

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.002

PRKAG2-AS1 通过 AMPK 抑制缺氧所致心肌细胞凋亡 *

苏 婷 宋晓伟 史承勇 唐文栋 胡海鹰 郑 兴[△]

(海军军医大学附属长海医院心血管内科 上海 200003)

摘要 目的:探讨 PRKAG2-AS1 在缺氧所致心肌细胞凋亡中的作用及其可能机制。**方法:**以人心肌细胞系作为主要研究对象,使用 RNA 核质分提的方法检测 PRKAG2-AS1 在细胞中的表达分布模式。将人心肌细胞系分为常氧对照组及低氧组,分别置于常氧环境(21 % O₂)和低氧环境(1 % O₂)培养 12 小时,构建心肌细胞缺氧模型,AnnexinV-FITC/PI 流式细胞学检测细胞凋亡,Real-time PCR 检测模型中 SOD mRNA 及 PRKAG2-AS1 基因表达。对常氧培养条件下心肌细胞通过 siRNA 及反寡义核苷酸方法分别靶向敲低胞质及胞核内 PRKAG2-AS1 的表达水平,AnnexinV-FITC/PI 流式细胞学检测细胞凋亡,观察 PRKAG2-AS1 对心肌细胞凋亡的影响;Real-time PCR 检测 SOD mRNA 表达,Western blot 检测 AMPK γ 2 亚基蛋白的表达,观察 PRKAG2-AS1 对 SOD mRNA 及 AMPK γ 2 蛋白表达的影响。**结果:**PRKAG2-AS1 在心肌细胞胞质及胞核中均有表达,且以胞核为主。PRKAG2-AS1 基因表达水平在心肌细胞缺氧模型中明显降低($P<0.05$)。对常氧培养条件下心肌细胞,敲低 PRKAG2-AS1 基因表达,将导致细胞凋亡增加($P<0.05$),且敲低胞核中表达细胞凋亡更为明显,同时,敲低 PRKAG2-AS1 能够引起 SOD mRNA 表达水平改变($P<0.05$),且 AMPK γ 2 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。**结论:**PRKAG2-AS1 可能通过 AMPK 途径影响 SOD 表达,从而调控心肌缺氧损伤中的细胞凋亡。

关键词:PRKAG2-AS1;LncRNA;心肌细胞凋亡

中图分类号:R-33;R541 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)04-608-06

PRKAG2-AS1 is Involved in the Regulation of Apoptosis in Myocardial Hypoxia Injury*

SU Ting, SONG Xiao-wei, SHI Cheng-yong, TANG Wen-dong, HU Hai-ying, ZHENG Xing[△]

(Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China)

ABSTRACT Objective: This study was aimed to explore the effect and possible mechanism of PRKAG2-AS1 in the apoptosis in myocardial hypoxia injury. **Methods:** The human cardiomyocyte cell line (AC16) was selected as the main research object, RNA nuclear fractionation was taken to find out the expression pattern of PRKAG2-AS1 in the cell. AC16 cells were divided into control group and hypoxia group, treated under hypoxia (1% O₂) or normoxia (21% O₂) condition for 12 hours. AnnexinV-FITC/PI flow cytometry was used to detect the apoptosis rate, realtime-PCR was performed to detect PRKAG2-AS1 RNA expression level. Furthermore, PRKAG2-AS1 siRNA and anti-oligonucleotide was used to investigate the role of PRKAG2-AS1 on apoptosis of cardiomyocytes under normoxia condition, the mRNA levels of SOD and protein expression of AMPK were detected by realtime-PCR and Western-blot respectively. **Results:** The results shown that PRKAG2-AS1 was expressed in the cytoplasm and nucleus, mainly in the nucleus ($P<0.05$). Compared with the control group, the RNA relative expression level of PRKAG2-AS1 was significantly decreased in the hypoxic model of cardiomyocytes ($P<0.05$). PRKAG2-AS1 siRNA and oligo could promote apoptosis in AC16 cells under normoxia condition ($P<0.05$), which was more obvious by oligo. Moreover, the mRNA expression levels of SOD changed ($P<0.05$), and the protein level of AMPK γ 2 were reduced ($P<0.05$). **Conclusions:** PRKAG2-AS1 may regulate apoptosis in myocardial hypoxia injury by regulating the expression of SOD through AMPK pathway.

Key words: PRKAG2-AS1; LncRNA; Cardiomyocyte apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)04-608-06

前言

心肌缺氧诱导的心肌细胞凋亡是心肌梗塞后果之一,与心

肌细胞的能量代谢密切相关,AMPK 在调控心肌能量平衡和信号转导中发挥重要作用^[1]。既往研究表明 PRKAG2 基因突变可导致 AMPK 活性异常,引起心脏代谢紊乱,从而产生多种疾病

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170092)

作者简介:苏婷(1987-),女,博士研究生,主要研究方向:冠心病基础与临床研究,E-mail: st.hy.kn@163.com

[△] 通讯作者:郑兴,主任医师,教授,主要研究方向:冠心病和结构性心脏病基础与临床研究,E-mail: zhengxing57530@163.com

(收稿日期:2019-09-30 接受日期:2019-10-26)

表型^[2]。PRKAG2 基因定位于染色体 7q36,由 21 个外显子组成,大小为 280 kb,编码 569 个氨基酸。PRKAG2 基因启动子区存在一个长链非编码 RNA,即 PRKAG2-AS1。

