

• 论 著 •

高糖培养条件下 lncRNA CCAT2 调控心肌细胞损伤和凋亡的机制研究*

宋金萍, 崔彦杰, 刘 熔[△]

新疆维吾尔自治区人民医院临床检验中心, 新疆乌鲁木齐 830001

摘要:目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNA) 结肠癌相关转录本 2(CCAT2) 在高糖培养条件下心肌细胞中的表达变化及通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控心肌细胞损伤和凋亡的机制。方法 体外培养人心肌细胞 AC16, 将细胞分为 4 组, 对照组、高糖组、高糖+干扰 RNA 阴性对照组、高糖+干扰 RNA 组(干扰 RNA 的靶标为 lncRNA CCAT2)。采用 CCK8 法及流式细胞术检测细胞增殖和凋亡率; 实时荧光定量 PCR(qPCR) 检测 lncRNA CCAT2、 β -catenin、转录因子 7 类似物 2(TCF7L2)、Caspase-3、c-Myc、细胞周期蛋白(Cyclin)D1 基因的表达; Western blot 检测 β -catenin、TCF7L2、CyclinD1 蛋白表达; 检测细胞培养液中超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性。结果 高糖培养条件下的 AC16 心肌细胞 lncRNA CCAT2 的基因表达显著高于对照组($P<0.05$), 同时 β -catenin、TCF7L2、Caspase-3、c-Myc、CyclinD1 基因表达显著上调($P<0.05$), 细胞增殖受到抑制($P<0.05$), 凋亡率增加($P<0.05$), 细胞培养液中 LDH 和 AST 活性显著升高($P<0.05$), 细胞中 SOD 活性显著降低($P<0.05$)。高糖培养条件下, RNA 干扰 lncRNA CCAT2 表达后, 细胞增殖增加($P<0.05$), 细胞凋亡率显著下降($P<0.05$), β -catenin、TCF7L2、Caspase-3、c-Myc、CyclinD1 基因的表达下调($P<0.05$), β -catenin(细胞核)、TCF7L2、CyclinD1 蛋白表达显著下调($P<0.05$), β -catenin(细胞质)蛋白表达显著上调($P<0.05$)。结论 高糖条件下, lncRNA CCAT2 可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控心肌细胞损伤和凋亡。

关键词:长链非编码 RNA; 结肠癌相关转录本 2; Wnt 信号通路; 心肌细胞; 高糖培养条件; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.05.014

中图法分类号:Q255

文章编号:1673-4130(2024)05-0578-07

文献标志码:A

Mechanism of lncRNA CCAT2 regulating cardiomyocyte injury and apoptosis under high glucose culture condition*

SONG Jinping, CUI Yanjie, LIU Rong[△]

Clinical Laboratory Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of long non-coding RNA (lncRNA) colon cancer associated transcript 2(CCAT2) in cardiomyocytes cultured under high glucose culture condition and its mechanism of regulating cardiomyocyte injury and apoptosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** Human myocardial cells AC16 were cultured in vitro, and the cells were divided into 4 groups: control group, high glucose group, high glucose + interference RNA negative control group, and high glucose + interference RNA group (the target of interference RNA was lncRNA CCAT2). Cell proliferation and apoptosis were detected by CCK8 assay and flow cytometry. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of lncRNA CCAT2, β -catenin, transcription factor 7 analogue 2 (TCF7L2), Caspase-3, c-Myc, and CyclinD1 genes. The protein expressions of β -catenin, TCF7L2 and CyclinD1 were detected by Western blot. The activities of superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) in cell culture medium were detected. **Results** The gene expression of lncRNA CCAT2 in AC16 cardiomyocytes cultured in high glucose was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$), and the gene expressions of β -catenin, TCF7L2, Caspase-3, c-Myc and CyclinD1 were significantly up-regulated ($P<0.05$). The cell proliferation was inhibited ($P<0.05$), the apoptosis rate was increased ($P<$

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2020D01C113)。

作者简介:宋金萍,女,副研究员,主要从事心血管疾病研究。 [△] 通信作者, E-mail: songjinping2022@163.com。

0.05), the activities of LDH and AST in the cell culture medium were increased ($P < 0.05$), and the activity of SOD in the cells was decreased ($P < 0.05$). Under high glucose condition, after RNA interference of lncRNA CCAT2 expression, cell proliferation was increased ($P < 0.05$), cell apoptosis rate was decreased ($P < 0.05$), and the expression of β -catenin, TCF7L2, Caspase-3, c-Myc and CyclinD1 genes was down-regulated ($P < 0.05$). The expression of β -catenin (nuclear), TCF7L2 and CyclinD1 protein was significantly down-regulated ($P < 0.05$), and the expression of β -catenin (cytoplasmic) protein was significantly up-regulated ($P < 0.05$).

Conclusion lncRNA CCAT2 regulates cardiomyocyte injury and apoptosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway under high glucose condition.

