

# LINC00926通过募集ELAVL1促进低氧诱导的人脐静脉血管内皮细胞焦亡

姜勇<sup>1</sup>,葛文婷<sup>1</sup>,赵莹<sup>2</sup>,吴煜格<sup>1</sup>,霍一鸣<sup>1</sup>,潘岚婷<sup>1</sup>,曹爽<sup>3</sup>

吉林医药学院<sup>1</sup>检验学院,<sup>3</sup>临床医学院,吉林 吉林 132013;<sup>2</sup>吉林市中心医院心内科,吉林 吉林 132011

**摘要:**目的 探讨长链非编码RNA LINC00926对低氧诱导的人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)焦亡的调控作用及分子机制。方法 低氧(5% O<sub>2</sub>)处理HUVECs细胞体外模拟冠心病。实验将HUVECs细胞分为常氧对照组(Normal)、转染空载质粒组(OE-NC)、转染LINC00926过表达质粒组(OE-LINC00926)、低氧处理组(Hypoxia)、Hypoxia+OE-NC对照组、Hypoxia+OE-LINC00926组、Hypoxia+si-Ctrl对照组、Hypoxia+si-ELAVL1组、Hypoxia+si-ELAVL1+OE-LINC00926组。应用RT-qPCR及Western blot检测LINC00926和ELAVL1的表达情况。采用CCK-8法检测细胞增殖情况,ELISA法检测炎症因子IL-1 $\beta$ 水平,Western blot检测焦亡相关蛋白caspase1、cleaved-caspase1和NLRP3的蛋白表达水平。应用RIP实验验证LINC00926与ELAVL1的结合情况。结果 与Normal组相比,低氧处理上调了HUVECs中LINC00926的mRNA表达和ELAVL1的蛋白表达( $P<0.05$ ),但不影响ELAVL1的mRNA表达。与Normal组相比,过表达LINC00926可抑制HUVECs细胞增殖( $P<0.05$ ),提高了HUVECs中炎症因子IL-1 $\beta$ 水平( $P<0.05$ )以及焦亡相关蛋白(caspase1、cleaved-caspase1和NLRP3)的表达( $P<0.05$ )。在低氧处理的HUVECs中,过表达LINC00926可以进一步提高低氧处理上调的ELAVL1蛋白水平。RIP实验结果证实了LINC00926与ELAVL1蛋白的结合关系。在低氧诱导的HUVECs中,敲低ELAVL1可降低IL-1 $\beta$ 水平和焦亡相关蛋白(caspase1、cleaved-caspase1、NLRP3)的表达( $P<0.05$ ),而LINC00926过表达可部分逆转敲低ELAVL1的影响。结论 在低氧处理的HUVECs中,LINC00926通过募集ELAVL1促进HUVECs细胞焦亡。

**关键词:**LINC00926;ELAVL1;人脐静脉血管内皮细胞;细胞焦亡;冠心病

## LINC00926 promotes pyroptosis of hypoxia-induced human umbilical vein vascular endothelial cells by recruiting ELAVL1

JIANG Yong<sup>1</sup>, GE Wenting<sup>1</sup>, ZHAO Ying<sup>2</sup>, WU Yuge<sup>1</sup>, HUO Yiming<sup>1</sup>, PAN Lanting<sup>1</sup>, CAO Shuang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, <sup>3</sup>College of Clinical Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013, China; <sup>2</sup>Department of Cardiology, Jilin Central Hospital, Jilin 132011, China

**Abstract: Objective** To investigate the regulatory role of the long non-coding RNA LINC00926 in pyroptosis of hypoxia-induced human umbilical vein vascular endothelial cells (HUVECs) and explore the molecular mechanism. **Methods** HUVECs were transfected with a LINC00926-overexpressing plasmid (OE-LINC00926), a siRNA targeting ELAVL1, or both, followed by exposure to hypoxia (5% O<sub>2</sub>) or normoxia. The expression of LINC00926 and ELAVL1 in hypoxia-treated HUVECs was detected using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting. Cell proliferation was detected using Cell Counting Kit-8 (CCK-8), and the levels of IL-1 $\beta$  in the cell cultures was determined with ELISA. The protein expression levels of pyroptosis-related proteins (caspase-1, cleaved caspase-1 and NLRP3) in the treated cells were analyzed using Western blotting, and the binding between LINC00926 and ELAVL1 was verified with RNA immunoprecipitation (RIP) assay. **Results** Exposure to hypoxia obviously up-regulated the mRNA expression of LINC00926 and the protein expression of ELAVL1 in HUVECs, but did not affect the mRNA expression of ELAVL1. LINC00926 overexpression in the cells significantly inhibited cell proliferation, increased IL-1 $\beta$  level and enhanced the expressions of pyroptosis-related proteins (all  $P<0.05$ ). LINC00926 overexpression further up-regulated the protein expression of ELAVL1 in hypoxia-exposed HUVECs. The results of RIP assay confirmed the binding between LINC00926 and ELAVL1. ELAVL1 knockdown significantly decreased IL-1 $\beta$  level and the expressions of pyroptosis-related proteins in hypoxia-exposed HUVECs ( $P<0.05$ ), while LINC00926 overexpression partially reversed the effects of ELAVL1 knockdown. **Conclusion** LINC00926 promotes pyroptosis of hypoxia-induced HUVECs by recruiting ELAVL1.

