

• 论 著 •

长链非编码RNA Dnm3os在心肌成纤维细胞活化中的作用研究

孔启航¹, 周骏腾², 田格尔¹, 权月¹, 吴文超¹, 刘小菁^{1,2}

1. 四川大学华西医院 再生医学研究中心 心血管疾病研究室(成都 610041)

2. 四川大学华西医院 心内科(成都 610041)

【摘要】 长链非编码 RNA (lncRNA) Dnm3os 在肌腱周围组织纤维化和肺纤维化中发挥了重要作用, 但其是否参与心肌纤维化过程, 目前尚不清楚。为此, 本研究利用课题组前期通过胸主动脉缩窄术 (TAC) 所致的小鼠纤维化模型的心脏组织, 以及转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 所诱导的体外心肌成纤维细胞活化模型, 采用定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR)、蛋白质印迹法 (Western blot) 及胶原凝胶收缩等方法, 对心肌成纤维细胞活化表型和 Dnm3os 的表达变化进行鉴定和检测。并通过 RNA 干扰技术来沉默 Dnm3os, 以探究其在心肌成纤维细胞活化过程中的作用。结果表明, Dnm3os 在小鼠纤维化心肌组织和体外培养活化的心肌成纤维细胞中均表达升高, 而沉默其表达则可明显缓解心肌成纤维细胞活化。此外, TGF- β 1/Smad2/3 通路在心肌成纤维细胞活化过程中被激活; 而沉默 Dnm3os 后, 该通路受到抑制。本研究的结果提示, 沉默 Dnm3os 可通过抑制 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路来影响心肌成纤维细胞的活化过程。因此, 干预 lncRNA Dnm3os 的表达可能成为治疗心肌纤维化的潜在靶点。

【关键词】 长链非编码RNA Dnm3os; 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞活化; 转化生长因子- β 1/Smad2/3

The potential role of long non-coding RNA Dnm3os in the activation of cardiac fibroblasts

KONG Qihang¹, ZHOU Junteng², TIAN Geer¹, QUAN Yue¹, WU Wenchao¹, LIU Xiaojing^{1,2}

1. Laboratory of Cardiovascular Diseases, Regenerative Medicine Research Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, P.R.China

2. Department of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, P.R.China

Corresponding author: LIU Xiaojing, Email: liuxq@scu.edu.cn

【Abstract】 Long non-coding RNA (lncRNA) Dnm3os plays a critical role in peritendinous fibrosis and pulmonary fibrosis, but its role in the process of cardiac fibrosis is still unclear. Therefore, we carried out study by using the myocardial fibrotic tissues obtained by thoracic aortic constriction (TAC) in an early study of our group, and the *in vitro* cardiac fibroblast activation model induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), Western blot, and collagen gel contraction test were used to identify the changes of activation phenotype and the expression of Dnm3os in cardiac fibroblasts. Small interfering RNA was used to silence Dnm3os to explore its role in the activation of cardiac fibroblasts. The results showed that the expression of Dnm3os was increased significantly in myocardial fibrotic tissues and in the activated cardiac fibroblasts. And the activation of cardiac fibroblasts could be alleviated by Dnm3os silencing. Furthermore, the TGF- β 1/Smad2/3 pathway was activated during the process of cardiac fibroblasts activation, while was inhibited after silencing Dnm3os. The results suggest that Dnm3os silencing may affect the process of cardiac fibroblast activation by inhibiting TGF- β 1/Smad2/3 signal pathway. Therefore, interfering with the expression of lncRNA Dnm3os may be a potential target for the treatment of cardiac fibrosis.

【Key words】 long non-coding RNA Dnm3os; cardiac fibrosis; cardiac fibroblast activation; transforming growth factor- β 1/Smad2/3

DOI: 10.7507/1001-5515.202102021

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (12072215); 四川省科技厅项目 (2021YFS0120)

通信作者: 刘小菁, Email: liuxq@scu.edu.cn



引言

心肌纤维化是指压力超负荷、缺血、炎症等致病因素导致心肌细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 异常增多和过度积聚的病理过程。在此过程中, 心肌成纤维细胞会发生表型转变, 活化为肌成纤维细胞^[1-3]。心肌成纤维细胞向肌成纤维细胞表型转换的过程, 近年来得到了广泛关注, 但其中具体的机制尚未完全阐明。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA, 可在转录调节、分化、细胞重编程等过程中发挥重要作用^[4-5]。研究发现, lncRNA 参与了心血管系统调节网络, 其表达异常与心肌肥厚、心力衰竭及心肌梗死等心血管疾病的发生、发展密切相关^[6-8]。lncRNA Dnm3os 是动力蛋白 (dynamins-3) 的反义链通过可变剪切产生的 lncRNA 分子^[9]。研究显示, Dnm3os 与多种细胞的增殖、分化相关, 包括视网膜母细胞瘤细胞的增殖^[10]、上皮细胞-间充质转化^[11]。新近研究表明, lncRNA Dnm3os 通过转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 通路参与肌腱周围组织纤维化^[12]和肺纤维化^[13]的过程; 此外, 它通过转录因子 Twist1、microRNA-214 和结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 构成的信号轴调节了肝纤维化的发展过程^[14]。但 Dnm3os 是否参与了心肌纤维化的过程, 目前尚未见报道。

因此, 本研究旨在观察 lncRNA Dnm3os 在小鼠纤维化心肌组织和心肌成纤维细胞活化过程中的表达情况, 并探索其在心肌成纤维细胞活化过程中的作用, 从而为心肌纤维化的诊疗提供潜在的新靶点。

