

• 药理与临床 •

基于 *LncRNA MIAT/miR-384-5p* 研究九龙藤黄酮抑制自噬抗心肌缺氧损伤的作用机制

苏文晓, 卢 珺, 甘晓雯, 陈卉彬, 简 洁*

广西糖尿病系统医学重点实验室, 广西 桂林 541199

摘要: 目的 基于长链非编码 RNA (long non coding RNA, LncRNA) 心肌梗死相关转录本 (myocardial infarction associated transcript, *MIAT*) /*miR-384-5p* 探讨九龙藤黄酮 (*Bauhinia championii* flavones, BCF) 抑制自噬抗心肌缺氧损伤的作用及机制。方法 培养 H9c2 心肌细胞及敲低 *LncRNA MIAT* 稳转株, 建立心肌细胞氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 模型模拟心肌缺血缺氧, 给予 BCF 预处理; 选取 SD 雄性大鼠, 沉默 *miR-384-5p* 基因, 建立急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 模型, 给予 BCF 预处理。以 qRT-PCR 法检测 *LncRNA MIAT*、*miR-384-5p* 及自噬相关基因表达; 采用双荧光素酶报告基因实验及 RNA 反义纯化 (RNA antisense purification, RAP) 实验验证 *LncRNA MIAT* 与 *miR-384-5p* 的靶向关系; 采用 ELISA 法检测细胞上清液及大鼠血清中肌钙蛋白-I (cardiac troponin-I, cTn-I) 水平; 采用 CCK-8 法检测细胞活力; 采用透射电镜观察自噬小体数量; 以自噬双标腺病毒 Ad-mRFP-GFP-LC3 感染细胞检测自噬流; 采用 TTC 染色法检测大鼠心肌梗死面积; 采用 Western blotting 法检测自噬相关蛋白表达。结果 与 OGD 组比较, BCF 能够下调 *LncRNA MIAT* 并上调 *miR-384-5p* 基因表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提高心肌细胞活力 ($P < 0.01$), 降低 cTn-I 水平 ($P < 0.001$), 下调 *Beclin1*、*Cathepsin D*、*LC3* 基因及蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少自噬小体数量 ($P < 0.01$), 减轻自噬流 ($P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因及 RAP 实验结果显示, *LncRNA MIAT* 靶向负调控 *miR-384-5p* 表达。敲低 *LncRNA MIAT* 可抑制自噬, 减轻心肌缺氧损伤; 与单纯 BCF 预处理相比, 敲低 *LncRNA MIAT* 可显著增强 BCF 抑制自噬和保护心肌的作用 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与 AMI + BCF 组比较, 沉默 *miR-384-5p* 后给予 BCF 处理, 大鼠心肌梗死面积显著增加 ($P < 0.01$), 血清中 cTn-I 水平显著升高 ($P < 0.01$), 心脏组织中自噬相关基因及蛋白表达均显著上调 ($P < 0.01$), 心肌缺血损伤加重。结论 BCF 通过 *LncRNA MIAT/miR-384-5p* 抑制自噬, 从而减轻心肌缺氧损伤。

关键词: 九龙藤黄酮; *LncRNA MIAT*; *miR-384-5p*; 心肌缺氧损伤; 自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2022)18 - 5701 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.013

Anti-myocardial hypoxia injury effect of *Bauhinia championii* flavones by inhibiting autophagy based on *LncRNA MIAT/miR-384-5p*

SU Wen-xiao, LU Jun, GAN Xiao-wen, CHEN Hui-bin, JIAN Jie

Guangxi Key Laboratory of Diabetic Systems Medicine, Guilin 541199, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Bauhinia championii* flavones (BCF) on myocardial hypoxia injury by inhibiting autophagy based on long non-coding RNA (LncRNA) myocardial infarction associated transcript (*MIAT*)/*miR-384-5p*. **Methods** H9c2 cardiomyocytes and stable *LncRNA MIAT* knockdown strain were cultured, and cardiomyocyte oxygen-glucose deprivation (OGD) model was established to simulate myocardial ischemia and hypoxia, cells were pretreated with BCF. Male SD rats were selected to establish acute myocardial infarction (AMI) model by silencing *miR-384-5p* gene expression, and were pretreated with BCF. qRT-PCR was used to detect the expressions of *LncRNA MIAT*, *miR-384-5p* and autophagy-related genes; Dual luciferase reporter gene experiment and RNA antisense purification (RAP) experiment were used to verify that *LncRNA MIAT* and *miR-384-5p* targeting

收稿日期: 2022-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760726); 国家自然科学基金资助项目 (82060659)

作者简介: 苏文晓, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为心肌缺血损伤的药物干预及分子机制。E-mail: 1063013501@qq.com

*通信作者: 简 洁, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为心肌缺血损伤的药物干预及分子机制。E-mail: 251181281@qq.com

relationship; ELISA method was used to detect cardiac troponin-I (cTn-I) levels in supernatant of cells and serum of rats; CCK-8 method was used to detect cell viability; Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the number of phagosomes; Autophagy flux was detected by infecting cells with autophagy double-labeled adenovirus Ad-mRFP-GFP-LC3; Myocardial infarction size was detected by TTC staining; Expressions of autophagy-related proteins was detected by Western blotting. **Results** Compared with OGD group, BCF down-regulated *LncRNA MIAT* and up-regulated *miR-384-5p* gene expressions ($P < 0.05, 0.01$), increased myocardial cells viability ($P < 0.01$), decreased cTn-I level ($P < 0.001$), down-regulated *Beclin1*, *Cathepsin D*, *LC3* gene and protein expressions ($P < 0.05, 0.01$), decreased the number of autophagosomes ($P < 0.01$), and reduced autophagic flux ($P < 0.01$). The results of dual-luciferase reporter gene and RAP assay showed that *LncRNA MIAT* targeted and negatively regulated the expression of *miR-384-5p*. Knockdown of *LncRNA MIAT* could inhibit autophagy and alleviate myocardial hypoxia injury; Compared with BCF pretreatment, knockdown of *LncRNA MIAT* significantly enhanced the effect of BCF on autophagy inhibition and myocardial protection ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with AMI + BCF group, after silencing *miR-384-5p* and then giving BCF treatment, myocardial infarction area of rats was significantly increased ($P < 0.01$), cTn-I level in serum was significantly increased ($P < 0.01$), autophagy-related gene and protein expressions in cardiac tissue were significantly up-regulated ($P < 0.01$), and myocardial ischemia injury was aggravated. **Conclusion** BCF alleviates myocardial hypoxic injury by inhibits autophagy through *LncRNA MIAT*/*miR-384-5p*.