**Keywords:** lncRNA LINC00926; ELAVL1; human umbilical vein vascular endothelial cells pyroptosis; coronary heart disease

冠心病是由冠状动脉粥样硬化引起血管阻塞,使心肌缺血、缺氧或坏死。冠心病是全球范围内人类死亡的主要致死病因之一,它严重危害人类生命和健康。血管内皮在血管腔内起着保护和稳定作用,内皮功能发生损伤及障碍时,就是冠心病发作的起始环节<sup>[1,2]</sup>。而内皮细胞损伤和炎症是导致血管内皮功能障碍的主要因素<sup>[3]</sup>。因此,探究内皮细胞损伤和炎症的发生机制意义重大。

长链非编码RNA (lncRNA)是一类几乎没有编码功能性蛋白能力的RNA,与人类的许多疾病密切相关

收稿日期:2022-09-20

基金项目:吉林省教育厅项目(JJKH20230543KJ,JJKH20180828KJ);大学生创新训练项目(S202213706028,202013706037);吉林省科技厅项目(20180101105JC)

作者简介/通信作者:姜勇,博士,教授, E-mail: jiangyongpost@sina.com

关。研究表明 lncRNA 在调节内皮细胞功能和血管炎症中发挥重要作用<sup>[4,5]</sup>。Liao 等<sup>[6]</sup>采用高通量测序方法鉴定冠心病患者与健康对照之间差异表达的 lncRNA, 结果发现 LINC00926 在冠心病患者外周血液中高表达, 提示 LINC00926 可能参与冠心病的发生发展。然而, 目前还未见文献报道关于 LINC00926 对冠心病以及血管内皮细胞功能的影响。对 LINC00926 的预测分析显示 LINC00926 可与 RNA 结合蛋白 ELAVL1 进行结合。

胚胎致死性异常视觉类蛋白 1 (ELAVL1) 也称人类抗原 R (HuR), 是一种可以稳定 mRNA 的 RNA 结合蛋白。有研究表明, 在人脐静脉血管内皮细胞 (HUVECs) 中, ELAVL1 在 NLRP3 炎症小体激活过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。近年来, 细胞焦亡被发现并证实是一种细胞程序性死亡的过程, 在高血脂、高血糖等刺激下 NLRP3 炎症小体被激活, 促使炎症因子如 IL-18 和 IL-1 $\beta$  的激活<sup>[8,9]</sup>, 进而引发细胞焦亡。已有文献表明细胞焦亡在冠心病的发展进程中有着至关重要的影响<sup>[10,11]</sup>。LINC00926 是否可以通过与 ELAVL1 结合从而影响血管内皮细胞焦亡, 目前还未见文献报道。本研究通过低氧处理

HUVECs, 探讨 LINC00926 与 ELAVL1 之间的相互作用, 以及对 HUVECs 细胞焦亡的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和主要试剂

HUVECs (CTCC); RPMI 1640 培养基 (Hyclone); 胎牛血清 (FBS) 购自 Lonsera; LINC00926 过表达载体 (江苏赛索飞生物科技有限公司); siRNA (北京欧林格生物科技有限公司); Lipofectamine 2000 (Invitrogen); RNAliquid 超速全血 (液体样本) 总 RNA 提取试剂盒购自艾德莱 (RN23); BCA 蛋白定量试剂盒 (Biosharp); 兔抗 ELAVL1 抗体、兔抗 caspase-1 抗体、兔抗 NLRP3 抗体 (Abcam); 兔抗 cleaved-caspase-1 抗体 (Affinity); 小鼠抗 GAPDH 抗体 (Proteintech); 辣根酶标记山羊抗兔/小鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); ECL 发光液 (北京鼎国); 96 孔培养板 (Costa); CCK-8 (碧云天); IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (Abcam); Protein-A/G 包被的磁珠 (YEASAN (36417ES03)); 蛋白酶 K (Solarbio); 引物由上海生工公司 Primer Premier 5.0 软件设计、合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequence

Primer	Sequence (5'-3')
LINC00926 (human)-F	AGTAGGGACGAGGTTTCAC
LINC00926 (human)-R	CAGCCATTCATCTCACA
ELAVL1-F	TTGACAAACGGTCGGAGGCAGAAGA
ELAVL1-R	AGATGAAAATGCACCAGCCGGAGGA
Gapdh (human)-F	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG
Gapdh (human)-R	AGGGGCCATCCACAGTCTTC

### 1.2 细胞培养和分组

HUVECs 培养于含有 10% FBS 的 RPMI 1640 中, 放置在 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱中。观察细胞生长, 等到其融合度达到 80% 以上时, 选取生长良好的 HUVECs 进行传代培养。用适量 0.25% 胰酶溶液消化细胞, 并调整细胞至适宜浓度 (1 × 10<sup>5</sup> /mL)。将 HUVECs 细胞接种于 96 孔板上 (100  $\mu$ L/孔), 在培养箱内孵育 24 h。Hypoxia 组放入缺氧 (5% O<sub>2</sub>) 培养箱中孵育 24 h。Normal 组在常氧条件下培养。将 LINC00926 过表达载体和空载质粒转染 HUVECs 细胞, 设为 OE-NC 组和 OE-LINC00926 组。之后将转染过表达载体的细胞放入缺氧 (5% O<sub>2</sub>) 培养箱中培养 24 h, 设为 Hypoxia+OE-NC 组和 Hypoxia+OE-LINC00926 组。siRNA-NC 组, siRNA-ELAVL1-1 组, siRNA-ELAVL1-2 组, siRNA-

