

达格列净保护 *PDK1* 基因敲除心衰小鼠表达谱系研究^{*}

刘海浪 姜爱侠 魏忠诚 徐海燕

(南京医科大学附属淮安第一医院心内科, 江苏 淮安 223300)

【摘要】 目的 探讨钠-葡萄糖协同转运蛋白 2(SGLT2)抑制剂达格列净(DAPA)对 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(*PDK1*)基因敲除心力衰竭(HF)小鼠中长链非编码 RNA(lncRNA)表达谱的影响。**方法** 将 *PDK1* 敲除 HF 小鼠分为对照组(KO 组, $n=10$)和达格列净治疗组(KO+DAPA 组, $n=15$);使用 Arraystar 小鼠 lncRNA 微阵列通过测序和筛选分析 lncRNA 表达谱;实时定量 PCR 验证差异表达的 lncRNA;构建 lncRNA-mRNA 共表达网络。**结果** KO+DAPA 组显著延长 HF 小鼠生存期;两组表达水平变化 >1.5 倍 lncRNAs 有 2653 个;生信分析表明 lncRNAs 参与能量代谢过程;差异表达大于 3 倍以上且人鼠同源的 7 个 lncRNAs 构建 lncRNA-mRNA 共表达网络提示 uc. 347 和 uc. 321 分别关联 141 个 mRNA 和 108 个 mRNA;uc. 347 在心肌细胞中的过表达促进了 ATP 能量的产生。**结论** 本研究揭示了达格列净影响 *PDK1* 基因敲除心衰小鼠 lncRNA 表达谱,差异表达的 lncRNA 可能参与能量代谢过程,从而改善心衰预后。

【关键词】 SGLT2 抑制剂;达格列净;lncRNA;*PDK1* 基因敲除;心力衰竭

【中图分类号】 R541.6 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 03. 006

LncRNA expression profiling induced by dapagliflozin in mice with heart failure

LIU Hailang, JIANG Aixia, WEI Zhongchen, XU Haiyan

(Department of Cardiology, The Affiliated Huaian First People's Hospital of Nanjing Medical University, Huaian 223300, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of SGLT2 inhibitor on lncRNA expression profiles in *PDK1* knock-out mice with heart failure. **Methods** *PDK1* knockout mice were divided into control group and dapagliflozin(DAPA) treatment group. Arraystar mouse lncRNA microarray was used to analyze lncRNA expression profile by sequencing and screening. The real-time quantitative PCR was used to verify differentially expressed lncRNA. The lncRNA-mRNA co-expression network. **Results** KO+DAPAgrou significantly prolonged the survival of heart failure mice. There were 2653 lncRNAs in the two groups whose expression levels changed >1.5 times; bioinformatics analysis showed that lncRNAs were involved in energy metabolism. The differential expression was greater than 3 times and the above-mentioned 7 lncRNAs homologous to human and mouse construct a lncRNA-mRNA co-expression network, suggesting that uc. 347 and uc. 321 are associated with 141 mRNAs and 108 mRNAs, respectively. The overexpression of uc. 347 in cardiomyocytes promotes the production of ATP energy. **Conclusion** This study revealed that dapagliflozin affects the lncRNA expression profile of *PDK1* knockout mice with heart failure, and the differentially expressed lncRNA may be involved in the process of energy metabolism, thereby improving the prognosis of heart failure.

【Key words】 SGLT2 inhibitor; DAPA; lncRNA; *PDK1* gene knockout; Heart failure

心力衰竭(Heart failure, HF)是各种心脏疾病晚期的严重表现,死亡率和再入院率居高不下。发达国

家 HF 患病率为 1.5%~2.0%,70 岁以上人群患病率 $\geq 10\%$ ^[1]。我国最新研究显示,近 15 年 HF 发病率上升 44%,35 岁以上人群 HF 发病率 1.3%^[2]。许多研究表明,非编码 RNA 参与调控蛋白质基因的表达,其中长链非编码 RNA(Long-noncoding RNA, lncRNAs)发挥着重要作用。随着 RNA 测序的快速发展,更多的非编码 RNA 被鉴定出来。最近,有报道称

基金项目:南京医科大学科技发展基金(NMUB2018157)

通讯作者:徐海燕, E-mail: xhy200510@126.com

引用本文:刘海浪,姜爱侠,魏忠诚,等.达格列净保护 *PDK1* 基因敲除心衰小鼠表达谱系研究[J].西部医学,2023,35(3):341-347,353.
DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 03. 006

非编码 RNA,尤其是 lncRNA、微小 RNA (miRNA) 和环状 RNA,作为心脏基因表达的表观遗传调节因子,从而显著影响心脏稳态和功能^[3]。如 lncRNA-LIPCAR 是一种新型的心脏重塑生物标志物,可预测 HF 患者未来的死亡^[4]。Cai 等^[5]报道了 lncRNA-DACH1 通过抑制 SERCA2a 调节心脏功能。但是其在 HF 中具体机制仍不明确。钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (Sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2) 蛋白主要在肾脏和小肠中表达,在心脏中几乎不表达^[6],但 SGLT2 抑制剂已被许多大型临床研究证实具有心脏保护作用,如 EMPA-REG OUTCOME 和 CANVAS 试验研究 (Empagliflozin, Canagliflozin) 提示 SGLT2 抑制剂可降低心血管高危 2 型糖尿病患者 HF 的死亡率和住院率^[7-8]。DAPA-HF 研究表明,达格列净 (Dapagliflozin, DAPA) 属于 SGLT2 抑制剂,同样可以降低糖尿病 HF 患者的住院率和全因死亡率^[9]。亚组研究发现 DAPA 可以减少包括非糖尿病和非缺血性 HF 患者的心血管死亡并改善 HF 症状、身体功能和生活质量^[10]。然而,SGLT2 抑制剂改善扩张型心肌病预后的研究较少,同时对表现出类似扩张型心肌病的 HF 小鼠心脏中 lncRNA 的表达影响鲜有报道,故本研究以扩张型心肌病表现 HF 的小鼠为研究对象,探究 DAPA 对其生存期、心脏功能及心脏中 lncRNA 的表达影响及可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本研究中使用具有心肌细胞特异性的 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (PDK1) 缺失 (PDK1 F/F; α MHC-Cre) 的小鼠购买于南京大学模式动物研究所。由于出生后第 7 天心肌细胞中的 α -肌球蛋白重链重组酶开始表达,随后逐渐出现 HF 症状,5 至 8 周内死于 HF^[11]。共选取 PDK1 基因敲除小鼠 25 只,在出生后第 8 天开始通过灌胃法喂服 DAPA (每天 0.1 mg/kg,百时美施贵宝) 治疗 PDK1 基因敲除小鼠作为达格列净治疗组 (KO+DAPA 组, $n=15$),最长时间长达 13 周,同时未经处理的 PDK1 基因敲除小鼠作为对照组 (KO 组, $n=10$)。本实验小鼠的处理符合动物伦理要求,并经医院伦理委员会审核同意。

