

绞股蓝皂苷调控长链非编码 RNA TUG1/miR-26a 干扰线粒体凋亡对 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏脂质沉积的影响及机制研究

宋 因^{1,2}, 曹慧敏^{1,2}, 陈 丝^{1,2},
王 莹^{1,2}, 王 杰^{1,2}, 王 群^{1,2}, 贾连群^{1,2*}, 杨关林^{1,2*}

¹辽宁中医药大学 中医药创新工程技术中心 脏象理论及应用教育部重点实验室; ²辽宁中医药大学, 沈阳 110847

摘要:为探讨绞股蓝皂苷通过影响长链非编码 RNA TUG1/miR-26a 干扰线粒体凋亡改善 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏脂质沉积防治 AS 机制,本实验将 10 只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组,20 只健康 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为模型组、绞股蓝皂苷组(高脂饲料喂养 12 周),灌胃给药 4 周。HE 染色观察小鼠肝脏脂质沉积情况,全自动生化分析仪检测血脂水平,实时荧光定量 Q-PCR 检测长链非编码 TUG1、miRNA-26a 表达,实时荧光定量 Q-PCR 及 Wes 全自动蛋白质印迹定量分析系统检测 Bcl2、Bax、Cyt-c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP 基因及蛋白表达。结果显示模型组 ApoE^{-/-} 小鼠血脂水平发生紊乱,肝细胞体积变大,脂肪空泡明显,小鼠肝脏 Lnc-TUG1 表达显著升高,miRNA-26a 显著下降($P < 0.01$);Bax、Cyt-c、cleaved caspase-3、cleaved PARP mRNA 及蛋白表达显著升高,Bcl2 mRNA 及蛋白显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);cleaved caspase-9 蛋白表达显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),cleaved caspase-9 mRNA 仅有上升趋势;绞股蓝皂苷干预后血脂紊乱得以改善,肝细胞脂肪变性程度减轻,脂肪空泡明显减少,小鼠肝脏 Lnc-TUG1 表达有所下降,miRNA-26a 表达有所上调($P < 0.05$),小鼠肝脏 Bax、Cyt-c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 mRNA 及蛋白表达显著下调,Bcl2 mRNA 及蛋白显著上调($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),cleaved PARP 蛋白表达显著下调($P < 0.05$),cleaved PARP mRNA 仅有下调趋势;研究结果提示绞股蓝皂苷可能通过影响长链非编码 RNA TUG1/miR-26a 干扰线粒体凋亡改善 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏脂质沉积,进而防治动脉粥样硬化。

关键词:绞股蓝皂苷;动脉粥样硬化;长链非编码 RNA TUG1/miR-26a;肝脏脂质沉积;线粒体凋亡

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)7-1178-08

DOI:10. 16333/j. 1001-6880. 2021. 7. 013

Gypenoside regulates long non-coding RNA TUG1/miR-26a by interfering with mitochondrial apoptosis on hepatic lipid deposition of ApoE^{-/-} AS mice

SONG Nan^{1,2}, CAO Hui-min^{1,2}, CHEN Si^{1,2}, WANG Ying^{1,2},
WANG Jie^{1,2}, WANG Qun^{1,2}, JIA Lian-qun^{1,2*}, YANG Guan-lin^{1,2*}

¹Chinese Medicine Innovation Engineering Technology Center, Liaoning Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, University of Traditional Chinese Medicine;

²Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: To explore the mechanism of gypenoside preventing and treating AS by affecting long non-coding RNA TUG1/miR-26a to interfere with mitochondrial apoptosis, thereby improving liver lipid deposition in ApoE^{-/-} AS mice. In this experiment, 10 C57BL/6J mice were used as the normal control group, and 20 healthy ApoE^{-/-} mice fed with high-fat diet for 12 weeks were randomly divided into model group and gypenoside group, given intragastrically for 4 weeks. Lipid deposition in mouse liver was observed by HE staining, blood lipid level was detected by automatic biochemical analyzer, and mRNA expression of long non-coding TUG1, miRNA-26a, Bcl2, Bax, Cyt-c, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and cleaved PARP were detected by real-time q-PCR, and protein expression of Bcl2, Bax, Cyt-c, cleaved caspase-9 and cleaved PARP were detected by Wes

收稿日期:2020-08-31 接受日期:2021-04-29

基金项目:中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程);辽宁省自然科学基金指导计划项目(2019-ZD-0966);辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC1902100)