ELAVL1-3 组分别转染对照 siRNA 和不同干扰序列的 siRNA-ELAVL1-1、siRNA-ELAVL1-2、siRNA-ELAVL1-3。为了验证 LINC00926 和 ELAVL1 之间的调控作用, 将细胞分为 Normal, Hypoxia, Hypoxia+si-Ctrl, Hypoxia + siRNA-ELAVL1, Hypoxia + siRNA-ELAVL1+OE-LINC00926 组。前 4 组的处理按之前描述, 最后一组将细胞共转染 siRNA-ELAVL1 和过表达 LINC00926, 然后进行低氧处理。

### 1.3 细胞转染

转染前 1 d, 选取处于对数生长期的 HUVECs 细胞, 浓度调整为 1 × 10<sup>5</sup> cells/mL, 将细胞以 500  $\mu$ L/孔加入 24 孔培养板, 于培养箱内孵育 24 h。观察细胞达到 80% 生长密度时, 按照产品使用说明书, 用 Lipofectamine 2000 进行细胞转染。共转染 siRNA-ELAVL1 和 LINC00926

过表达质粒时,分别用无血清培养基稀释 LINC00926 过表达质粒/空载质粒、siRNA-ELAVL1/ siRNA-NC 和 Lipofectamine 2000,将三者混匀,20 min 后形成转染复合物。吸掉培养孔中的上清液并清洗细胞,之后每孔加入培养基及转染复合物各 50  $\mu\text{L}$ 。于培养箱(37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ )内孵育 4~6 h 后(Hypoxia 组细胞按照组别放入缺氧(5% $\text{O}_2$ )培养箱),弃上清液,加入 100  $\mu\text{L}$  培养基继续培养 24 h 后收集细胞用于 RT-qPCR 分析;48 h 后收集细胞用于 Western blot 检测。

#### 1.4 实时荧光定量 PCR

Trizol 试剂用于提取细胞中总 RNA。紫外分光光度计用来检测 RNA 纯度。此外,运用 1% 琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的完整性。逆转录反应中采用第一链 cDNA 合成试剂盒。反应结束后,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存 cDNA 备用。反应体系:SYBR Green qPCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 正反向引物各 1  $\mu\text{L}$ ,cDNA 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件:94  $^{\circ}\text{C}$  10 min,(94  $^{\circ}\text{C}$  20 s,55  $^{\circ}\text{C}$  20 s,72  $^{\circ}\text{C}$  20 s)40 个循环。实验结果使用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行分析。以 Gapdh 为内参对照。引物具体序列见表 1。

#### 1.5 Western blot 试验

将 RIPA 裂解液加到收集的各组细胞中,用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。配制 SDS-PAGE 凝胶,取 25  $\mu\text{g}$  蛋白上样,电泳分离。后将目的胶带移至 PVDF 膜上,用 TBST 漂洗膜 3 次后,浸入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中,37  $^{\circ}\text{C}$  缓慢震荡封膜 2 h。再次用 TBST 洗膜后,滴加相应一抗(ELAVL1(1:1000);caspase1(1:1000);cleaved-caspase1(1:1000);NLRP3(1:1000);GAPDH(1:5000))4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。重复洗膜 3 次,加辣根酶标记的二抗(IgG(1:5000))溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  缓慢振荡孵育 1 h。TBST 冲洗 3 次后,加适量 ECL 发光液避光显影,用一体式化学发光成像仪拍摄照片并通过 Image J 软件进行定量分析。

#### 1.6 细胞增殖检测

将转染后的各组细胞浓度调整为  $1 \times 10^5$  /mL,按

100  $\mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔培养板,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱内培养。24 h 后,根据每孔 20  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂的量加进细胞,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  下避光孵育 3 h。然后使用酶标检测仪(Thermo MK3 型)检测吸光度  $A_{450\text{nm}}$  值,并进行细胞生长影响的分析。

#### 1.7 ELISA 试验

根据制造商说明书,使用 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒进行检测。分别将标准品或待测样品、捕获抗体和检测抗体混合物加入到预包被 IL-1 $\beta$  抗体的微孔板中,室温孵育 1 h 后彻底洗涤。然后加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液避光反应,在终止反应后 15 min 内用酶标检测仪测出每个样品的吸光度  $A_{450\text{nm}}$  值。

#### 1.8 RNA 免疫沉淀实验(RIP)

从细胞中提取细胞裂解物,Protein-A/G 包被的磁珠悬液中加入抗体(抗 ELAVL1 或阴性对照 IgG),然后将细胞裂解物中加入包被好抗体的磁珠混合,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。用蛋白酶 K 消化后提取 RNA,获得的 RNA 样品用于 PCR 验证。

#### 1.9 统计学处理

采用 GraphPad Prism 7.0 进行绘图分析。所有实验均重复 3 次,实验数据表示均采用均数 $\pm$ 标准差表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验或者单因素方差分析。 $P < 0.05$  时认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 低氧处理的 HUVECs 中 LINC00926 和 ELAVL1 的表达情况

RT-qPCR 检测结果显示,与 Normal 组比,Hypoxia 组中 LINC00926 的表达水平明显上升( $P < 0.05$ ),而 ELAVL1 的 mRNA 水平不变( $P > 0.05$ ,图 1A)。Western blot 结果表明,Hypoxia 组 ELAVL1 的蛋白水平明显高于 Normal 组( $P < 0.05$ ,图 1B)。