1.2 方法

1.2.1 超声心动图和组织采集 因 8 周左右小鼠死于 HF,在第 7 周时各取 3 只 KO 组及 KO+DAPA 组小鼠行心脏超声检查并同时提取心脏组织。使用 Vevo 770 UBM 系统 (VisualSonics Inc, Toronto, ON, Canada) 进行超声心动图检查,中心频率为 30 MHz,帧率为 30 Hz。B 型成像的空间分辨率约为

115 mm (横向) 乘以约 55 mm (轴向)。心率保持在每分钟 350~450 次之间。测量后,根据 Vevo 660 UBM 系统随附的指南计算心输出量值,如射血分数、缩短分数和左心室舒张内径。标本在液氮中速冻,随后储存在 -80 °C。血浆 N 端脑钠肽前体 (BNP) 使用可用的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, 加利福尼亚,美国)。根据制造商提供的说明,使用 TRIzol 试剂 (赛默飞世尔科技,加利福尼亚,美国) 提取总 RNA。

1.2.2 微阵列和数据分析

1.2.2.1 DNA 微阵列 如文献^[12]所述,微阵列分析由中国上海康成生物技术公司进行。对于每个微阵列研究,来自 KO 组和 KO+DAPA 组的各 3 个小鼠心脏组织样本的 RNA 混合并用于杂交。阵列实验在两组不同的小鼠来源组织上重复两次。

1.2.2.2 RNA 标记和阵列杂交 将三个样品杂交,每个样品有两个生物学重复 (分别是 KO 组和 KO+DAPA 组小鼠的心脏组织)。具体的详细步骤参照文献^[12]中描述。微阵列分析由中国上海康成生物技术公司进行。

1.2.2.3 数据分析和功能组分析 使用标准富集计算方法进行 GO 分析和通路分析。详细步骤和方法参照文献^[9]中描述。

1.2.3 定量实时 PCR 使用 TRIzol 试剂从未处理和处理的 DAPA 组小鼠心脏组织中分离总 RNA。六个小鼠样品用于生物学重复,每个样品用于三个技术重复。每个 lncRNA 的实时 RT-PCR 反应重复 3 次。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对于 GAPDH (内部对照) 的 lncRNA 水平。所有反应至少重复三次。详细步骤和方法参照文献^[12]描述。引物见表 1。

1.2.4 非编码-编码基因共表达网络 基于差异表达的 lncRNAs 和 mRNAs 之间的相关性分析构建了非编码-编码基因共表达网络,参照文献描述方案操作^[13]。lncRNAs 和编码基因之间的 Pearson 相关系数根据选择的 lncRNAs 和 mRNAs 的表达水平计算。参数为 Pearson 相关系数 ($abs \geq 0.8$ 、 $P \leq 0.05$ 和 $FDR \leq 0.05$)。用 Cytoscape (v3.7.2) (系统生物学研究所,西雅图,美国) 构建共表达网络。

1.2.5 细胞培养和转染实验 心肌细胞 H9C2 细胞购自中国科学院上海 (中国上海)。由大鼠胚胎心室心肌细胞制备的 H9C2 细胞维持在 DMEM 培养基中,并补充有 10% 胎牛血清 (Gemini Bio-Products)。细胞在 37 °C 5% CO₂ 和 95% 空气中培养。

1.2.6 慢病毒生产和稳定细胞系的建立 uc.347 慢病毒过表达载体由 Gene-Pharma (中国上海) 构建。

表 1 用于定量实时 PCR 分析的 LncRNA 引物
Table 1 LncRNA primers for quantitative real-time PCR analysis