*通信作者 E-mail:yang_guanlin@163.com, jlq-8@163.com

automatic Western blotting quantitative analysis system. The results showed that the blood lipid level of ApoE^{-/-} mice in the model group was disordered, liver cell volume increased, and fat vacuoles were obvious. The expression of Lnc-TUG1 in mouse liver was significantly increased, and miRNA-26a was significantly decreased ($P < 0.01$) ; Bax, Cyt c, cleaved caspase-3, cleaved PARP mRNA and protein expression significantly increased, Bcl2 mRNA and protein expression significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) ; cleaved caspase-9 protein expression significantly increased ($P < 0.05$), cleaved caspase-9 mRNA only has an upward trend. After the intervention of gypenoside, dyslipidemia was improved, the degree of liver cell steatosis was reduced, fatty vacuoles were significantly reduced. Lnc-TUG1 expression was decreased, miRNA-26a expression was increased ($P < 0.05$), the mRNA and protein expressions of Bax, Cyt c, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 were significantly down-regulated, Bcl2 mRNA and protein was significantly up-regulated, the expressions of cleaved PARP protein were significantly down-regulated ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and cleaved PARP mRNA showed only a downregulation trend. The results suggested that the effect of gypenoside in preventing and treating atherosclerosis may be to interfere with mitochondrial apoptosis by affecting long non-coding RNA TUG1/miR-26a, thereby improving liver lipid deposition in ApoE^{-/-} AS mice.

Key words: gypenoside; atherosclerosis; long chain non-coding RNA TUG1/ miR-26a; hepatic lipid deposition; mitochondrial apoptosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心脑血管疾病前期的主要病理基础,肝脏是 AS 及其相关疾病启动和发展中最易受损的器官之一,其脂质沉积水平直接或间接反应动脉内膜脂质沉积情况,可作为预测 AS 水平的指标^[1]。人类基因组中大部分为非编码区,转录产生非编码 RNA (ncRNA),微小 RNA (miRNA) 和长链非编码 RNA (LncRNA) 是 ncRNA 的两个重要分类。其中,LncRNA 通过多种机制在不同水平进行基因表达调控,发挥其生物学功能。近年来,miRNA 和 LncRNA 在疾病发生发展中相互作用的分子机制引起了人们的注意^[2]。长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1 (taurine upregulates gene 1, TUG1) 是一种进化上高度保守的长链非编码 RNA。有研究发现 TUG1 与食管癌、胃癌、肝癌、肺癌等癌症的发生发展有关^[3],但是其与肝脏脂质沉积及动脉粥样硬化的关系,研究尚少。有研究发现干扰长链非编码 RNA TUG1 可通过上调 miR-26a 缓解 LPS 诱导的线粒体损伤、细胞凋亡和炎症反应^[4]。

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*, GP)是绞股蓝属(*Cynostemma*)的多年生草本藤本植物。其名最早见于明代的《救荒本草》。其具益气健脾,化痰止咳,清热解毒的功效。曾被科技部“星火计划”列为待开发的“珍贵中草药”,在 2002 年被卫生部列入保健品清单。自 20 世纪 70 年代以来,人们已经系统地研究了绞股蓝的化学成分及药理学作用。研究发现其主要药用成分是绞股蓝皂苷(gypenoside, GPs)。GPs 通过降脂,抗血小板聚集和抗血栓形成

发挥抗 AS 作用^[5,6]。课题组前期采用 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞出现线粒体膜电位损伤及呼吸链复合物 I、II、III、IV、V 酶活性下降,并且明确了 GP 的有效成分 GPs、绞股蓝皂苷 XILX、人参皂苷 GRb3 可以通过提高线粒体膜电位;影响线粒体能量代谢相关蛋白;上调 ox-LDL 诱导内皮细胞的自噬效应,降低内皮细胞损伤,发挥对 ox-LDL 诱导的内皮细胞的保护作用^[7-9]。在前期研究的基础上,本文重点关注 GPs 是否通过影响长链非编码 RNA TUG1/miR-26a 干扰线粒体凋亡改善 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏脂质沉积,进而防治 AS。

1 材料

1.1 动物饲养及分组给药

20 只健康 ApoE^{-/-} 小鼠,10 只 C57BL/6J 小鼠,体重 20 ± 2 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2016-0006。动物饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,SPF 级,环境温度为 22 ± 1 °C,湿度 $50\% \pm 5\%$,自然光照,正常饲料喂饲,自由饮飮水,适应性喂养 7 d 后,将 20 只健康 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为 2 组:模型组、绞股蓝皂苷组,每组 10 只。给予高脂饲料喂饲,每日给予高脂饲料:脂肪供能比为 41% 的高脂纯化饲料,通常称为“西方饮食”饲料,额外添加 0.15% 胆固醇,喂饲 12 周。造模 12 周后,绞股蓝皂苷组按照 2.973 mg/kg/d 灌胃,正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,灌胃 4 周。