1 实验材料与试剂

1.1 实验动物

本实验所用动物为 0~1 d 的无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 C57BL/6 乳鼠 (SCXK (川) 2020-030), 购买于四川省达硕实验动物中心。本实验经四川大学华西医院动物伦理委员会批准通过 (伦理备案号: 2018162A)。

1.2 主要试剂

促纤维化因子 TGF- β 1 购自北京神州义翘科技有限公司; 转染试剂 Lipofectamine[®] RNAiMAX 购自美国 Invitrogen 公司; RNA 提取试剂盒购自北京天漠科技开发有限公司; 逆转录试剂盒 (rever-

tra ace 组合型) 购自日本 Toyobo 公司; 荧光定量试剂 SYBR[®] Green PCR Master Mix 和增强化学发光试剂 (electrochemiluminescence, ECL) 购自美国 Bio-Rad 公司; II 型胶原酶购自美国 Worthington 公司; 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 细胞增殖检测试剂盒 (apollo 567) 购自广州锐博生物科技有限公司; 兔单克隆抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、兔单克隆抗骨膜素 (Periostin)、兔单克隆抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、兔单克隆抗微管蛋白 (Tubulin)、兔单克隆抗肌动蛋白 (β -actin) 和兔多克隆抗结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 购自美国 Abcam 公司; 荧光二抗、兔多克隆抗体 Smad2/3、p-Smad2、p-Smad3 购自美国 CST 公司; 山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司; 含 4, 6-二氨基-2-苯基吲哚 (4, 6-diamino-2-phenyl indole, DAPI) 的封片剂和 I 型鼠尾胶原购自北京索莱宝公司; 细胞通透剂 Triton[®]X-100 和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 均购自德国 Biofroxx 公司; 放射免疫沉淀测定 (radio-immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液购自上海碧云天生物公司。

2 实验方法

2.1 压力超负荷所致心肌纤维化小鼠模型的建立

采用胸主动脉缩窄术 (thoracic aortic constriction, TAC) 建立小鼠压力超负荷所致的心肌肥厚/纤维化模型, 实验分为进行主动脉弓缩窄的 TAC 组和未进行主动脉弓缩窄的假手术 (Sham) 组, 详见本实验室前期报道的文献^[15]。在本实验中, 分别取用 Sham 组和 TAC 组的 6 个 RNA 样本进行研究。

2.2 小鼠乳鼠心肌成纤维原代细胞培养及细胞活化模型建立

根据实验室所建立的原代细胞培养方法^[15], 将 0~1 d 的 C57BL/6 乳鼠消毒后行颈脱位法, 取心脏剪碎, 在 0.25% 胰蛋白酶中消化过夜。第二天, 使用 II 型胶原酶继续消化, 待组织块消化干净后, 取滤液至含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的改良型 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 中终止消化。200 g/min 离心 5 min 后, 弃上清, 加入含 10%FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞沉淀, 随后放置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵箱中进行培养。差速贴壁 0.5 h 后, 吸出培养液, 加入含

10%FBS 的 DMEM 培养基, 随后放入孵箱中继续培养。待贴壁的心肌成纤维细胞密度达到 95% 左右时, 对细胞进行传代操作, 种于 12 孔板中。当细胞融合度达到 65% 左右时, 使用 DMEM 培养基饥饿处理细胞 4 h, 更换含 10%FBS 的 DMEM 培养基, 并加入 TGF-β1 (10 ng/mL) 进行刺激。实验分为: 对照组 (Control), 不加入 TGF-β1; 实验组 (TGF-β1), 加入 TGF-β1 刺激。每组设置 3 个复孔, 24 h 后进行后续实验。

2.3 LncRNA Dnm3os 特异性小干扰 RNA 转染及实验分组

将心肌成纤维细胞接种于 12 孔板中, 待细胞生长至 50% ~ 60% 融合度时, 用转染试剂 Lipofectamine® RNAiMAX 进行转染, 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的序列如表 1 所示。24 h 后, 更换新的完全培养基。根据实验需要, 针对不同序列的 siRNA, 将实验分组为: ① 非特异性对照 (non-special control, NC) 的 siRNA 序列 (si-NC) 组; ② si-NC+TGF-β1 组; ③ 特异性敲低 Dnm3os 的 siRNA 序列 (si-Dnm3os) 组; ④ si-Dnm3os+TGF-β1 组。每组设置 3 个复孔。

2.4 胶原凝胶收缩实验

胶原凝胶收缩实验是给细胞提供三维培养环境, 维持细胞的生长、黏附和迁移, 常用于检测细胞的收缩活性。根据胶原凝胶收缩实验常规方法^[16], 准备好悬浮于培养液的心肌成纤维细胞, 并放置于冰浴中。将 800 μL 鼠尾胶原蛋白 I 型 (5 mg/mL) 加到 48 μL 0.1 mol/L NaOH 中, 立即混匀。再加入细胞悬浮液, 混匀后立即加到 24 孔板中。室温放置 1 h, 待胶原凝结后, 将其转移至含有完全培养基的 12 孔板中, 并根据实验需要, 加入浓度为 10 ng/mL 的 TGF-β1 进行刺激。在 37℃, 5%CO₂ 孵箱中孵育 24 h 后, 对胶原凝胶进行拍照, 并使用图像处理软件 Image J (National Institutes of Health, 美国) 测量每组凝胶的面积。

2.5 EdU 法检测细胞增殖

按照 EdU 检测试剂盒说明书的步骤, 对处理完毕的心肌成纤维细胞进行增殖活性检测^[17]。第二天, 在荧光显微镜下观察并拍照, 随机选取每组 15 个视野进行后续的分析, 即计算各组内处于 S 期的细胞百分比。