随着高通量测序技术的发展,近年来 LncRNA 受到人们越来越多的关注。LncRNA 的作用广泛,主要以顺式及反式作用调控基因表达,参与调节 X 染色体失活、印记基因沉默、染色质修饰转录激活及抑制^[3-6],在多种生理及病理过程中发挥着重要作用。多项研究提示 LncRNA 作为重要的转录调节因子,参与调节多种心血管疾病的发生发展^[7]。但 PRKAG2-AS1 的相关功能和机制目前尚不清楚。在本研究中,我们主要探讨了 PRKAG2-AS1 缺氧所致心肌细胞凋亡中的作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人心肌细胞系 (AC16 细胞) 由长海医院心内科实验室提供,冻存于液氮中保存。DMEM 培养基(CORNING 公司);胎牛血清、不含 EDTA 胰蛋白酶(Gibco 公司);0.25%胰蛋白酶(LIFE 公司);Lipofectamine 3000(Invitrogen 公司);siRNA(吉玛公司);oligo (锐博公司);PARIS kit (life technologies 公司);Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(凯基生物公司);逆转录试剂盒(TOYOBO 公司);SYBR Green PCR Master Mix(TOYOBO 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 PRKAG2 生物信息学在线分析 利用 NCBI 网站对 PRKAG2 进行基因学特征的综合检索(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)。

1.2.2 细胞培养 实验中所使用的细胞系均冻存于液氮罐中;AC16 细胞使用含有 10%胎牛血清、1%双抗的 DMEM 完全培养基,置于 37℃恒温,5%CO₂ 浓度和饱和湿度的细胞培养箱中培养,根据细胞生长状态,使用 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.3 心肌细胞系缺氧模型的构建 实验分为缺氧 12 h 组及常氧对照组。将细胞接种于培养皿或培养板上,正常培养 24 h 左右,待细胞密度约 60%左右,取缺氧 12 h 组细胞至低氧孵箱(O₂ 浓度为 1%),继续培养 12 h 后,统一消化收集两组细胞,进行后续实验。

1.2.4 细胞瞬时转染 特异性设计针对靶向的 PRKAG2-AS1 的干扰序列 siRNA 及反义寡核苷酸 (ASO),引物序列如下:PRKAG2-AS1 siRNA 靶序列为:Sense:CCCACUGAAUGCU CAAGAUTT;Antisense:AUCUUGAGCAUUCAGUGGGTT.NC-siRNA 靶序列为:Sense :UUCUCCGAACGUGUCACGUDtT, Antisense:ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT。PRKAG2-AS1 oligo 靶序列为:ACGAACGGGCTTACTGGTTC。根据说明使用 lipo3000 转染,并设计 NC 为阴性对照,终浓度为 50 nM,培养 24 h,提取蛋白、RNA 并进行后续研究。

1.2.5 RNA 提取和 Real-time PCR 检测 将已经过处理的不同分组细胞用冰上预冷 PBS 洗涤 3 次,按照 Trizol 法提取总 RNA,使用紫外分光光度计测定总 RNA 纯度。按照逆转录试剂盒说明书将所得 RNA 反转录成 cDNA,并以此为模板在 PCR 仪中进行反转录扩增。相关基因引物序列如下:GAPDH 上游引物 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3',下游引物 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAGT-3';U6 上游引物

5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; PRKAG2-AS1 上游引物 5'-GC-CATCCAGCAGCTTACAAG-3',下游引物 5'-GTGTGACCTCATGAATCGCA-3'。SOD1 上游引物 5'-AGGCCGTGTGCGT-GCTGAAG-3',下游引物 5'-CACCTTTGCCCAAGTCATCTGC-3'。SOD2 上游引物 5'-GGGTTGGCTTGGTTCAATAAG-GAA-3',下游引物 5'-AGGTAGTAAGCGTGCTCCCACACAT-3';SOD3 上游引物 5'-CGCGCCATCCACGTG-CACCAGTTCG-3',下游引物 5'-CGCACACGCCCCAC-CACGCAGCAG-3'。实时荧光定量 PCR:反应体系 20 μL, mixture 10 μL, 探针引物 1 μL, cDNA 2 μL。RT-PCR 扩增条件:95℃预变性 10 min;94℃变性 15 s,60℃复性 60 s,72℃退火 60 s,共 40 个循环。荧光定量 PCR 读取目的基因 Ct(cycle threshold)值,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算各组目标 RNA 的相对表达量。

1.2.6 Annexin V/PI 双染流式细胞学检测细胞凋亡 将处理好的各组细胞使用不含 EDTA 胰蛋白酶消化,收集至 1.5 mL EP 管中。1000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。加入 PBS 重悬后再次 1000 r/min 离心 5 min,弃去上清,留置细胞沉淀。加入 200 μL Binding Buffer 重悬,并每管依次加入 5 μL Annexin V-FITC、5 μL PI,混匀。室温下避光孵育 15 min;流式细胞仪上机检测,记录结果。

1.2.7 Western-blot 检测 将已处理好的各组细胞用 PBS 洗涤 3 次,取 0.5 mL 蛋白裂解液,收集细胞样本,沸水 10 min 使蛋白变性。用 BCA 法测定蛋白浓度,抽提各组细胞蛋白。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质后,转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶封闭并在 4℃过夜。洗膜后加入鼠源一抗(1:1000 稀释),4℃过夜。TBST 漂洗后,加入二抗(1:500 稀释),室温孵育 2 h。TBST 漂洗后进行化学发光显色,利用 ImageJ 图像分析系统对条带进行灰度值分析。以 GAPDH 作为内参,计算蛋白相对含量。

1.3 统计学分析

采用 sigmaplot 软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PRKAG2-AS1 在心肌细胞胞质胞核中均有分布,且主要存在于胞核中

为了明确 PRKAG2-AS1 在细胞中的表达,我们对 AC16 细胞进行 RNA 核质分离,以主要在细胞核内表达的 U6 及主要在胞质中表达的 GAPDH 为参照,检测相应组分中 PRKAG2-AS1 基因相对表达水平,结果显示 PRKAG2-AS1 在胞质胞核均有表达,且胞核居多(图 1)。

