

• 论 著 •

# lncRNA Gm44981 抑制心脏衰老的作用和机制研究

李 洁, 李林淋, 曹慧霞

(河南省人民医院肾内科, 河南 郑州 450000)

**[摘要]** **目的** 分析小鼠心脏衰老过程中长链非编码(lnc)RNA Gm44981 的表达水平,探索其抑制心脏衰老的机制。**方法** 选取 3 月龄年轻和 24 月龄年老小鼠各 5 只,提取心肌组织 RNA 后,采用实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 Gm44981 的表达水平。另选取 4 月龄快速老化小鼠 10 只,分为对照组和 Gm44981 过表达组(构建 Gm44981 过表达快速老化小鼠模型),各 5 只。采用 qRT-PCR 检测对照组和 Gm44981 过表达组小鼠 Gm44981 和衰老相关分泌表型(SASP)表达水平, $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -gal)染色检测 SA- $\beta$ -gal 活性,蛋白质免疫印迹试验检测 p53 和 Sirt1 衰老相关蛋白表达水平。采用 qRT-PCR 检测 miRNA-34a 表达水平。**结果** Gm44981 在年老小鼠的心肌组织中表达水平较年轻小鼠低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较,Gm44981 过表达组小鼠 Gm44981 表达上调,白细胞介素(IL)-1 $\alpha$  和 IL-6 等 SASP 和 SA- $\beta$ -gal 表达下调,p53 表达下调,Sirt1 表达上调,miRNA-34a 表达下调,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** lncRNA Gm44981 在心脏衰老过程中表达下调,其可能通过作用于 miRNA-34a/Sirt1 抑制心脏衰老。

**[关键词]** 心脏; 衰老; 长链非编码 RNA; 衰老相关蛋白; 实时定量聚合酶链式反应; 小鼠

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.05.005

中图法分类号:R-33;R392

文章编号:1009-5519(2024)05-0745-05

文献标识码:A

## Effect and mechanism of lncRNA Gm44981 on cardiac aging in mice

LI Jie, LI Linlin, CAO Huixia

(Department of Nephrology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the expression level of long non-coding (lnc)RNA Gm44981 during cardiac aging in mice and explore the mechanism of inhibiting cardiac aging. **Methods** Five 3-month-old young mice and five 24-month-old old mice were selected to extract myocardial tissue RNA, and the expression level of Gm44981 was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). In addition, 10 rapidly aging mice aged four months were selected and divided into the control group (AAV-nc) and the Gm44981 overexpression group (AAV-Gm44981 to construct Gm44981 overexpression rapidly aging mouse model), with five mice in each group. The expression levels of Gm44981 and aging-related secretory phenotype (SASP) in the control group and the Gm44981 overexpression group were detected by qRT-PCR, the activity of SA- $\beta$ -gal was detected by  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining, and the expression of p53 and Sirt1 senescence related proteins were detected by western blotting. The expression level of miRNA-34a was detected by qRT-PCR. **Results** The expression level of Gm44981 in myocardial tissue of old mice was lower than that of young mice, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the the control group, the Gm44981 overexpression group showed up-regulated Gm44981 expression, SASP such as interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-6 and SA- $\beta$ -gal expression were down-regulated, p53 expression was down-regulated, Sirt1 expression was up-regulated, and miRNA-34a expression was down-regulated, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of lncRNA Gm44981 is down-regulated during cardiac aging, which may inhibit cardiac aging by acting on miRNA-34a/Sirt1.

**[Key words]** Heart; Aging; Long non-coding RNA; Senescence related proteins; Real-time quantitative polymerase chain reaction; Mouse

据统计,到 2050 年,全球范围内超过 65 岁的老年人口将超过 15 亿,占总人口的 16%,80 岁以上的人数将增加 2 倍<sup>[1]</sup>。人口老龄化已经逐渐成为一个全球性的热点话题,随之而来的是衰老相关疾病发生率的增加,给社会医疗体系带来了巨大的负担<sup>[2]</sup>。心脏在 40 岁之后就会开始衰老,随着年龄增加,心肌细胞发生变性和坏死,导致心脏功能下降,患上心脏疾病的风险也大大提升。关注心脏衰老的分子机制,并持续推动靶向心肌细胞以抗衰老的应用转化便显得尤为迫切。长链非编码 RNA(lncRNA)是一种长度超过 200 个核苷酸的 RNA,lncRNA 的发现为心脏衰老的研究提供了新的干预靶点。

