

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.22.004

LncRNA SNHG1 通过 miR-361-3p/Nfat5 信号通路 对阿尔茨海默病细胞模型损伤的影响*

刘丽丹 徐佳骏 刘文萍 李达丽 彭颜晖[△]

(新疆医科大学第六附属医院神经内科 新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要 目的:探讨 LncRNA SNHG1 表达对 AD 细胞损伤模型的影响,并研究其作用与 miR-361-3p/Nfat5 通路的关系。**方法:**建立 AD 细胞模型。向 SH-SY5Y 细胞转入 SNHG1-shRNA 以减低 SNHG1 表达,转入 miR-361-3p-mimic 以过表达 miR-361-3p。检测 SNHG1 和 miR-361 表达水平、细胞凋亡、蛋白表达水平,并验证 miR-361-3p 与 SNHG1 结合。**结果:**与空白对照组相比,AD 模型组细胞 miR-361-3p 表达水平降低,而 SNHG1 表达水平升高,细胞凋亡率升高($P<0.05$)。敲低 SNHG1 表达降低可降低细胞凋亡率($P<0.05$)。过表达 miR-361-3p 降低 SNHG1 表达水平。AD 模型组细胞 Nfat5 和 p-Tau 蛋白表达均升高,而 Nestin 蛋白表达降低($P<0.05$);敲低 SNHG1 降低 AD 细胞模型中 Nfat5 和 p-Tau 蛋白表达水平,提高 Nestin 蛋白表达水平。**结论:**敲低 SNHG1 可降低 A β 25-35 蛋白诱导的 AD 细胞模型损伤,其机制与激活 miR-361-3p/Nfat5 通路有关。

关键词:LncRNA SNHG1;miR-361-3p;阿尔茨海默症;凋亡

中图分类号:R-33;R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)22-4221-03

Effect of LncRNA SNHG1 on the Damage of Alzheimer's Disease Cell Models through the miR-361-3p/Nfat5 Signaling Pathway*

LIU Li-dan, XU Jia-jun, LIU Wen-ping, LI Da-li, PENG Yan-hui[△]

(Department of Neurology, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of LncRNA SNHG1 expression on AD cell damage model, and to study its relationship with miR-361-3p/Nfat5 pathway. **Methods:** Establish an AD cell model. To SH-SY 5 Y cells to SNHG 1-shRNA to reduce SNHG 1 expression and to miR-361-3p-mimic to overexpress miR-361-3p. The expression levels of SNHG 1 and miR-361, apoptosis, and protein expression were examined, and miR-361-3p was bound to SNHG 1. **Results:** Compared with the blank control group, the AD model group showed decreased miR-361-3p expression, but increased SNHG 1 expression and increased apoptosis rate ($P<0.05$). Knockdown of reduced SNHG 1 expression decreased the apoptosis rate ($P<0.05$). Overexpression of miR-361-3p reduces the level of SNHG 1 expression. In the AD model group, Nfat 5 and p-Tau were increased, while Nestin protein decreased ($P<0.05$); knockdown of SNHG 1 decreased the expression of Nfat 5 and p-Tau and increased the Nestin protein expression. **Conclusion:** Knockdown of SNHG1 can reduce the damage induced by A β 25-35 protein in AD cell models, and the mechanism is related to the activation of miR-361-3p/Nfat5 pathway.

Key words: LncRNA SNHG1; miR-361-3p; Alzheimer's disease; Apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)22-4221-03

前言

阿尔茨海默病(AD)主要影响老年人,其特点是大脑内形成异常结构,这些变化逐渐导致大脑神经元死亡和功能丧失^[1]。然而目前阿尔茨海默症发病机制不清楚。因此探索该疾病的机制是目前急需解决的问题。LncRNA 可调整多种基因表达,在各种生物学活动中发挥重要作用,与阿尔茨海默症、帕金森病以及癫痫病等多种神经退行性疾病的发生发展有关^[2]。LncRNA SNHG1(SNHG1)被发现在多种神经系统疾病中异常表