1.2 试剂、药物与仪器

胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆

固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(四川迈新生物技术有限公司);HE染色液(北京索莱宝科技有限公司);一抗稀释液(上海碧云天生物技术研究所),Bcl2、Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP及GAPDH抗体(proteintech,中国);绞股蓝皂苷(西安天丰生物科技有限公司);动物组织RNA提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司);反转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);全自动生化分析仪(日本东芝),7500Real Time PCR仪(美国Applied Biosystems),Wes全自动蛋白质印迹定量分析系统及配套试剂(ProteinSimple, San Jose, CA, USA)。

2 方法

2.1 动物处置

取材实验前禁止进食12 h,不禁水,称体重,10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血约5~10 mL,静置1~2 h,3 000 rpm离心30 min,分离血清,取上清液,低温(4 °C)保存。取小鼠肝组织并切成小块,分别4%多聚甲醛固定及冷冻。

2.2 血脂检测

按生化试剂盒说明书采用全自动生化分析仪检

测小鼠血清中TC、TG、LDL-C、HDL-C含量。

2.3 HE染色观察肝脏组织病理形态

将肝脏组织在4%多聚甲醛溶液中固定24 h,按苏木素-伊红(HE)染色常规方法进行。70%~100%梯度酒精脱水、二甲苯透明,石蜡包埋、切片(切片厚度5 μm)、贴片、烤片后,用二甲苯脱蜡、70%~100%梯度酒精复水、苏木精染色、70%盐酸酒精分色、伊红复染后,再用70%~100%梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封片石蜡包埋,光学显微镜下观察小鼠肝脏组织形态。

2.4 实时荧光定量qPCR检测长链非编码TUG1、miRNA-26a及Bcl2、Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP mRNA表达

Trizol处理各组肝脏组织,提取总RNA,逆转录成cDNA,设定PCR反应条件,用SYBR Green Master Mix试剂检测待测基因的mRNA及miRNA水平(引物序列见表1),共重复检测3次。用ΔΔCT法对RT-PCR结果进行相对定量分析。ΔCT值为目的基因CT值与管家基因(GAPDH, U6)CT值的差值,ΔΔCT为各实验组ΔCT与空白对照组ΔCT的差值。平均相对含量=2^{-ΔΔCT},为相对于正常组mRNA及miRNA水平。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	长度 Length (bp)
LncRNA TUG1	上游: CCAATACAGAGATCAGGCACAT 下游: CAGCCGTTGACCATAACAAGA	233
Cyt c	上游: CACGCTTACCCCTCGTTCT 上游: TGAGGCCAGTTAACATCTTC	193
Bax	上游: CTCCGGCGAATTGGAGAT 下游: GATCAGCTCGGGCACTTTAG	213
Bcl2	上游: TCGCAGAGATGTCCAGTCAG 下游: TTGACGCTCTCCACACACAT	154
Cleaved caspase-9	上游: ACGACCTGACTGCCAAGAAA 下游: GCATCCATCTGTCCCAGAC	155
Cleaved caspase-3	上游: TGACTGGAAAGCCGAAACTC 下游: TGCAAAGGGACTGGATGAAC	210
Cleaved PARP	上游: TTGAGGTGGATGGCTTCTCT 下游: CCTGTTGGACTTGGCGTACT	161
GAPDH	上游: GTGTTCTCGTCCCGTAGA 下游: CCTTGACTGTGCCGTGAAT	202
mmt-miR-26a-1-3p	上游: CGCGCCCCCTATTCTGGTTACT	-
U6	上游: CTCCGCTTCGGCAGCACATATACT 下游: ACGCTTCACGAATTGCGTGT	-

2.5 Wes 全自动蛋白质印迹定量分析系统检测

Bcl2、Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP 蛋白表达

打开 Wes、电脑和 Compass 软件,进行硬件自检。利用 RIPA 蛋白裂解液(含 PMSF)提肝脏组织蛋白,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,使用 Antibody Diluent II 按 1:50 比例稀释一抗,每个样品上样量为 4.5 μL(包括 5 × Master Mix 0.9 μL, 样品原液与 0.1 × Sample Buffer 合为 3.6 μL, 95 °C 变性 5 min)。样品制备后,分别按照样品、封闭液、一抗、二抗、发光液及清洗缓冲液的顺序加入板内,排板布局,点击 start 进行检测,检查结束后分析结果。

2.6 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,多组间数据比较用 ANOVA 方差分析,组间两两比较用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为统计学上有显著差异。

表 2 各组小鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 含量的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of serum TG, TC, LDL-C, HDL-C content in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
正常对照组 Control group	1.56 ± 0.33	3.50 ± 0.28	0.74 ± 0.18	1.19 ± 0.13
模型组 Model group	3.35 ± 0.46 **	16.61 ± 1.67 **	3.30 ± 0.50 **	0.83 ± 0.15 **
绞股蓝皂苷组 Gypenoside group	2.52 ± 0.26 ▲▲	12.59 ± 0.77 ▲▲	1.57 ± 0.23 ▲▲	0.80 ± 0.12

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with the model group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$.