Key words: lncRNA; colon cancer associated transcript 2; Wnt signaling pathway; cardiomyocytes; high glucose culture conditions; apoptosis

糖尿病心肌病(DCM)是糖尿病患者心脏的特异性病变,独立于高血压和冠心病,与糖尿病患者发生心力衰竭和病死率升高密切相关^[1]。DCM 发病因素多,确切的发病机制仍不明确^[2]。心肌细胞的损伤与凋亡是引起 DCM 的主要原因^[3]。高血糖诱导的心肌细胞的损伤和凋亡可能是造成心室结构改变的重要原因,最终导致心功能障碍^[4]。因此,研究如何减轻心肌细胞损伤与凋亡具有重要意义。长链非编码 RNA(lncRNA)的异常表达被证实在分子水平调控了 DCM 的病理发展过程^[5]。研究证实,lncRNA 结肠癌相关转录本 2(CCAT2)可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进肿瘤细胞增殖,抑制细胞凋亡^[6]。那么高糖条件下,lncRNA CCAT2 是否通过 Wnt 信号通路调控心肌细胞的损伤和凋亡。在此,本课题组研究了 lncRNA CCAT2 在高糖诱导的 AC16 心肌细胞损伤和凋亡中的作用,并对 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控机制进行了研究。研究结果表明,靶向 lncRNA CCAT2 可能是一种很有前景的 DCM 治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人心肌细胞 AC16 购自雅吉生物公司。

1.2 仪器与试剂 DMEM(高糖)培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自 Excell Bio 公司,青霉素-链霉素双抗和胰酶(0.25% Trypsin-EDTA)购自美国 Gibco 公司;CCK8 细胞增殖/毒性检测试剂盒购自全式金生物公司;Lipofectamine 3000[®] (Lipo3000)转染试剂购自 Invitrogen 公司;干扰 RNA 阴性对照、干扰 RNA(干扰靶点为 lncRNA CCAT2)、riboMONITOR Transfection Indicator 试剂盒购自广州锐博公司;TRIzolTM Reagent 购自 Ambion 公司;反转录试剂盒 5×All-In-One RT MasterMix (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit)和基因扩增试剂盒 EvaGreen Express 2×qPCR MasterMix-Low Rox 购自 ABM 公司;Annexin V PE/7AAD 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的活性测试试剂盒购自南京建成科技有限公司;哺乳动物细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒购自北京全式金生物

公司。重组 β -catenin 一抗(小鼠源)、转录因子 7 类似物 2(TCF7L2)一抗(兔源)、细胞周期蛋白(Cyclin)D1 一抗(兔源)购自美国 Abcam 公司。内参组蛋白 H3 抗体(兔源)、 β -actin 抗体(小鼠源)购自 CST。二抗山羊抗兔 IgG H&L(HRP)和山羊抗小鼠 IgG H&L(HRP)购自 ABM 公司。实时荧光定量 PCR(qPCR)仪(ABI 7500 Fast 型)购自美国 ABI 公司;酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 用于实验的细胞培养 AC16 细胞培养条件为 DMEM(高糖)培养基 + 10% FBS + 1% 双抗, 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度。AC16 细胞生长至对数期时用于实验。取生长状态良好、汇合率达 90% 的细胞消化传代。

1.3.2 实验条件筛选 用含不同葡萄糖水平(5、15、25、35、45、55 mmol/L)的培养基培养细胞。采用增殖最快的葡萄糖水平作为正常培养条件的葡萄糖水平,采用增殖受到明显抑制的葡萄糖水平作为高糖培养条件的葡萄糖水平。

1.3.3 实验分组 后续实验中,将 AC16 细胞分为 4 组进行培养。对照组:在正常培养条件下培养 48 h;高糖组:先在正常培养条件培养 24 h,再在高糖培养条件下培养 48 h;高糖+干扰 RNA 阴性对照组:使用 Lipo3000(1.5 μ L/mL)转染阴性对照干扰 RNA(100 nmol/L)24 h 后,在高糖培养条件下继续培养 48 h;高糖+干扰 RNA 组:使用 Lipo3000(1.5 μ L/mL)转染干扰 RNA 100 nmol/L(干扰 RNA 的靶标为 lncRNA CCAT2)24 h 后,在高糖培养条件下继续培养 48 h。

1.3.4 干扰 RNA 的转染 lncRNA CCAT2 干扰 RNA 由 3 条特异性的小干扰 RNA(siRNA)和 3 条反义寡核苷酸(ASO)组成。转染前 1 h 接种生长至对数期的 AC16 细胞于 6 孔板,接种浓度为 3.6×10^5 个/孔,观察细胞生长状态,当细胞生长融合达 80%~90% 时转染阴性对照干扰 RNA、干扰 RNA,转染采用瞬时转染。转染 24 h 后,再在高糖培养条件下培养 48 h,收集细胞,用于细胞增殖、凋亡及基因表达等后续检测。

1.3.5 CCK8 检测细胞增殖 将 AC16 细胞接种于

96 孔板(每孔 100 μL , 5×10^3 个/孔)中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。然后,将细胞进行分组培养,按 1.3.3 中的方法进行处理。处理后,每孔加入 100 μL 制备的 10% CCK8 溶液。孵育 1 h 后,用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度(A)值。

1.3.6 细胞凋亡检测 处理后,收集 AC16 细胞,在 500 μL 1 $\times$ 结合缓冲液中重新悬浮。将细胞悬液与 5 μL Annexin V-PE 和 10 μL 7-AAD 试剂在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。计算凋亡细胞数目的总和(Q2+Q3 象限),计算凋亡率。