达^[3],并且靶基因预测 SNHG1 与 miR-361-3p 存在结合位点^[4],而血清 miR-361-3p 水平与帕金森进行严重程度有关^[5]。然而,SNHG1 和 miR-361-3p 对阿尔茨海默症疾病发生发展的作用未知。因此,本研究使用体外构建的阿尔茨海默症细胞损伤模型以探讨 SNHG1 和 miR-361-3p 的表达及其影响。

1 材料与方法

1.1 细胞分组与模型制备

SH-SY5Y 细胞根据不同处理方式分为以下 8 组,即空白

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C456)

作者简介:刘丽丹(1985-),女,硕士研究生,副主任医师,研究方向:神经系统退行性疾病,E-mail:liu1319lid@163.com

[△] 通讯作者:彭颜晖(1962-),女,本科,主任医师,研究方向:脑血管病,E-mail:xjpengyanhui@sina.cn

(收稿日期:2024-05-18 接受日期:2024-06-12)

对照组 (Blank)、AD model 组 AD model + NC 组、AD model + SNHG1-shRNA 组、SNHG1-WT+mimics NC 组、SNHG1-WT+miR-361-3p-mimics 组、SNHG1-MUT+mimics NC 组和 SNHG1-MUT+ miR-361-3p-mimics 组。空白对照组细胞不进行任何处理培养 24 小时;AD model 组细胞加入 5 μmol/L 的 Aβ25-35 蛋白孵育 24 小时;AD model + NC 组和 AD model + SNHG1-shRNA 组细胞分别在转入阴性对照 shRNA 和 SNHG1-shRNA72 小时后加入 5 μmol/L 的 Aβ25-35 蛋白孵育 24 小时;SNHG1-WT+mimics NC 组、SNHG1-WT+miR-361-3p-mimics 组、SNHG1-MUT+mimics NC 组和 SNHG1-MUT+ miR-361-3p-mimics 组细胞分别转入 SNHG1-WT 序列^[6]和阴性对照 mimics、SNHG1-WT 序列和 miR-361-3p-mimics、SNHG1-MUT 序列^[6]和阴性对照 mimics、SNHG1-MUT 序列和 miR-361-3p-mimics 后 48 小时收集细胞。

1.2 荧光定量 PCR 检测 miR-361-3p 和 SNHG1 表达

配置荧光定量 PCR 反应体系,使用荧光定量 PCR 仪检测 miR-361-3p 和 SNHG1 表达的 CT 值, 根据 2^{-ΔΔCt} 方法计算

miR-361-3p 和 SNHG1 相对表达水平。

1.3 流式细胞仪分析细胞凋亡

各组 SH-SY5Y 细胞经不同方式处理后收集细胞,预冷、洗涤、重悬细胞,加入染液,混匀后室温孵育 15 min。加入 PBS 使总体积达到 0.4 mL 后使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.4 细胞 Nfat5、Nestin、Tau 和 p-Tau 蛋白水平检测

各组细胞经不同方式处理后收集细胞,提取细胞总蛋白,并使用 BCA 试剂盒检测细胞总蛋白浓度。最后使用蛋白免疫印迹法检测 Nfat5、Nestin、Tau 和 p-Tau 蛋白水平。

1.5 统计学分析方法

SPSS 软件(23.0)分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,使用单因素方差分析比较多组间计量资料差异,Duncan 检验计算两组间 P 值,P<0.05 表示差异显著具有统计学意义。

2 结果

2.1 比较 4 组细胞中 miR-361-3p 和 SNHG1 表达

四组间 miR-361-3p、SNHG1 表达表达有差异(P<0.05)。表 1。

表 1 各组 miR-361-3p 和 SNHG1 表达水平($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Expression levels of miR-361-3p and SNHG1 in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	miR-361-3p	SNHG1
Blank group	5	1.00± 0.12	1.00± 0.09
AD model group	5	0.48± 0.10 [△]	1.77± 0.21 [△]
AD model + NC group	5	0.49± 0.06 [△]	1.74± 0.05 [△]
AD model + SNHG1-shRNA group	5	0.96± 0.09 ^{△▽}	1.21± 0.13 ^{△▽}
F	-	26.524	19.325
P	-	<0.001	<0.001

Note: [△] Compared with control group, P<0.05; [▲] Compared with AD model group, P<0.05;

[▽] Compared with AD model + NC group, P<0.05. the same below.