名称	正向引物序列	反向引物序列
GAPDH	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
uc. 92	CTTGGTGCGGAGGTTATG	TGATGGACACGGCAGAAG
AK043267	CCTGCCTTCTGTTTGGAC	ATTGGTAGCCTTGCTCTG
Gm15265	GGGGTGAGCTGGAAGGA	CAGGCACAACGGGAACAT
mouselincRNA1492	ACAGACTCCCCACAAGCA	TGCTTGTGGGGAGTCTGT
mouselincRNA1524	CCGAGGCTGATGAGTTTT	AAACTCATCAGCCTCGG
mouselincRNA1108	CAGCCAGCCCAGCACCTCA	TTGGTGGGAGCCGAGGGACGAG
mouselincRNA0173	ATTCATAAAGCAGGGCATCT	GCCCTGCTTTATGAATTGTCTT
mouselincRNA1646	AAAGCAAAGCCTGAACTG	CAGTTCAGGCTTTTGCTTT
mouselincRNA1654	GTGTCTTGAGGGTTAGTA	TACTAACCCCTCAAGACAC
uc. 377	ATAAAGGTGCTGAATGGG	GTAAGGAAGGACGAAGAG
uc. 77	ACACTCTGTTTCTGTCACTGCTC	AGCCAAAAGATGCTTGAAAGATAAAT
uc. 367	ATTGATACTGCTTGCTCTA	TAGAGGCAAGCAGTATCA
uc. 185	TAAAGTGGAATAGAAAAACAAC	GTGTGACAGAAACAGAGTGTGGCGA
uc. 321	AAATCGCCTGTAAATCTACGGAGC	GCCACAAACAAGAAGCAGGACAGAA
uc. 347	GACTTTCTGTCTGCTTC	ACAAACAAGAAGCAGGAC
uc. 217	TCTGTCTGCTTCTTGTGTTGTGGCT	AAAGCCACAAACAAGAAGCAGGACA

慢病毒在 293T 细胞中扩增并使用聚乙二醇(System Biosciences, LLC, Palo Alto, CA, USA)进行浓缩。对于过表达实验,通过定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)在受感染的 H9C2 细胞中验证感染效率。嘌呤霉素(Sigma, 上海, 中国)选择用于建立稳定的细胞系。

1.2.7 三磷酸腺苷(ATP)含量检测 使用基于荧光素酶的发光 ATP 检测试剂盒(Beyotime, 南通, 中国)测量 ATP。细胞在冰冷的 ATP 释放缓冲液中匀浆并以 12,000×g 离心 5 min。根据制造商的说明分析上清液中的 ATP 水平。将 20 μL 样品的发光添加到 100 μL ATP 检测缓冲液中,并在单管发光计(Turner Biosystems, CA, USA)中进行测定。使用已知浓度的 ATP(1~1,000 nM) 构建标准曲线。

1.3 统计学分析 使用 Graphpad prism 9 软件进行统计学分析,所有数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。Student's t-test 进行统计分析以进行两组比较,

并使用方差分析(ANOVA)进行多重比较。在这两种情况下, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。使用 Student's *t*-检验在倍数变化方面分析微阵列结果的统计显著性。计算错误发现率(FDR)以校正 *P* 值。倍数变化 ≥ 2 或 > 1.5 ,或 ≤ 0.25 ($P < 0.01$)被用于筛选差异表达的 lncRNA 和 mRNA 的阈值。

2 结果

2.1 DAPA 对 PDK1 基因敲除心衰小鼠的影响 为了验证 SGLT2 抑制剂是否可以改善 PDK1 敲除小鼠的心脏功能,PDK1 敲除小鼠在出生一周后开始喂食 DAPA。发现 PDK1 敲除小鼠在 8 周内全部死于 HF,这与之前的研究一致,而 DAPA 治疗的小鼠可以存活 13 周(图 1A),存活时间显著延长。同时,DAPA 治疗小鼠的心脏功能得到改善,心脏射血分数(图 1B, $P = 0.045$)和心脏缩短分数(图 1C, $P = 0.048$)增加,左室舒张末期直径(图 1D, $P = 0.023$)和 N-末端脑钠肽前体水平(图 1E, $P = 0.015$)降低。

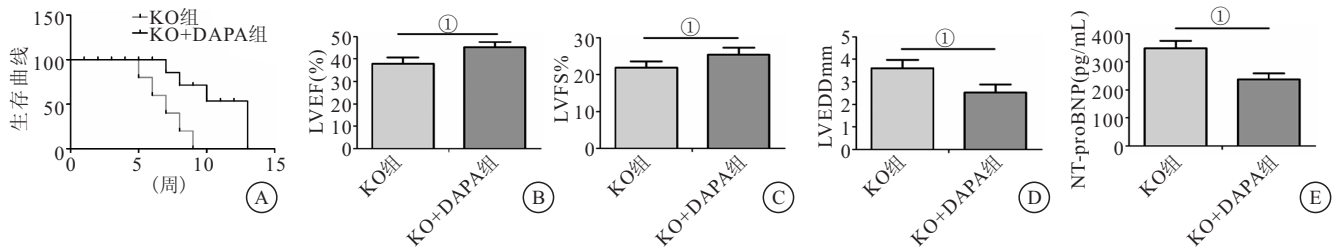


图 1 DAPA 对 PDK1 基因敲除心衰小鼠的影响
Figure 1 Effects of dapagliflozin on PDK1 knockout mice with heart failure

注:A. 两组存活时间比较;B. 两组心脏射血分数比较;C. 两组心脏缩短分数增加比较;D. 两组左室舒张末期直径比较;E. 两组 N 端脑钠肽前体比较。两组比较,① $P < 0.05$ 。

2.2 LncRNAs 在 KO 和 KO+DAPA 两组中差异表达 为了进一步研究 DAPA 中 lncRNA 改善 PDK1

基因敲除小鼠心脏功能的机制,本研究对 KO 组和 KO+DAPA 组组间的 lncRNA 表达谱进行了分析,

通过层次聚类分析的差异 LncRNA 热图,发现在 DAPA 处理组和未处理组之间差异表达倍数变化 > 1.5,有 2653 个 lncRNAs,其中检测到 1023 个 lncRNAs 上调和 1630 个 lncRNAs 下调。见图 2。