2.6 细胞免疫荧光染色

按照实验室以前报道的细胞免疫荧光染色方法^[15], 将心肌成纤维细胞悬液加入到 24 孔板中, 待细胞融合度达到 50% 左右时, 根据实验需要, 进

行转染操作或 TGF-β1 药物处理。待细胞处理完毕后, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞, 15 min 后, 加入含有 0.5% 细胞通透剂 Triton®X-100 和 1% BSA 的混合液, 封闭穿孔 1 h。随后, 加入 α-SMA 抗体溶液, 进行 4℃ 孵育过夜处理。第二天, 回收 α-SMA 抗体并加入荧光二抗, 室温避光孵育 2 h。磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗净残余荧光二抗后, 用含 DAPI 的封片剂孵育细胞 10 min, 后续使用全自动倒置荧光显微镜 IX83 (Olympus, 日本) 采集图像, 并采用 Image J 软件进行半定量分析。

2.7 定量聚合酶链式反应检测基因及 LncRNA Dnm3os 的表达变化

使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA 后, 采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。之后在定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 仪 CFX96™ (Bio-Rad, 美国) 上对目的基因进行荧光定量检测, 以观察其变化情况, 目的基因的引物序列如表 2 所示。

2.8 Western blot 检测蛋白表达

使用 RIPA 裂解液提取药物处理完毕后的成纤维细胞总蛋白, 经过蛋白质定量检测后, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (dodecyl sulfate sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 上, 随后用 1%BSA 封闭液进行封闭。1 h 后, 在 4℃ 冰箱中孵育抗体 (1 :

表 1 si-Dnm3os 的序列

Tab.1 Sequences of si-Dnm3os

序列名	序列
si-Dnm3os-1	GGTTGTAGTTAAAGGATA
si-Dnm3os-2	GGATAGTATGGTAAGTCTA
si-Dnm3os-3	GATCAAGTATTTCAAGTTA
si-NC	由锐博生物公司提供

表 2 RT-qPCR 反应使用的引物序列

Tab.2 Primer sequences of RT-qPCR

基因	引物序列
Dnm3os	F: CCCATGACCACCCAACAGAA R: CCCTGAACGGGTACATTCC
α-SMA	F: GGACGTACAACCTGGTATTGTGC R: TCGGCAGTAGTCACGAAGGA
Periostin	F: CACGGCATGGTTATTCCTTCA R: TCAGGACACGGTCAATGACAT
CTGF	F: GGACACCTAAAATCGCCAAGC R: ACTTAGCCCTGTATGTCTTCACA
GAPDH	F: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG R: TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT

1 000) 过夜。第二天,回收抗体并在室温下孵育山羊抗兔二抗(1 : 2 000) 2 h,缓冲液洗涤后,用 ECL 显影液进行显影,采用 Image J 软件进行半定量分析。

2.9 数据分析

实验数据采用数据分析软件 GraphPad Prism 8.0 (graphPad Software Inc., 美国) 进行统计分析,实验结果以均数 ± 标准差表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), *P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 LncRNA Dnm3os 在小鼠纤维化心脏组织中表达升高

在本实验室前期通过 TAC 手术所构建的小鼠纤维化模型中^[15],采用 RT-qPCR 检测了纤维化心脏组织中 lncRNA Dnm3os 的表达变化,发现其表达水平与 Sham 组相比,明显升高,如图 1 所示。

3.2 LncRNA Dnm3os 在心肌成纤维细胞活化过程中表达升高

3.2.1 心肌成纤维细胞活化模型的建立与评价 如图 2 所示, I 型胶原凝胶收缩实验显示,与 Control 组相比, TGF-β1 组中细胞与 I 型胶原凝胶混合 24 h 后,凝胶收缩的面积是其 1.22 倍。EdU 实验结果显示, TGF-β1 组的细胞增殖率为 Control 组的 3 倍。细胞免疫荧光染色的半定量结果显示, TGF-β1 组中的心肌成纤维细胞的活化标志物 α-SMA 荧光强度相比于 Control 组增加了约 98%。

3.2.2 LncRNA Dnm3os 在活化的心肌成纤维细胞中表达升高 本实验用 RT-qPCR 和 Western blot

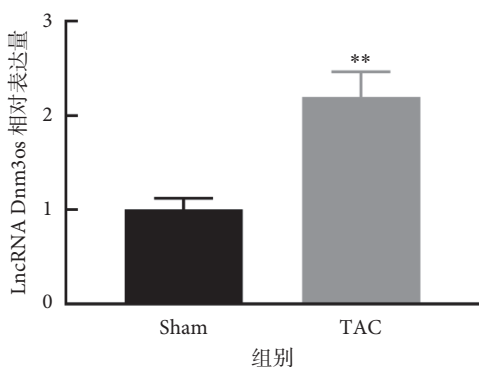


图 1 LncRNA Dnm3os 在小鼠纤维化心脏组织中的表达升高 (*n* = 6, ***P* < 0.01)

Fig.1 The expression of lncRNA Dnm3os was increased in myocardial fibrosis tissues (*n* = 6, ***P* < 0.01)

分别检测了心肌成纤维细胞活化相关标志物 Periostin、α-SMA、CTGF 的 mRNA 和蛋白水平变化,与 Control 组相比均显示升高,如图 3 所示。上述结果表明, TGF-β1 成功诱导了心肌成纤维细胞活化。进一步的实验结果发现, Dnm3os 在心肌成纤维细胞的活化过程中表达明显升高。

3.3 敲低 lncRNA Dnm3os 缓解 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞活化

3.3.1 小干扰 RNA 转染效率检测及纤维化表型变化 在转染 lncRNA Dnm3os 特异性 siRNA 之后,用 TGF-β1 对心肌成纤维细胞进行刺激,以观察敲低 lncRNA Dnm3os 对心肌成纤维细胞活化的影响。结果显示,相比于 si-NC 组,在所设计的三条 si-Dnm3os 序列中, si-Dnm3os-1 的敲低效率最高,如图 4 所示,因此本文使用该序列用于后续的实验。