Key words: *Bauhinia championii* flavones; *LncRNA MIAT*; *miR-384-5p*; myocardial hypoxia injury; autophagy

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 以心肌缺血和缺氧为特征, 其发病率和死亡率高, 严重危害人类健康^[1]。诱发心肌缺血损伤的因素有多种, 包括氧化应激、钙超载、炎症反应、凋亡、自噬和坏死等, 其中自噬在心肌缺血的发生发展中起重要作用。自噬是长寿蛋白和胞质细胞器降解和再循环的重要过程^[2], 在心肌细胞缺血缺氧时抑制自噬有利于心肌细胞的存活, 并减轻心肌损伤^[3]。

九龙藤黄酮 (*Bauhinia championii* flavones, BCF) 是广西民族特色草药九龙藤 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. 的主要活性成分, 本课题组前期研究表明, BCF 具有抗炎、抗氧化的作用, 能够通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路, 抑制细胞凋亡及过度自噬, 抗心肌缺氧损伤^[4-6]; 细胞实验发现上调 *miR-384-5p* 能增强 BCF 抑制自噬的作用^[4], 但在整体动物水平, *miR-384-5p* 对 BCF 的作用尚不明确。

研究表明, 长链非编码 RNA (long non coding RNA, *LncRNA*) 能够发挥微小 RNA (microRNA, *miRNA*) 海绵作用, 竞争性结合 *miRNA* 的反应元件, 进而对其靶基因进行负向调控^[7]。*LncRNA* 心肌梗死相关转录本 (myocardial infarction associated transcript, *MIAT*) 参与了心肌梗死、动脉粥样硬化等多种疾病过程^[8], 如结合 *miR-150* 部分增强心肌肥厚, 结合 *miR-26a* 抗动脉粥样硬化^[9-10], 但 *LncRNA MIAT* 参与心肌梗死的分子机制仍有待深入研究。*LncRNA MIAT* 能否通过“分子海绵吸附”作用结合

miR-384-5p 影响自噬, 参与心肌缺血损伤尚无相关报道, 其对 BCF 的心肌保护作用也未阐明。本研究基于 *LncRNA MIAT*/*miR-384-5p* 信号轴探究 BCF 对心肌缺氧损伤的作用及机制, 为临床治疗心肌缺血损伤提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

大鼠心肌 H9c2 细胞购自上海中科院细胞库, 敲低 *LncRNA MIAT* 基因及空载对照的 H9c2 稳转细胞株购自武汉金凯瑞生物工程有限公司。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 220~240 g, 7 周龄, 购自湖南斯莱克景达动物有限公司, 许可证号 SCKX (湘) 2019-0004。动物于温度 (24±2) °C、相对湿度 (50±10) %、12 h 光照/黑暗交替的环境下适应性饲养 7 d, 自由进食饮水。动物实验经桂林医学院动物伦理委员会批准 (批准号 GLMC201703031)。

1.3 药品与试剂

BCF 由本课题组分离纯化, 总黄酮质量分数以芦丁计为 82%^[11]; 胎牛血清 (批号 SN201909)、高糖及无糖 DMEM (批号 8121382) 购自 Gibco 公司; mRFP-GFP-LC3 腺病毒 (批号 133F082)、CCK-8 试剂盒 (批号 20210323) 购自 Hanbio Biotechnology; 引物购自武汉金凯瑞生物工程有限公司; 电镜固定液 (批号 20210911)、TTC 染色液 (批号 415F031) 购自北京索莱宝科技有限公司; TRNzol Universal Reagent (批号 W9830)、TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (批号 O11208)、PerfectStart Green qPCR SuperMix (批号

P30726) 购自上海全式金生物有限公司; Luciferase Reporter Assay Kit (批号 E2920)、pmirGLO 载体 (批号 E1330) 购自美国 Promega 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 60004-1-Ig) 购自 Proteintech Group; 组织蛋白酶 D (Cathepsin D) 抗体 (批号 DF6486) 购自 Affinity Biosciences; 微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 抗体 (批号 ab192890)、Beclin1 抗体 (批号 ab207612)、p62 抗体 (批号 ab12484)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 ab6721) 购自英国 Abcam 公司; *miR-384-5p* 过表达质粒、antagomir 和空载 pcDNA 由上海吉凯基因医学科技股份有限公司合成; 大鼠肌钙蛋白-I (cardiac troponin-I, cTn-I) ELISA 试剂盒 (批号 20210415) 购自美国 Elabscience 公司。

1.4 仪器

CCL-170B-8 型 CO₂ 培养箱 (ESCO 公司); LAI3T 型厌氧培养箱 (上海龙跃仪器设备有限公司); 荧光显微镜、ELx800 型酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); NanoDrop One 型微量核酸蛋白测定仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); MyGo Pro 型小型荧光定量 PCR 仪 (英国 IT-IS 公司); 化学发光成像系统 (Gene 公司); JEM1200EX 型钨灯丝透射电子显微镜 (TEM, 日本 JEOL 公司); SAR-1000 型小动物呼吸机 (美国 CEW 公司)。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 转染及稳转株筛选 常规复苏 H9c2 细胞, 接种至 24 孔板中。配制 1 mg/mL 的嘌呤霉素母液, 用完全培养基分别稀释至 0.1、0.4、0.8、1.0、1.4、1.8、2.0 μg/mL, 加入 24 孔板中, 放入培养箱中培养, 观察细胞生长状况, 后续以 2.0 μg/mL 的嘌呤霉素筛选稳转株。

取出敲低 *LncRNA MIAT* 基因的慢病毒液, 冰浴融化待用。将病毒液用培养基稀释, 以 1×10^7 /孔加入 24 孔板中, 病毒感染 6 h 后, 更换成 2 mL 完全培养基。继续培养 48 h 后, 将完全培养基更换为含 2.0 μg/mL 嘌呤霉素的完全培养基 (即筛选培养基), 每 2 天更换 1 次筛选培养基, 继续培养, 每日观察。15 d 后收集细胞, 采用 qRT-PCR 检测目的基因表达。稳定细胞株冻存, 得到敲低 *LncRNA MIAT* 基因的稳转株细胞, 同时设置未感染对照细胞 (negative

control, sh-NC)。

2.1.2 细胞培养与模型建立 H9c2 细胞和敲低 *LncRNA MIAT* 及空载对照的稳转株细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞融合度达到 80% 时, 将含血清的高糖 DMEM 换为不含血清的无糖 DMEM 培养基, 放入 5% CO₂、1% O₂、94% N₂ 的厌氧箱中培养 24 h, 建立氧糖剥夺 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 模型^[12]。

2.1.3 分组与给药 设置对照组、OGD (模型) 组、sh-NC 组、sh-MIAT 组、BCF 组、BCF+sh-NC 组和 BCF+sh-MIAT 组, 每组设 5 个复孔。对照组、OGD 组及 BCF 组为 H9c2 细胞, 其余组使用稳转株细胞。实验时根据分组同时培养 H9c2 细胞和敲低 *LncRNA MIAT* 及空载对照的稳转株细胞。除对照组外, 其余各组按 “2.1.2” 项下方法造模, 各给药组造模前加入 BCF (6 μg/mL) 预孵育 4 h, 造模时各给药组培养基换成含有 BCF 的无糖无血清 DMEM 培养基。

2.1.4 qRT-PCR 法检测 *LncRNA MIAT*、*miR-384-5p* 和自噬相关基因表达 取造模后各组细胞, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1, 将 *U6* 作为 *miR-384-5p* 内参, 将 *GAPDH* 作为其他基因内参。

2.1.5 双荧光素酶报告基因和 RNA 反义纯化 (RNA antisense purification, RAP) 实验验证 *LncRNA MIAT* 和 *miR-384-5p* 的靶向关系

(1) 双荧光素酶报告基因实验检测 *LncRNA MIAT* 和 *miR-384-5p* 结合关系: 分别构建含野生型和突变型 3'-UTR 的荧光素酶报告基因质粒, 质粒同 *miR-384-5p* 共转染, 以 PBS 清洗 2 次, 加入