3 结果

3.1 绞股蓝皂苷对 ApoE^{-/-} AS 小鼠血脂水平的影响

与正常对照组相比,模型 ApoE^{-/-} 小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平均显著升高,HDL-C 水平显著下降($P < 0.01$);与模型组相比,绞股蓝皂苷组血清中 TG、TC、LDL-C 水平均发生显著性降低($P < 0.01$),HDL-C 水平无明显变化趋势(见表 2)。

3.2 绞股蓝皂苷对 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏病理形态的改变

正常对照组肝小叶结构正常,肝细胞为圆形,细胞核居中,胞浆内未见脂滴,排列方式为条索状且肝窦不狭窄;模型组肝细胞体积变大,胞浆内可见大量的脂肪空泡,且大小不等,肝窦狭窄或消失;绞股蓝皂苷组较模型组有所变化,其肝细胞脂肪变性程度减轻,脂肪空泡明显减少,肝窦狭窄有所减轻(见图 1)。

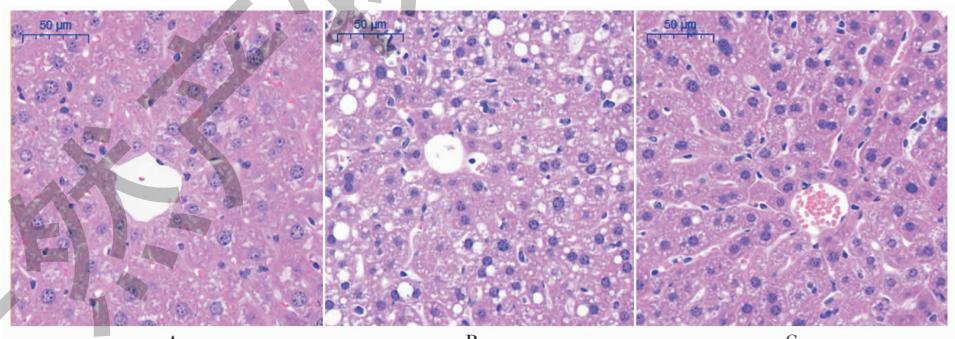


图 1 小鼠肝脏病理形态学改变结果(200×)

Fig. 1 Results of pathological morphological changes of mouse liver (200×)

注:A:正常组;B:模型组;C:绞股蓝皂苷组 Note: A: Normal group; B: Model group; C: Gypenoside group

3.3 绞股蓝皂苷对 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏长链非编码 TUG1、miRNA-26a 及 Bcl2、Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP mRNA 表达的影响

与正常组相比,模型 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏 Lnc-TUG1 表达显著升高,miRNA-26a 显著下降($P <$

0.01);与模型组相比,绞股蓝皂苷肝脏 Lnc-TUG1 表达有所下降,miRNA-26a 表达有所上调($P < 0.05$);与正常对照组相比,模型 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏 Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved PARP mRNA 表达显著升高,cleaved caspase-9 mRNA 仅有上升趋势,Bcl2 mRNA 显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与

模型组相比,绞股蓝皂苷小鼠肝脏 Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 mRNA 表达显著下调,

cleaved PARP mRNA 仅有下调趋势,Bcl2 mRNA 显著上调($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$,见图 2)。