2.2 缺氧导致心肌细胞 PRKAG2-AS1 表达降低

人心肌细胞分别在常氧和低氧条件下培养 12 h,采用 Annexin V/PI 双染流式细胞学检测细胞凋亡。结果显示缺氧诱导 12 h,心肌细胞出现凋亡,凋亡率为(7.93±1.91)%。此外,缺氧 12 h 组较常氧培养对照组,SOD1、SOD3 表达水平下降。且心肌细胞中 PRKAG2-AS1 的表达常氧诱导的细胞明显降低(P<0.05)(图 2)。

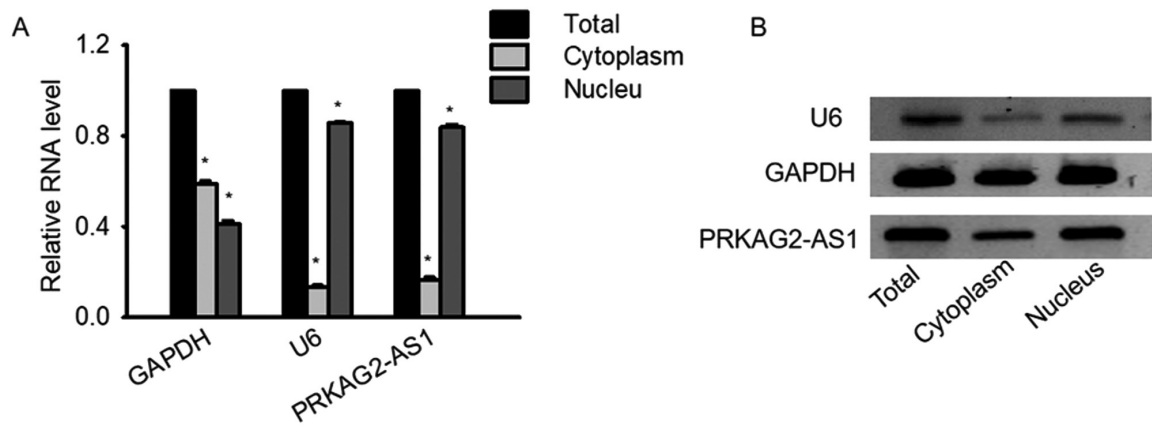


图1 PRKAG2-AS1 主要表达在心肌细胞核

A: 对 AC16 细胞 RNA 进行核质分离,通过 qRT-PCR 检测,以 U6 及 GAPDH 作为内参,PRKAG2-AS1 主要在胞核中表达。B:通过半定量 PCR 琼脂糖凝胶电泳,PRKAG2-AS1 在胞质胞核均有表达,且胞核居多。(* $P < 0.05$)

Fig.1 PRKAG2-AS1 is mainly expressed in the nucleus of AC-16 cells

A: RT-PCR assay for GAPDH, U6, PRKAG2-AS1 RNA level in the cytoplasm and nucleus of AC16 cells; B: Semi-quantitative PCR agarose gel electrophoresis assay for GAPDH, U6, PRKAG2-AS1 relative expression level in AC16 cells. (* $P < 0.05$)

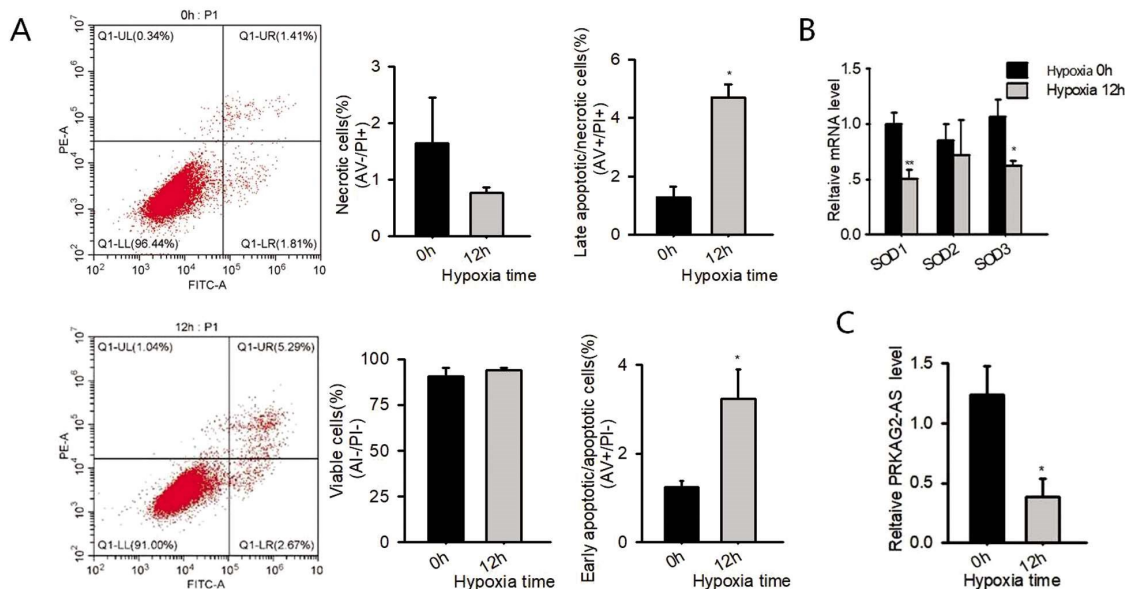


图2 缺氧诱导心肌细胞凋亡并降低 PRKAG2-AS1 的表达

A: 使用 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡,相对常氧培养细胞,缺氧 12 h 心肌细胞 Annexin V+/PI+ 染色细胞增多。B: 通过 qRT-PCR 检测,相对常氧培养细胞,缺氧 12 h 心肌细胞, SOD1 及 SOD3 mRNA 表达水平降低。C: 通过 qRT-PCR 检测,相对常氧培养细胞,缺氧 12 h 心肌细胞 PRKAG2-AS1 的表达水平明显降低。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Hypoxia promotes apoptosis and down-regulates the expression of PRKAG2-AS1 RNA in AC16 cells