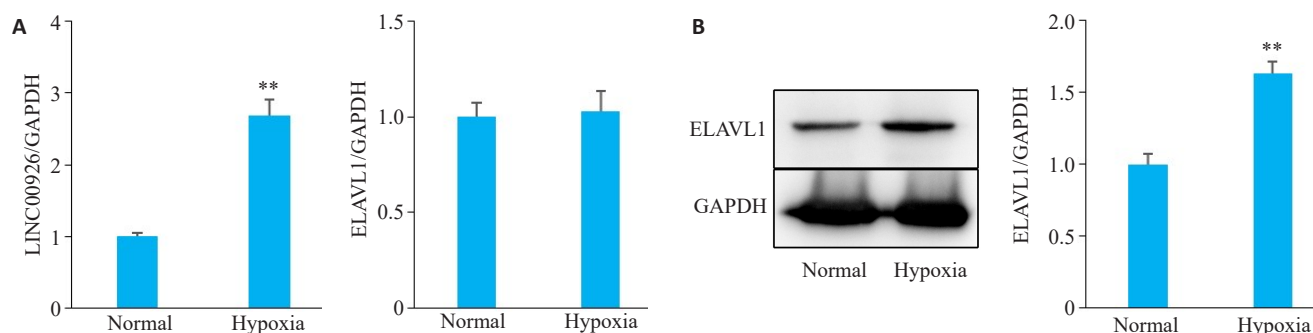


图1 低氧处理的HUVECs中LINC00926和ELAVL1的表达情况

Fig.1 Expression of LINC00926 and ELAVL1 in hypoxia-induced HUVECs. A: mRNA expressions of LINC00926 and ELAVL1 detected by RT-qPCR. B: Protein expressions of ELAVL1 determined by Western blotting. \*\* $P < 0.01$  vs Normal.



### 2.2 过表达LINC00926对HUVECs细胞增殖、细胞焦亡的影响

RT-qPCR分析结果显示,转染LINC00926过表达载体后,HUVEC细胞中LINC00926表达明显增强( $P<0.05$ ,图2A)。CCK-8结果显示,过表达LINC00926明显降低了细胞增殖能力,细胞状态更差,折光性显著

变差,细胞形态不完整( $P<0.05$ ,图2B)。Western blot结果显示,过表达LINC00926组中caspase1、cleaved-caspase1和NLRP3的蛋白水平明显上升( $P<0.05$ ,图2C)。ELISA结果表明,与Normal组相比,过表达LINC00926组的细胞上清液中IL-1 $\beta$ 水平显著升高( $P<0.05$ ,图2D)。