1.3.7 细胞损伤指标检测 细胞分组处理后,收集细胞和细胞培养上清,用相应的试剂盒测定 SOD、LDH 和 AST 的活性。

1.3.8 qPCR 检测 lncRNA CCAT2 及 Wnt/ β -catenin 通路基因表达水平 按 Trizol 试剂盒提取操作流程提取细胞 RNA,用反转录试剂盒反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,使用 ABM 公司的基因扩增试剂,采用 20 μL 的反应体系,进行 qPCR 检测。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 lncRNA CCAT2、 β -catenin、TCF7L2、Caspase-3、c-Myc、CyclinD1 的相对表达水平。qPCR 引物及干扰 RNA 序列见表 1。

表 1 qPCR 引物及干扰 RNA 序列	
名称	序列(5'-3')
qPCR 引物	
GAPDH	F:TGTTGCCATCAATGACCCCTT R:CTCCACGACGTACTCAGCG
lncRNA CCAT2	F:CTTCCAGCTCCACCTCTG R:GAGCTCAAAGGACGATGAGG
β -catenin	F:CATCTACACAGTTTGATGCTGCT R:GCAGTTTTTGTCAGTTCAGGGA
TCF7L2	F:GAAGGAGCGACAGCTTCATA R:GGGGGAGGCGAATCTAGTAA
Caspase-3	F:GAAATGTGGAATTGATGCGTGA R:CTACAACGATCCCTCTGAAAAA
c-Myc	F:GTCAAGAGGCGAACACACAAC R:TTGGACGGACAGGATGTATGC
CyclinD1	F:GGAGGAGGGTTGTGTACAG R:GCCTAGAACCCCACTACAGC
siRNA 序列	
lncRNA CCAT2 干扰 RNA1	GCCTGACCCGTGGTCAAATTG
lncRNA CCAT2 干扰 RNA2	TTAAAGCTACCAGCAGCACC
lncRNA CCAT2 干扰 RNA3	CACTTTCCAGCAGGCTGTA
ASO 序列	
lncRNA CCAT2 干扰 RNA4	CCAAATGATCATCAGACAT
lncRNA CCAT2 干扰 RNA5	CCAGGCAATAACTGTGCAA
lncRNA CCAT2 干扰 RNA6	GCGCTGACAGAGATTGCTT

1.3.9 Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达水平 收集细胞 1×10^6 个,冷 PBS 漂洗 2 次,1 000 $\times$ g 离心 3 min,弃上清。细胞蛋白提取步骤如下,向细胞沉淀中加入 1 mL 细胞质蛋白提取液 I,剧烈振荡 15 s,冰上孵育 10 min,其间每 2 min 振荡混均 1 次。加入 55 μL 细胞质蛋白提取液 II,高速涡旋振荡 5 s,冰上孵育 1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 16 000 $\times$ g 离心 15 min,小心收集上清(得到细胞质蛋白标本),冰上放置。向沉淀中加入 500 μL 细胞质蛋白提取液 I,重悬,高速涡旋振荡 5 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 16 000 $\times$ g 离心 5 min,小心弃上清。加入 500 μL 核蛋白提取液,将沉淀重悬,高速涡旋振荡 15 s,冰上孵育 30 min,其间每隔 5 min 高速涡旋振荡 15 s。4 $^{\circ}\text{C}$ 16 000 $\times$ g 离心 10 min,小心收集上清(得到细胞核蛋白标本)。采用 BCA 法测定蛋白浓度。然后,通过 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,并转移到 PVDF 膜上。然后,将膜与抗 β -catenin、TCF7L2、CyclinD1、内参(组蛋白 H3 和 β -actin)的一抗以及相应的二抗一起孵育。用 ECL 试剂盒进行显色处理。计算蛋白相对表达水平。

1.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS19.0 进行统计分析。符合正态分布且方差齐的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同水平葡萄糖对 AC16 细胞增殖的影响 用含不同水平葡萄糖的培养基培养 AC16 细胞 48 h 后,检测细胞增殖情况。葡萄糖水平为 5 mmol/L 和 15 mmol/L 的培养基中,AC16 细胞增殖受到抑制;葡萄糖水平增加到 25 mmol/L 时,AC16 细胞增殖最快;葡萄糖水平增加到 35 mmol/L 时,细胞增殖开始受到抑制,并且随葡萄糖水平增加抑制程度增加,见图 1。CCK8 法检测各组细胞的增殖情况;结果与细胞生长形态观察结果一致;葡萄糖水平为 25 mmol/L 时 A 值最高,与其他葡萄糖水平 A 值比较,差异有统计学意义($P<0.05$);葡萄糖水平低于 25 mmol/L 时,A 值随葡萄糖水平的增加而增加;葡萄糖水平增加到 35、45、55 mmol/L 时,A 值随葡萄糖水平的增加而逐渐降低。因此,采用增殖最快的葡萄糖水平 25 mmol/L 作为正常培养条件,采用增殖受到明显抑制的葡萄糖水平 55 mmol/L 作为高糖培养条件。

2.2 lncRNA CCAT2 在高糖培养条件下的 AC16 细胞中表达上调 qPCR 检测 lncRNA CCAT2 的表达,与对照组比较,高糖组和高糖+干扰 RNA 阴性对照组的 lncRNA CCAT2 的表达上调($P<0.05$)。与高糖组和高糖+干扰 RNA 阴性对照组相比,高糖+干扰 RNA 组 lncRNA CCAT2 的表达降低($P<0.05$)。见图 2。lncRNA CCAT2 特异性干扰 RNA 能有效抑制 lncRNA CCAT2 的表达。