结果发现, si-Dnm3os-1 转染后,心肌成纤维细胞活化标志物 Periostin、α-SMA 和 CTGF 的 mRNA 水平分别降低了 13%、18% 和 52%,而蛋白表达分别下降了 55%、23% 和 30%。此外, si-Dnm3os-1 转染明显抑制了 TGF-β1 诱导的胶原凝胶收缩,如图 4 所示。

3.3.2 细胞增殖能力和 α-SMA 荧光强度检测 EdU 增殖实验和免疫荧光实验表明, si-Dnm3os-1 转染能够降低由 TGF-β1 引起的细胞增殖率和 α-SMA 荧光强度的增加,如图 5 所示。

上述结果提示,敲低 Dnm3os 能够缓解由 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞活化。

3.4 Dnm3os 通过影响 Smad2/3 通路来调节心肌成纤维细胞的活化

为了进一步探究 Dnm3os 是否通过 Smad2/3 通路来参与心肌成纤维细胞的活化,本研究检测了 Smad2、Smad3、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白水平变化。结果显示,与 Control 组相比, TGF-β1 组中 Smad2/3 的磷酸化水平明显增加,如图 6 所示;而用 si-Dnm3os-1 来敲低 Dnm3os 的表达后,能明显降低由 TGF-β1 诱导的 Smad2/3 磷酸化,如图 6 所示。

上述结果表明, Dnm3os 可能通过影响 Smad2/3 信号通路来参与调节 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞活化。

4 讨论

在急性或慢性损伤后,心肌成纤维细胞可转化为更具合成和收缩力的肌成纤维细胞,进而促进心

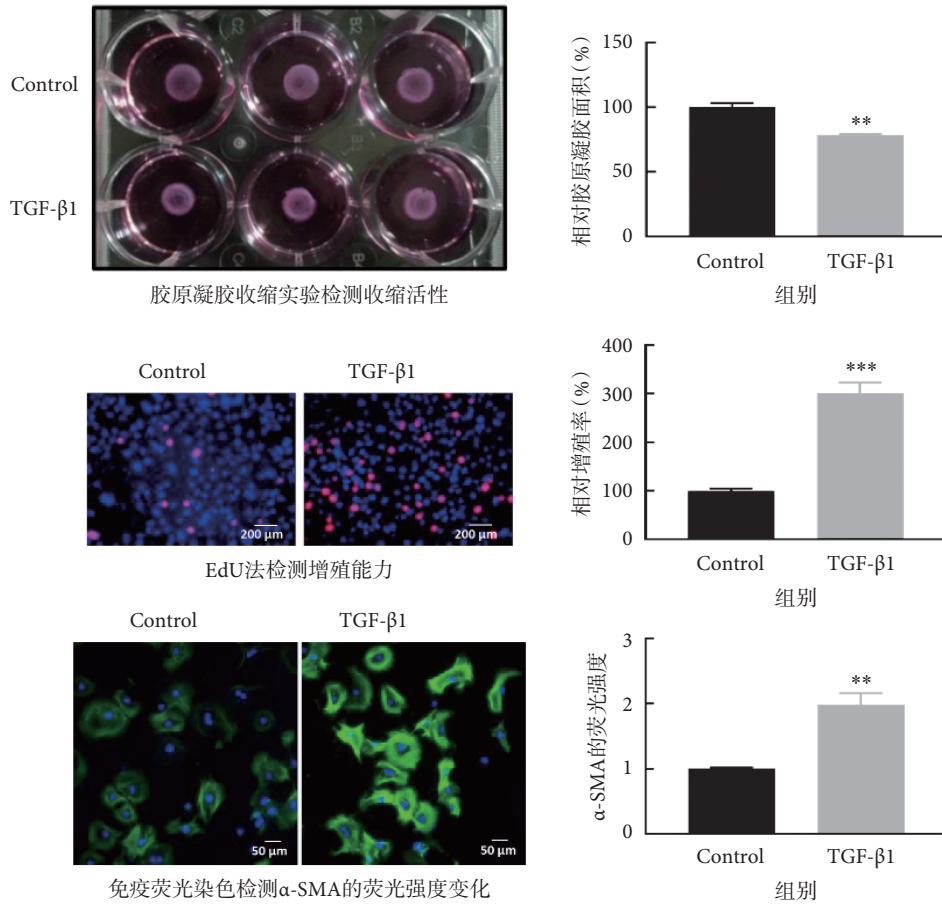


图2 心肌成纤维细胞活化模型的建立与评价 (n = 3, **P < 0.01, ***P < 0.001)

Fig.2 Establishment and evaluation of cardiac fibroblast activation model (n = 3, **P < 0.01, ***P < 0.001)