2.2 比较 4 组细胞细胞凋亡率

四组间细胞活性比较有差异(P<0.05)。表 2。

表 2 各组细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of cell apoptosis ratio between groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Relative activity of cells
Blank group	5	3.75± 0.70
AD model group	5	16.29± 0.89 [△]
AD model + NC group	5	16.48± 0.93 [△]
AD model + SNHG1-shRNA group	5	9.55± 0.94 ^{△▽}
F	-	147.275
P	-	<0.001

2.3 miR-361-3p 对 SNHG1 表达的影响

四组间细胞荧光虫荧光强度、海参荧光强度、荧光虫荧光与海参荧光比值比较有差异(P<0.05)。表 3。

2.4 各组蛋白表达比较

四组间 Nfat5、Nestin、p-Tau 蛋白比较有差异(P>0.05)。表 4。

3 讨论

LncRNA 在剂量补偿效应、表观遗传调控等生命活动中具有重要作用,是当前 AD 和帕金森病等神经退行性疾病的研究热点^[7]。本研究表明,在 Aβ 蛋白诱导的 SH-SY5Y 细胞的 AD 细胞损伤模型中 SNHG1 表达升高,而 miR-361-3p 表达降低,并且细胞凋亡率升高;而敲低 SNHG1 可降低 Aβ 蛋白诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡和增高细胞活性,这表明敲低 SNHG1 减轻 Aβ 蛋白诱导的 AD 神经细胞损伤。众所周知,SH-SY5Y 细胞

表 3 各组双荧光素酶活性比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of dual luciferase activity in each groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Firefly	Renilla	Firefly/Renilla
SNHG1-WT+mimics NC	3	12697.13± 643.78	2463.98± 175.53	5.18± 0.38
SNHG1-WT+ miR-361-3p-mimics	3	9029.98± 1047.32 ^a	3273.56± 391.02 ^a	2.79± 0.45 ^a
SNHG1-MUT+mimics NC	3	13071.83± 1296.51 [▲]	2698.96± 167.35 [▲]	4.83± 0.49 [▲]
SNHG1-MUT+ miR-361-3p-mimics	3	13430.66± 705.5 [▲]	2750.14± 144.03 [▲]	4.90 ± 0.51 [▲]
F	-	26.261	22.327	17.290
P	-	<0.001	<0.001	<0.001

表 4 各组双荧光素酶活性比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of dual luciferase activity in each groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Nfat5	Nestin	Tau	p-Tau
Blank group	3	0.27± 0.03	0.75± 0.03	0.85± 0.04	0.28± 0.02
AD model group	3	0.45± 0.02 ^a	0.39± 0.07 ^a	0.84± 0.06	0.65± 0.03 ^a
AD model + NC group	3	0.45± 0.01 ^a	0.38± 0.04 ^a	0.84± 0.04	0.63± 0.07 ^a
AD model + SNHG1-shRNA group	3	0.38± 0.011 ^{a ▲▽}	0.56± 0.05 ^{a ▲▽}	0.85± 0.03	0.44± 0.03 ^{a ▲▽}
F	-	22.315	24.892	0.628	33.219
P	-	<0.001	<0.001	0.537	<0.001

具有表达 GABA 受体、谷氨酸受体等功能的亚型,并参与了多种神经递质的合成与释放^[8]。Aβ 蛋白沉积通过诱导神经细胞损伤而在 AD 疾病发生中发挥重要作用,所以在体外使用 Aβ 蛋白诱导的神经细胞损伤是常用的 AD 细胞模型^[9]。SNHG1 的表达失调促进了帕金森神经炎症的发生,其机制与 miRNA 竞争内源 RNA 而促进 NLRP3 表达有关。同时,SNHG1 也可以通过调节下游基因表达而影响脓毒症神经损伤。同样的,miR-361-3p 也被发现与神经退行性疾病的发生发展有关^[10]。