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>LC3</i>	F: ACCCTCTACGATGCTGGTGA R: GCTGTCCTCAATGTCCTTCTG
<i>LncRNA MIAT</i>	F: AGGTCAGGCAGAGGAAGTCA R: CTCCCATAACAACATCACG
<i>Beclin1</i>	F: GCCTCTGAACTGGACACG R: CCTCTTCCTCTGGCTCTCT
<i>GAPDH</i>	F: GACATGCCGCTGGAGAAAC R: AGCCCAGGATGCCCTTTAGT
<i>U6</i>	F: CAAATTCGTGAAGCGTT R: TGGTGTCTGGAGTTCG
<i>miR-384-5p</i>	F: CTCAACTGGTGTCTGGAGT R: AACTCCAGTGGGTGTAAA
<i>Cathepsin D</i>	F: CCGCAGTGTACAGTCGT R: CGTGCCGTCTTCACATAGG

Passive Lysis Buffer 裂解后离心, 吸取上清液至黑色 96 孔板中, 按照试剂盒说明书检测萤火虫荧光素和海肾荧光素的荧光强度。

(2) RAP 实验检测 *LncRNA MIAT* 和 *miR-384-5p* 结合关系: 取 2×10^7 个 H9c2 细胞, 去除培养基后用 PBS 洗涤 1 次, 进行紫外交联, 交联后 DNA 超声破碎。将生物素化的反义探针加入到 *LncRNA*-RAP 系统中, 探针在 65 °C 变性 10 min, 室温杂交 2 h, 然后加入 200 μ L 链霉亲和素包被的磁珠, 提取 RNA 后荧光定量验证 *LncRNA MIAT* 与 *miR-384-5p* 间的相互作用。

2.1.6 CCK-8 法检测细胞活力 H9c2 细胞以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 培养 24 h。按“2.1.2”项下方法进行分组和处理, 造模结束后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育 3 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (*A*) 值。

2.1.7 ELISA 法检测 cTn-I 水平 取造模后各组细胞上清液, 按试剂盒说明书测定上清液 cTn-I 水平。

2.1.8 TEM 观察自噬小体数量 取造模后各组细胞, 4 °C、1000 r/min 离心 5 min, 吸除上清液, 加入 PBS 重悬 10 min, 离心后吸除上清液, 加入电镜固定液后重悬, 4 °C 固定过夜, 将样品装载在 200 目铜网上, 用 TEM 观察自噬小体产生情况。

2.1.9 自噬双标腺病毒 (Ad-mRFP-GFP-LC3) 感染 H9c2 细胞检测自噬流 H9c2 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板, 板中预先铺被细胞爬片, 培养 24 h。每孔加入 5 μ L 腺病毒培养 6 h, 换液, 继续培养 12 h 后建立 OGD 模型。造模结束, 取出 24 孔板, PBS 洗涤 2 次, 加入组织固定液固定 10 min, 以 DAPI 染色后取出细胞爬片, 倒扣在滴加抗荧光淬灭剂的载玻片上, 于荧光显微镜下观察。

2.1.10 Western blotting 法检测自噬相关蛋白表达 取造模后各组细胞, 加入裂解液裂解细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 牛血清白蛋白中封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次, 分别加入 Beclin1、Cathepsin D、LC3、p62 抗体 (1:5000), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 加入二抗孵育 1 h, 洗膜后采用凝胶成像系统拍照。

2.2 动物实验

2.2.1 敲低 *LncRNA MIAT* 对大鼠心脏 *miR-384-5p* 基因表达的影响 大鼠随机分为对照组、AMI (模

型) 组、AMI+si-NC 组及 AMI+si-MIAT 组, 每组 5 只。按文献方法^[6]开胸后用 6-0 带线缝合针结扎冠状动脉前左降支, 建立 AMI 模型, 缺血 24 h。在大鼠左心房注射 10 μ L si-MIAT 或 si-NC (滴度为 1×10^8 T), 取各组大鼠心肌组织, 按“2.1.4”项下方法检测 *miR-384-5p* 基因表达。

2.2.2 沉默 *miR-384-5p* 基因表达逆转 BCF 的抗心肌缺血损伤作用 动物随机分为 sh *miRNA-384-5p* 组、AMI+sh *miRNA-384-5p* 组、AMI+BCF 组和 AMI+BCF+sh *miRNA-384-5p* 组, 每组 5 只。通过在体转染技术^[9]在大鼠左心室注射 10 μ L *miR-384-5p* 抑制剂 (滴度为 1×10^8 T), 转染 24 h。按文献方法^[9]建立 AMI 模型, 缺血 24 h。术前 30 min 舌下静脉给予 BCF (20 mg/kg) 预处理。造模结束后, 取血, 放入 4 °C 冰箱过夜后, 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 收集血清, 按“2.1.7”项下方法测定血清中 cTn-I 水平; 迅速取出大鼠心脏, 切成 2 mm 薄片, 加入 1% TTC 溶液避光孵育 20 min, 染色后用 4% 多聚甲醛固定过夜, 于显微镜下观察心肌梗死情况; 取心脏组织, 按“2.1.4”项下方法检测自噬相关基因表达, 按“2.1.10”项下方法检测自噬相关蛋白表达。

2.3 统计学分析

应用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t* 检验法用于两组之间比较, 单因素方差分析法用于多组间比较。

3 结果

3.1 BCF 下调 *LncRNA MIAT* 并上调 *miR-384-5p* 基因表达

如图 1 所示, 与对照组比较, OGD 组细胞中 *LncRNA MIAT* 基因表达显著上调 ($P < 0.01$), *miR-384-5p* 基因表达显著下调 ($P < 0.01$); 与 OGD 组比较, BCF 组细胞中 *LncRNA MIAT* 基因表达显著下调 ($P < 0.01$), *miR-384-5p* 基因表达显著上调 ($P < 0.05$)。

3.2 *LncRNA MIAT* 靶向调控 *miR-384-5p*

双荧光素酶报告基因实验结果显示 (图 2), 共转 *miRNA-384-5p* 和 *LncRNA MIAT*-WT 后荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.001$), 说明 *miRNA-384-5p* 与 *LncRNA MIAT* 互作。RAP 实验进一步验证两者的作用关系 (图 2-C), *miRNA-384-5p* 被 *LncRNA MIAT* 探针富集, 表明 *LncRNA MIAT* 与 *miR-384-5p* 存在相互作用。如图 2-D、E 所示, 与 sh-NC 组比