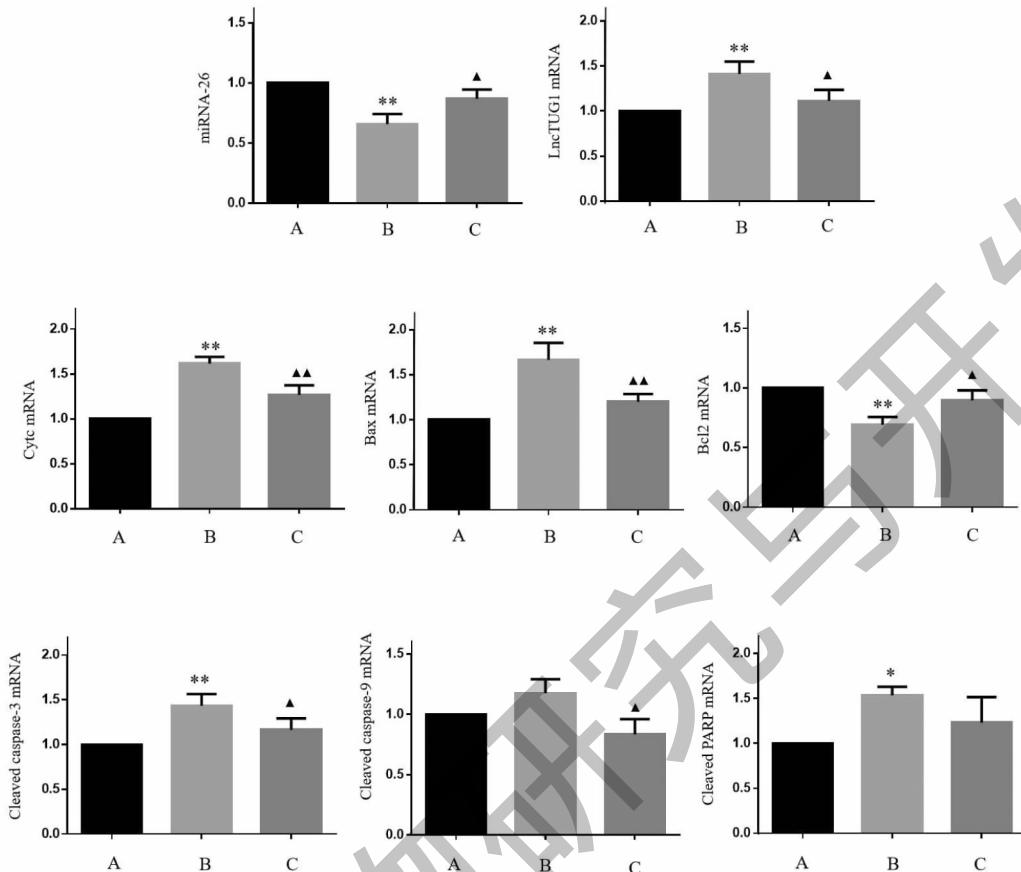


图 2 各组小鼠肝脏 Lnc TUG1、miRNA-26a 及 Bcl2、Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP mRNA 的表达($n=3$)

Fig. 2 The expression of Lnc TUG1, miRNA-26a and Bcl2, Bax, Cyt c, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, cleaved PARP mRNA in the liver of each group of mice ($n=3$)

注:A:正常组;B:模型组;C:绞股蓝皂苷组。与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$,下同。

Note : A: Normal group ; B: Model group ; C: Gypenoside group. Compared with the normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with the

model group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$. The same below.

3.4 绞股蓝皂苷对 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏 Bcl2、Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 及 cleaved PARP 蛋白影响

与正常对照组相比,模型 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏 Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP 蛋白表达显著升高,Bcl2 蛋白显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组相比,绞股蓝皂苷小鼠肝脏 Bax、Cyt c、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、cleaved PARP 蛋白表达显著下调,Bcl2 蛋白显著上调($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(见图 3)。

4 讨论与结论

随着人们生活水平显著提高,饮食结构也有所

改变,在高胆固醇饮食与高强度工作压力等因素下,心血管疾病的发病率逐渐增高,AS 为心血管疾病最主要的死亡因素,对其防治具有重要的意义。GP 系葫芦科绞股蓝属多年生草质藤本植物。绞股蓝全草入药,性凉,味苦、微甘,归肺、脾、肾经,具有清热解毒、止咳清肺祛痰、养心安神、补气生精之功效^[10]。GPs 是从 GP 中提取的有效成分群,含有 80 余种人参皂苷类成分,所有 GPs 的皂元部分都为达玛烷型四环三萜类,对治疗和预防 AS 等心血管疾病有显著功效^[11,12]。