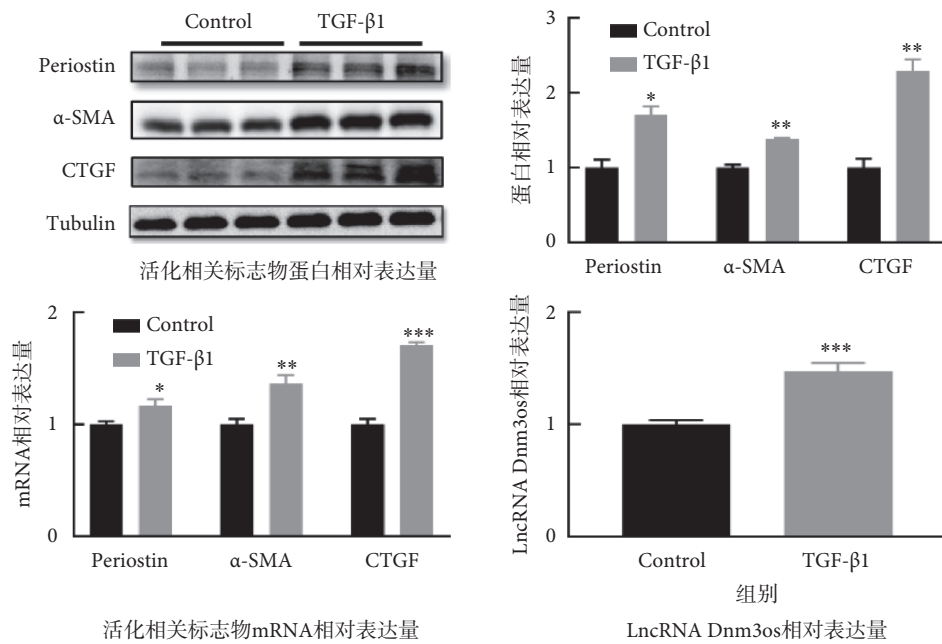


图3 lncRNA Dnm3os在心肌成纤维细胞活化过程中的表达升高 (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

Fig.3 The expression of lncRNA Dnm3os was increased in the process of cardiac fibroblasts activation (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

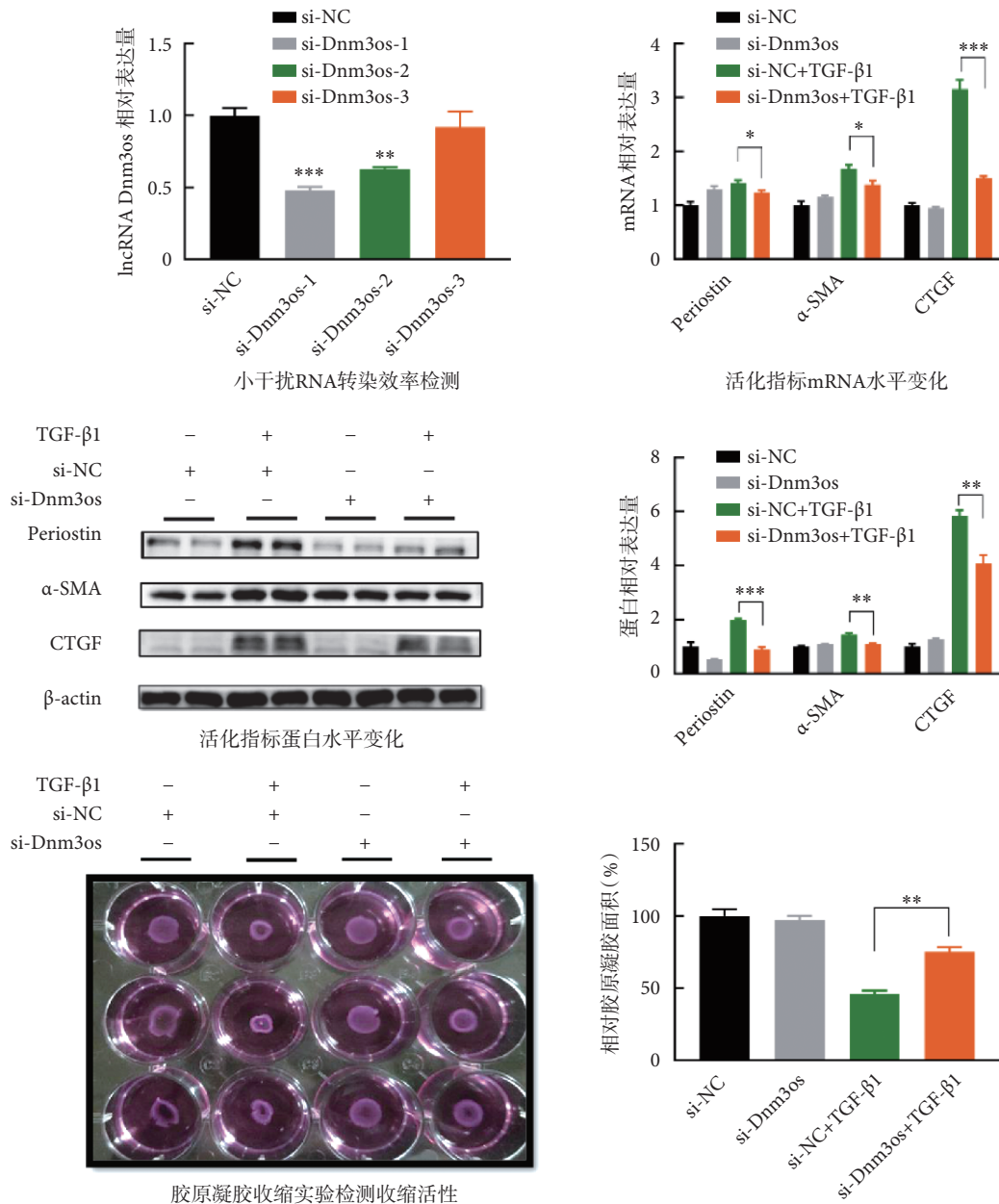


图4 小干扰RNA转染效率检测及纤维化表型变化 (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

Fig.4 Detection of siRNA transfection efficiency and fibrotic phenotype changes (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

肌纤维化和心脏重塑过程^[18]。研究表明,在压力超负荷的作用下,左心室中也会出现活化状态的肌成纤维细胞^[19-20]。肌成纤维细胞的活化导致左心室正常的心肌基质被过量的纤维状胶原所替代,使心肌僵硬增加,并随着压力超负荷时间的延长,导致心肌纤维化,最终进行性的发展为心力衰竭^[21]。