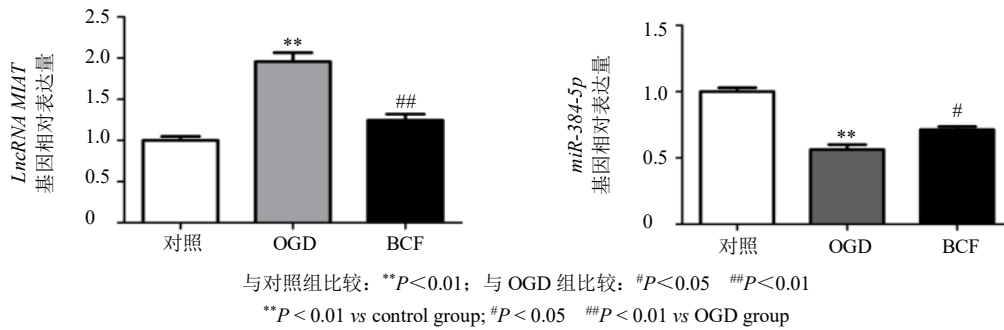
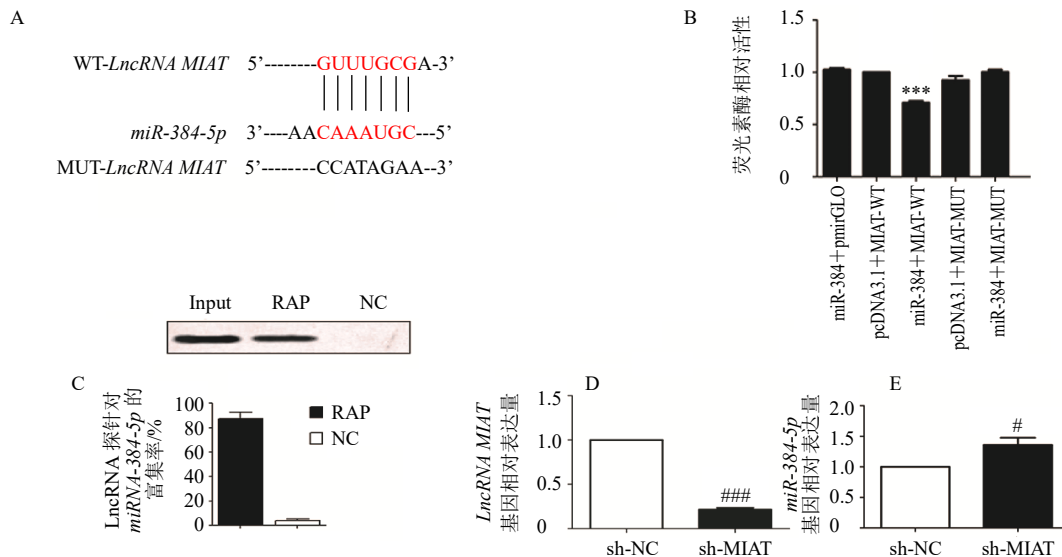


图 1 BCF 下调 *LncRNA MIAT* (A) 并上调 *miR-384-5p* (B) 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 BCF down-regulated *LncRNA MIAT* (A) and up-regulated *miR-384-5p* (B) gene expressions ($\bar{x} \pm s, n=5$)



A-*LncRNA MIAT* 和 *miR-384-5p* 的潜在结合序列 B-双荧光素酶报告基因实验验证 *LncRNA MIAT* 和 *miR-384-5p* 的靶向关系 C-RAP 实验验证 *LncRNA MIAT* 和 *miR-384-5p* 的靶向关系 D-qRT-PCR 检测敲低 *LncRNA MIAT* 后 *LncRNA MIAT* 基因表达 E-qRT-PCR 检测敲低 *LncRNA MIAT* 后 *miR-384-5p* 基因表达 与 pcDNA3.1+MIAT-WT 组比较: *** $P<0.001$; 与 sh-NC 组比较: # $P<0.05$ ### $P<0.001$

A-potential binding sequence of *LncRNA MIAT* and *miR-384-5p* B-targeting relationship between *LncRNA MIAT* and *miR-384-5p* verified by dual luciferase reporter gene experiment C-targeting relationship between *LncRNA MIAT* and *miR-384-5p* verified by RAP experiment D-*LncRNA MIAT* gene expression after knockdown of *LncRNA MIAT* detected by qRT-PCR E-*miR-384-5p* gene expression after knockdown of *LncRNA MIAT* detected by qRT-PCR *** $P<0.001$ vs pcDNA3.1 + MIAT-WT group; # $P<0.05$ ### $P<0.001$ vs sh-NC group

图 2 *LncRNA MIAT* 靶向调控 *miR-384-5p* ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 *LncRNA MIAT* targets *miR-384-5p* ($\bar{x} \pm s, n=5$)

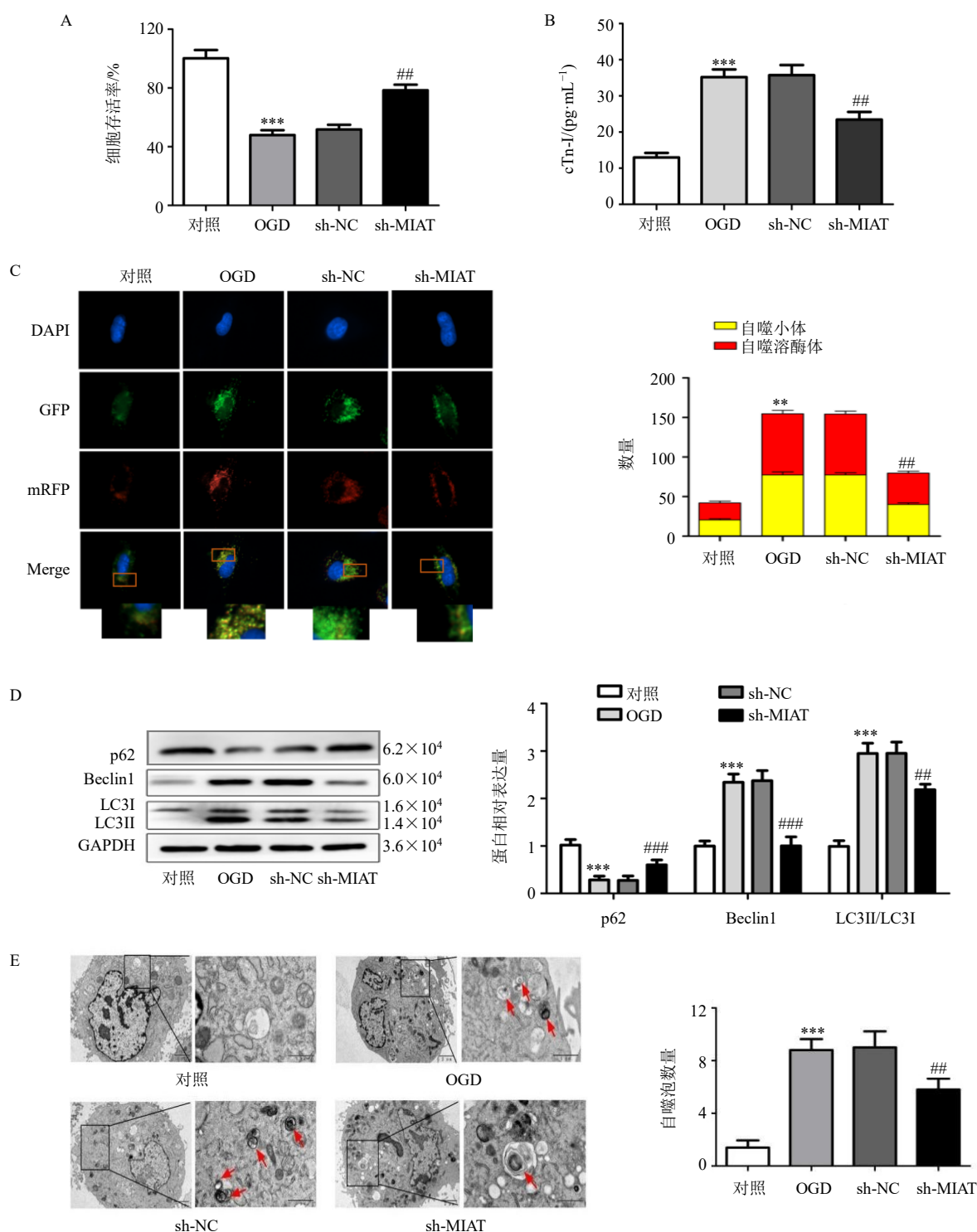
较, 敲低 *LncRNA MIAT* 后 *LncRNA MIAT* 基因表达降低 ($P<0.001$), 而 *miRNA-384-5p* 基因表达升高 ($P<0.05$)。上述结果表明 *miR-384-5p* 是 *LncRNA MIAT* 的靶基因, 并受到 *LncRNA MIAT* 的负调控。