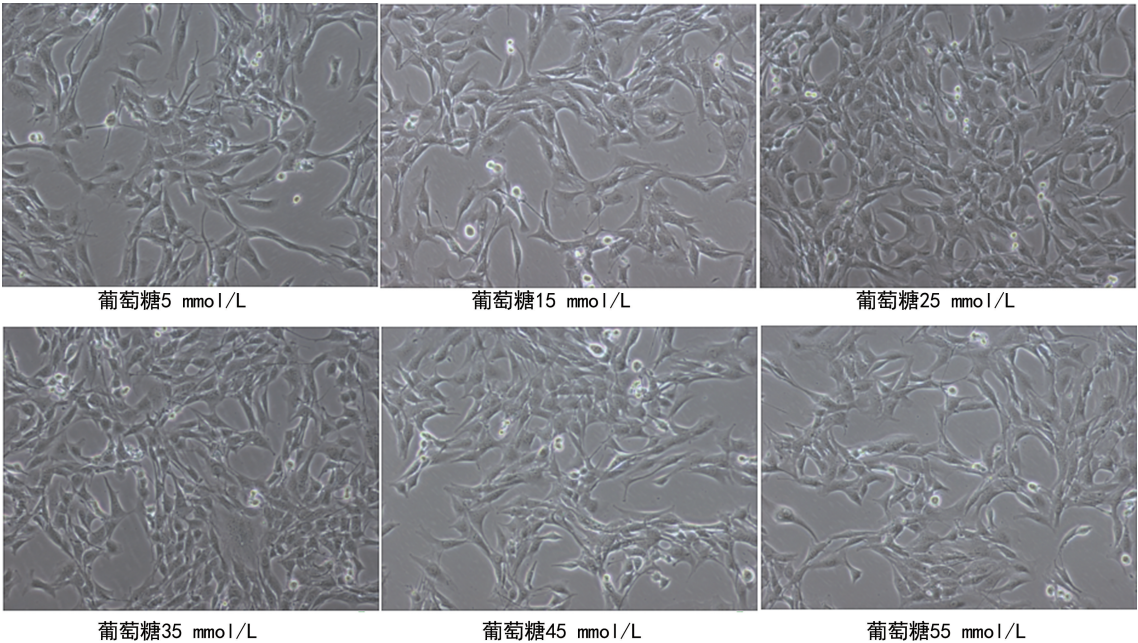
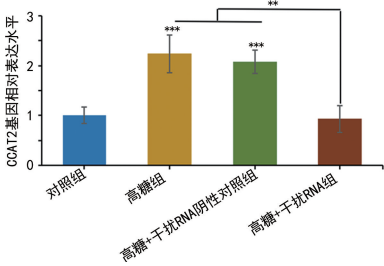


图 1 不同葡萄糖水平培养 AC16 细胞生长情况 (×100)

2.3 下调 lncRNA CCAT2 可提高 AC16 细胞增殖能力 采用 CCK8 法检测细胞增殖情况。结果显示,与对照组比较,高糖组和高糖+干扰 RNA 阴性对照组的 A 值降低($P<0.05$);与高糖组和高糖+干扰 RNA 阴性对照组比较,高糖+干扰 RNA 组的 A 值升高($P<0.05$)。抑制 lncRNA CCAT2 表达可以促进高糖条件下 AC16 细胞的增殖。见图 3。

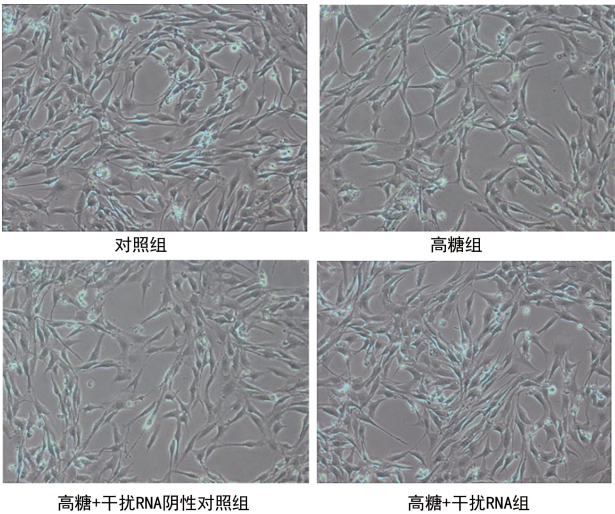
2.4 下调 lncRNA CCAT2 可抑制 AC16 细胞损伤和凋亡 与对照组相比,高糖组和高糖+干扰 RNA 阴性对照组的 LDH 和 AST 活性显著升高($P<0.05$),而 SOD 显著降低($P<0.05$);高糖+干扰 RNA 组 LDH 和 AST 活性显著低于高糖组($P<0.05$),而 SOD 显著高于高糖组($P<0.05$),见图 4。采用流式细胞术检测高糖培养条件下, lncRNA

CCAT2 对 AC16 细胞凋亡的影响, lncRNA CCAT2 特异性干扰 RNA 会抑制高糖培养条件下的 AC16 细胞凋亡($P<0.05$),见图 5。