课题组既往研究已经探讨了 Gm44981 在小鼠肾脏衰老中的表达下调并抑制肾脏衰老的进展<sup>[3]</sup>。在此基础上,本研究通过构建对照组和 Gm44981 过表达快速老化小鼠模型,检测小鼠心脏组织中白细胞介素(IL)-1 $\alpha$  和 IL-6 等衰老相关分泌表型(SASP)、 $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -gal)和衰老相关蛋白的表达水平,并进一步检测 miR-34a 的表达水平,探讨 Gm44981 在心脏衰老发生中的作用及可能的作用机制。

## 1 资料与方法

**1.1 实验动物** 选取 3 月龄年轻和 24 月龄年老 C57BL/6 小鼠各 5 只,雄性,体重均在 80 g 左右,购自厦门大学实验动物中心[使用许可证号 SYXK(闽)2018-0009]。另选取 4 月龄快速老化小鼠(SAMP8

小鼠)10 只,雄性,体重均在 100 g 左右,购自北京大学医学部[使用许可证号 SCXK(京)2016-0010]。所有小鼠均饲养于 SPF 标准环境中,定期进行明/暗循环,可自由取水和进食,分笼饲养。

## 1.2 方法

**1.2.1 建模** 10 只 SAMP8 小鼠标号后按随机数字表法分为两组( $n=5$ ):对照组和 Gm44981 过表达组,分别尾静脉注射腺相关病毒(AAV)阴性对照和 AAV-Gm44981 过表达病毒,根据病毒手册每只小鼠注射的 AAV 病毒总量为  $1 \times 10^{12}$  v. g,注射后 4 个月左右处死小鼠,获取新鲜心肌组织,立即放于液氮中保存。

**1.2.2 RNA 提取及实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)** 从液氮中取出心脏组织,根据试剂盒说明依次顺序加入 Trizol、氯仿、异丙醇、75%乙醇,提取 RNA。紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。吸光度(A)值在 1.8~2.0 之间为合格。根据反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,反转录条件设置为 37  $^{\circ}$ C 15 min,85  $^{\circ}$ C 5 s,4  $^{\circ}$ C 10 s。将反转录后的 cDNA 进行 qRT-PCR 检测,条件设置为 95  $^{\circ}$ C 30 s;95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 30 s(40 个循环);95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 60 s,95  $^{\circ}$ C 15 s。qRT-PCR 仪(Bio-Rad 公司)进行扩增和分析,均采用 GAPDH 进行标准化,每个样本设置 3 个复孔,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各 RNA 的相对表达量。引物名称及序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

名称	引物	序列
Gm44981	正向引物	5'- CGGCCACAGAGCACAACCTCC -3'
	反向引物	5'- AGCACGTTTACCACAGAATCATCC -3'
IL-1 $\alpha$	正向引物	5'- CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC -3'
	反向引物	5'- TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGAC -3'
IL-6	正向引物	5'- CTCCAACAGACCTGTCTATAC -3'
	反向引物	5'- CCATTGCACAACCTTTTCTCA -3'
GAPDH	正向引物	5'-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3'
	反向引物	5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'
miR-34a	茎环引物	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAACCAG-3'
	正向引物	5'-ACACTCCAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAGCT-3'
	反向引物	5'-TGGTGTCTGAGTGGAGTTCG-3'
U6	正向引物	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	反向引物	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

**1.2.3 SA- $\beta$ -gal 染色** 将心肌组织冰冻切片首先进行复温,磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡洗涤,加入适当体积的 SA- $\beta$ -gal 染色固定液以充分盖住组织为宜,室温固定组织至少 15 min,再次用 PBS 浸泡洗涤组织,吸除

PBS 后加入适量配制好的工作液,工作液成分和配制比例:SA- $\beta$ -gal 染色液 A 10  $\mu$ L,SA- $\beta$ -gal 染色液 B 10  $\mu$ L,SA- $\beta$ -gal 染色液 C 930  $\mu$ L,X-Gal 溶液 50  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 孵育过夜,在普通光学显微镜下观察。SA- $\beta$ -gal 的