3.3 敲低 *LncRNA MIAT* 抑制自噬减轻心肌缺氧损伤

如图 3-A、B 所示, 与对照组比较, OGD 组细胞存活率显著降低 ($P<0.001$), 心肌缺血损伤标志物 cTn-I 水平显著升高 ($P<0.001$); 敲低 *LncRNA MIAT* 能够提高 H9c2 细胞存活率 ($P<0.01$), 降低 cTn-I 水平 ($P<0.01$), 提示下调 *LncRNA MIAT* 能

减轻 OGD 诱导的心肌缺氧损伤。

进一步验证 *LncRNA MIAT* 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞自噬的影响, 如图 3-C~E 所示, 与对照组比较, OGD 组自噬小体及自噬溶酶体数量增多 ($P<0.01$), Beclin1 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 值升高 ($P<0.001$), p62 蛋白表达水平降低 ($P<0.001$); 与 sh-NC 组比较, 敲低 *LncRNA MIAT* 后自噬小体及自噬溶酶体数量减少 ($P<0.01$), Beclin1 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 值降低 ($P<0.01$ 、 0.001), p62 蛋白表达水平升高 ($P<0.001$), 表明敲低 *LncRNA MIAT* 能抑制 OGD 诱导的心肌细胞自噬。



A-敲低 *LncRNA MIAT* 对 H9c2 细胞存活率的影响 B-敲低 *LncRNA MIAT* 对 H9c2 细胞上清液中 cTn-I 水平的影响 C-敲低 *LncRNA MIAT* 对自噬流的影响 D-敲低 *LncRNA MIAT* 对自噬相关蛋白表达的影响 E-敲低 *LncRNA MIAT* 对自噬小体产生的影响 (箭头为自噬小体) 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 sh-NC 组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

A-effect of knockdown *LncRNA MIAT* on viability of H9c2 cells B-effect of knockdown *LncRNA MIAT* on cTn-I level in supernatant of H9c2 cells C-effect of knockdown *LncRNA MIAT* on autophagic flux D-effect of knockdown *LncRNA MIAT* on expression of autophagy-related proteins E-effect of knockdown *LncRNA MIAT* on production of autophagosomes (arrow showed autophagosome) ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs sh-NC group

图3 敲低 *LncRNA MIAT* 抑制自噬减轻心肌缺氧损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Down-regulation of *LncRNA MIAT* inhibited autophagy and alleviated myocardial hypoxia injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.4 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞存活率和上清液中 cTn-I 水平的影响

如图 4 所示, 与 OGD 组比较, BCF 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$), 上清液中 cTn-I 水平显著降低 ($P < 0.001$); 敲低 *LncRNA MIAT* 可增强 BCF 的作用 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.5 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞自噬小体的影响

如图 5 所示, 与 OGD 组比较, BCF 组自噬小体数量显著减少 ($P < 0.01$); 敲低 *LncRNA MIAT* 可增强 BCF 的作用 ($P < 0.01$)。

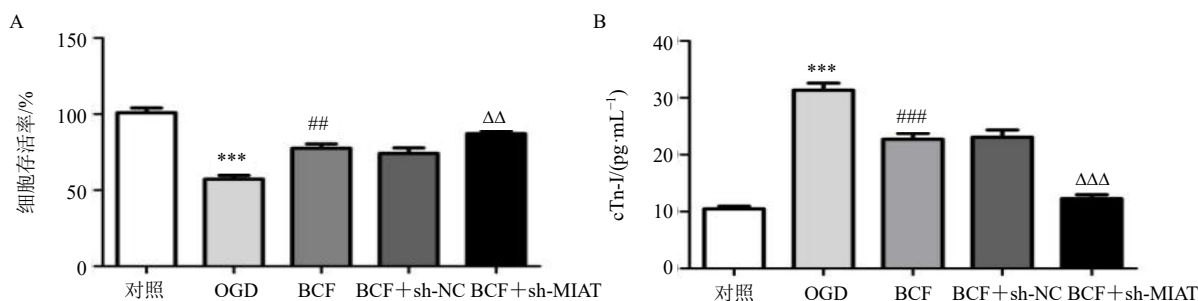
3.6 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞自噬相关基因及蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与 OGD 组比较, BCF 组细胞中

Beclin1、*Cathepsin D* 及 *LC3* 基因表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), *Beclin1* 和 *Cathepsin D* 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), *LC3-II/LC3-I* 值显著降低 ($P < 0.01$); 敲低 *LncRNA MIAT* 可增强 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞自噬的抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.7 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞自噬流的影响

如图 7 所示, 与 OGD 组比较, BCF 组细胞中自噬体和自噬溶酶体数量均显著减少 ($P < 0.01$); 敲低 *LncRNA MIAT* 后自噬体和自噬溶酶体数量进一步减少 ($P < 0.05$), 表明 BCF 通过下调 *LncRNA MIAT* 抑制自噬体和自噬溶酶体的形成, 从而阻滞自噬流。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 OGD 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与 BCF+sh-NC 组相比: Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ ΔΔΔ $P < 0.001$, 图 5~7 同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs OGD group; Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ ΔΔΔ $P < 0.001$ vs BCF+sh-NC group, same as fig. 5~7

图 4 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞存活率 (A) 和上清液中 cTn-I 水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of BCF on viability (A) and cTn-I level (B) in supernatant of H9c2 cells induced by OGD ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

