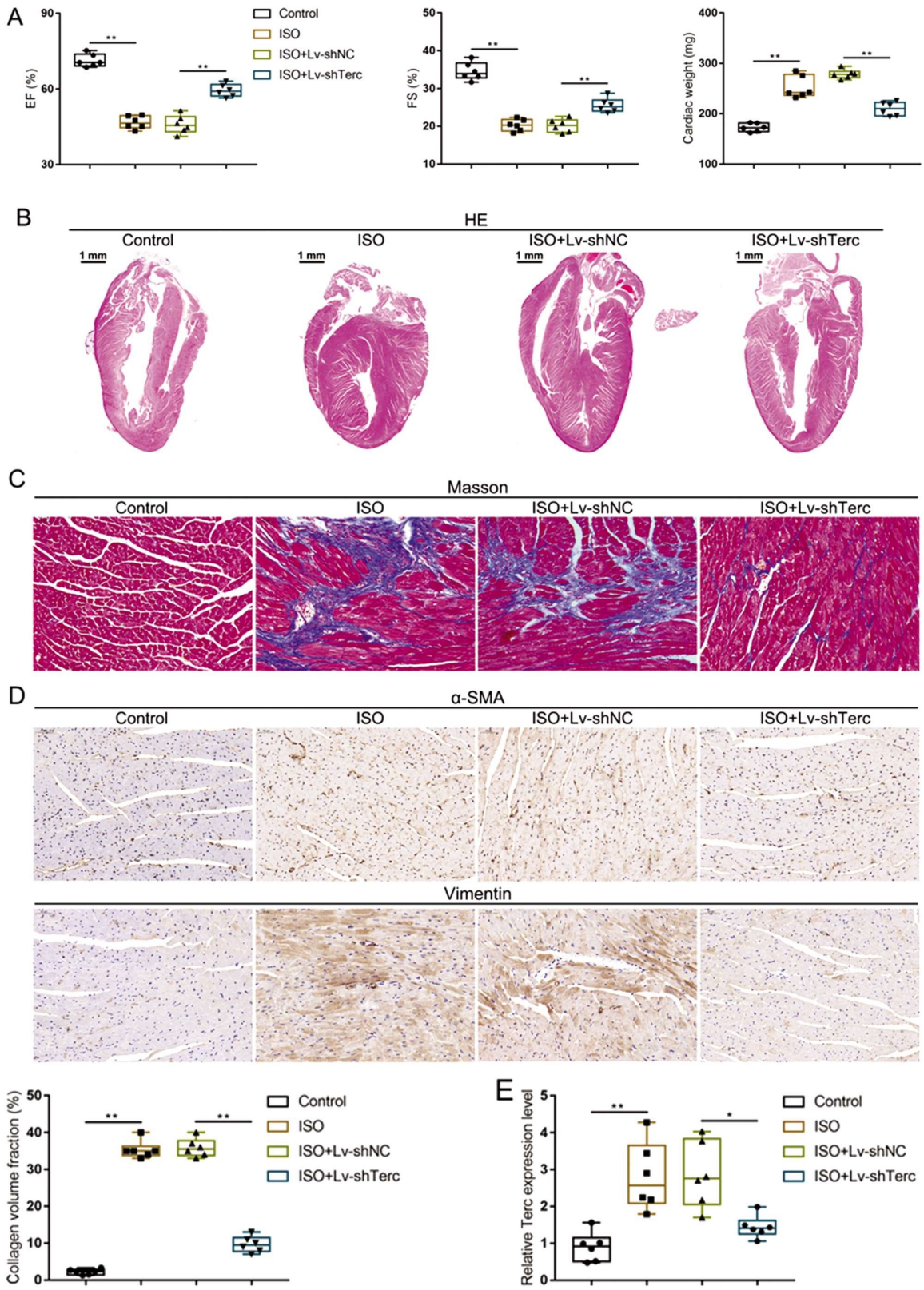

图 4 小鼠心肌纤维化动物模型中探讨 lncRNA Terc 的作用 A:多普勒超声仪检测小鼠的 EF 和 FS 并称量心脏的湿重;B-C:HE 染色及 Masson 染色检测病理变化;D:免疫组化检测α-SMA、Vimentin 的表达水平;E:qRT-PCR 检测 Terc 的表达水平

Fig.4 Investigating the role of lncRNA Terc in an animal model of myocardial fibrosis in mice A: The EF and FS was detected by using Doppler ultrasound, and the cardiac weight was also detected; B- C: The cardiac pathological changes were detected by Masson and HE. D: Expression levels of α-SMA and Vimentin detected by IHC. E: Expression levels of Terc detected by qRT-PCR

Death Dis, 2018, 9(10): 1000

[18] Tang H, Wang H, Cheng X, et al. HuR regulates telomerase activity through TERC methylation [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2213