长链非编码核糖核酸 (long non-coding ribonucleic acid, LncRNA) 是一类长度超过 200 nt 的功能

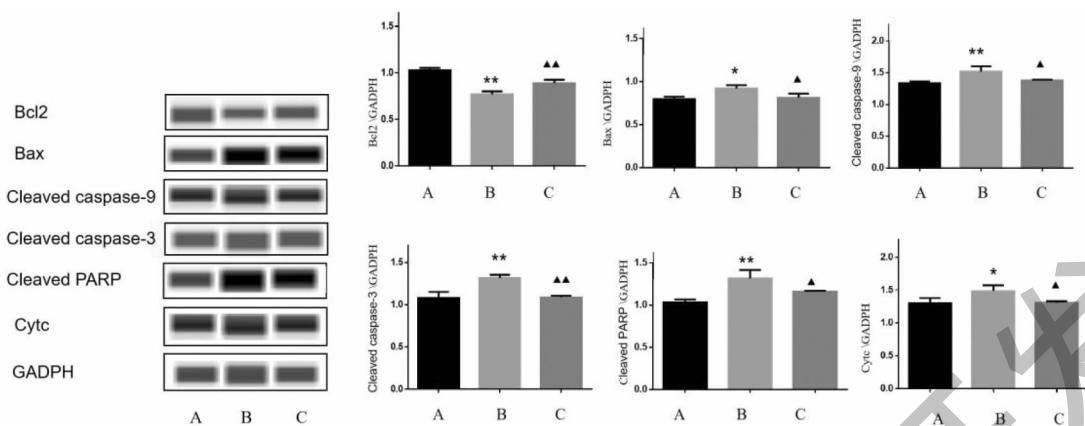


图 3 各组小鼠肝脏 Bcl2、Bax、Cytc、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 及 cleaved PARP 蛋白表达 ($n = 3$)
Fig. 3 The expression of Bcl2, Bax, Cytc, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 and cleaved PARP protein in the liver of each group of mice ($n = 3$)

性 RNA 分子,不具有蛋白编码功能,早期被认为是 RNA 转录过程中的“噪音”^[13]。但近年来的研究发现,LncRNA 参与人类多种疾病的发生、发展^[14]。值得重视的是 LncRNA 也在心血管疾病中存在差异表达,并且通过不同的作用机制在心血管疾病的调控网络中发挥作用,参与心血管疾病的发生发展。前期研究已明确 miRNA 通过与靶 mRNA 上的互补序列结合来抑制 mRNA 的翻译或促进 mRNA 的降解^[15],而 LncRNA 可以作为 miRNA 海绵与 miRNA 相互作用^[16]来影响 mRNA 进而调控基因表达。研究发现在缺氧/复氧条件下,LncRNA AK088388 通过作为 miR-30a 的内源性 RNA 海绵来调节心肌细胞的自噬^[17]。LncRNA Mexis 是依赖于 LXR 转录的 ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1)基因的扩增器,而 ABCA1 蛋白可将动脉血管壁细胞内的胆固醇泵出细胞,对高密度脂蛋白(HDL)的形成和胆固醇外流的调节至关重要^[18]。可见,LncRNA 参与脂质代谢影响 AS 发生发展机制研究不容忽视。TUG1 是一种进化上高度保守的长链非编码 RNA,目前研究明确 TUG1 不仅与食管癌、胃癌、肝癌、肺癌等癌症的发生发展极为密切,LncRNA TUG1 与 miR-138-5p 相互影响可能参与慢性心力衰竭的发病发展^[19,20],并且可通过上调 miR-26a 缓解 LPS 诱导的线粒体损伤、细胞凋亡。研究发现 miRNA-26 在心血管疾病中发挥重要作用,其在心脏疾病中表达下调,miRNA-26 在心肌肥大中起关键作用,大鼠模型和心肌细胞中 miRNA-26a/b 表达均下调^[21]。课题组前期研究发现,线粒体凋亡途径在 AS 发生发展过程中发挥着重要的作用,并且在此过程中,GPs 具有调节

作用。根据 ApoE^{-/-}小鼠在高脂喂饲 12 周可出现典型的 AS 病理特征,本文选用 AS 经典模型(ApoE^{-/-}的 C57BL/6J 小鼠)作为主要研究对象,以 C57BL/6J 小鼠作为正常对照^[22],重点关注 GPs 是否通过影响长链非编码 RNA TUG1/miR-26a 干扰线粒体凋亡改善 ApoE^{-/-}AS 小鼠肝脏脂质沉积,进而防治 AS。

研究发现 GPs 可以改善 ApoE^{-/-}AS 小鼠血脂水平及肝脏脂质沉积情况,结果与前期研究一致。在此基础上,首先发现 ApoE^{-/-}AS 小鼠肝脏长链非编码 RNA TUG1 明显上调,而 miR-26a 显著下调,经 GPs 干预后,上述情况出现反向结果。而线粒体凋亡途径相关指标也同时发生变化,ApoE^{-/-}AS 小鼠肝脏 Bcl2、Bax、Cytc、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 及 cleaved PARP mRNA 及蛋白表达趋势基本一致,在模型组中 Bcl2 mRNA 及蛋白表达显著下调,Bax、Cytc、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 及 cleaved PARP mRNA 及蛋白表达出现上调,GPs 干预后,Bcl2 mRNA 及蛋白表达有所上调,Bax、Cytc、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 及 cleaved PARP mRNA 及蛋白表达有所下调。线粒体是细胞有氧呼吸的主要基地和供应能量的重要场所,在细胞凋亡的发生中发挥着重要的作用。线粒体是细胞凋亡的关键调节器,作为细胞的能量工厂,参与氧化磷酸化和 ATP 的生成,同时线粒体功能障碍也将会导致 ATP 合成受损。内源性线粒体途径是细胞凋亡主要途径之一,Cytc 是线粒体内包含的与细胞凋亡存在密切关系的物质。在凋亡信号的刺激下,线粒体膜的通透性处于开放状态,Cytc 的释放以及 caspase 的激活进而发生线粒体凋亡^[23,24]。可见,Cytc 由线粒