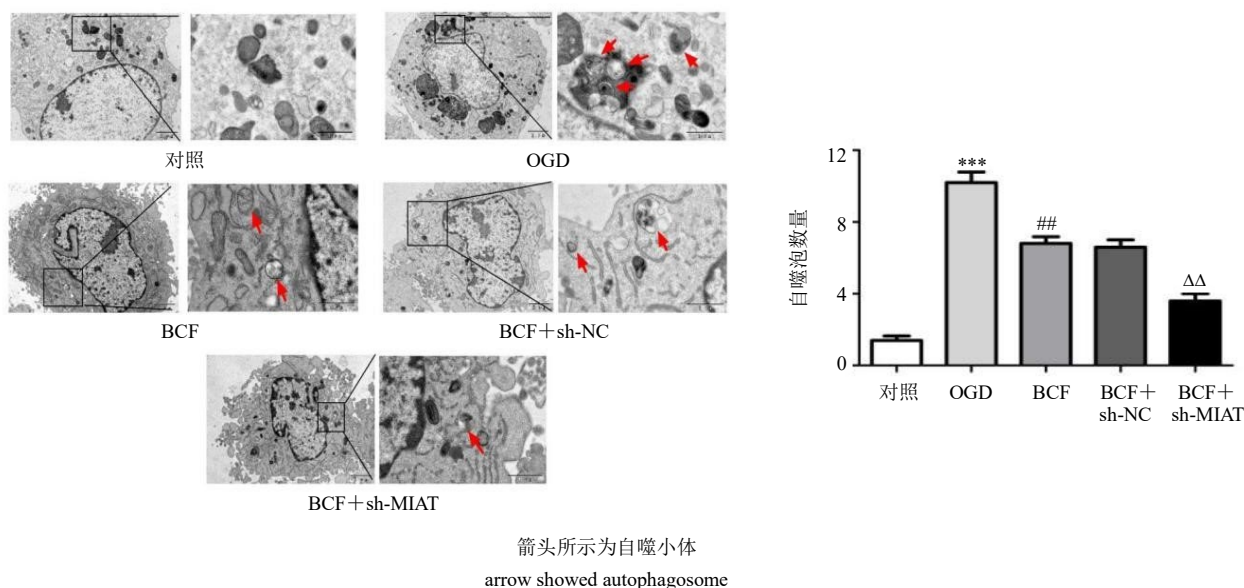


图 5 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞自噬小体的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of BCF on autophagosome of H9c2 cells induced by OGD ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

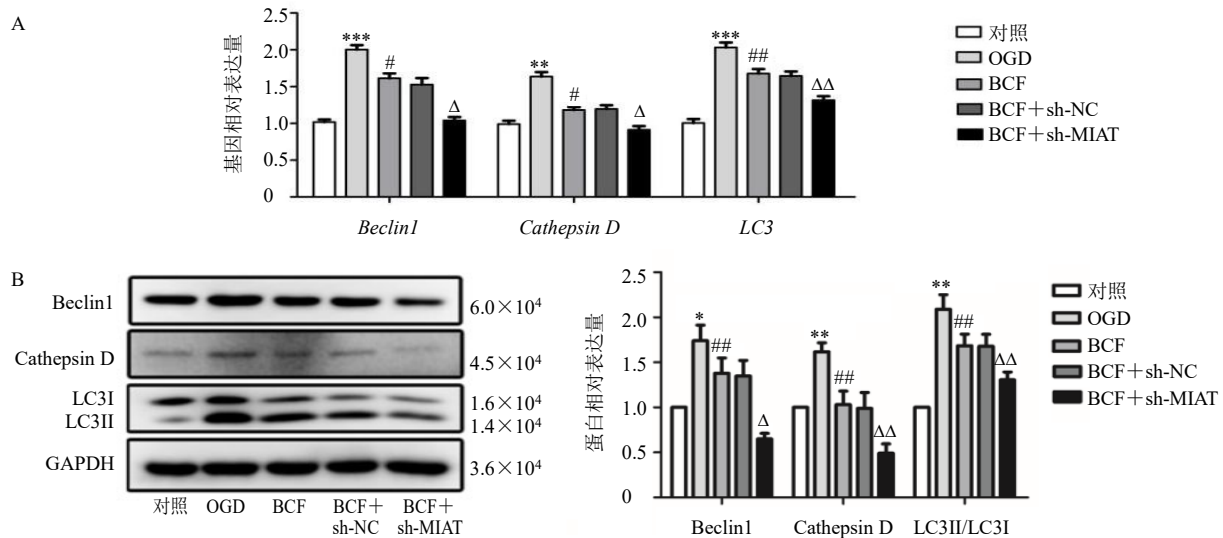


图 6 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞自噬相关基因 (A) 及蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of BCF on autophagy-related gene (A) and protein expressions (B) of H9c2 cells induced by OGD ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

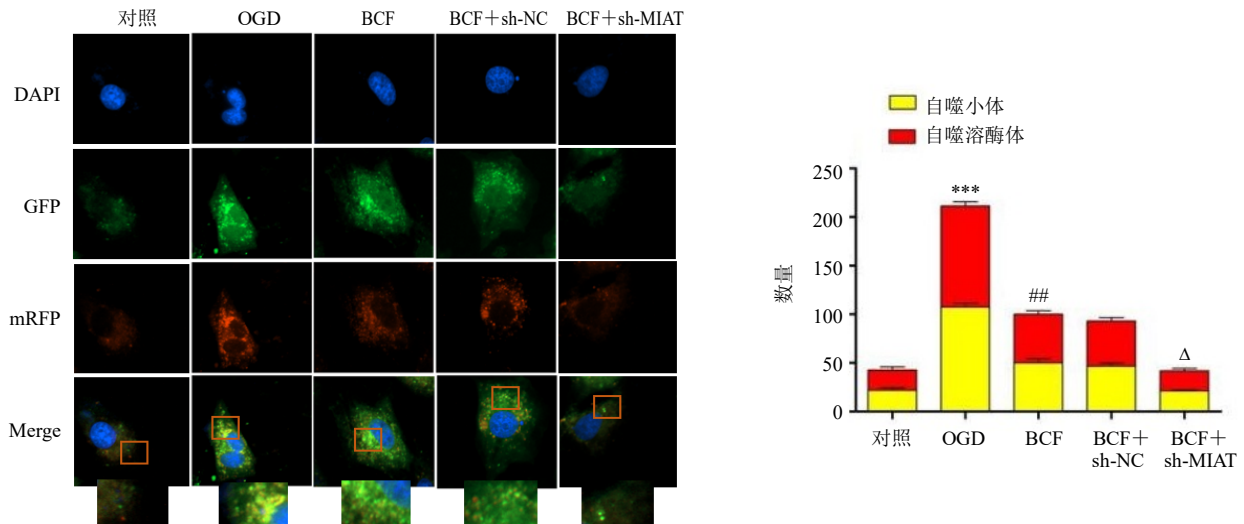


图 7 BCF 对 OGD 诱导的 H9c2 细胞自噬流的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of BCF on autophagic flux of H9c2 cells induced by OGD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 敲低 *LncRNA MIAT* 对大鼠心脏 *miR-384-5p* 基因表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, AMI 组大鼠心脏中 *miR-384-5p* 基因表达显著下调 ($P < 0.001$); 敲低 *LncRNA MIAT* 显著增加心脏中 *miR-384-5p* 基因表达 ($P < 0.05$)。

3.9 沉默 *miR-384-5p* 基因表达逆转 BCF 的抗心肌缺血损伤作用

如图 9 所示, 与 AMI+BCF 组比较, 沉默 *miR-384-5p* 后给予 BCF 处理, 大鼠心肌梗死面积增加, 梗死率显著升高 ($P < 0.01$); 血清中 cTn-I 水平显著升高 ($P < 0.01$), 心脏组织中自噬相关基因及蛋白