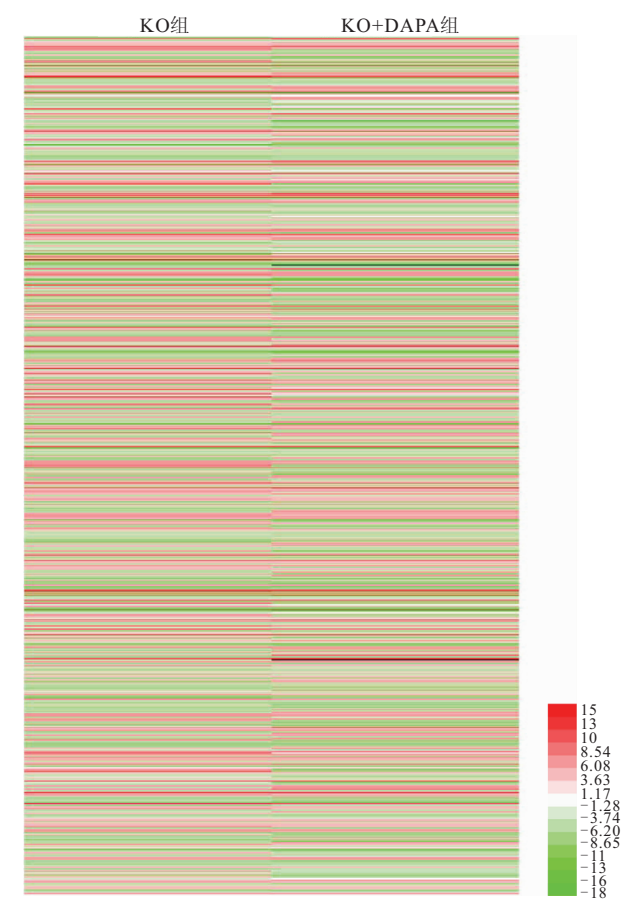


图 2 LncRNAs 在 KO 和 KO+DAPA 两组中差异表达
Figure 2 Differential expression of LncRNAs in KO and KO+DAPA treatment groups

2.3 RT-PCR 验证结果与芯片数据一致 从差异表达倍数变化 > 5 倍的 lncRNA 中筛选了 16 个 LncRNA,其中 9 个上调的 lncRNA(uc. 92, Gm15265, mouselincRNA 1492, uc. 377, mouselincRNA 1524, uc. 77, uc. 367, mouselincRNA1108, uc. 185) 和 7 个下调的 lncRNA (AK043267, mouselincRNA0173, uc. 321, mouselincRNA1646, uc. 347, uc. 217, mouselincRNA1654)用于 RT-PCR 验证。见图 3。

2.4 人鼠同源的 lncRNAs 验证 基于 lncRNA 基因序列的特征,与人类基因组中的序列完全相同的非编码 RNA 分别命名为 lincRNA 和 Ultraconserved (uc.)RNA,在差异表达的 LncRNA 中筛选出 13 个 LncRNA,7 个上调的 lncRNA(mouse lincRNA 1492、uc. 377、mouse lincRNA 1524、uc. 77、uc. 367、mouselincRNA1108、uc. 185)和 6 个下调的 lncRNA (mouselincRNA0173、uc. 321、mouselincRNA1646、uc.

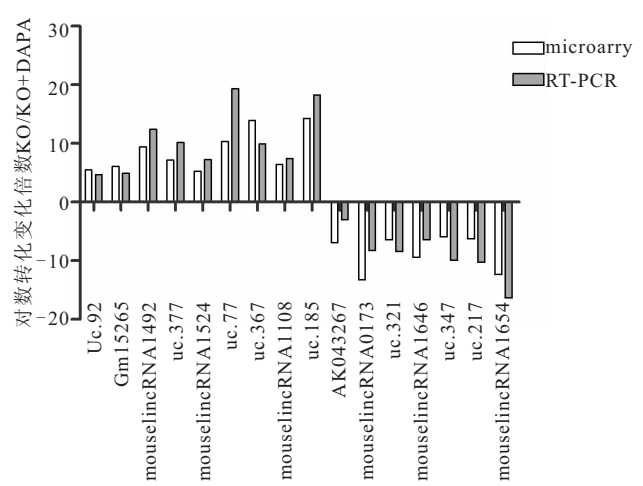


图 3 RT-PCR 验证结果与芯片数据一致
Figure 3 Real-time quantitative PCR validation results are consistent with microarray data

注:图表中列的高度表示表达中对数转换的中位数倍数变化(KO/KO+DAPA)。

347、uc. 217, mouselincRNA1654)。重新验证了其在 KO 组和 KO + DAPA 组中的表达水平变化, lncRNA-uc. 77 表达上调 10 倍以上,而 uc. 321 和 uc347 下调近 5 倍,见图 4。

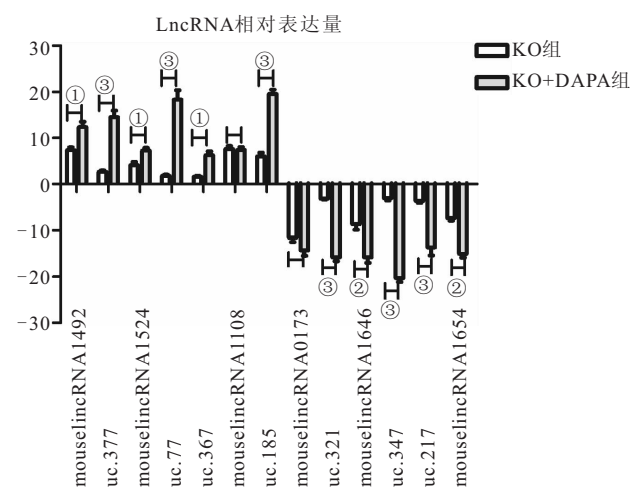


图 4 人鼠同源的 lncRNAs 验证
Figure 4 Validation of human-mouse homologous lncRNAs
注:两组比较,①P<0.05, ②P<0.01, ③P<0.001。