本文发现 miR-361-3p 与 SNHG1 存在结合的序列,并且 miR-361-3p 过表达抑制 SNHG1 的表达,这与之前的研究结果一致。马文彪等人^[6] 乳腺癌细胞中研究发现,SNHG1 通过与 miR-361-3p 结合而降低 miR-361-3p 与 MMP-1 的结合,进而促进乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力。此外,在神经细胞中,Liu L 等人^[11]研究也发现,SNHG1 与 miR-361-3p 而降低 miR-361-3p 的表达,进而参与调控 Aβ1-42 原纤维输注大鼠海马引起的认知功能障碍和海马区神经炎症。由此可以看出,SNHG1 在 Aβ 蛋白诱导的 AD 神经损伤模型中发挥促进作用,其机制与抑制 miR-361-3p 的表达有关。此外,本研究还发现,Aβ 蛋白诱导神经细胞中 Nfat5 和 p-Tau 蛋白表达均升高和 Nestin 蛋白表达降低,而敲低 SNHG1 可降低 Aβ 蛋白在 AD 神经损伤模型中对蛋白表达的影响。Nfat5 可通过与 NF-κB 的结合而进一步控制免疫抑制巨噬细胞的糖酵解基因表达和降低促炎细胞因子的表达,在海马区神经细胞中发挥促炎基因的作用^[12]。Nestin 对神经分化具有重要调控作用。Nestin 仅在胚胎发育早期的神经上皮表达,所以通过检测 Nestin 蛋白表达水平可用于指征神经细胞活性^[13]。AD 患者脑中 Tau 蛋白总量较正常人多,且异常过度磷酸化 Tau 蛋白表达增加,导致 AD 患者脑中受累神经元

微管结构遭到广泛破坏,正常轴突转运收到损伤,造成突触丢失神经元功能损伤,进而引发脑神经退行性病变^[14]。

综上所述,在 Aβ 蛋白诱导的 AD 神经细胞损伤模型中 SNHG1 表达升高,而 miR-361-3p 表达降低,敲低 SNHG1 可通过降低其与 miR-361-3p 的结合而间接促进 miR-361-3p 的表达,进而抑制其靶基因 Nfat5 的表达,最终减弱 Aβ 蛋白诱导的 AD 神经细胞损伤。

参 考 文 献(References)

- [1] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [2] Balusu S, Horré K, Thrupp N, et al. MEG3 activates necroptosis in human neuron xenografts modeling Alzheimer's disease [J]. Science, 2023, 381(6663): 1176-1182.
- [3] 张辉芳,李富强,白银雪,等. LncRNA SNHG1 通过吸附 miR-326 调控帕金森病发生,发展的作用机制[J].中国老年学杂志, 2021, 41(24): 5682-5687.
- [4] Li X, Zheng H. LncRNA SNHG1 influences cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the miR-361-3p/FRAT1 axis [J]. Thorac Cancer, 2020, 11(2): 295-304.
- [5] 王晓宇,楼滢,温良,等. 老年帕金森病患者血浆 miR-361-3p, miR-626 表达与病情严重程度的相关性 [J]. 浙江实用医学, 2022, 27(5): 396-398.
- [6] 马文彪,夏蕾,石博,等. SNHG1/miR-361-3p/MMP-1 轴调控乳腺癌细胞迁移和侵袭的机制[J]. 解剖学研究, 2020, 42(6): 520-523, 528.
- [7] Zhou L, Huang X, Li H, et al. Triptolide improves Alzheimer's disease by regulating the NF-κB signaling pathway through the lncRNA NEAT1/microRNA 361-3p/TRAF2 axis [J]. Exp Ther Med, 2023, 26(3): 440.