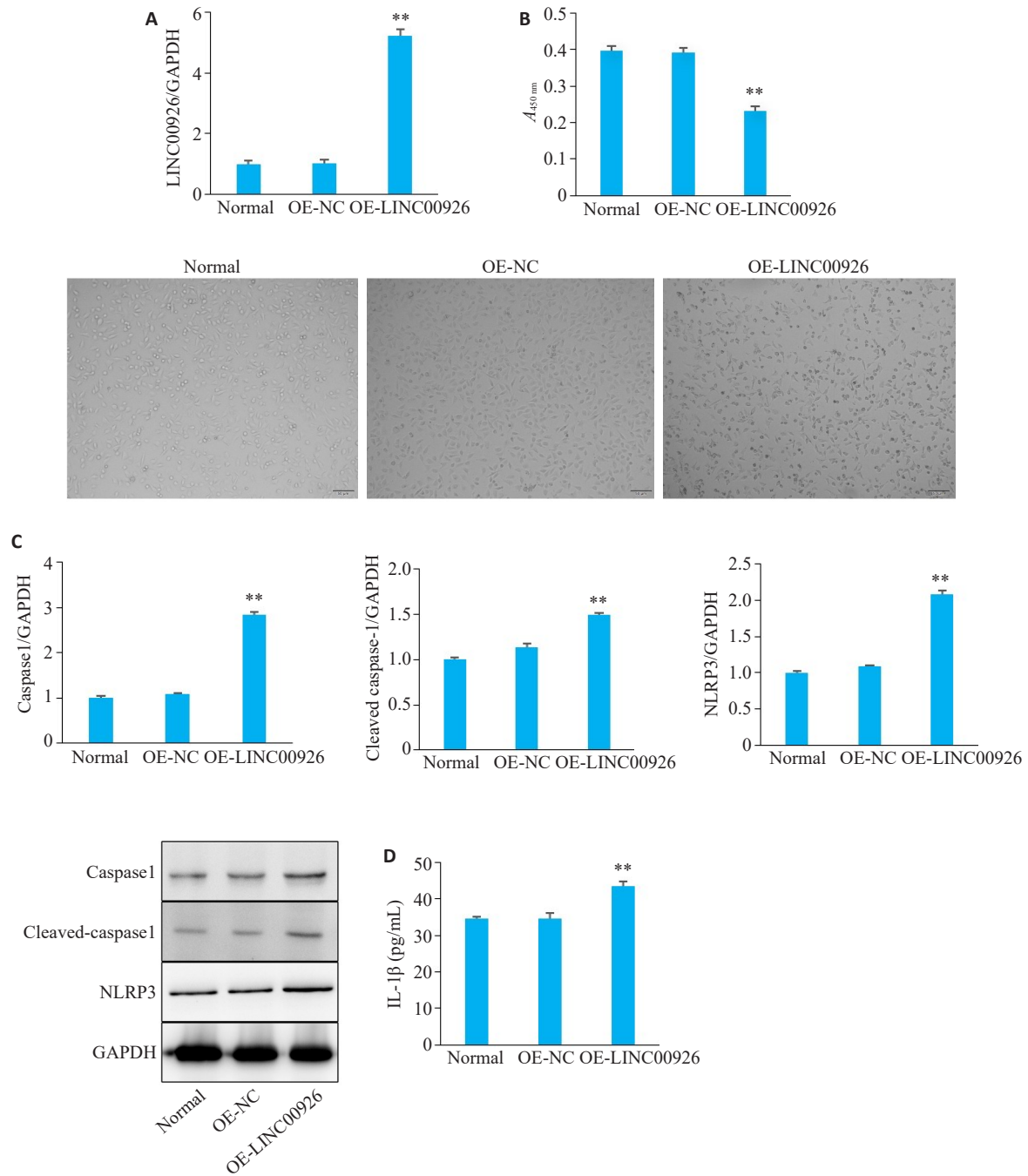


图2 过表达LINC00926对HUVECs细胞增殖、细胞焦亡的影响

Fig.2 Effects of LINC00926 overexpression on proliferation and pyroptosis in hypoxia-induced HUVECs. A: Transfection efficiency of the LINC00926-overexpressing plasmid (OE-LINC00926) assessed by RT-qPCR. B: CCK-8 assay for assessing cell proliferation (Original magnification:  $\times 100$ ). C: Expressions of caspase-1, cleaved caspase-1 and NLRP3 detected by Western blotting. D: ELISA for analyzing the level of IL-1 $\beta$ . \*\* $P<0.01$  vs OE-NC.

### 2.3 在低氧诱导的HUVECs细胞中,过表达LINC00926对ELAVL1表达的影响

与Normal组相比,低氧处理对ELAVL1的mRNA水平无影响,但明显促进ELAVL1蛋白的表达。在低氧

诱导的HUVECs细胞中,LINC00926过表达对ELAVL1的mRNA水平无影响,但明显促进ELAVL1蛋白的表达( $P<0.05$ ,图3)。

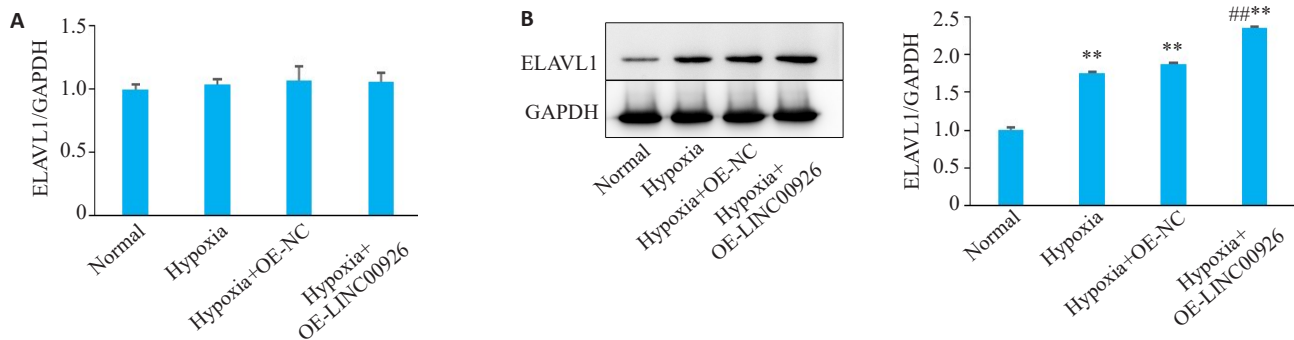


图3 在低氧诱导的HUVECs细胞中,过表达LINC00926对ELAVL1表达的影响

Fig.3 Expression of ELAVL1 in hypoxia-induced HUVECs transfected with LINC00926-overexpressing plasmid. A: RT-qPCR for assessing the mRNA level of ELAVL1. B: Protein expression of ELAVL1 detected by Western blotting. \*\* $P<0.01$  vs Normal; ## $P<0.01$  vs Hypoxia+OE-NC.

### 2.4 LINC00926通过募集ELAVL1调控低氧诱导的HUVECs细胞焦亡

RIP实验确认了ELAVL1蛋白可与LINC00926结合( $P<0.05$ ,图4A)。RT-qPCR结果表明,ELAVL1的3条干扰序列都有显著的干扰效率,干扰效率最高的siRNA-ELAVL1-1用于后续实验( $P<0.05$ ,图4B)。RT-qPCR结果显示,与Normal组相比,低氧可上调LINC00926表达( $P<0.05$ ,图4C);si-ELAVL1对LINC00926表达无影响;OE-LINC00926可以进一步上调LINC00926表达( $P<0.05$ )。此外,低氧对ELAVL1无影响,si-ELAVL1降低了ELAVL1表达( $P<0.05$ ),而过表达LINC00926后ELAVL1的表达无明显变化。Western blot结果显示,低氧上调了ELAVL1和焦亡相关蛋白(caspase1、cleaved-caspase1、NLRP3)的表达;si-ELAVL1则显著降低了ELAVL1和caspase1、cleaved-caspase1、NLRP3的表达;而过表达LINC00926则逆转了si-ELAVL1的影响( $P<0.05$ ,图4D)。ELISA结果显示,低氧上调了IL-1 $\beta$ 水平,si-ELAVL1则降低了IL-1 $\beta$ 水平,过表达LINC00926则逆转了si-ELAVL1的影响( $P<0.05$ ,图4E)。