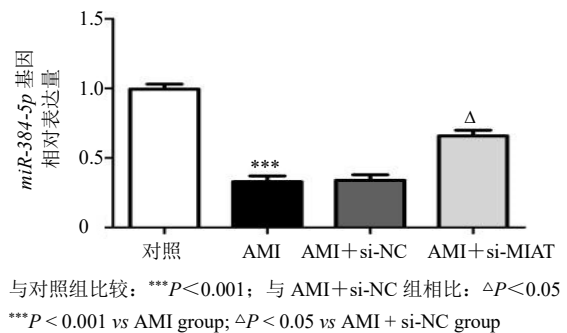
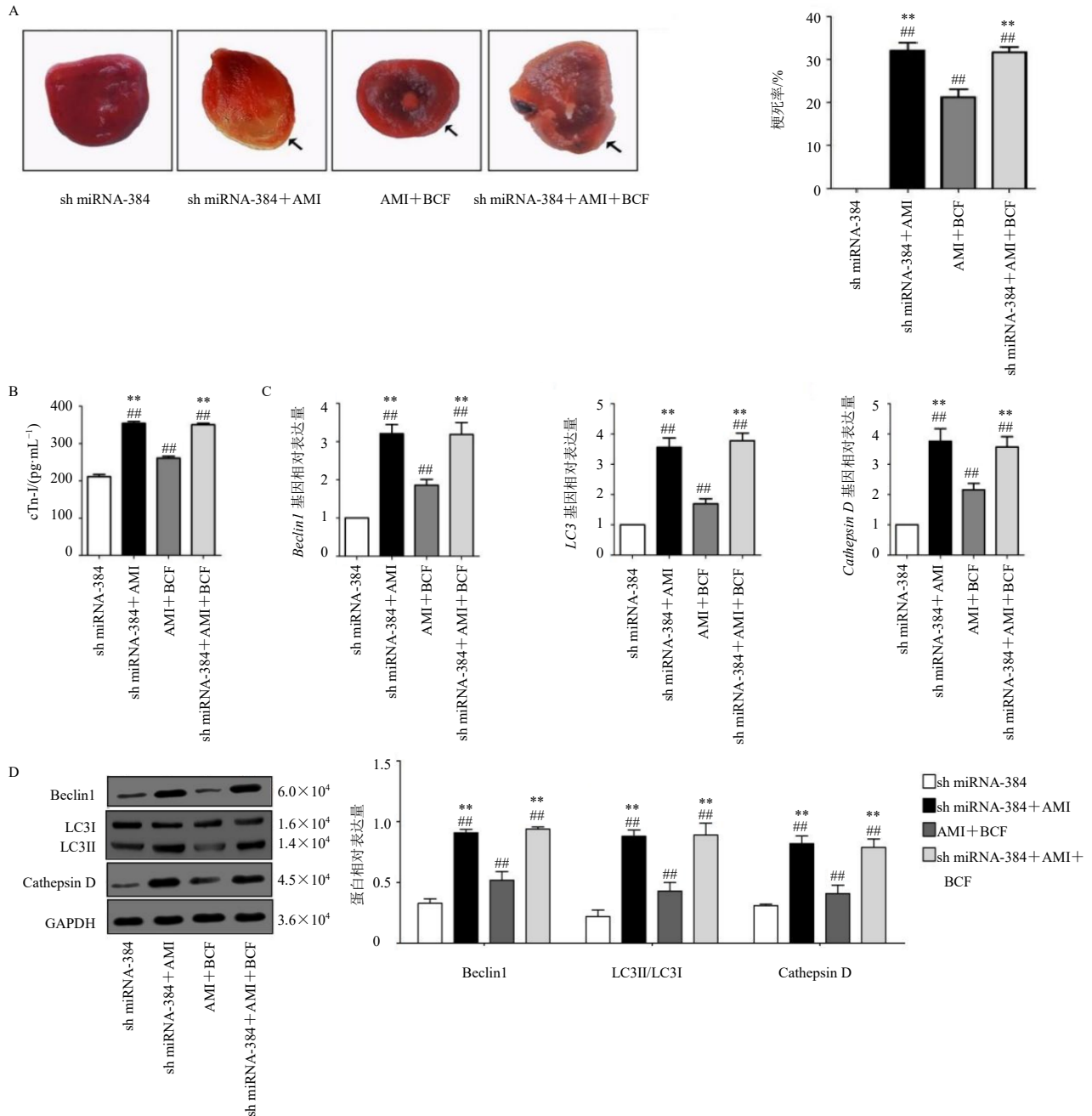


图 8 敲低 *LncRNA MIAT* 后大鼠心脏中 *miR-384-5p* 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 *miR-384-5p* gene expression in heart of rats after silencing *LncRNA MIAT* ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



A-各组大鼠心肌梗死面积 (黑色箭头为心肌梗死区) B-各组大鼠血清中 cTn-I 水平 C-各组大鼠心脏组织中自噬相关基因表达 D-各组大鼠心脏组织中自噬相关蛋白表达 与 sh miRNA-384-5p 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 AMI+BCF 组比较: ^{**} $P < 0.01$

A-myocardial infarction area of rats in each group (black arrow is myocardial infarction area) B-cTn-I level in serum of rats in each group C-expressions of autophagy-related genes in cardiac tissue of rats in each group D-expressions of autophagy-related protein in cardiac tissue of rats in each group ^{##} $P < 0.01$ vs sh miRNA-384-5p group; ^{**} $P < 0.01$ vs AMI + BCF group

图 9 沉默 *miR-384-5p* 基因表达逆转 BCF 的抗心肌缺血损伤作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Silencing *miR-384-5p* gene expression reversed anti-myocardial ischemic injury of BCF ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表达均显著上调 ($P < 0.01$), 心肌缺血损伤加重。

4 讨论

AMI 是一种严重的致命性疾病, 由冠状动脉阻塞引起的心肌缺血损伤是造成患者死亡的原因

之一^[13]。目前, 临床治疗 AMI 的主要方法为经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI), PCI 能够较快且安全地恢复血流再灌注, 但其发病血管仍有急性再闭塞的可能性^[14]。一些活血

化瘀中药具有防治心血管疾病的作用, 深入研究其作用机制, 有望为开发防治 AMI 的药物提供依据。

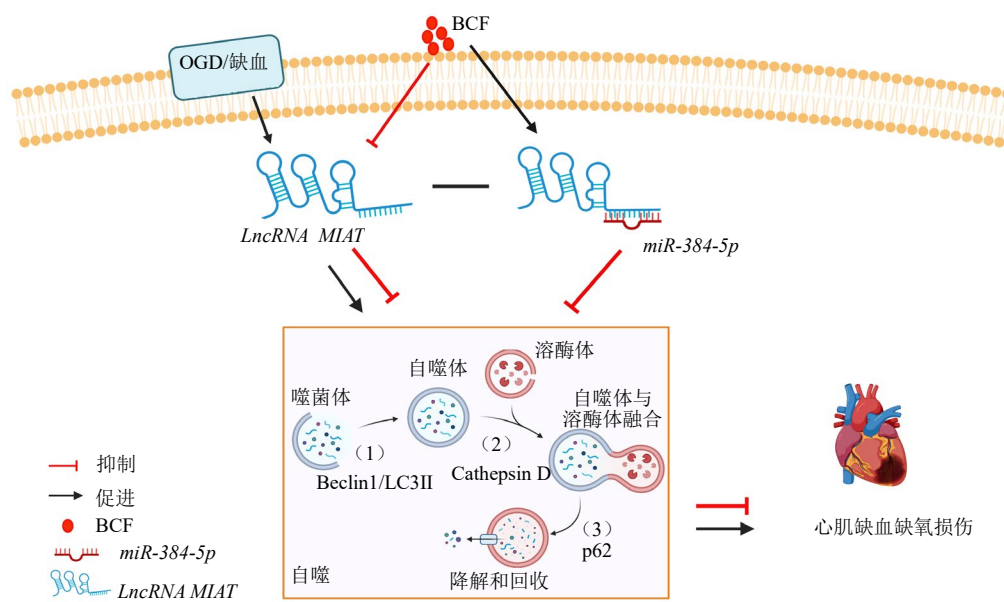
自噬在 AMI 中的发生机制、调控因素及药物干预为近年研究热点^[2]。自噬是一个动态的过程, 包括自噬体形成(一般以 Beclin1、LC3II 为标志)、自噬体与溶酶体融合(一般以 Cathepsin D 为标志)和自噬体的降解(一般以 p62 作为标志)3 个连续的步骤。细胞在正常情况下很少发生自噬, 而内质网应激、缺血缺氧等常诱导自噬^[3]。九龙藤是一种传统的中草药和功能性食品, 性平低毒, BCF 是其茎提取物的主要活性成分, 研究发现 BCF 可抗氧化、抑制细胞凋亡和自噬、减轻心肌缺血缺氧损伤^[5-6], 但其具体的分子机制尚不清楚。本课题组前期研究表明 *miR-384-5p* 负调控 Beclin1 表达抑制自噬, 过表达 *miR-384-5p* 可增强 BCF 的心肌保护作用^[4]。本研究亦发现 OGD 诱导的 H9c2 细胞给予 BCF 预处理后, *miR-384-5p* 基因表达上调, 提示 *miR-384-5p* 可能参与了 BCF 抑制自噬的作用。