研究显示, lncRNA 参与到包括心肌纤维化、心力衰竭在内的多种心脏疾病的病理生理过程中^[22-23]。在 TAC 模型中,沉默 lncRNA Meg3 可通过下调基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 的表达,从而减少心肌纤维化和改善心脏舒张功能^[24]。此外,在小鼠心肌梗死模型和

TGF-β1 诱导的体外心肌成纤维细胞活化模型中,促纤维化的 lncRNA (a pro-fibrotic lncRNA, lncRNA PFL) 可通过竞争性结合 microRNA let-7d 的方式上调血小板活化因子受体 (platelet activated factor receptor, Ptafr) 的表达,进而促进心肌纤维化^[25]。最近的研究发现,在心肌成纤维细胞中高表达的 lncRNA 心脏成纤维细胞相关转录物 (cardiac fibroblast-associated transcript, Cfast), 在心肌纤维化过程中发挥了重要作用。lncRNA Cfast 通过竞争性抑制毛状样蛋白 COTL1 与 TGF-β 受体相关蛋白 (TGF-β receptor 1, Tgfr1) 的相互作用,从而调控 Smad2/4 复合物的形成,以增强 TGF-β 信号传导^[26]。

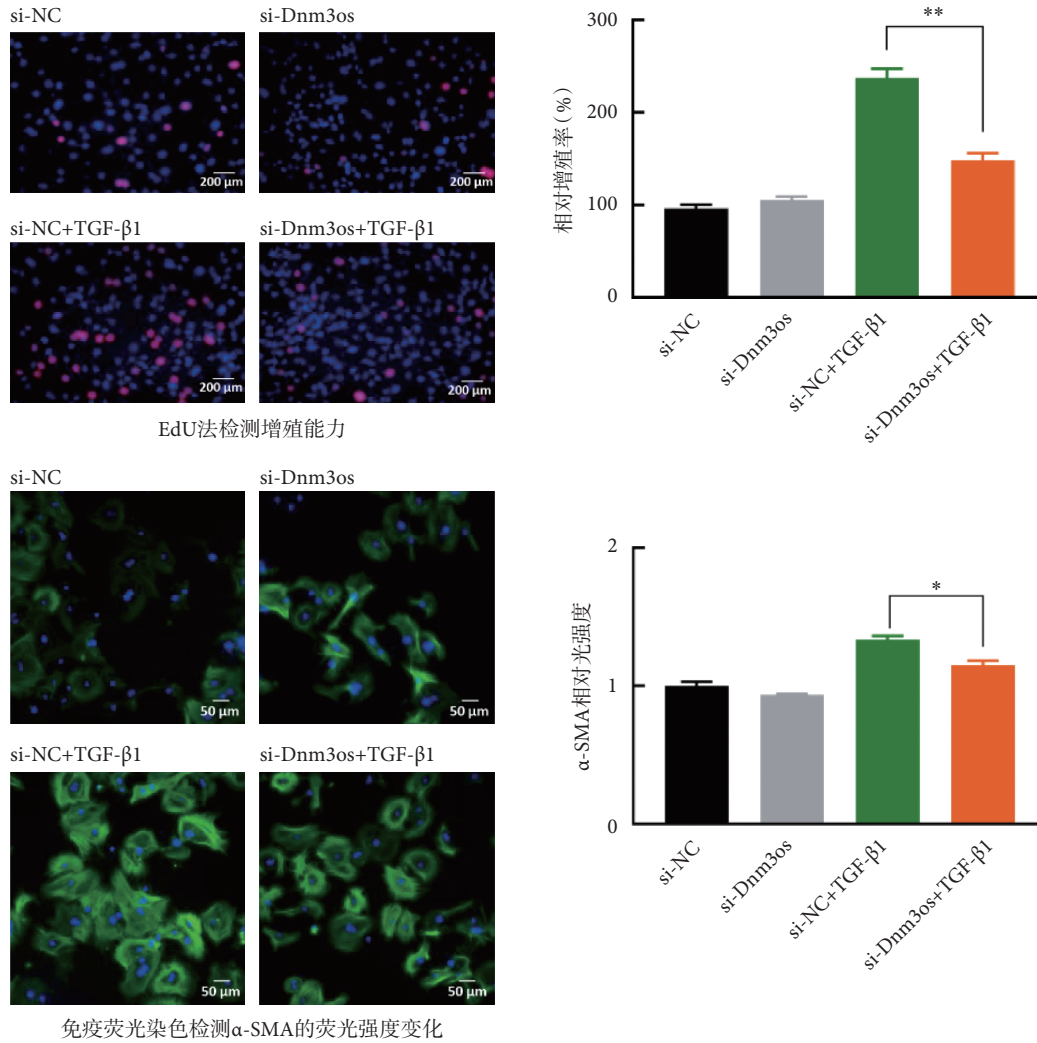


图5 细胞增殖能力和 α-SMA 荧光强度检测 ($n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.5 Detection of cell proliferation ability and α-SMA fluorescence intensity ($n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

LncRNA Dnm3os 在糖尿病^[27]、心力衰竭^[28]等多种疾病中发挥了重要作用。特别是在纤维化疾病中,有研究表明沉默 Dnm3os 可以阻止 TGF-β1 诱导的肌腱细胞增殖和纤维化相关基因 α-SMA、纤粘连蛋白 (fibronectin1, FN1) 的表达^[12]。在肝脏中, Dnm3os 通过影响肝星状细胞的激活来调节肝纤维化,其机制是通过调控 microRNA-214 的产生来进一步调控 CTGF 的表达^[14]。另外, Dnm3os 还可以通过产生 microRNA-199a-3p/5p 来调控 TGF-β/Smads 信号通路,从而介导肺成纤维细胞活化,进而调控肺纤维化的发生发展过程^[13]。