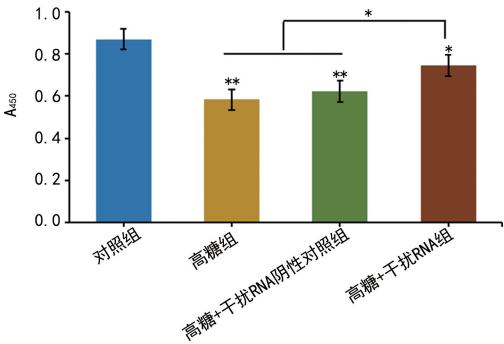
注:与对照组或高糖+干扰 RNA 组(星号标于连线上方)比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

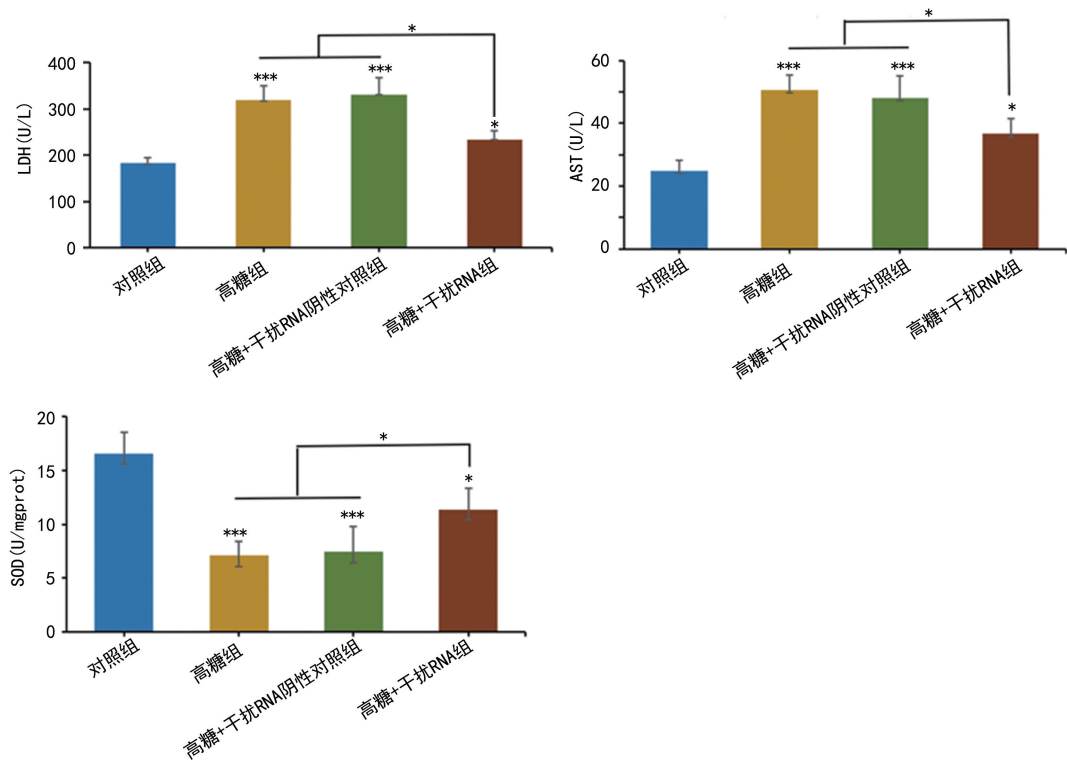
图 2 lncRNA CCAT2 在高糖培养条件下的 AC16 细胞中表达上调



注: A 为各组细胞生长形态图 (×100); B 为 CCK8 检测各组 AC16 细胞的 A 值; 与对照组或高糖+干扰 RNA 组(星号标于连线上方)比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