2.5 差异表达的 LncRNA 生物信息学分析 为了研究 lncRNA 在 PDK1 敲除小鼠心脏中的生物学功能,本研究对与 lncRNA 异常表达显著相关的 mRNA 进行了功能富集分析。功能富集排列前 10 的数据分析表明,这些相关的 mRNA 可能与细胞结合以调节心肌细胞的代谢过程,如图 5A~C。此外,KEGG 通路分析显示与 lncRNA 显著相关的 mRNA 主要富集在 MAPK 信号通路、PPAR 信号通路和 ErbB 信号通路中。图 5D 中列出了排列前 18 条 KEGG 通路。

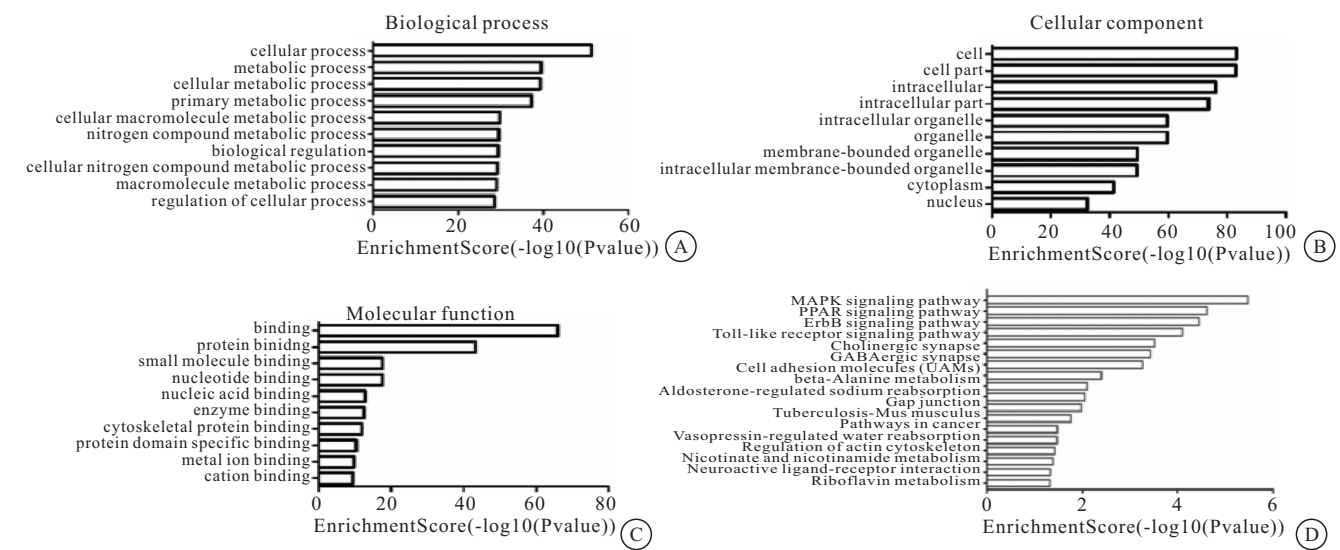


图 5 差异表达的 lncRNA 生物信息学分析

Figure 5 Bioinformatics analysis of differentially expressed lncRNAs

注:列出了前 10 个 GO(A 显示生物过程,B 显示细胞成分,C 显示分子功能)和前 18 条 KEGG 途径(D)。

2.6 lncRNA-mRNA 网络分析 为了进一步阐明 lncRNA 靶基因的相关功能,基于使用 Cytoscape 的 GO 分析构建了功能网络。本研究从人鼠同源的 13 个 lncRNAs 中筛选出 7 个差异表达倍数变化>3 倍的 lncRNA 用于构建编码-非编码基因构建表达网络。其中 4 个上调的 lncRNA(uc. 377、uc. 77、uc. 367、uc.

185)和 3 个下调的 lncRNA(uc. 321、uc. 347、uc. 217)被验证,显示了基于这 7 个 lncRNA 和 574 个 mRNA 的网络概况。结果显示 lncRNA uc. 321 与 108 个 mRNA 相关联,lncRNA uc. 347 与 141 个 mRNA 相关联。见图 6。