Smad2/3 信号通路参与了多种组织和器官的纤维化过程,如肾纤维化^[29]、肝纤维化^[30]以及肺纤维化^[31]。此外,其在心肌纤维化过程中也发挥了重要作用,研究表明,在血管紧张素 II 诱导的小鼠心肌纤维化模型中, Smad2/3 的去磷酸化能够抑制 TGF-β 通路所介导的纤维化过程^[32]。而在 TAC 所致的

小鼠心肌纤维化模型和 TGF-β 诱导的心肌成纤维活化模型中, Smad2/3 磷酸化水平的降低有效缓解了心肌成纤维细胞活化^[33],上述研究表明 Smad2/3 磷酸化水平的升高与纤维化过程密切相关。

本研究观察到 Dnm3os 通过 Smad2/3 通路,参与了心肌成纤维细胞的活化,提示其在纤维化疾病的发生发展中可能起着重要作用。然而, Dnm3os 如何通过 Smad2/3 通路来调节心肌纤维化,特别是其直接或间接作用的下游靶基因是什么,有待深入的研究验证。此外,在体内动物实验中干扰 Dnm3os 的表达,是否能缓解心肌纤维化的程度,需要进一步的研究。

综上所述, LncRNA Dnm3os 通过 Smad2/3 通路介导了心肌成纤维细胞的活化;而干预 LncRNA Dnm3os 的表达可能成为治疗心肌纤维化的潜在靶点。

利益冲突声明: 本文全体作者均声明不存在利益冲突。

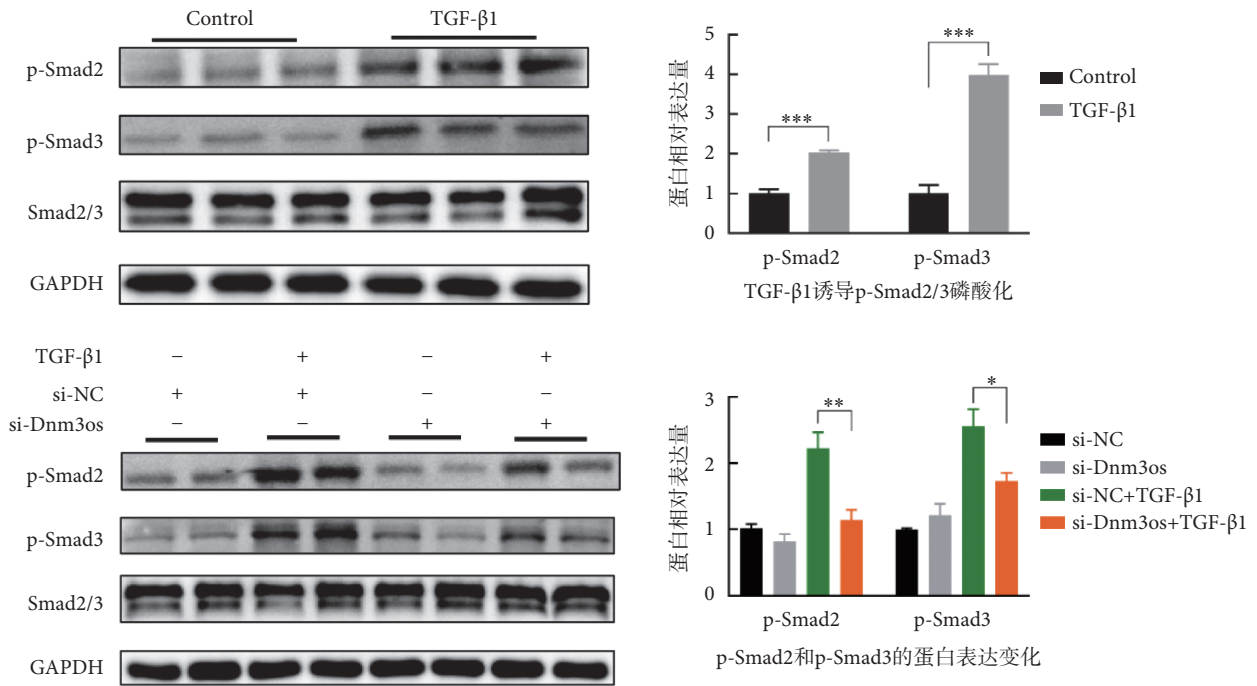


图 6 Dnm3os 影响 Smad2/3 信号通路来调节 TGF-β1 诱导的心肌纤维细胞活化 (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

Fig.6 Dnm3os regulates Smad2/3 signaling pathway in TGF-β1-induced cardiac fibroblasts activation (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