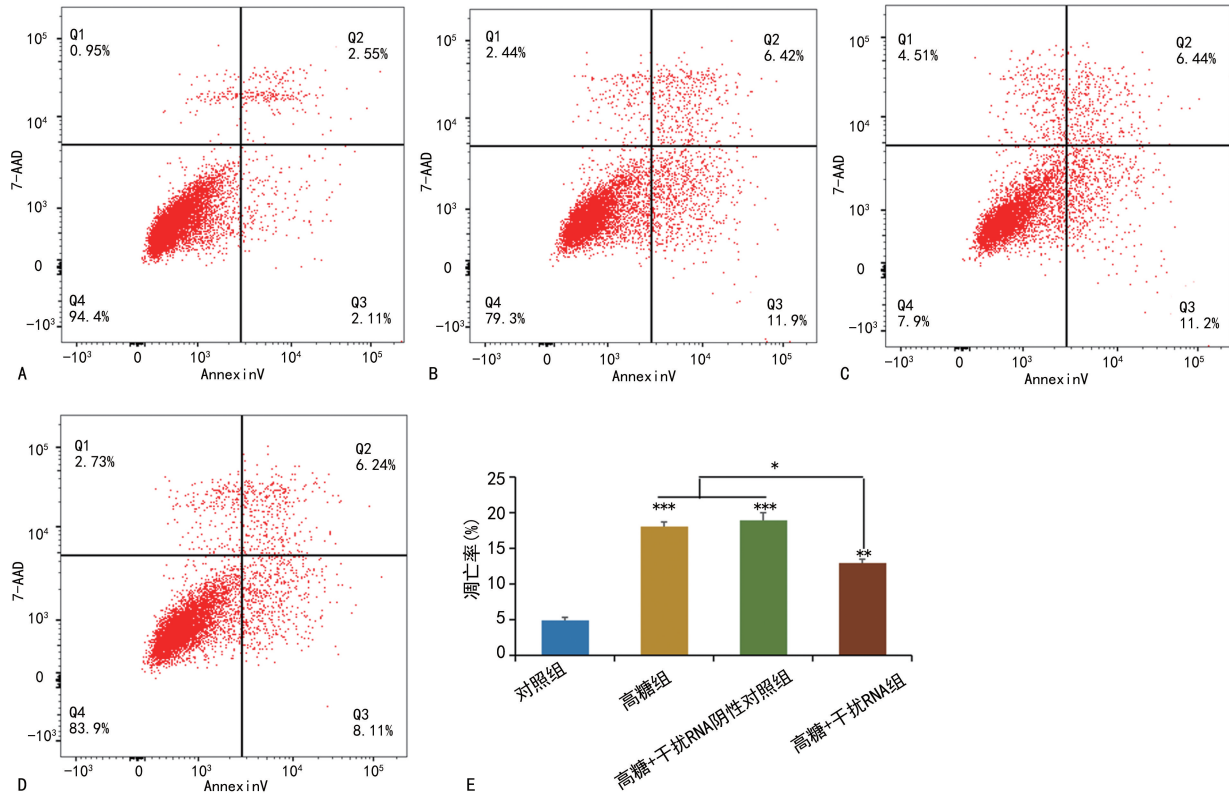
图 3 下调 lncRNA CCAT2 可促进高糖条件下 AC16 细胞的增殖





注:与对照组或高糖+干扰 RNA 组(星号标于连线上方)比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 4 高糖条件下 lncRNA CCAT2 对 AC16 细胞损伤标志物的影响



注:A 为对照组;B 为高糖组;C 为高糖+干扰 RNA 阴性对照组;D 为高糖+干扰 RNA 组;E 为各组细胞凋亡率比较,细胞凋亡率=凋亡细胞数(Q2+Q3)/细胞总数;与对照组或高糖+干扰 RNA 组(星号标于连线上方)比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