A: Hypoxia decreased PRKAG2-AS1 RNA relative expression level in AC16 cells; B: RT-PCR assay for SOD mRNA level in myocardial hypoxia model; C: Annexin V-FITC/PI assay show that hypoxia promotes the apoptosis of AC16 cells. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.3 PRKAG2-AS1 抑制常氧培养条件下心肌细胞凋亡

为了进一步探究 PRKAG2-AS1 在心肌细胞中的生物学作用,分别将特异性 siRNA 及 oligo 引入细胞,敲低胞质及胞核中 PRKAG2-AS1 表达,并通过 Real-time PCR 验证转染效率。采用 Annexin V/PI 双染流式细胞学检测细胞凋亡,结果显示敲低胞质及胞核中 PRKAG2-AS1 表达均可促进细胞凋亡,且敲低胞核中 PRKAG2-AS1 表达,细胞凋亡更为明显($P < 0.05$)(图3)。

2.4 敲低常氧培养心肌细胞中 PRKAG2-AS1 影响 SOD 基因表达水平

我们对常氧培养条件下心肌细胞,引入特异性 siRNA 敲

低胞质中 PRKAG2-AS1 心肌细胞进行检测,发现其 SOD1 表达较 NC 对照组显著降低, SOD2、SOD3 基因表达水平升高。而 oligo 敲低细胞核内 PRKAG2-AS1 后, SOD1、SOD3 表达水平降低,但 SOD2 基因表达水平无明显变化($P < 0.05$)(图 4)。

2.5 敲低常氧培养心肌细胞中 PRKAG2-AS1 影响 AMPK γ 2 亚基的表达

分别使用 oligo 及 siRNA 敲低胞核胞质中 PRKAG2-AS1 表达,使用蛋白免疫印迹法检测 AMPK γ 2 亚基的表达,结果显示相对于 NC 对照组,敲低 PRKAG2-AS1 可导致 AMPK γ 2 亚基的蛋白表达水平降低(图 5)。

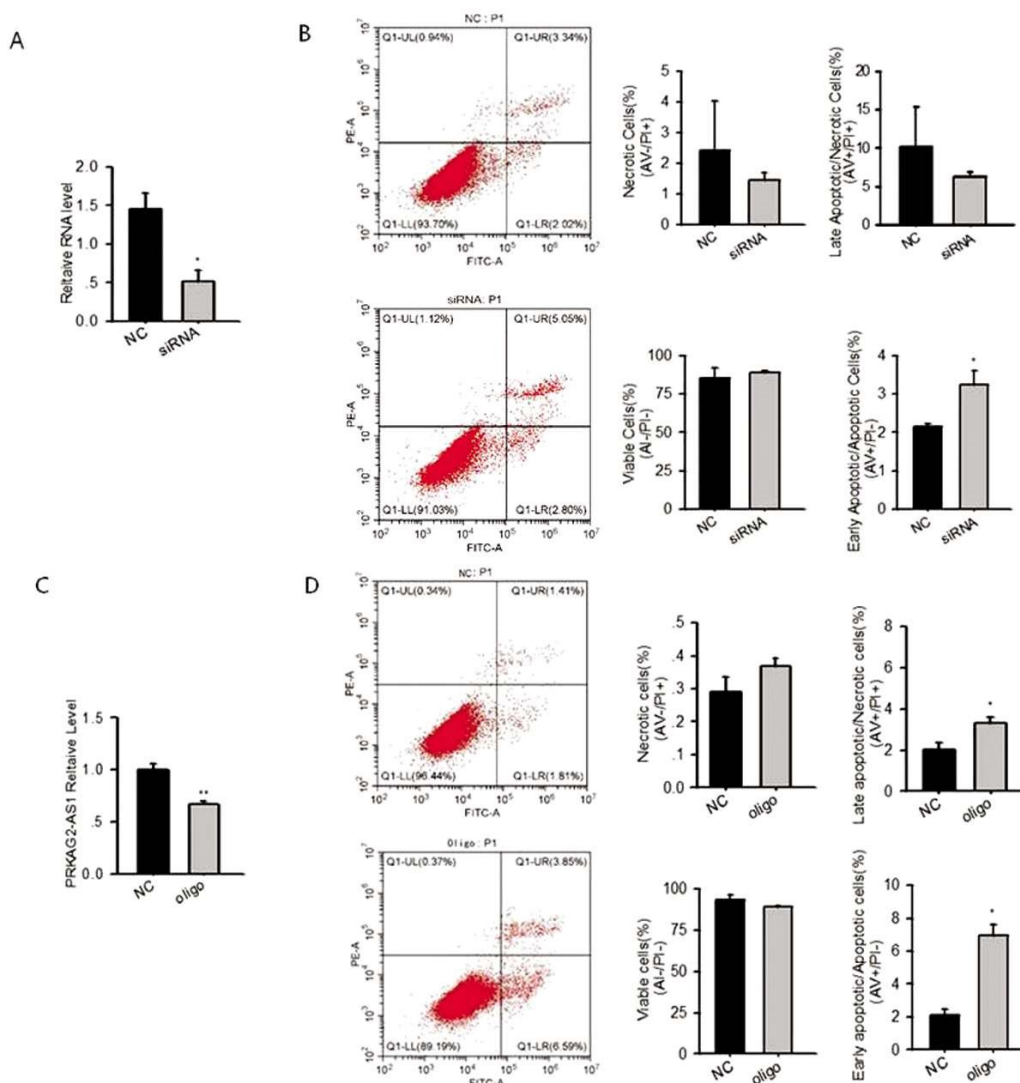


图3 敲低 PRKAG2-AS1 促进心肌细胞凋亡

A: 检测 si RNA 转染效率; B: siRNA 敲低胞质中 PRKAG2-AS1, 使用 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡; C: 检测 oligo 转染效率; D: oligo 敲低胞核中的 PRKAG2-AS1, 使用 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.3 Knockdown PRKAG2-AS1 promote apoptosis