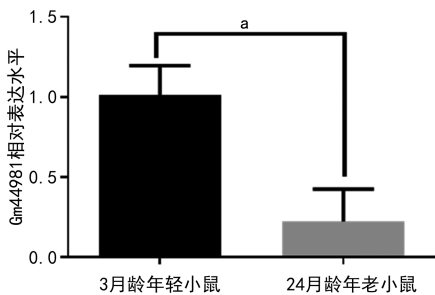
活性可以通过 SA-β-gal 染色检测,其是反映衰老的直观指标。

**1.2.4 蛋白提取和蛋白质免疫印迹试验检测** 将冰冻的心脏组织分割成小块,加入 RIPA 裂解液,放入 4℃ 预冷的组织匀浆仪中进行裂解,裂解结束后离心,然后将上清液转移至新的 EP 管中,BCA 法进行蛋白浓度测定及定量,加入上样缓冲液后煮沸蛋白样品使其变性。然后配制分离胶和浓缩胶,上样后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,25 V 恒压电转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,封闭结束后加入稀释后的一抗 4℃ 孵育过夜,Tris 盐酸液(TBST)洗膜 3 次,加入稀释后的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,显影。以 GAPDH 为内参,采用 Image J 进行灰度分析,计算目的蛋白(p53 和 Sirt1 衰老相关蛋白)的相对表达水平。有研究报道,miRNA-34a 与 Sirt1 存在靶向结合位点<sup>[4]</sup>,过表达 Gm44981 会导致 Sirt1 表达上调,因此作者推测 Gm44981 可能通过作用于 miRNA-34a 抑制 Sirt1 的表达,从而抑制心脏衰老的发生。因此,本研究采用 qRT-PCR 对 miRNA-34a 的表达水平进行了检测。

**1.3 统计学处理** 符合正态分布的计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组样本间比较采用 Student's *t* 检验,实验数据使用 SPSS23.0 软件进行统计学分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Gm44981 在 3 月龄年轻和 24 月龄年老小鼠心肌组织中的表达** Gm44981 在 24 月龄年老小鼠的心肌组织中的表达水平低于 3 月龄年轻小鼠,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。

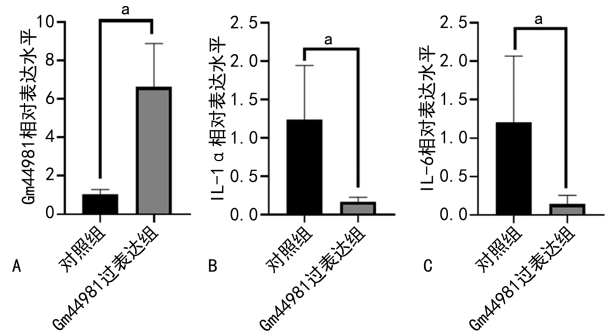


注: $^a P < 0.05$ 。

图 1 Gm44981 在 3 月龄年轻和 24 月龄年老小鼠心肌组织中的表达

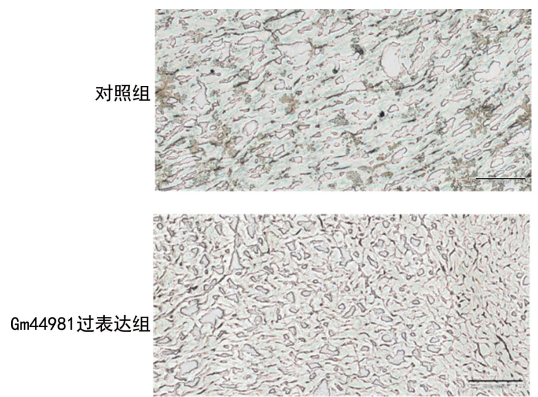
**2.2 对照组和 Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 Gm44981、IL-1α 和 IL-6 的表达** 与对照组比较,Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 Gm44981 表达水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2A。与对照组比较,Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中的 IL-1α、IL-6 等 SASP 的表达水平均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2B、C。

**2.3 对照组及 Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 SA-β-gal 的表达** 与对照组比较,Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 SA-β-gal 的表达水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。



注:A. Gm44981; B. IL-1α; C. IL-6;  $^a P < 0.05$ 。

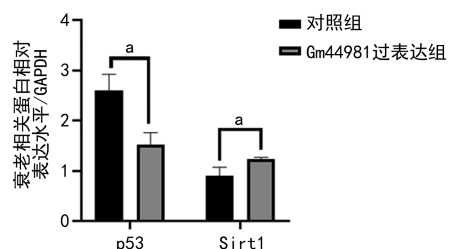
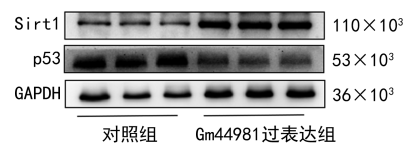
图 2 对照组和 Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 Gm44981、IL-1α 和 IL-6 的表达