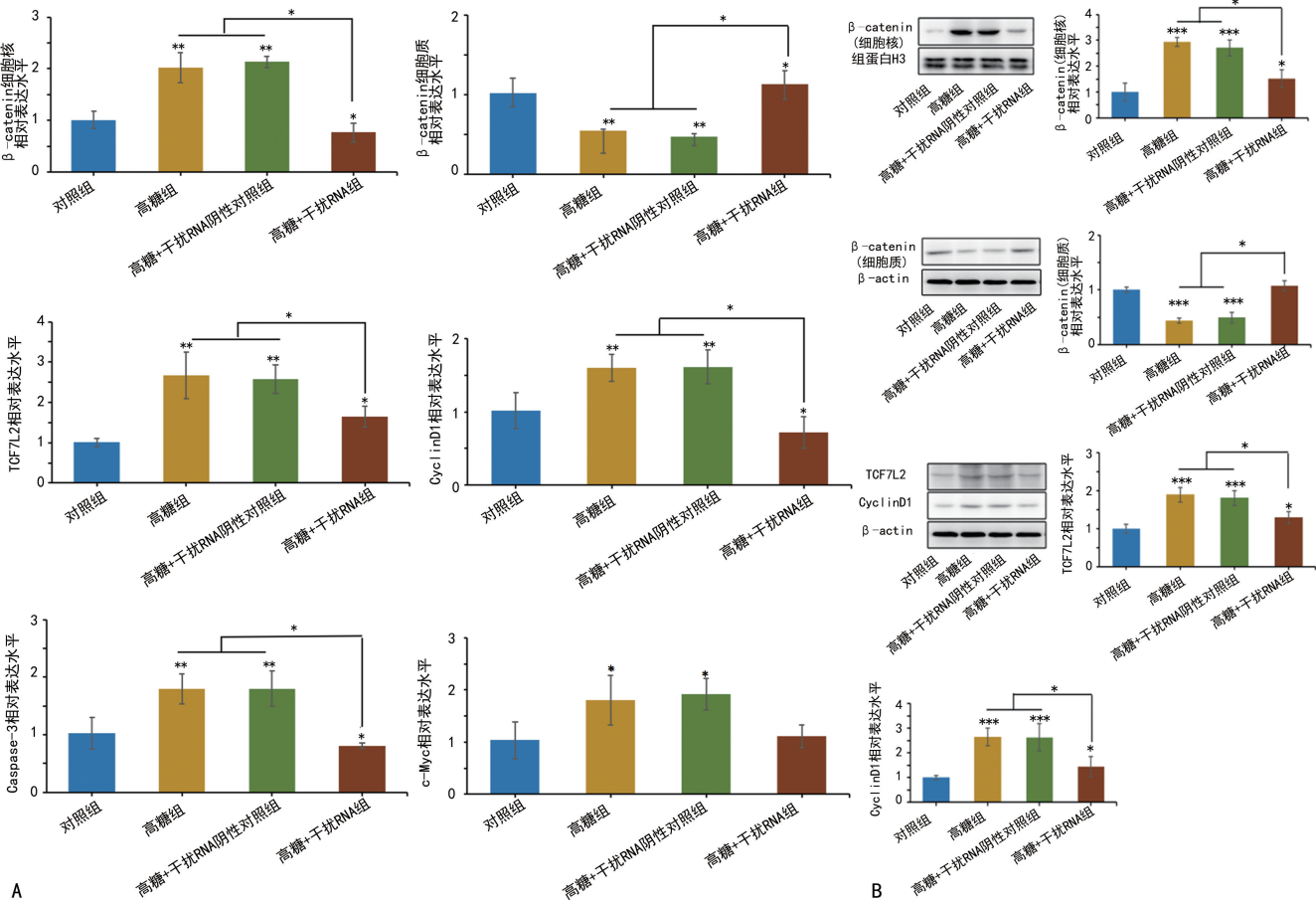
图 5 高糖条件下 lncRNA CCAT2 对 AC16 细胞凋亡的影响

2.5 lncRNA CCAT2 对高糖培养条件下 AC16 细胞 Wnt 信号通路的影响 qPCR 检测显示,在高糖培养条件下,核内 β -catenin mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$),细胞质中 β -catenin mRNA 表达显著下降

($P<0.05$),见图 6A。Western blot 检测结果显示,细胞质中 β -catenin 的表达显著下调 ($P<0.05$),而细胞核中的表达显著上调 ($P<0.05$),采用干扰 RNA 下调 lncRNA CCAT2 的表达逆转了 β -catenin 表达的

上述变化($P<0.05$),见图 6B。此外,在高糖培养条件下,lncRNA CCAT2 靶基因 TCF7L2 的 mRNA 和蛋白表达均显著上调($P<0.05$),抑制 lncRNA CCAT2 的表达后,TCF7L2 的表达显著下调($P<$

0.05),见图 6。在高糖条件下,Wnt/ β -catenin 信号通路被激活,抑制 lncRNA CCAT2 的表达可以通过 β -catenin 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路及其下游基因的表达。



注:A为qPCR检测lncRNA CCAT2表达对Wnt信号通路基因表达的影响;B为Western blot检测lncRNA CCAT2对Wnt信号通路蛋白表达的影响;与对照组或高糖+干扰RNA组(星号标于连线上方)比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图6 lncRNA CCAT2对高糖培养条件下AC16细胞Wnt信号通路的影响

3 讨论

一些 lncRNA 通过调节凋亡过程参与 DCM 的病理生理过程^[7]。lncRNA CCAT2 是一种新型的 lncRNA,位于 8 号染色体长臂 2 区 4 带(8q24),高度保守,由 1 752 个核苷酸组成,首先在大肠癌中被发现并命名^[8]。lncRNA CCAT2 除了在结直肠癌,还在卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌等其他肿瘤疾病中异常表达,并对肿瘤细胞的增殖、凋亡起调控作用^[9]。然而,lncRNA CCAT2 在心血管疾病中的研究鲜见报道。本研究发现,在高糖条件下,lncRNA CCAT2 在心肌细胞中显著上调,而沉默 lncRNA CCAT2 可降低心肌细胞的损伤和凋亡。提示 lncRNA CCAT2 可能是糖代谢异常诱导 DCM 发病的关键因素。

由于 lncRNA CCAT2 在调节心肌细胞损伤和凋亡中表现出了重要作用,因此本研究进一步探索了 lncRNA CCAT2 调控心肌细胞凋亡的机制。已经有研究证实糖尿病患者长期高血糖可诱导心肌细胞凋

亡^[10]。心肌细胞凋亡导致的细胞损失降低了心脏舒张、收缩功能,并且促进了心脏重塑和心力衰竭^[11],参与了 DCM 的发病过程。典型的 Wnt/ β -catenin 信号通路与心脏重构、心肌梗死、心力衰竭和心律失常的病理过程相关。TCF7L2 是 Wnt 信号通路的一员,位于 10q25 染色体上,是调节胰腺 β 细胞增殖的必要分子,参与调节胰岛素的表达、分泌和加工^[12]。然而,TCF7L2 在不同的组织和细胞中的作用是不同的。例如,TCF7L2 在糖尿病小鼠的视网膜神经细胞中高表达,引起内质网应激,进而促进糖尿病视网膜病变^[13],而 TCF7L2 在脂肪细胞中低表达,可导致脂肪细胞和葡萄糖代谢受损^[14]。本研究中,高糖培养条件下,人 AC16 心肌细胞中 TCF7L2 基因和蛋白的表达显著上调。而沉默 lncRNA CCAT2 后,其 TCF7L2 基因和蛋白被下调。这一结果证明 TCF7L2 在高糖培养条件下的心肌细胞中异常表达,并提示 lncRNA CCAT2 对 TCF7L2 有调控作用。

此外,TCF7L2 在肠道、肝脏、骨骼肌、胰腺组织和大脑中的 Wnt 信号通路和葡萄糖代谢的调控中起着关键作用^[15]。Wnt/ β -catenin 信号通路已被证明通过调控下游基因来管理许多不同器官的成体干细胞的胚胎发育和更新,并密切参与了增殖和凋亡过程^[16]。TCF7L2/Wnt/ β -catenin 通路参与了多种糖代谢疾病,包括糖尿病肾病和糖尿病视网膜病变^[17]。已知 TCF7L2 是肿瘤细胞中 Wnt/ β -catenin 激活剂^[18],但是也有报道证实 TCF7L2 在脂肪组织中具有拮抗 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用^[14]。