A: Detection of the transfection efficiency of PRKAG2-AS1 siRNA; B: PRKAG2-AS1 siRNA promote apoptosis of AC16 cells; C: Detection of the transfection efficiency of PRKAG2-AS1 oligo; D: PRKAG2-AS1 oligo promote apoptosis of AC16 cells. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

3 讨论

心肌缺氧诱导的心肌细胞凋亡与心肌梗死、缺血性心脏病、心力衰竭等心血管疾病有着密切联系,在多种心血管疾病的发生和发展中起着关键性的作用^[8,9]。心肌细胞凋亡可导致心肌细胞数目的减少进而影响心肌收缩性,并可引起心肌细胞代偿性肥大及纤维化,促进心血管系统疾病的进展^[10],心肌细胞凋亡并被认为是导致左心室功能受损的主要机制之一,因此,抑制或改善心肌细胞凋亡是临床关心的重要课题,探寻心肌细胞凋亡相关靶点及相关分子机制具有重要意义。

心肌细胞凋亡与心肌细胞的能量代谢密切相关,AMPK在调控心肌能量平衡和信号转导中发挥重要作用^[11]。AMPK在真核生物中广泛表达,作为一种细胞能量传感器参与细胞ATP代谢,在调节细胞葡萄糖和脂肪酸代谢途径中起关键作用。在各种细胞应激作用下AMPK激活,开启分解代谢途径,增加葡

萄糖摄取和脂肪酸氧化,从而促进ATP的产生,同时抑制蛋白质和脂质合成等ATP消耗过程。此外,AMPK激活可被高浓度的ATP抑制^[12]。AMPK由一个催化亚基 α (PRKAA),一个调节亚基 β (PRKAB)和一个调节亚基 γ (PRKAG)组成的异源三聚体复合物,每个亚基包由不同基因编码,而产生不同亚型($\alpha 1/\alpha 2$; $\beta 1/\beta 2$; $\gamma 1/\gamma 2/\gamma 3$)。其中 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 在多种组织中广谱表达, $\alpha 2$ 和 $\beta 2$ 主要在骨骼肌中表达, γ 亚基 $\gamma 1$ 在不同组织中广谱表达,而 $\gamma 3$ 仅在骨骼肌中广谱表达。 $\gamma 2$ 在心脏中高丰度表达^[12-14]。其中 $\gamma 2$ 亚基由PRKAG2基因编码^[15]。

PRKAG2在后生物中普遍表达,该基因定位于染色体7q36,由21个外显子组成,大小为280kb,编码569个氨基酸,在人类多种组织中均有表达,在心脏组织中表达最多。PRKAG2基因突变将导致AMPK活性异常,进而引起心脏代谢的紊乱,从而产生多种疾病表型^[16]。既往研究表明,PRKAG2在心脏疾病中发挥着重要作用,PRKAG2基因突变可导致心肌细胞

肥大、进行性传导异常、心肌糖原累积,与 Wolff-Parkinson-White 综合征、家族性肥厚性心肌病和心脏的糖原贮积病

密切相关^[17-21]。

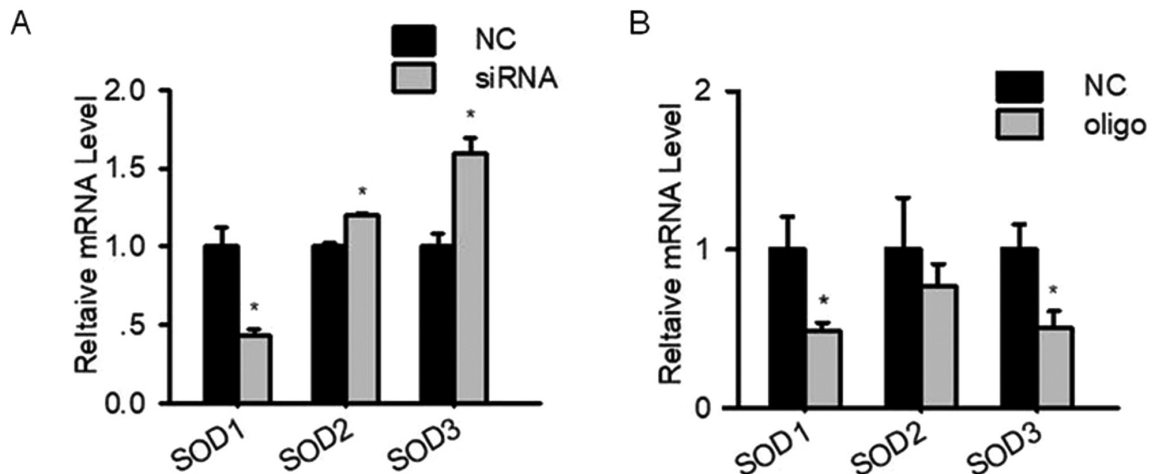


图4 PRKAG2-AS1 影响 SOD 基因表达水平

A; siRNA 敲低胞质中 PRKAG2-AS1 表达影响 SOD mRNA 表达水平; B: oligo 敲低胞质中 PRKAG2-AS1 表达影响 SOD mRNA 表达水平。
(* $P < 0.05$)