体释放至胞浆是引发线粒体凋亡途径发生的关键步骤,Cytc 释放是在细胞凋亡早期发生的重要事件,具体环节为通过线粒体 MPTP 或 Bcl-2 家族成员调控的 MOMP 释放到细胞质中,接下来释放到细胞质中的 Cytc 进一步被利用,可在 ATP/dATP 存在的情况下,与 caspase-9 结合形成凋亡复合物,继而活化 caspase-9,活化后的 caspase-9 又可激活 caspase-3,进一步启动 caspase 级联反应而导致细胞凋亡^[25,26]。Caspase 是一类酶原,正常状态下是以无活性的结构存在的,caspase 依赖的线粒体通路中,Cytc 从线粒体释放后与 ATP,Apaf-1 联合构成多聚体,同时 caspase-9 和它结合构成凋亡体,可水解 caspase-9 酶原而激活 caspase-9,激活的 caspase-9 又可以进一步激活 caspase-3,活化的 caspase-3 可切割 DNA 修复酶 PARP,使 PARP 被剪切为小片段,不能发挥其正常功能,进而导致 DNA 裂解,最终引起细胞凋亡^[27,28]。综上结果说明,GPs 可能通过影响长链非编码 RNA TUG1/miR-26a 干扰线粒体凋亡改善 ApoE^{-/-} AS 小鼠肝脏脂质沉积,进而防治 AS,其干扰机制可能与调控线粒体凋亡的 Bcl2、Bax、Cytc、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 及 cleaved PARP 表达水平有关。然而,其具体靶向调控关系,有待后续细胞实验深入验证,此研究有望为中药防治疾病的网络靶标分析、中药多成分多靶点复杂机制解析等研究奠定基础,为中西医结合防治心血管疾病及临床应用提供更有力的实验依据。

参考文献

- Wu Y,Song N,Jia LQ,et al. Effect of tanshinone II A on liver lipid deposition and ferroptosis-related protein expression in ApoE^{-/-} mice[J]. Chin J Pathol(中国病理生理杂志),2020,36:1261-1268.
- Yin LD,Sun Qin,Sun M,et al. Research progress of the interactions between long non-coding RNAs and miRNAs in human cancer[J]. Chin Clin Oncol(临床肿瘤学杂志),2014,19:662-666.
- Khalil AM,Guttman M,Huarte M,et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2009,106:11667-11672.
- Li Y,Ye L. Interfering LncRNA TUG1 attenuates mitochondrial damage and immune disorders in LPS-induced sepsis rats by up-regulating miR-26a [J]. Immunol J(免疫学杂志),2020,36:125-131.
- Quan Y,Qian MZ. Effect and mechanism of gypenosides on the inflammatory molecular expression in high-fat Induced atherosclerosis rats[J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志),2010,30:403-406.
- Zhang N,Song N,Cao HM,et al. Effect of gypenosides on the prevention and treatment of atherosclerosis by autophagosome [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2017,29:2112-2116.
- Cao HM,Song N,Jia LQ,et al. Effects of different active ingredients of *Gynostemma pentaphyllum* on mitochondrial membrane potential of oxidative damaged endothelial cells [J]. Prog Anat Sci(解剖科学进展),2017,23:447-450.
- Zheng HL,Song N,Cao HM,et al. Effects of different active constituents of *Gynostemma pentaphyllum* on mitochondrial energy metabolism-related proteins in endothelial cells induced by ox-LDL[J]. Chin J Pathol(中国病理生理杂志),2020,36:713-718.
- Cao HM,Song N,Jia LQ,et al. Effects of different Active Ingredients of *Gynostemma pentaphyllum* on autophagy effect Induced by ox-LDL in endothelial Cells[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2018,36:1166-1168.
- Sun XN,Song N,Yang X,et al. Study on the mechanism of gynosaponin A improving ox-LDL-induced EA. HY926 cell injury by regulating mitochondrial function [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊),2020,38(1):77-80.
- Cai Y,Zhou HL,Duan WT,et al. Effect of *Gynostemma pentaphyllum* on oxidative stress and liver cell apoptosis of non-alcoholic fatty liver disease rats[J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志),2020,36:1256-1259.
- Sun XN,Song N,Yang X,et al. Mechanism of *Gynostemma saponin a* improving ox-LDL-induced EA. hy926 cell injury by regulating mitochondrial function [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2020,38(1):77-80.
- Li B,Hu Y,Li X,et al. Sirt1 antisense long noncoding rna promotes cardiomyocyte proliferation by enhancing the stability of sirt1[J]. J Am Heart Assoc,2018,7(21):e009700.
- Lu YW,Wang DZ. Non-coding RNA in ischemic and non-ischemic cardiomyopathy [J]. Curr Cardiol Rep, 2018, 20(11):115.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell,2009,136:215-233.
- Furió-Tarí P,Tarazona S,Gabaldón T,et al. SpongeScan: a web for in detecting microRNA binding elements lncRNA sequences[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44 (W1): W176-W180.
- Wang JJ,Bie ZD,Sun CF. Long noncoding RNA AK088388 regulates autophagy through miR-30a to affect cardiomyocyte