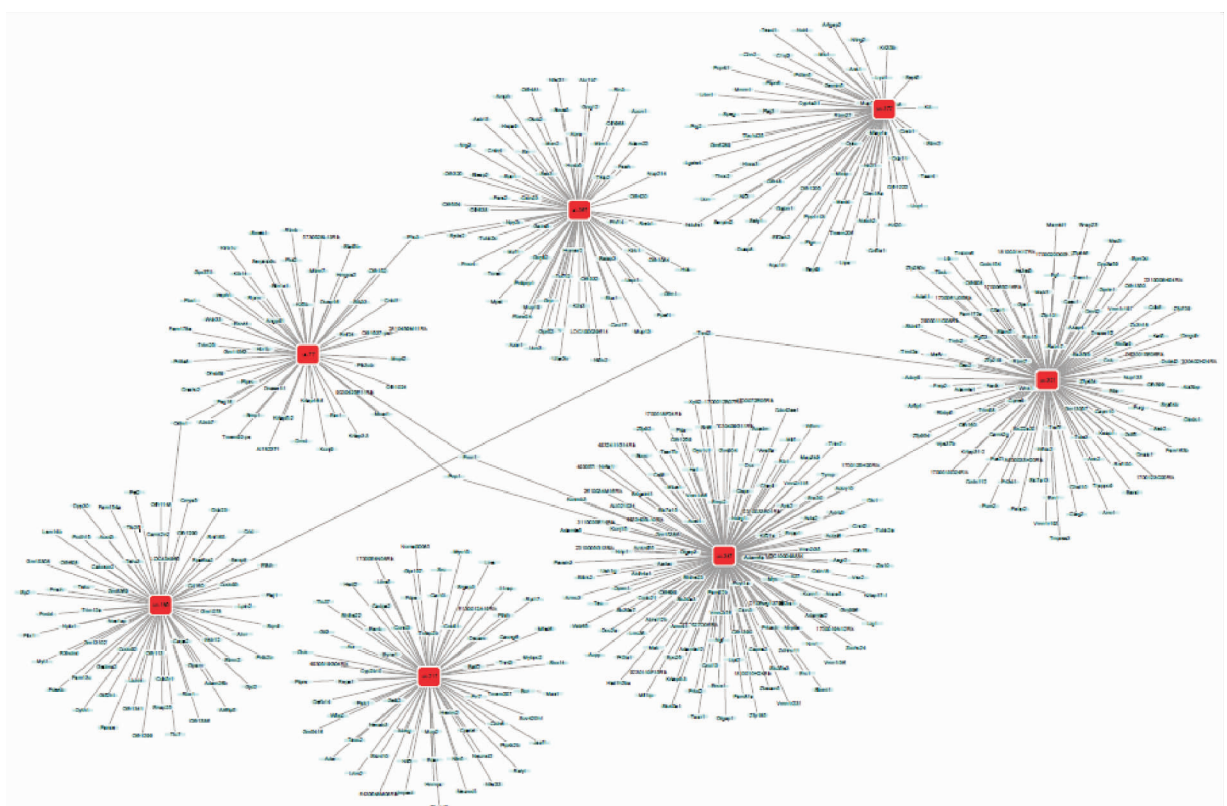


图 6 筛选出的差异表达 lncRNA 及相关 mRNA 共表达网络分析

Figure 6 Co-expression network analysis of screened differentially expressed lncRNAs and related mRNAs

2.7 lncRNA uc. 347 在 H9C2 中过表达促进细胞 ATP 产生 生物信息学和 lncRNA-mRNA 共表达网络分析表明 uc. 347 为人鼠同源, 下调倍数 >5 倍, 且靶向关联 141 个 mRNA, 综合表明其可能参与了 HF 的能量代谢过程。为此本研究对 uc. 347 是否影响心肌细胞能量代谢进行初步研究, 与空载体转染的 H9C2 细胞相比, uc. 347 过表达细胞中的 ATP 含量显著增加(约 1.5 倍)($P < 0.05$)(图 7)。本研究只对 uc. 347 对 ATP 能量产生的影响进行了研究, uc. 347 对细胞凋亡和线粒体形态的影响有待进一步研究。

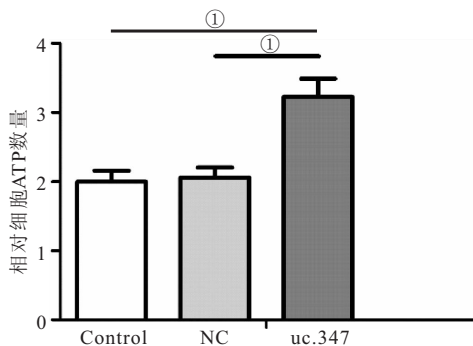


图 7 lncRNA uc. 347 在 H9C2 中过表达促进细胞 ATP 产生

Figure 7 Overexpression of lncRNA uc. 347 in H9C2 promotes cellular ATP production

注: 在 H9C2 细胞中通过基于荧光素酶的发光测定测量细胞 ATP 产生。与慢病毒空载体和对照细胞相比, ① $P < 0.05$ 。

3 讨论

HF 的病理生理学是复杂的。虽然最近的研究已经阐明其发生发展包括交感神经系统、免疫系统、炎症因子、心肌细胞凋亡、坏死、间质纤维化和氧化应激等, 而心肌细胞能量代谢异常贯穿 HF 的整个发展过程^[14]。正常心脏每天循环 6 公斤 ATP 能量, 是正常心脏重量的 20~30 倍。它比其他器官需要更多的能量供应, 而线粒体提供了 90% 的 ATP 能量。细胞内钙离子失衡、能量代谢减少、活性氧产生、诱导细胞凋亡引起线粒体功能异常, 最终导致 HF^[15]。

关于 SGLT2 抑制剂改善 HF 的机制有许多不同的观点。初期一些研究发现 SGLT2 抑制剂降低高糖心脏毒性和心脏前后负荷的机制^[16]。也有研究提示 SGLT2 抑制剂可直接降低心脏炎症因子的激活和氧化应激反应, 减少心肌细胞凋亡, 改善离子通道, 平衡心肌能量代谢, 抑制心脏重构, 改善心脏功能^[17-18]。随后众多的研究表明 SGLT2 抑制剂可通过心肌能量代谢途径改善心脏功能^[19-20]。而对于 DAPA 与线粒体能量代谢的关系, 有研究人员在尿液中检测到线粒体代谢物, 提示 DAPA 可能参与线粒体功能调节^[21]。另一项实验表明, DAPA 通过增强线粒体功能和氧化