参考文献

- Perestrelo A R, Silva A C, Oliver-De L J, *et al.* Multiscale analysis of extracellular matrix remodeling in the failing heart. *Circ Res*, 2021, 128(1): 24-38.
- Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, *et al.* Fibroblast-specific TGF-β-Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3770-3783.
- Morishige S, Takahashi-Yanaga F, Ishikane S, *et al.* 2, 5-Dimethylcelecoxib prevents isoprenaline-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast activation by inhibiting Akt-mediated GSK-3 phosphorylation. *Biochem Pharmacol*, 2019, 168: 82-90.
- Gil N, Ulitsky I. Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(2): 102-117.
- Qian X, Zhao J, Yeung P Y, *et al.* Revealing lncRNA structures and interactions by sequencing-based approaches. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(1): 33-52.
- Li Yongqin, Liang Yajun, Zhu Yujiao, *et al.* Noncoding RNAs in cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Transl Res*, 2018, 11(6): 439-449.
- Jusic A, Devaux Y. Action E U-C C mitochondrial noncoding RNA-regulatory network in cardiovascular disease. *Basic Res Cardiol*, 2020, 115: 23.
- LU Dongchao, Thum T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(11): 661-674.
- Mei Z, Huang B, Zhang Y, *et al.* Histone deacetylase 6 negatively regulated microRNA-199a-5p induces the occurrence of preeclampsia by targeting VEGFA *in vitro*. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108805.
- Wang H. Ji X SMAD6, positively regulated by the DNM3OS-miR-134-5p axis, confers promoting effects to cell proliferation, migration and EMT process in retinoblastoma. *Cancer Cell International*, 2020, 2020(20): 23.
- Wang S, Ni B, Zhang Z, *et al.* Long non-coding RNA DNM3OS promotes tumor progression and EMT in gastric cancer by associating with Snail. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(1): 57-62.
- Zheng W, Chen C, Chen S, *et al.* Integrated analysis of long non-coding RNAs and mRNAs associated with peritendinous fibrosis. *J Adv Res*, 2019, 15: 49-58.
- Savary G, Dewaeles E, Diazi S, *et al.* The long noncoding RNA DNM3OS is a reservoir of fibromirs with major functions in lung fibroblast response to TGF-β and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(2): 184-198.
- Chen L, Chen R J, Kemper S, *et al.* Suppression of fibrogenic signaling in hepatic stellate cells by twist1-dependent microRNA-214 expression: role of exosomes in horizontal transfer of twist1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309(6): G491-G499.
- Zhou J, Tian G, Quan Y, *et al.* Inhibition of P2X7 purinergic receptor ameliorates cardiac fibrosis by suppressing NLRP3/IL-1beta pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7956274.
- Lee S A, Yang H W, Um J Y, *et al.* Vitamin D attenuates myofibroblast differentiation and extracellular matrix accumulation in nasal polyp-derived fibroblasts through smad2/3 signaling pathway. *Sci Rep*, 2017, 7: 7299.
- Qu J, Li M, Li D, *et al.* Stimulation of sigma-1 receptor protects against cardiac fibrosis by alleviating IRE1 pathway and autophagy impairment. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8836818.
- Ramjee V, Li D, Manderfield L J, *et al.* Epicardial YAP/TAZ orchestrate an immunosuppressive response following myocardial infarction. *J Clin Invest*, 2017, 127(3): 899-911.
- Zhao Y, Wang C, Hong X, *et al.* Wnt/β-catenin signaling mediates both heart and kidney injury in type 2 cardiorenal syndrome.

- Kidney Int, 2019, 95(4): 815-829.
- 20 Yao Y, Hu C, Song Q, *et al.* ADAMTS16 activates latent TGF- β , accentuating fibrosis and dysfunction of the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(5): 956-969.
- 21 Oatmen K E, Cull E, Spinale F G. Heart failure as interstitial cancer: emergence of a malignant fibroblast phenotype. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(8): 523-531.
- 22 Greco S, Salgado S A, Devaux Y, *et al.* Long noncoding RNAs and cardiac disease. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(9): 880-901.
- 23 Lozano-Vidal N, Bink D I, Boon R A. Long noncoding RNA in cardiac aging and disease. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(10): 860-867.
- 24 Piccoli M T, Gupta S K, Viereck J, *et al.* Inhibition of the cardiac fibroblast-enriched lncRNA meg3 prevents cardiac fibrosis and diastolic dysfunction. *Circ Res*, 2017, 121(5): 575-583.
- 25 Liang H, Pan Z, Zhao X, *et al.* LncRNA PFL contributes to cardiac fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of let-7d. *Theranostics*, 2018, 8(4): 1180-1194.
- 26 Zhang F, Fu X, Kataoka M, *et al.* Long noncoding RNA Cfast regulates cardiac fibrosis. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 23: 377-392.
- 27 Das S, Reddy M, Senapati P, *et al.* Diabetes Mellitus-Induced long noncoding RNA Dnm3os regulates macrophage functions and inflammation via nuclear mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(8): 1806-1820.
- 28 el Azzouzi H, Leptidis S, Dirx E, *et al.* The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a approximately 214 targets myocardial PPAR δ and impairs mitochondrial fatty acid oxidation. *Cell Metab*, 2013, 18(3): 341-354.
- 29 Higgins S P, Tang Y, Higgins C E, *et al.* TGF- β 1/p53 signaling in renal fibrogenesis. *Cell Signal*, 2018, 43: 1-10.
- 30 Wu C, Chen W, Ding H, *et al.* Salvianolic acid B exerts anti-liver fibrosis effects via inhibition of MAPK-mediated phospho-Smad2/3at linker regions *in vivo* and *in vitro*. *Life Sciences*, 2019, 239: 116881.
- 31 Lv Q, Wang J, Xu C, *et al.* Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis *in vitro* and *in vivo* through regulating Wnt/GSK-3beta/beta-catenin and TGF-beta1/Smad2/3 signaling pathways. *Mol Med*, 2020, 26: 49.
- 32 Arno B, Galli F, Roostalu U, *et al.* TNAP limits TGF-beta-dependent cardiac and skeletal muscle fibrosis by inactivating the SMAD2/3 transcription factors. *J Cell Sci*, 2019.
- 33 Zhu J X, Ling W, Xue C, *et al.* Higenamine attenuates cardiac fibroblast activation and fibrosis via inhibition of TGF-beta1/Smad signaling. *European Journal of Pharmacology*, 2021: 174013.

收稿日期: 2021-02-15 修回日期: 2021-04-01

本文编辑: 陈咏竹