- injury [J]. J Cell Biochem, 2019, 120: 10155-10163.
- 18 Sallam T, Jones M, Thomas BJ, et al. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA [J]. Nat Med, 2018, 24: 304-312.
- 19 Song K, Liu N, Song YF, et al. Effect of lncRNA TUG1 regulating miR-138-5p on proliferation, apoptosis, invasion and migration of osteosarcoma cells [J]. J Mod Oncol(现代肿瘤医学), 2020, 28: 2221-2225.
- 20 Li K, Feng J, Yu D, et al. Expression and significance of lncRNA TUG1 and miR-138-5p in patients with chronic heart failure [J]. Chin J Arterioscler(中国动脉硬化杂志), 2020, 28: 219-223.
- 21 Xing XW. miR-26a-5p) protects against myocardial ischemia/reperfusion injury am through regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [D]. Jinan: Shandong Univ(山东大学), 2020.
- 22 Ou HL, Zhang LL, He XL, et al. The establishment of atherosclerosis model in ApoE^{-/-} mice [J]. Life Sci Res(生命科学研究), 2015(2): 141-144.
- 23 Elkholi R, Renault TT, Serasinghe MN, et al. Putting the pieces together; how is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? [J]. Cancer Metab, 2014, 2: 16.
- 24 Burke PJ. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer [J]. Trends Cancer, 2017, 3: 857-870.
- 25 Peng N, Meng N, Wang SQ, et al. An activator of mTOR inhibits oxLDL-induced autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells and restricts atherosclerosis in apolipoprotein E(2)/(2) mice [J]. Sci Rep, 2014, 4: 5519.
- 26 Liang S, Sun K, Wang Y, et al. Role of Cyt-C/caspases-9, 3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid [J]. Chem-Bio Interact, 2016, 258: 40-51.
- 27 Menghini R, Casagrande V, Marino A, et al. MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy [J]. Cell Death Dis, 2015, 5: e1029.
- 28 Bell RAV, Megeney LA. Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: twins separated at birth [J]. Cell Death Differ, 2017, 24: 1359-1368.

天然产物生物合成的新策略

微生物产生天然产物,例如作为致病毒力因子或作为对抗捕食者和竞争者的防御物质。来自弗莱堡大学生物学系的 Robin Teufel 带领的研究小组,以及来自波恩大学的研究人员,现在已经发现了一种新的酶,这种酶对于所谓的细菌性托酮天然产物的生产至关重要。研究人员将他们的研究结果发表在最新一期的《Journal of the American Chemical Society》上。

在陆地和海洋环境中发现的细菌与植物、藻类或低等动物共生时,会产生托酮天然产物,作为珊瑚和海绵中微生物病原体的假定保护物质。弗莱堡的研究人员现在正在研究这种共生细菌是如何产生这些生物活性物质的。Teufel 和他的研究小组发现了一种全新的酶,这种酶对于产生这些细菌性趋同蛋白是必不可少的。

研究发现,这种酶以一种前所未知的方式激活氧,并将其结合成一种化学前体化合物。在此过程中,生成了托酮的基本结构。使用化学和生化方法,研究人员能够更详细地研究这种酶的功能,从而在托酮生物合成中阐明新的中间物。这些发现可作为今后更好地对抗某些病原体或利用生物技术方法获得新型托酮化合物的基础。

胡乃华编译自:<https://phys.org/news/2021-07-strategy-natural-product-biosynthesis.html>

原文链接:<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.1c04996>

原文标题:A Flavoprotein Dioxygenase Steers Bacterial Tropone Biosynthesis via Coenzyme A-Ester Oxygenolysis and Ring Epoxidation