注:标尺=100 μm。

图 3 对照组和 Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 SA-β-gal 的表达

**2.4 对照组及 Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中衰老相关蛋白的表达** 与对照组比较,Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 p53 表达下调,Sirt1 表达上调,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。

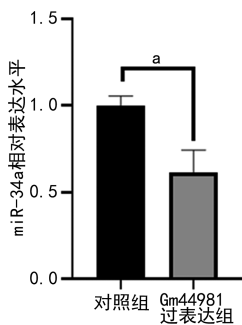


注: $^a P < 0.05$ 。

图 4 对照组和 Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中衰老相关蛋白的表达

**2.5 对照组及 Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中**

miRNA-34a 的表达 与对照组比较, Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 miRNA-34a 表达下调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。



注:  $a P < 0.05$ 。

图 5 对照组和 Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 miRNA-34a 的表达

### 3 讨论

人口老龄化日益受到众多学者的关注, 年龄是心血管疾病的独立危险因素, 同时, 心血管疾病也是 65 岁以上老年人死亡的主要病因。lncRNA 在多种心血管疾病中的研究日益增多, 但其在心脏衰老中作用的研究仍然较少。课题组既往研究提示 Gm44981 在老年小鼠肾脏组织中表达下调, 其通过抑制 P21 启动子区甲基化从而发挥抑制肾脏衰老的作用<sup>[3]</sup>。本研究结果显示, 年老小鼠心肌组织中 Gm44981 的表达水平显著低于年轻小鼠, 提示其在心脏衰老的过程中可能也发挥着重要作用。

lncRNA 与衰老的关系是国内外的研究热点。最近多项研究表明, 在多种生物的衰老过程中数百种 lncRNA 的表达存在显著差异<sup>[5-6]</sup>。越来越多研究提示, lncRNA 参与多种器官、组织的衰老, 如肝脏<sup>[7]</sup>、肾脏<sup>[8]</sup>, 其在多种衰老及衰老相关疾病的发生、发展过程中发挥重要作用。另外, 也有众多研究显示, lncRNA 与多种心脏疾病有关, 如心力衰竭<sup>[9]</sup>、心肌梗死<sup>[10]</sup>、心脏自噬<sup>[11]</sup>等。然而, 目前关于 lncRNA 与心脏衰老的研究仍屈指可数, 本研究通过检测 3 月龄年轻和 24 月龄年老小鼠心肌组织中表达下调的 Gm44981, 然后构建 Gm44981 过表达小鼠模型, 检测其下游 SASP、SA- $\beta$ -gal 和衰老相关蛋白、miRNA-34a 等的表达, 结果表明, 过表达 Gm44981 可抑制心肌组织衰老。

Gm44981 是一个包含 1 943 bp 的非编码 RNA, 课题组既往研究结果提示其在肾脏衰老中发挥重要作用。lncRNA 可通过印记和 X 染色体失活、作为染色质修饰剂、增强剂、分子海绵、小 RNA 的前体等多种方式调节基因表达来影响重要的生理过程<sup>[12-16]</sup>。有研究结果显示, lncRNA 在肝癌<sup>[17]</sup>、胃癌<sup>[18]</sup>等多种疾病中充当海绵分子参与 ceRNA 网络从而发挥作

用。有研究报道, miRNA-34a 在老年小鼠心肌组织中的表达水平高于年轻小鼠<sup>[19]</sup>, 在心肌梗死模型中, 抑制 miRNA-34a 表达可改善心肌纤维化、心肌细胞死亡<sup>[19-20]</sup>。Sirt1 作为长寿促进因子, 在衰老过程中表达减少, 是延缓心脏衰老的重要介质<sup>[21]</sup>。既往研究报道显示, miR-34a 与 Sirt1 之间存在靶向结合位点<sup>[4]</sup>。本研究结果显示, 与对照组比较, Gm44981 过表达组小鼠心肌组织中 Sirt1 表达上调, miRNA-34a 表达下调, 提示 Gm44981 可能通过作用于 miRNA-34a/Sirt1 抑制心脏衰老。