线净收益率大于0,超过了两条无效线,表明该模型具有较好的应用效果。

综上所述,老年 T2DM 患者发生 MC 与年龄、病程、FPG、HbA1c、HDL-C、LDL-C 密切相关,通过上述指标构建的列线图预测模型,可以辅助预测老年 T2DM 患者发生 MC 的风险,有助于临床早期干预和治疗。

参考文献(References)

- [1] Tinajero MG, Malik VS. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2021, 50(3): 337-355.
- [2] 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南编写组, 中国老年医学学会老年内分泌代谢分会, 中国老年保健医学研究会老年内分泌与代谢分会, 等. 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南(2022 年版)[J]. *中华内科杂志*, 2022, 61(1): 12-50.
- [3] 张子月, 王璋, 钟大鹏. 125 例老年 2 型糖尿病患者慢性血管并发症的危险因素分析[J]. *贵州医科大学学报*, 2023, 48(2): 177-181, 187.
- [4] 李艳杰, 倪青. 2 型糖尿病脑微血管并发症的研究现状 [J]. *河北医药*, 2023, 45(1): 131-135.
- [5] 雷庆华, 李军华, 霍燕飞, 等. 列线图预测中国老年人 2 型糖尿病患病风险[J]. *科学技术与工程*, 2023, 23(13): 5493-5499.
- [6] 孟娇, 梁赞, 陈飞, 等. 2 型糖尿病患者皮肤和血清晚期糖基化终产物与代谢指标及微血管并发症的关系 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2023, 31(4): 274-278.
- [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2021, 37(4): 311-398.
- [8] Faselis C, Katsimardou A, Imprialos K, et al. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2020, 18(2): 117-124.
- [9] 何楚婕, 陈家隆, 陈巧, 等. 2 型糖尿病住院患者心脏自主神经病变的影响因素及对夜间 AH 和夜间 VA 的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2023, 23(14): 2672-2676.
- [10] 孙文宇, 乔晶, 孟敏敏, 等. 甘油三酯葡萄糖指数与 2 型糖尿病胰岛素抵抗及血管并发症的相关性 [J]. *临床内科杂志*, 2023, 40(10): 681-685.
- [11] Batista TM, Haider N, Kahn CR. Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2021, 64 (5): 994-1006.
- [12] Asghar S, Asghar S, Shahid S, et al. Metabolic Syndrome in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: Prevalence, Risk Factors, and Associated Microvascular Complications[J]. *Cureus*, 2023, 15(5): e39076.
- [13] 马鸣飞, 马杉杉, 刘燕, 等. 2 型糖尿病患者代谢指标达标情况和微血管并发症患病情况及后者的影响因素分析 [J]. *中国医药*, 2023, 18(2): 224-227.

(上接第 4223 页)

- [8] Ioghen OC, Ceafalan LC, Popescu BO. SH-SY5Y Cell Line In Vitro Models for Parkinson Disease Research-Old Practice for New Trends [J]. *J Integr Neurosci*, 2023, 22(1): 20.
- [9] Jucker M, Walker LC. Alzheimer's disease: From immunotherapy to immunoprevention[J]. *Cell*, 2023, 186(20): 4260-4270.
- [10] Dong J, Fu T, Yang Y, et al. Long Noncoding RNA SNHG1 Promotes Lipopolysaccharide-Induced Activation and Inflammation in Microglia via Targeting miR-181b [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2021, 28(4): 255-265.
- [11] Liu L, Peng Y, Liu W, et al. GATA-binding protein 4 promotes neuroinflammation and cognitive impairment in A β 1-42 fibril-infused rats through small nucleolar RNA host gene 1/miR-361-3p axis [J]. *Chin J Physiol*, 2023, 66(1): 14-20.
- [12] Lee JH, Kim JW, Im YS, et al. Cyclosporine A induces nerve growth factor expression via activation of MAPK p38 and NFAT5[J]. *Cornea*, 2011, 30 Suppl 1: S19-24.
- [13] Wang J, Lai X, Yao S, et al. Nestin promotes pulmonary fibrosis via facilitating recycling of TGF- β receptor I [J]. *Eur Respir J*, 2022, 59 (5): 2003721.
- [14] Jia J, Ning Y, Chen M, et al. Biomarker Changes during 20 Years Preceding Alzheimer's Disease [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390 (8): 712-722.