Fig.4 Knockdown PRKAG2-AS1 affects the relative expression level of SOD

A: PRKAG2-AS1 siRNA affects SOD gene expression level; B: PRKAG2-AS1 oligo affects SOD gene expression level. (* $P < 0.05$)

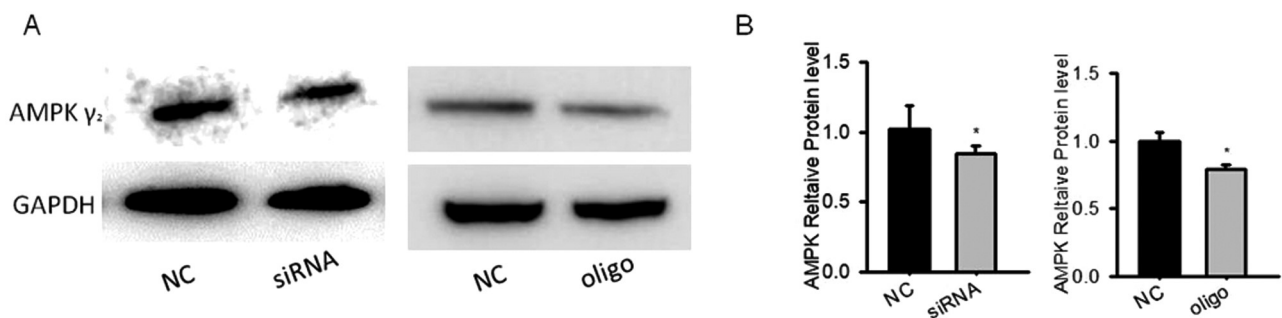


图5 PRKAG2-AS1 影响 AMPK γ_2 亚基的表达

A: Western blot 检测 AMPK γ_2 蛋白表达水平; B: Western blot 结果定量分析。(* $P < 0.05$)

Fig.5 Knockdown PRKAG2-AS1 affects AMPK γ_2 protein level

A: Western blot assay for AMPK γ_2 protein level; B: Quantification of western blot results. (* $P < 0.05$)

PRKAG2-AS1 是存在于 PRKAG2 基因启动子区的长链非编码 RNA。随着高通量测序技术的发展,非编码 RNA 受到越来越多的关注。人类基因组中约有 98 % 的 DNA 序列被转录,却仅有不到 2 % 的基因组编码蛋白质,其他大多数核苷酸在某些条件下可检测到转录,编码成非编码 RNA^[22]。最初人们认为这些不行使蛋白编码功能的 RNA 是 " 转录噪声 ",但随着对非编码基因组研究的深入,事实上这些 " 转录噪声 " 参与了体内绝大部分的生物学过程。其中长度大于 200 个碱基的长链非编码 RNA 备受关注。大多数 LncRNA 位于细胞核内,也有部分 LncRNA 位于细胞质内。胞质内 LncRNA 可以结合靶点 mRNA 或者作为 microRNA 的海绵体以起到竞争内源性 RNA 的作用^[23]。在人类基因组中约有 100,000 多种 LncRNA^[24],然而,绝大多数 LncRNA 的功能和生物学相关性尚不明确。多项研究提示 LncRNA 在转录及转录后水平作为重要的转录调节因子^[25],参与调节多种心血管疾病的发生发展,如动脉粥样硬化^[26,27]、心肌肥厚^[28]、心力衰竭^[29]及心脏发育^[30]。

在本实验中,心肌缺氧细胞模型中 PRKAG2-AS1 的表达

水平明显降低。这一结果提示 PRKAG2-AS1 可能在心肌细胞凋亡中发挥重要作用。我们使用 RNA 核质分提发现 PRKAG2-AS1 在胞质、胞核内均有表达,且核内居多。为了进一步探究 PRKAG2-AS1 在心肌细胞中的生物学作用,我们分别使用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 及反义寡核苷酸 (Antisense oligonucleotides, oligo) 的干预措施,敲低胞质及胞核中目标 LncRNA 表达。结果显示敲低胞质中的 PRKAG2-AS1 表达后,早期凋亡细胞有所增加,同时,敲低胞核中的 PRKAG2-AS1,将导致早期及晚期凋亡细胞明显增加。

为了进一步检测 PRKAG2-AS1 通过何种途径参与调控心肌细胞凋亡,我们检测 PRKAG2-AS1 对 SOD 表达的影响。机体内存在多种抗氧化酶系统,以维持细胞内 ROS 稳态。临床和实验研究等大量证据表明,ROS 直接诱导心肌细胞凋亡^[31-33]。超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 作为其中的重要一员,被认为是抵抗自由基积聚的第一道防线。SOD 由酶蛋白和金属辅助因子构成,根据所含金属辅助因子的不同,SOD 可以分为铜锌超氧化物歧化酶 (Copper/zinc Superoxide Dismu-

tase, SOD1), 锰超氧化物歧化酶(MnSOD/SOD2)及细胞外铜锌超氧化物歧化酶 SOD3 三种类型。SOD1 是细胞内的主要的 SOD, 主要位于细胞质中, 在线粒体外膜、细胞核、脂质体、过氧化物酶体中也有分布。SOD2 主要位于线粒体基质中, 在维持线粒体功能起重要作用, 敲除 SOD2 将导致新生小鼠致死性表型。SOD3 主要定位在细胞外基质和细胞表面, 少部分分布在血浆及胞外液^[34,35]。在本研究中, 敲低细胞质中 PRKAG2-AS1 能够下调 SOD1 表达, 上调 SOD2、SOD3 表达, 而敲低细胞核内 PRKAG2-AS1 下调 SOD1 及 SOD3 表达, 但对 SOD2 表达水平无明显影响。提示 PRKAG2-AS1 可能通过调节 SOD 表达水平, 参与调控心肌细胞凋亡。同时, 这一结果也提示胞核和胞质中的 PRKAG2-AS1 可能通过不同的机制影响 SOD 的表达水平。我们进一步使用 Western blot 检测敲低 PRKAG2-AS1 表达对 AMPK γ 2 亚基蛋白表达水平的影响, 结果发现敲低细胞中的 PRKAG2-AS1 表达可导致 AMPK γ 2 亚基的蛋白表达水平降低, 提示 PRKAG2-AS1 可能通过 AMPK 途径调控心肌细胞凋亡。