## 3 讨论

冠心病的形成多由吸烟、高血脂、高血糖等多种危险因素诱发,而血管内皮细胞功能障碍作为冠心病的发病基础常常受这些危险因素影响<sup>[12-14]</sup>。细胞焦亡作为一种独特的细胞死亡方式,它的发生通常依赖于caspase-1或caspase-4/5/11的活化,并伴随着细胞膜的破裂,引起

强烈的炎症反应,最终导致细胞裂解<sup>[11,15]</sup>。由内皮细胞炎症触发的细胞焦亡,致使内皮细胞发生功能障碍<sup>[16]</sup>,从而参与多种心血管疾病(心肌缺血再灌注损伤<sup>[17,18]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[19]</sup>、冠心病<sup>[20]</sup>等)的发展进程。因此,研究血管内皮细胞焦亡的分子发生机制对冠心病的治疗策略具有一定指导意义。

有研究报道lncRNA NORAD通过募集HDAC6增强H3K9去乙酰化,抑制VEGF基因转录从而促进血管内皮细胞损伤<sup>[21]</sup>。此外,研究表明沉默lncRNA AK136714可以通过直接结合HuR和FOXO3抑制内皮细胞的炎症反应和凋亡<sup>[22]</sup>。虽然已有文献报道LINC00926在冠心病组的病人外周血中显著高表达<sup>[6]</sup>,但目前LINC00926对血管内皮细胞的影响尚未可知。因此,本研究采用低氧(5%O<sub>2</sub>)处理HUVECs细胞体外模拟冠心病,初次探究LINC00926在低氧诱导的HUVECs中的作用。研究结果显示低氧可诱导HUVECs细胞中LINC00926高表达。进一步分析显示LINC00926过表达降低了HUVECs细胞增殖能力,可提高细胞焦亡相关蛋白caspase1、cleaved-caspase1和NLRP3的表达水平,以及炎症因子IL-1 $\beta$ 水平。由此可知,LINC00926上调可抑制细胞增殖,促进HUVECs细胞焦亡及相关炎症反应。

ELAVL1作为一种RNA结合蛋白,主要通过竞争靶mRNA 3'UTR端的腺嘌呤、尿嘌呤的富集元件位点与靶mRNA结合,从而增加靶mRNA的稳定性和翻译<sup>[23]</sup>。其他ELAVL家族成员主要在神经元细胞中表达,而ELAVL1在所有人体组织细胞中普遍表达<sup>[24,25]</sup>。