应激, 然后改善融合裂变蛋白来改善心脏功能^[22]。总之, 之前的许多研究证实, DAPA 直接保护心脏, 可能通过调节心肌细胞中的线粒体能量代谢。

PDK1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 通过激活的 AGC 蛋白激酶家族和其他蛋白激酶的磷酸化^[23], 进而调节细胞生长增殖、迁移和存活参与心衰发展^[24]。*PDK1* 基因敲除的小鼠在出生后第 7 天开始在心肌细胞中表达 α -肌球蛋白重链重组酶, 在出生后第 40 天出现类似于扩张型心肌病的 HF, 并在大约 5 至 8 周死于 HF^[11]。然而 DAPA 能否改善 *PDK1* 敲除小鼠 HF 预后不得而知, 本实验发现 DAPA 确实可以通过改善心脏功能延长 *PDK1* 敲除小鼠寿命。Feng 等^[25]报道 *PDK1* 通过激活 Akt 和 Snail 参与心血管发育。Li 等^[26]发现 *PDK1* 缺失可能通过影响线粒体活性参与 HF 的发病机制。之前的研究发现一些差异 lncRNA 表达可能参与了 *PDK1* 基因敲除小鼠 HF 的病理过程^[12]。通过本研究发现 DAPA 影响 HF 小鼠心脏组织中的 lncRNA 的表达, 既往已有研究提示 lncRNA 参与调节心脏功能, 预测 HF 死亡^[27], 然后本研究对两组间的 lncRNA 表达谱进行了分析, 发现 KO+DAPA 组相比于 KO 组有 2653 个差异表达的 lncRNAs。功能富集分析表明, 这些 lncRNAs 相关的 mRNAs 可能通过 MAPK 信号通路、PPAR 信号通路和 ErbB 信号通路参与调节心肌细胞的代谢过程。证据表明 DAPA 治疗后 HF 小鼠出现众多异常表达的 lncRNA, 为探讨这些 lncRNA 是否参与 DAPA 改善心衰的过程, 本研究通过进一步生物信息及功能分析发现 13 个 lncRNA 基因序列与人类基因组相同, 其中 7 个 lncRNA 通过 RT-PCR 验证表达变化达 5 倍以上。最后, 对这 7 个差异表达变化倍数大且人鼠同源 lncRNA 进行关联 mRNA 的共表达分析。在 7 个 lncRNA 中, 与 uc. 347 相关的 mRNA 最多。进一步生物学分析表明, uc. 347(一种基因间 lncRNA) 的序列在 14 号染色体有义链上从 97959641 延伸到 97959850。为此使用慢病毒载体在 H9C2 细胞中过表达 uc. 347, 发现 uc. 347 促进细胞 ATP 能量产生, 故推测 uc. 347 通过影响心肌细胞能量代谢进而改善 HF 预后。

最近的研究表明, lncRNA 可能通过调节 microRNA 参与了 HF 的发展。例如, 长非编码 RNA 核富集丰度转录本 1(NEAT1) 通过调节 miR-129-5p 影响 H_2O_2 诱导的 H9C2 细胞的细胞增殖和凋亡^[28]。本研究中没有对 uc. 347 对细胞凋亡和线粒体形态的影响进行试验分析, 也没有研究 uc. 347 调节线粒体能量代谢的具体机制。有研究人员通过强大的计算模

型构建 lncRNA-miRNA-mRNA 关联网络来预测潜在基因调控模式,从而为研究 lncRNA 分子机制提供了一种新策略^[29]。后续仍需要进一步的研究来阐明 uc. 347 在 PDK1 敲除 HF 小鼠中的详细机制及其与 DAPA 的关系,同时 uc. 347 是否通过调控 microRNA 参与线粒体能量代谢也需要更深入的研究。

4 结论

DAPA 影响心衰小鼠中 lncRNA 的表达谱系变化及差异表达的 lncRNA 参与了 HF 的能量代谢过程。同时确定了其中一个 lncRNA-uc. 347 可以促进细胞能量代谢。然而,需要更多的研究来阐明 DAPA 在扩张型心肌病心衰中的保护机制,同时阐明 lncRNAs 在 HF 病理学中的分子机制和生物学功能。

【参考文献】

- [1] MOSTERD A, HOES A W. Clinical epidemiology of heart failure[J]. Heart, 2007, 93(9): 1137-1146.
- [2] HAO G, WANG X, CHEN Z, *et al.* Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China: the China Hypertension Survey, 2012-2015[J]. Eur J Heart Fail, 2019, 21(11): 1329-1337.
- [3] DI SALVO T G. Epigenetic Regulation in Heart Failure: Part I RNA[J]. Cardiol Rev, 2015, 23(5): 213-228.
- [4] SANTER L, LÓPEZ B, RAVASSA S, *et al.* Circulating Long Noncoding RNA LIPCAR Predicts Heart Failure Outcomes in Patients Without Chronic Kidney Disease[J]. Hypertension, 2019, 73(4): 820-828.
- [5] CAI B, ZHANG Y, ZHAO Y, *et al.* Long Noncoding RNA-DACH1 (Dachshund Homolog 1) Regulates Cardiac Function by Inhibiting SERCA2a (Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2a)[J]. Hypertension, 2019, 74(4): 833-842.
- [6] VRHOVAC I, BALEN EROR D, KLESSEN D, *et al.* Localizations of Na(+)-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart[J]. Pflugers Arch, 2015, 467(9): 1881-1898.
- [7] FITCHETT D, INZUCCHI S E, CANNON C P, *et al.* Empagliflozin Reduced Mortality and Hospitalization for Heart Failure Across the Spectrum of Cardiovascular Risk in the EMPA-REG OUTCOME Trial[J]. Circulation, 2019, 139(11): 1384-1395.
- [8] MAHAFFEY K W, NEAL B, PERKOVIC V, *et al.* Canagliflozin for Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Events; Results From the CANVAS Program (Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study)[J]. Circulation, 2018, 137(4): 323-334.
- [9] DOCHERTY K F, JHUND P S, ANAND I, *et al.* Effect of Dapagliflozin on Outpatient Worsening of Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction: A Prespecified Analysis of DAPA-HF[J]. Circulation, 2020, 142(17): 1623-1632.
- [10] PACKER M. Lessons learned from the DAPA-HF trial concerning the mechanisms of benefit of SGLT2 inhibitors on heart failure events in the context of other large-scale trials nearing com-