综上, PRKAG2-AS1 可能通过 AMPK 途径, 调节 SOD 表达, 参与调控心肌细胞凋亡, 此外, 胞核胞质中的 PRKAG2-AS1 可能具有不同的生物学功能。这一研究发现将有助于进一步了解心肌缺血过程中细胞凋亡异常的病理生理过程。

参考文献(References)

- [1] Salt IP, Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase: An Ubiquitous Signaling Pathway With Key Roles in the Cardiovascular System[J]. Circ Res, 2017, 120(11): 1825-1841
- [2] Porto AG, Brun F, Severini GM, et al. Clinical Spectrum of PRKAG2 Syndrome[J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2016, 9(1): e003121
- [3] Cerase A, Pintacuda G, Tattermusch A, et al. Xist localization and function: new insights from multiple levels [J]. Genome Biol, 2015, 16: 166
- [4] Latos PA, Pauler FM, Koerner MV, et al. Airn transcriptional overlap, but not its lncRNA products, induces imprinted Igf2r silencing [J]. Science, 2012, 338(6113): 1469-1472
- [5] Anderson KM, Anderson DM, McAnally JR, et al. Transcription of the non-coding RNA upperhand controls Hand2 expression and heart development[J]. Nature, 2016, 539(7629): 433-436
- [6] Engreitz JM, Haines JE, Perez EM, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing [J]. Nature, 2016, 539(7629): 452-455
- [7] Archer K, Broskova Z, Bayoumi AS, et al. Long Non-Coding RNAs as Master Regulators in Cardiovascular Diseases[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10): 23651-23667
- [8] Zungu-Edmondson M, Suzuki YJ. Differential stress response mechanisms in right and left ventricles [J]. J Rare Dis Res Treat, 2016, 1(2): 39-45
- [9] Zhu J, Yao K, Wang Q, et al. Ischemic Postconditioning-Regulated miR-499 Protects the Rat Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis through PDCD4 [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(6): 2364-2380
- [10] Jose Corbalan J, Vatner DE, Vatner SF. Myocardial apoptosis in heart disease: does the emperor have clothes?[J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(3): 31
- [11] Carling D. AMPK signalling in health and disease[J]. Curr Opin Cell Biol, 2017, 45: 31-37
- [12] Hardie DG. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis[J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 33: 1-7
- [13] Pinter K, Jefferson A, Czibik G, et al. Subunit composition of AMPK trimers present in the cytokinetic apparatus: Implications for drug target identification[J]. Cell Cycle, 2012, 11(5): 917-921
- [14] Ding Y, Zou MH. AMP-Activated Protein Kinase gamma2 to the Rescue in Ischemic Heart[J]. Circ Res, 2017, 121(10): 1113-1115
- [15] Ben Jehuda R, Eisen B, Shemer Y, et al. CRISPR correction of the PRKAG2 gene mutation in the patient's induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes eliminates electrophysiological and structural abnormalities[J]. Heart Rhythm, 2018, 15(2): 267-276
- [16] Yavari A, Bellahcene M, Bucchi A, et al. Mammalian gamma2 AMPK regulates intrinsic heart rate [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1258
- [17] Banankhah P, Fishbein GA, Dota A, et al. Cardiac manifestations of PRKAG2 mutation[J]. BMC Med Genet, 2018, 19(1): 1
- [18] Xu Y, Gray A, Hardie DG, et al. A novel, de novo mutation in the PRKAG2 gene: infantile-onset phenotype and the signaling pathway involved [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313 (2): H283-h292
- [19] Epicoco G, Ali H, Lupo P, et al. An Unusual Pattern of Ventricular Pre-Excitation: Electrophysiological and Genetic Substrate [J]. JACC Clin Electrophysiol, 2018, 4(10): 1377-1378
- [20] Miyamoto L. Molecular Pathogenesis of Familial Wolff-Parkinson-White Syndrome[J]. J Med Invest, 2018, 65(1.2): 1-8
- [21] Yavari A, Sarma D, Sternick EB. Human gamma2-AMPK Mutations [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1732: 581-619
- [22] Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells[J]. Nature, 2012, 489(7414): 101-108
- [23] St Laurent G, Wahlestedt C, Kapranov P. The Landscape of long non-coding RNA classification[J]. Trends Genet, 2015, 31(5): 239-251
- [24] Zhao Y, Li H, Fang S, et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D203-208
- [25] Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs[J]. Cell, 2018, 172(3): 393-407
- [26] Hu YW, Yang JY, Ma X, et al. A lincRNA-DYNLRB2-2/GPR119/GLP-1R/ABCA1-dependent signal transduction pathway is essential for the regulation of cholesterol homeostasis[J]. J Lipid Res, 2014, 55 (4): 681-697
- [27] Hu YW, Zhao JY, Li SF, et al. RP5-833A20.1/miR-382-5p/NFIA-dependent signal transduction pathway contributes to the regulation of cholesterol homeostasis and inflammatory reaction [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(1): 87-101
- [28] Han P, Li W, Lin CH, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy[J]. Nature, 2014, 514(7520): 102-106
- [29] Dangwal S, Schimmel K, Foinquinos A, et al. Noncoding RNAs in Heart Failure[J]. Handb Exp Pharmacol, 2017, 243: 423-445
- [30] Kurian L, Aguirre A, Sancho-Martinez I, et al. Identification of novel long noncoding RNAs underlying vertebrate cardiovascular development[J]. Circulation, 2015, 131(14): 1278-1290 (下转第 677 页)