### 参考文献

- [1] MAGENTA A, LORDE R, SYED S B, et al. Molecular therapies delaying cardiovascular ageing: Disease-or health-oriented approaches[J]. Vasc Biol, 2020, 2(1): R45-R58.
- [2] PARTRIDGE L, DEELEN J, SLAGBOOM P E. Facing up to the global challenges of ageing [J]. Nature, 2018, 561(7721): 45-56.
- [3] LI J, GAO F, WEI L, et al. Predict the role of lncRNA in kidney aging based on RNA sequencing[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 254.
- [4] YAMAKUCHI M N K, FERLITO M, LOWENSTEIN C J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(36): 13421-13426.
- [5] LIU S L, WANG Z B, CHEN B, et al. Annotation and cluster analysis of spatiotemporal-and sex-related lncRNA expression in rhesus macaque brain[J]. Genome Res, 2017, 27(9): 1608-1620.
- [6] KIM S S, LEE S J V. Non-Coding RNAs in caenorhabditis elegans aging[J]. Mol Cells, 2019, 42(5): 379-385.
- [7] CHEN L L, CARMICHAEL G G. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: Functional role of a nuclear noncoding RNA[J]. Mol Cell, 2009, 35(4): 467-478.
- [8] LI J, GAO F F, WEI L M, et al. Predict the role of lncRNA in kidney aging based on RNA sequencing[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 254.
- [9] GAO W, WANG Z M, ZHU M, et al. Altered long noncoding RNA expression profiles in the myocardium of rats with ischemic heart failure [J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2015, 16

(7):473-479.

- [10] ZANGRANDO J, ZHANG L, VAUSORT M, et al. Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):460.
- [11] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451 (7182): 1069-1075.
- [12] SLEUTELS F, ZWART R, BARLOW D P. The non-coding air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes [J]. *Nature*, 2002, 415(6873):810-813.
- [13] TSAI M C, MANOR O, WAN Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes [J]. *Science*, 2010, 329 (5992):689-693.
- [14] KIM K T, HEMBERG M, GRAY J M, et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers [J]. *Nature*, 2010, 465 (7295):182-187.
- [15] EBERT M S, SHARP P A. Emerging roles for natural microRNA sponges [J]. *Curr Biol*, 2010, 20(19):R858-R861.
- [16] BARTEL D P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136

(2):215-233.

- [17] CHENG D, DENG J, ZHANG B, et al. LncRNA HOTAIR epigenetically suppresses miR-122 expression in hepatocellular carcinoma via DNA methylation [J]. *EBioMedicine*, 2018, 36:159-170.
- [18] SUN M, NIE F, WANG Y, et al. LncRNA HOXA11-AS promotes proliferation and invasion of gastric cancer by scaffolding the chromatin modification factors PRC2, LSD1, and DNMT1 [J]. *Cancer Res*, 2016, 76 (21): 6299-6310.
- [19] BOON R, IEKUSHI K, LECHNER S, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function [J]. *Nature*, 2013, 495(7439):107-110.
- [20] HUANG Y, QI Y, DU Y, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting Smad4 [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(12):1355-1365.
- [21] HU C, ZHANG X, TENG T, et al. Cellular senescence in cardiovascular diseases: A systematic review [J]. *Aging Dis*, 2022, 13 (1): 103-128.

(收稿日期:2023-06-01 修回日期:2023-11-16)

(上接第 744 页)

- [15] VAN DEN HOOGEN L L, BARENG P, ALVES J, et al. Comparison of commercial ELISA Kits to confirm the absence of transmission in malaria elimination settings [J]. *Front Public Health*, 2020, 8:480.
- [16] DAMBRUN M, SARE N, VIANOU B, et al. Serological diagnosis of toxoplasmosis in pregnancy: comparison between a manual commercial ELISA assay and the automated VIDAS® kit [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2023, 42 (6):759-769.
- [17] 戚凤敏, 范新新. 献血者初复检使用不同厂家 ELISA 抗-HCV 试剂组合对实验效果探讨 [J]. *系统医学*, 2020, 5(5):7-9.

- [18] 李红, 敬海明, 林长缨, 等. 不同厂家试剂盒检测大鼠血清总蛋白、白蛋白的比较 [J]. *医学动物防制*, 2021, 37(10):970-972.
- [19] KINN RØD A M, HARKESTAD N, JELLES-TAD F K, et al. Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):6748.
- [20] EECKHOUT K, VAN COTTHEM K, GUERTI K. Evaluation of three commercially available ELISA kits for the determination of chromogranin A [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2021, 42(2):95-105.

(收稿日期:2023-05-29 修回日期:2023-10-24)