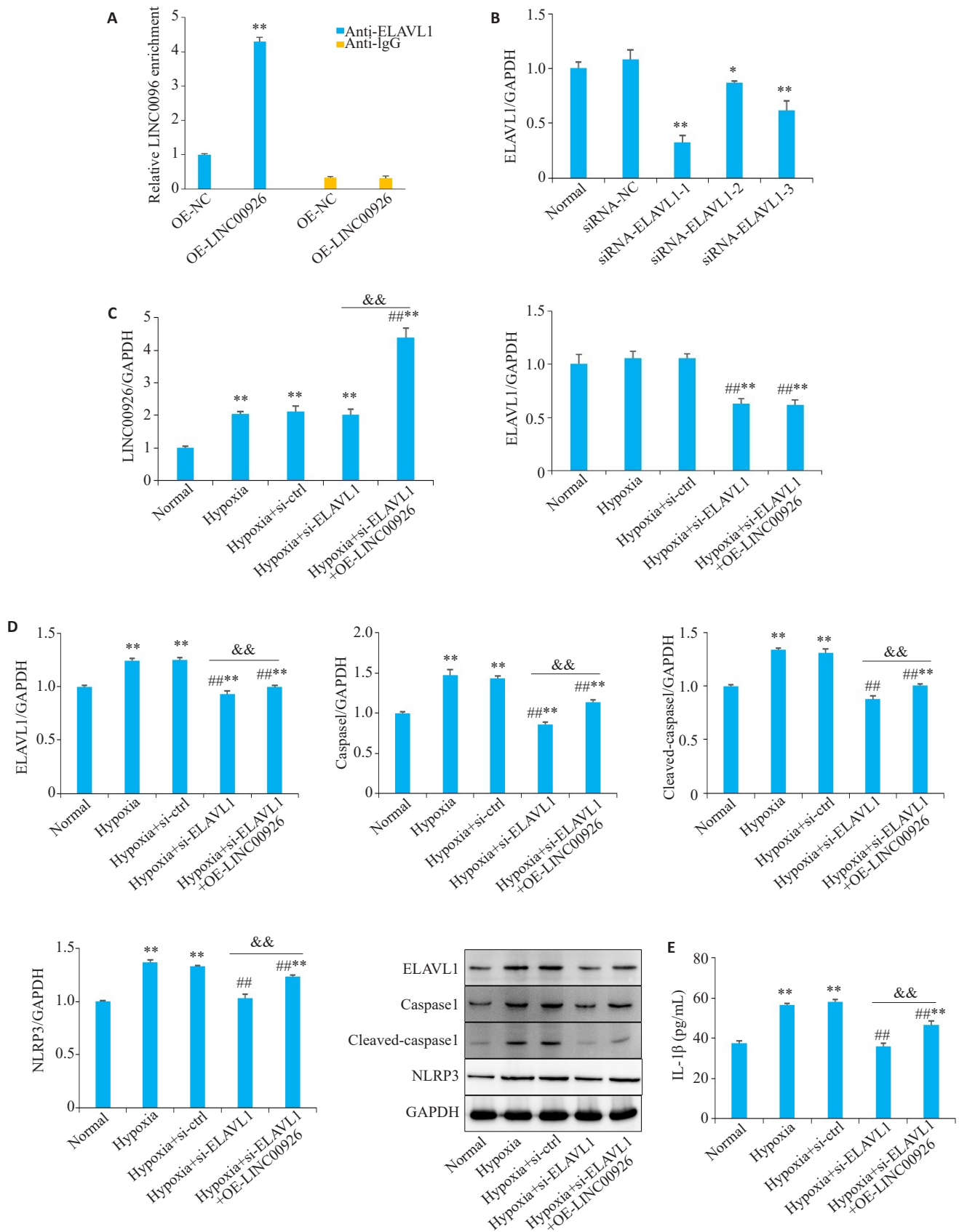


图4 LINC00926通过募集ELAVL1调控低氧诱导的HUVECs细胞焦亡

Fig.4 LINC00926 regulates viability and pyroptosis of hypoxia-induced HUVECs by recruiting ELAVL1. **A:** RIP assay for determining the relationship between LINC00926 and ELAVL1. \*\* $P < 0.01$  vs OE-NC. **B:** RT-qPCR for verifying interference efficiency of ELAVL1 with different siRNA sequences. \* $P < 0.05$  vs Normal; \*\* $P < 0.01$  vs Normal. **C:** RT-qPCR for assessing mRNA expressions of LINC00926 and ELAVL1. **D:** Protein levels of ELAVL1, caspase-1, cleaved caspase-1, and NLRP3 detected by Western blotting. **E:** ELISA for assessing IL-1 $\beta$  level. \*\* $P < 0.01$  vs Normal; \* $P < 0.05$  vs Hypoxia+si-ctrl; ### $P < 0.01$  vs Hypoxia+si-ELAVL1.

本研究结果发现低氧可上调HUVECs细胞中ELAVL1的蛋白表达,同时LINC00926过表达进一步提高了ELAVL1蛋白水平。令人感兴趣的是,低氧和LINC00926过表达均可提高ELAVL1的蛋白水平,但对ELAVL1的mRNA水平无显著影响。通过starbase网站对LINC00926进行生物信息学预测分析,结果发现ELAVL1可能是LINC00926的一个靶向结合蛋白。本文通过RIP实验证实了LINC00926与ELAVL1的结合关系。研究显示,泛素化蛋白RCHY1和 $\beta$ -TrCP调控ELAVL1蛋白泛素化<sup>[26,27]</sup>,此外,通过UbiBrowser数据库预测发现,FBXW11也是ELAVL1的泛素化修饰蛋白。因此本文推测缺氧条件下LINC00926可能与ELAVL1蛋白结合后,阻止了某个泛素化蛋白与之结合,进而上调了ELAVL1蛋白表达。然而这一推测还需进一步研究证实。研究发现敲低HuR/ELAVL1可以抑制TNF- $\alpha$ /CRT介导的NLRP3炎性小体激活,表明ELAVL1参与了NLRP3的启动和激活<sup>[7]</sup>。在细胞焦亡的典型反应途径中,NLRP3炎性小体的激活导致caspase1活化,然后通过GSDMD扩大细胞膜孔,外放细胞内容物和IL-1 $\beta$ 、IL-18,诱发细胞焦亡及炎症反应<sup>[28,29]</sup>。因此本文猜测LINC00926或许通过与ELAVL1结合调控血管内皮细胞焦亡及炎症反应。

相关文献表明miR-133a通过抑制ELAVL1的表达来抑制心肌细胞焦亡和减缓心肌缺血再灌注损伤<sup>[30]</sup>。研究显示敲降ELAVL1抑制了caspase1、NLRP3和IL-1 $\beta$ 表达,进而阻遏高糖诱导的心肌细胞焦亡<sup>[31]</sup>。另有研究发现M2巨噬细胞来源的细胞外囊泡传递miR-378a-3p以抑制ELAVL1(HuR)的表达及其胞质易位,从而阻断NLRP3/caspase-1/GSDMD通路的激活,进而减弱心肌细胞的焦亡<sup>[32]</sup>。以上报道均表明下调ELAVL1的表达可有效抑制心肌细胞焦亡,而调控ELAVL1的表达是否对血管内皮细胞也有相同的影响还未见文献报道。为进一步证实,本研究将LINC00926过表达载体和siRNA-ELAVL1共转染低氧诱导的HUVECs细胞。实验结果显示在低氧诱导的HUVECs细胞中,敲降ELAVL1均降低了细胞焦亡相关蛋白(caspase1, cleaved-caspase1, NLRP3)和促炎因子IL-1 $\beta$ 的水平。值得注意的是,过表达LINC00926逆转了以上变化。上述结果表明ELAVL1沉默可以减少HUVECs细胞焦亡和炎症反应,但这些效应却被LINC00926过表达所削弱。以上分析揭示了LINC00926可通过募集ELAVL1促进HUVECs细胞焦亡。

综上所述,低氧诱导的HUVECs细胞中LINC00926表达水平和ELAVL1蛋白水平上调,LINC00926可能通过募集ELAVL1促进细胞焦亡,引起血管内皮功能障碍,进而参与冠心病的发生和发展。