[19] Wu S, Ge Y, Lin K, et al. Telomerase RNA TERC and the PI3K-AKT pathway form a positive feedback loop to regulate cell proliferation independent of telomerase activity [J]. Nucleic Acids

Res, 2022, 22; 50(7): 3764-3776

[20] Tsai LK, Ou-Yang H, Xu J, et al. Effects of Recloning on the Telomere Lengths of Mouse Terc+/- Nuclear Transfer-Derived Embryonic Stem Cells[J]. Stem Cells Dev, 2022, 31(21-22): 720-729

[21] Liu H, Yang Y, Ge Y, et al. TERC promotes cellular inflammatory response independent of telomerase [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(15): 8084-8095

[22] Larson C, Oronsky B, Carter CA, et al. TGF-beta: a master immune regulator[J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(5): 427-438

[23] Peng D, Fu M, Wang M, et al.Targeting TGF-β signal transduction for fibrosis and cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 104

[24] Blyszczuk P, Muller-Edenborn B, Valenta T, et al. Transforming growth factor-beta-dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis [J]. Eur Heart J, 2017, 38(18): 1413-1425

[25] Chen Y, Huang M, Yan Y, et al. Tranilast inhibits angiotensin II-induced myocardial fibrosis through S100A11/ transforming growth factor-β (TGF-β1)/Smad axis [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 8447-8456

[26] Zankov DP, Shimizu A, Tanaka-Okamoto M, et al. Protective effects of intercalated disk protein afadin on chronic pressure overload-induced myocardial damage[J]. Scientific Reports, 2017, 7

[27] Peng H, Carretero OA, Peterson EL, et al. Ac-SDKP inhibits transforming growth factor-beta1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts [J]. American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology, 2010, 298(5): H1357

[28] Qiu Y, Wang Z, Zhang X, et al. A long-acting isomer of Ac-SDKP attenuates pulmonary fibrosis through SRPK1-mediated PI3K/AKT and Smad2 pathway inhibition [J]. IUBMB Life, 2020, 72 (12): 2611-2626

[29] Kassem KM, Vaid S, Peng H, et al.Tβ4-Ac-SDKP pathway: Any relevance for the cardiovascular system?[J].Can J Physiol Pharmacol, 2019, 97(7): 589-599

[30] Yuan Q, Cao S, Dong Q, et al. ALDH2 activation inhibited cardiac fibroblast-to-myofibroblast transformation via TGF-beta1/Smad signaling pathway [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, 73(4): 248-256

[31] Chen CH, Kraemer BR, Mochly-Rosen D. ALDH2 variance in disease and populations[J]. Dis Model Mech, 2022, 5(6): dmm049601

[32] Chen CH, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D. ALDH2 and Cardiovascular Disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1193: 53-67

（上接第 3057 页）

[21] Li S, Wang L, Zhao C, et al. CD8⁺T cells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Br J Haematol, 2007, 139(4): 605-611

[22] Caserta S, Zaccuri AM, Innao V, et al. Immune thrombocytopenia: options and new perspectives[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2021, 32 (7): 427-433

[23] Kohli R, Chaturvedi S. Epidemiology and Clinical Manifestations of Immune Thrombocytopenia [J]. Hamostaseologie, 2019, 39 (3): 238-249

[24] Qiu J, Liu X, Li X, et al. CD8 (+) T cells induce platelet clearance in the liver via platelet desialylation in immune thrombocytopenia[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 27445

[25] Zhang C, Tian Z. NK cell subsets in autoimmune diseases [J]. Autoimmun, 2017, 83(5): 22-30

[26] Wang S, Liu F, Zhao H. Eosinophil Granulocyte and NK Cell-Mediated Platelet Destruction in Immune Thrombocytopenia[J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2018, 34(1): 121-124

[27] Neunert CE. Management of newly diagnosed immune thrombocytopenia: can we change outcomes?[J]. Blood Adv, 2017, 2017(1): 400-405

[28] Puavilai T, Thadanipon K, Rattanasiri S, et al. Treatment efficacy for adult persistent immune thrombocytopenia: a systematic review and network meta-analysis[J]. Br J Haematol, 2020, 188(3): 450-459

[29] Cooper N, Kruse A, Kruse C, et al. Immune thrombocytopenia (ITP) World Impact Survey (iWISh): Patient and physician perceptions of diagnosis, signs and symptoms, and treatmentv [J]. Am J Hematol, 2021, 96(2): 188-198

[30] Heitink-Polle KM, Uiterwaal C, Porcelijn L, et al. Treatment with intravenous immunoglobulin does not prevent chronic immune thrombocytopenia in children: results of a randomized controlled trial [J]. Blood, 2016, 128(22): 866-871