- pletion[J]. Cardiovasc Diabetol, 2019, 18(1): 129.
- [11] DI R M, FENG Q T, CHANG Z, *et al.* PDK1 plays a critical role in regulating cardiac function in mice and human[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(17): 2358-2363.
- [12] LIU H, SONG G, ZHOU L, *et al.* Compared analysis of LncRNA expression profiling in pdk1 gene knockout mice at two time points [J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32 (5): 1497-1508.
- [13] LIAO Q, LIU C, YUAN X, *et al.* Large-scale prediction of long non-coding RNA functions in a coding-non-coding gene co-expression network[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(9): 3864-3878.
- [14] TANAI E, FRANTZ S. Pathophysiology of Heart Failure[J]. Compr Physiol, 2015, 6(1): 187-214.
- [15] NOORDALI H, LOUDON B L, FRENNEAUX M P, *et al.* Cardiac metabolism - A promising therapeutic target for heart failure[J]. Pharmacol Ther, 2018, 182: 95-114.
- [16] LAHNWONG S, CHATTIPAKORN S C, CHATTIPAKORN N. Potential mechanisms responsible for cardioprotective effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors[J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1): 101.
- [17] 路晨阳,贺秀,景娜,等. SGLT2 抑制剂对心力衰竭的影响[J]. 西部医学, 2019, 31(3): 470-473.
- [18] 王小波,郑在勇,吕明明,等. SGLT2 抑制剂治疗心力衰竭疗效的系统评价[J]. 西部医学, 2022, 34(3): 406-410.
- [19] GARCIA-ROPERO A, SANTOS-GALLEGO C G, ZAFAR M U, *et al.* Metabolism of the failing heart and the impact of SGLT2 inhibitors[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2019, 15(4): 275-285.
- [20] NAMBU H, TAKADA S, FUKUSHIMA A, *et al.* Empagliflozin restores lowered exercise endurance capacity via the activation of skeletal muscle fatty acid oxidation in a murine model of heart failure[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 866: 172810.
- [21] MULDER S, HAMMARSTEDT A, NAGARAJ S B, *et al.* A metabolomics based molecular pathway analysis of how the sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor dapagliflozin may slow kidney function decline in patients with diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2020, 22(7): 1157-1166.
- [22] LEE T M, CHANG N C, LIN S Z. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 104: 298-310.
- [23] DONG L Q, ZHANG R B, LANGLAIS P, *et al.* Primary structure, tissue distribution, and expression of mouse phosphoinositide-dependent protein kinase-1, a protein kinase that phosphorylates and activates protein kinase C ζ [J]. J Biol Chem, 1999, 274(12): 8117-8122.
- [24] LAWLOR M A, MORA A, ASHBY P R, *et al.* Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice[J]. EMBO J, 2002, 21(14): 3728-3738.
- [25] FENG Q, DI R, TAO F, *et al.* PDK1 regulates vascular remodeling and promotes epithelial-mesenchymal transition in cardiac development[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(14): 3711-3721.

- [14] ZHANG H, ZHANG Y, CHEN C, *et al.* A double-negative feedback loop between DEAD-box protein DDX21 and Snail regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2018, 437: 67-78.
- [15] TANAKA A, WANG J Y, SHIA J, *et al.* DEAD-box RNA helicase protein DDX21 as a prognosis marker for early stage colorectal cancer with microsatellite instability[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 22085.
- [16] ROAKE C M, ARTANDI S E. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 384-397.
- [17] LUDLOW A T, SLUSHER A L, SAYED M E. Insights into Telomerase/hTERT Alternative Splicing Regulation Using Bioinformatics and Network Analysis in Cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(5): 666.
- [18] 凌青霞, 金婷. 端粒酶调控因子 PinX1 对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2020, 27(1): 41-43.
- [19] 韩森, 马旭, 方健. 端粒与端粒酶研究在肺癌中的临床应用前景与挑战[J]. *中国肺癌杂志*, 2021, 24(1): 25-30.
- [20] 丁斌, 李建华, 王芳, 等. 结直肠癌患者人类端粒酶反转录酶 mRNA 的表达及影响因素[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(3): 533-535.
- [21] GONG C, YANG H, WANG S, *et al.* hTERT Promotes CRC Proliferation and Migration by Recruiting YBX1 to Increase NRF2 Expression[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(5): 658101-658112.
- [22] LI J, ZHANG N, ZHANG R, *et al.* CDC5L Promotes hTERT Expression and Colorectal Tumor Growth[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(6): 2475-2488.
- [23] WANG K, LI B, FAN P, *et al.* Downregulation of DEAD-box helicase 21 (DDX21) inhibits proliferation, cell cycle, and tumor growth in colorectal cancer via targeting cell division cycle 5-like (CDC5L)[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 12647-12658.
- (收稿日期: 2022-02-01; 修回日期: 2022-12-02; 编辑: 刘灵敏)

(上接第 347 页)

- [26] LI C, NIU Y, ZHENG H, *et al.* Metabolic remodeling of cardiomyocytes identified in phosphoinositide-dependent kinase 1-deficient mice[J]. *Biochem J*, 2019, 476(13): 1943-1954.
- [27] LIN F, GONG X, YU P, *et al.* Distinct Circulating Expression Profiles of Long Noncoding RNAs in Heart Failure Patients With Ischemic and Nonischemic Dilated Cardiomyopathy[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1116.
- [28] WEI Q, ZHOU H Y, SHI X D, *et al.* Long Noncoding RNA NEAT1 Promotes Myocardiocyte Apoptosis and Suppresses Proliferation Through Regulation of miR-129-5p[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74(6): 535-541.
- [29] TAO L, YANG L, HUANG X, *et al.* Reconstruction and Analysis of the lncRNA-miRNA-mRNA Network Based on Competitive Endogenous RNA Reveal Functional lncRNAs in Dilated Cardiomyopathy[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1149.
- (收稿日期: 2022-05-25; 修回日期: 2022-12-05; 编辑: 刘灵敏)