本文首次提出在冠心病中LINC00926的作用机制,为治疗冠心病提供了新思路。

#### 参考文献:

- [1] de Yébenes VG, Briones AM, Martos-Folgado I, et al. Aging-associated miR-217 aggravates atherosclerosis and promotes cardiovascular dysfunction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(10): 2408-24.
- [2] Shan R, Liu N, Yan Y, et al. Apoptosis, autophagy and atherosclerosis: relationships and the role of Hsp27 [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166(8): 105169.
- [3] Jia C, Zhang J, Chen HW, et al. Endothelial cell pyroptosis plays an important role in Kawasaki disease via HMGB1/RAGE/cathepsin B signaling pathway and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 778.
- [4] Bian WH, Jing XH, Yang ZY, et al. Downregulation of LncRNA NORAD promotes Ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury and atherosclerosis [J]. *Aging*, 2020, 12(7): 6385-400.
- [5] Wang YR, Song XJ, Li ZB, et al. Long non-coding RNAs in coronary atherosclerosis [J]. *Life Sci*, 2018, 211(8): 189-97.
- [6] Liao JQ, Wang J, Liu YM, et al. Transcriptome sequencing of lncRNA, miRNA, mRNA and interaction network constructing in coronary heart disease [J]. *BMC Med Genomics*, 2019, 12(1): 124.
- [7] Liu YX, Wei W, Wang Y, et al. TNF- $\alpha$ /calreticulin dual signaling induced NLRP3 inflammasome activation associated with HuR nucleocytoplasmic shuttling in rheumatoid arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(7): 597-611.
- [8] Fang Y, Tian S, Pan Y, et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121(6): 109595.
- [9] Zeng ZL, Li GH, Wu SY, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular disease [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(2): e12563.
- [10] Zhou Y, Zhou H, Hua L, et al. Verification of ferroptosis and pyroptosis and identification of PTGS2 as the hub gene in human coronary artery atherosclerosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 171(5): 55-68.
- [11] Wang Q, Wu J, Zeng Y, et al. Pyroptosis: A pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 510(8): 62-72.
- [12] Fujii N, Brunt VE, Minson CT. Tempol improves cutaneous thermal hyperemia through increasing nitric oxide bioavailability in young smokers [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(11): H1507-11.
- [13] Speer T, Owala FO, Holy EW, et al. Carbamylated low-density lipoprotein induces endothelial dysfunction [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(43): 3021-32.
- [14] Mao CY, Li DJ, Zhou E, et al. Nicotine exacerbates atherosclerosis through a macrophage-mediated endothelial injury pathway [J]. *Aging*, 2021, 13(5): 7627-43.
- [15] Loveless R, Bloomquist R, Teng Y. Pyroptosis at the forefront of anticancer immunity [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 264.
- [16] Bai BC, Yang YY, Wang Q, et al. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 776.
- [17] Shi HR, Gao Y, Dong Z, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury [J]. *Circ Res*, 2021, 129



- (3): 383-96.
- [18] Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): H1553-68.
- [19] Xu YJ, Zheng L, Hu YW, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 476(8): 28-37.
- [20] Song BR, Dang HM, Dong R. Differential expression of LOXL1-AS1 in coronary heart disease and its regulatory mechanism in ox-LDL-induced human coronary artery endothelial cell pyroptosis[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2023, 37(1): 75-87.
- [21] Kai HH, Wu QY, Yin RH, et al. LncRNA NORAD promotes vascular endothelial cell injury and atherosclerosis through suppressing VEGF gene transcription *via* enhancing H3K9 deacetylation by recruiting HDAC6[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(3): 701628.
- [22] Bai J, Liu JX, Fu ZX, et al. Silencing lncRNA AK136714 reduces endothelial cell damage and inhibits atherosclerosis[J]. *Aging*, 2021, 13(10): 14159-69.
- [23] Wu MX, Tong CWS, Yan W, et al. The RNA binding protein HuR: a promising drug target for anticancer therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2019, 19(5): 382-99.
- [24] Schultz CW, Preet R, Dhir T, et al. Understanding and targeting the disease-related RNA binding protein human antigen R (HuR) [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2020, 11(3): e1581.
- [25] Ke YS, Lv XP, Fu XY, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation enhances HuR oligomerization and contributes to pro-inflammatory gene mRNA stabilization[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1817-35.
- [26] Daks A, Petukhov A, Fedorova O, et al. The RNA-binding protein HuR is a novel target of Pirh2 E3 ubiquitin ligase[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 581.
- [27] Ding FZ, Lu L, Wu CJ, et al. circHIPK3 prevents cardiac senescence by acting as a scaffold to recruit ubiquitin ligase to degrade HuR[J]. *Theranostics*, 2022, 12(17): 7550-66.
- [28] Huang Y, Xu W, Zhou RB. NLRP3 inflammasome activation and cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-27.
- [29] Hamarshah S, Zeiser R. NLRP3 inflammasome activation in cancer: a double-edged sword[J]. *Front Immunol*, 2020, 11(3): 1444.
- [30] Liu NN, Xie L, Xiao PX, et al. Cardiac fibroblasts secrete exosome microRNA to suppress cardiomyocyte pyroptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Cell Biochem*, 2022, 477(4): 1249-60.
- [31] Jeyabal P, Thandavarayan RA, Joladarashi D, et al. MicroRNA-9 inhibits hyperglycemia-induced pyroptosis in human ventricular cardiomyocytes by targeting ELAVL1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(4): 423-9.
- [32] Yuan W, Liang X, Liu YY, et al. Mechanism of miR-378a-3p enriched in M2 macrophage-derived extracellular vesicles in cardiomyocyte pyroptosis after MI[J]. *Hypertens Res*, 2022, 45(4): 650-64.

(编辑:孙昌朋)