以双荧光素酶报告基因实验和 RAP 实验探析 *miR-384-5p* 的上游靶点, 结果显示, *LncRNA MIAT* 负靶向调控 *miR-384-5p*。作为 AMI 的危险等位基因, *LncRNA MIAT* 在 AMI 患者和小鼠血浆中高表达^[15-16], 但 *LncRNA MIAT* 在 OGD 诱导的 H9c2 细

胞中的作用尚未见报道。本研究发现, OGD 诱导的 H9c2 细胞中 *LncRNA MIAT* 表达上调, 敲低 *LncRNA MIAT* 可提高心肌细胞活力、降低 cTn-I 水平、减少自噬小体和自噬溶酶体数量、降低 Beclin1 蛋白表达及 LC3-II/LC3-I 值、增加 p62 蛋白表达、抑制心肌缺氧损伤。为进一步验证 BCF 是否通过影响 *LncRNA MIAT* 发挥心肌保护作用, 在敲低 *LncRNA MIAT* 基因的心肌细胞稳转株中给予 BCF 预处理, 结果显示, 与单纯 BCF 预处理相比, 合并敲低 *LncRNA MIAT* 后, BCF 抑制自噬和减轻心肌缺氧损伤的作用显著增强, 说明 *LncRNA MIAT* 可能是 BCF 发挥心肌保护作用的重要靶点。

为进一步验证 *miR-384-5p* 对 BCF 作用的影响, 构建 AMI 动物模型, 并通过在体转染方式, 沉默大鼠 *miR-384-5p* 基因表达。结果显示, 沉默 *miR-384-5p* 逆转了 BCF 抑制自噬的作用, 加重了大鼠心肌缺血损伤, 提示 BCF 抗心肌缺血损伤作用可能与上调 *miR-384-5p* 基因表达有关。

综上所述, 本研究发现 BCF 通过 *LncRNA MIAT/miR-384-5p* 抑制自噬减轻心肌缺氧损伤(图 10)。由于 *LncRNA MIAT* 全长序列为 8474 bp, 序列太长, 过表达后极有可能造成细胞死亡, 因此本研究未对过表达 *LncRNA MIAT* 情况进行分析。后续将



机制图在 BioRender 网站绘制

Mechanism diagram was created with BioRender website

图 10 BCF 通过 *LncRNA MIAT/miR-384-5p* 轴抑制自噬减轻心肌缺血缺氧损伤

Fig. 10 BCF alleviated myocardial ischemia and hypoxia injury by inhibiting autophagy through *LncRNA MIAT/miR-384-5p* axis

进一步在体内验证 BCF 下调 *LncRNA MIAT* 抑制自噬减轻心肌缺血损伤的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Su Q, Liu Y, Lv X W, *et al.* Inhibition of lncRNA TUG1 upregulates *miR-142-3p* to ameliorate myocardial injury during ischemia and reperfusion via targeting HMGB1- and Rac1-induced autophagy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133: 12-25.
- [2] Liu C Y, Zhang Y H, Li R B, *et al.* LncRNA CAIF inhibits autophagy and attenuates myocardial infarction by blocking p53-mediated myocardin transcription [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 29.
- [3] Zhang C, Liang R G, Gan X W, *et al.* *microRNA-384-5p/beclin-1* as potential indicators for epigallocatechin gallate against cardiomyocytes ischemia reperfusion injury by inhibiting autophagy via PI3K/Akt pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 3607-3623.
- [4] 杨秀芳. 基于 *miR-384-5p/Beclin 1* 信号轴探讨九龙藤总黄酮抑制自噬抗心肌缺血损伤的作用 [D]. 桂林: 桂林医学院, 2020.
- [5] 方瑜. 九龙藤总黄酮对垂体后叶素致大鼠急性心肌缺血的保护作用及机制研究 [D]. 桂林: 桂林医学院, 2014.
- [6] 禰霏霏. 九龙藤总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 PI3K/Akt 信号通路的调控作用及机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- [7] Long Y, Wang L, Li Z. SP1-induced SNHG14 aggravates hypertrophic response in *in vitro* model of cardiac hypertrophy via up-regulation of PCDH17 [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7115-7126.
- [8] Ye Z M, Yang S, Xia Y P, *et al.* LncRNA MIAT sponges *miR-149-5p* to inhibit efferocytosis in advanced atherosclerosis through CD47 upregulation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 138.
- [9] Zeng Z C, Pan Y, Wu W, *et al.* Myocardial hypertrophy is improved with berberine treatment via long non-coding RNA MIAT-mediated autophagy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(12): 1822-1831.
- [10] Tian S G, Yuan Y, Li Z, *et al.* LncRNA UCA1 sponges *miR-26a* to regulate the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Gene*, 2018, 673: 159-166.
- [11] Xuan F F, Jian J, Qin F Z, *et al.* *Bauhinia championii* flavone inhibits apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2015, 9: 5933-5945.
- [12] 齐献忠, 邢英瀛, 张小林, 等. 葛根素通过 circ-TLK1/*miR-367-3p*/TLR4 抑制 SK-N-SH 细胞氧糖剥夺损伤 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3286-3295.
- [13] Mao Q, Liang X L, Zhang C L, *et al.* LncRNA KLF3-AS1 in human mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorates pyroptosis of cardiomyocytes and myocardial infarction through *miR-138-5p/Sirt1* axis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 393.
- [14] Giannini F, Candilio L, Mitomo S, *et al.* A practical approach to the management of complications during percutaneous coronary intervention [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2018, 11(18): 1797-1810.
- [15] Azat M, Huojiahemaiti X, Gao R R, *et al.* Long noncoding RNA MIAT: A potential role in the diagnosis and mediation of acute myocardial infarction [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(6): 5216-5222.
- [16] Zhou J, Zhou Y, Wang C X. LncRNA-MIAT regulates fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) by mediating the expression of *miR-29a-3p* [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 11: 7265-7275.

[责任编辑 李亚楠]