- and Hormone Receptor Expression[J]. Breast cancer : basic and clinical research, 2019, 13(1178223419830982)
- [7] Aslan H, Pourbagher A. Breast Involvement by Hematologic Malignancies: Ultrasound and Elastography Findings with Clinical Outcomes [J]. Journal of clinical imaging science, 2017, 7(42)
- [8] Wienbeck S, Meyer H J, Uhlig J, et al. Radiological imaging characteristics of intramammary hematological malignancies: results from a german multicenter study[J]. Scientific reports, 2017, 7(1): 7435
- [9] Sandner A S, Weggel R, Mehraein Y, et al. Frequency of hematologic and solid malignancies in the family history of 50 patients with acute myeloid leukemia - a single center analysis[J]. PloS one, 2019, 14(4): e0215453
- [10] Jabagi M J, Vey N, Goncalves A, et al. Evaluation of the Incidence of Hematologic Malignant Neoplasms Among Breast Cancer Survivors in France[J]. JAMA network open, 2019, 2(1): e187147
- [11] Alsadi A, Lin D, Alnajjar H, et al. Hematologic Malignancies Discovered on Investigation of Breast Abnormalities [J]. Southern medical journal, 2017, 110(10): 614-620
- [12] Cheah C Y, Campbell B A, Seymour J F. Primary breast lymphoma [J]. Cancer treatment reviews, 2014, 40(8): 900-908
- [13] Candelaria M, Onate-Ocana L F, Corona-Herrera J, et al. Clinical Characteristics of Primary Extranodal Versus Nodal Diffuse Large B-cell Lymphoma: a Retrospective Cohort Study in a Cancer Center [J]. Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion, 2019, 71(5): 349-358
- [14] Shaikh M S, Kayani N. Aleukemic Myeloid Sarcoma of the Breast[J]. Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP, 2015, 25 Suppl 2(S122-3)
- [15] Barth P, Castillo J J, Olszewski A J. Outcomes of secondary solid tumor malignancies among patients with myeloma: A population-based study[J]. Cancer, 2019, 125(4): 550-558
- [16] Le D K, Metter D, Krause J R. Plasmablastic plasmacytoma of the breast[J]. Proceedings (Baylor University Medical Center), 2017, 30(2): 203-204
- [17] Wohlgenuth F B, Brasil M B Q, D'acampora A J. Risk of breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma in patients submitted to breast implantation: A systematic review [J]. The breast journal, 2019, 25(5): 932-937
- [18] Clemens M W, Medeiros L J, Butler C E, et al. Complete Surgical Excision Is Essential for the Management of Patients With Breast Implant-Associated Anaplastic Large-Cell Lymphoma [J]. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2016, 34(2): 160-168
- [19] Ebner P J, Liu A, Gould D J, et al. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma, a systematic review and in-depth evaluation of the current understanding [J]. Journal of surgical oncology, 2019, 120(4): 573-577
- [20] Jennings W C, Baker R S, Murray S S, et al. Primary breast lymphoma: the role of mastectomy and the importance of lymph node status [J]. Annals of surgery, 2007, 245(5): 784-789
- [21] Wiseman C, Liao K T. Primary lymphoma of the breast [J]. Cancer, 1972, 29(6): 1705-1712
- [22] Hugh J C, Jackson F I, Hanson J, et al. Primary breast lymphoma. An immunohistologic study of 20 new cases [J]. Cancer, 1990, 66(12): 2602-2611
- [23] Duman B B, Sahin B, Guvenc B, et al. Lymphoma of the breast in a male patient [J]. Medical oncology (Northwood, London, England), 2011, 28 Suppl 1(S490-3)
- [24] Topalovski M, Crisan D, Mattson J C. Lymphoma of the breast. A clinicopathologic study of primary and secondary cases [J]. Archives of pathology & laboratory medicine, 1999, 123(12): 1208-1218
- [25] Hoang J T, Yang R, Shah Z A, et al. Clinico-radiologic features and management of hematological tumors in the breast: a case series[J]. Breast cancer (Tokyo, Japan), 2019, 26(2): 244-248
- [26] Nicholson B T, Bhatti R M, Glassman L. Extranodal Lymphoma of the Breast [J]. Radiologic clinics of North America, 2016, 54(4): 711-726
- [27] Surov A, Holzhausen H J, Wienke A, et al. Primary and secondary breast lymphoma: prevalence, clinical signs and radiological features [J]. The British journal of radiology, 2012, 85(1014): e195-205
- [28] Ludmir E B, Milgrom S A, Pinnix C C, et al. Primary breast diffuse large B-cell lymphoma: treatment strategies and patterns of failure<sup>/> [J]. Leukemia & lymphoma, 2018, 59(12): 2896-2903
- [29] Bicchierai G, Rigacci L, Miele V, et al. Role of core needle biopsy in primary breast lymphoma [J]. La Radiologia medica, 2017, 122(9): 651-655
- [30] Liu P P, Wang K F, Jin J T, et al. Role of radiation therapy in primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the Rituximab era: a SEER database analysis [J]. Cancer medicine, 2018, 7(5): 1845-1851

(上接第 613 页)

- [31] van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future [J]. Eur J Heart Fail, 2019, 21(4): 425-435
- [32] Kiyuna LA, Albuquerque RPE, Chen CH, et al. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 129: 155-168
- [33] Moris D, Spartalis M, Tzatzaki E, et al. The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation [J]. Ann Transl Med, 2017, 5(16): 324
- [34] Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights [J]. FEBS Lett, 2012, 586(5): 585-595
- [35] Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(6): 1583-1606