本研究发现,高糖条件下,Wnt/ β -catenin 通路被显著激活,而沉默 lncRNA CCAT2 后,该通路被显著抑制,同时细胞损伤和凋亡减少。因此,在高糖培养条件下,lncRNA CCAT2 表达上调,能促进 Wnt/ β -catenin 通路中 β -catenin 蛋白的核转移,并进一步上调靶基因 TCF7L2 以及下游细胞周期和凋亡基因的表达。这些最终导致细胞损伤和凋亡增加。值得注意的是,抑制 lncRNA CCAT2 的表达可以抑制 Wnt/ β -catenin 通路的激活,减轻高糖诱导的细胞损伤和凋亡。

本研究发现,lncRNA CCAT2 可通过调控 TCF7L2/Wnt/ β -catenin 信号通路来促进心肌细胞凋亡和损伤,可能是 DCM 诊断和治疗的潜在生物标志物。研究结果揭示了 lncRNA CCAT2 在体外 DCM 模型中对心肌细胞损伤和凋亡的调控机制。在后续研究中,本课题组还将利用 DCM 的动物模型和临床样本进行实验,以进一步揭示 lncRNA CCAT2 在 DCM 中的作用。

参考文献

[1] KIM A H,JANG J E,HAN J. Current status on the therapeutic strategies for heart failure and diabetic cardiomyopathy[J]. Biomed Pharmacother,2022,145:112463.

[2] LORENZO-ALMOROS A,CEPEDA-RODRIGO J M,LORENZO O. Diabetic cardiomyopathy[J]. Rev Clin Esp (Barc),2022,222(2):100-111.

[3] LIU Q,WANG S,CAI L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms:role of oxidative stress and damage[J]. J Diabetes Investig,2014,5(6):623-634.

[4] JANKAUSKAS S S,KANSAKAR U,VARZIDEH F,et al. Heart failure in diabetes [J]. Metabolism, 2021, 125: 154910.

[5] QIN W,ZHAO X,TAI J,et al. Combination of dendrobium mixture and metformin curbs the development and progression of diabetic cardiomyopathy by targeting the lncRNA NEAT1 [J]. Clinics (Sao Paulo), 2021, 76: e2669.

[6] SHAKER O G,SENOUSY M A,ELBAZ E M. Association of rs6983267 at 8q24, HULC rs7763881 polymor-

phisms and serum lncRNAs CCAT2 and HULC with colorectal cancer in Egyptian patients[J]. Sci Rep,2017,7(1):16246-16256.

[7] WANG Y,SUN X. The functions of lncRNA in the heart [J]. Diabetes Res Clin Pract,2020,168:108249.

[8] XIN Y,LI Z,ZHENG H,et al. CCAT2:a novel oncogenic long non-coding RNA in human cancers[J]. Cell Prolif, 2017,50(3):e12342.

[9] 张培培,刘巍,李委佳,等. 长链非编码 RNA CCAT2 在肿瘤中的研究进展[J]. 国际免疫学杂志,2017,40(5):575-579.

[10] EL HAYEK M S,ERNANDE L,BENITAH J P,et al. The role of hyperglycaemia in the development of diabetic cardiomyopathy[J]. Arch Cardiovasc Dis,2021,114(11): 748-760.

[11] ABUKHALIL M H,ALTHUNIBAT O Y,ALADAI-LEH S H,et al. Galangin attenuates diabetic cardiomyopathy through modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2021,138:111410.

[12] YE Y,BARGHOUTH M,LUAN C,et al. The TCF7L2-dependent high-voltage activated calcium channel subunit $\alpha 2\delta$ -1 controls calcium signaling in rodent pancreatic beta-cells[J]. Mol Cell Endocrinol,2020,502:110673.

[13] WU K,ZHOU K,ZHAO M,et al. TCF7L2 promotes ER stress signaling in diabetic retinopathy[J]. Exp Eye Res, 2022,221:109142.

[14] GEOGHEGAN G,SIMCOX J,SELDIN M M,et al. Targeted deletion of Tcf7l2 in adipocytes promotes adipocyte hypertrophy and impaired glucose metabolism [J]. Mol Metab,2019,24:44-63.

[15] GRAVAND A,FOROUGHMAND A M,BOROUJENI M P. A study on the association of TCF7L2 rs11196205 (C/G) and CAPN10 rs3792267 (G/A) polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in the South Western of Iran[J]. Egypt J Med Hum Genet,2018,19(4):403-407.

[16] MACHIDA M,MACHIDA T,KIKUCHI M,et al. Methotrexate mediates the integrity of intestinal stem cells partly through nitric oxide-dependent Wnt/ β -catenin signaling in methotrexate-induced rat ileal mucositis [J]. J Pharmacol Sci,2022,148(3):281-285.

[17] LI H,MA Y,CHEN B,SHI J. miR-182 enhances acute kidney injury by promoting apoptosis involving the targeting and regulation of TCF7L2/Wnt/beta-catenins pathway[J]. Eur J Pharmacol,2018,831:20-27.

[18] PIRLOG R,DRULA R,NUTU A,et al. The roles of the colon cancer associated transcript 2 (CCAT2) long non-coding rna in cancer:a comprehensive characterization of the tumorigenic and molecular functions[J]. Int J Mol Sci,2021,22(22):12491.