·论著·

lncRNA NRON通过调节TGF-β/Smad信号通路诱导心肌梗死小鼠心肌纤维化

杨超[1,2]，苏涛[1]，贾迪[1]，林岩[3]，程昊[4]，张奇[5]，梁晶[6]，张春晶[1,2]
（1. 齐齐哈尔医学院医学技术学院生物化学教研室，黑龙江 齐齐哈尔 161006；2. 齐齐哈尔医药科学研究所博士后科研工作站，黑龙江 齐齐哈尔 161006；3. 齐齐哈尔医学院基础医学院病理生理学教研室，黑龙江 齐齐哈尔 161006；4. 齐齐哈尔医学院医院管理处卫生所，黑龙江 齐齐哈尔 161006；5. 齐齐哈尔医学院药学院临床药理学教研室，黑龙江 齐齐哈尔 161006；6. 哈尔滨医科大学附属第四医院临床药学科，哈尔滨 150001）

摘要 **目的** 探讨长链非编码RNA（lncRNA）NRON对心肌梗死（MI）小鼠心肌纤维化的影响及作用机制。**方法** 将32只C57BL/6小鼠随机分成Sham组、MI组、MI+shNRON组和MI+NC组，每组8只。采用实时定量PCR检测小鼠心肌组织中lncRNA NRON的表达水平；HE染色、Masson染色、免疫组织化学检测小鼠心肌病理损伤程度和心肌纤维化程度，胶原蛋白Ⅰ（colⅠ）的表达水平；Western blotting检测小鼠心肌组织中转化生长因子β1（TGF-β1）、磷酸化的Smad2（p-Smad2）、磷酸化的Smad3（p-Smad3）蛋白表达水平。**结果** 与Sham组相比，MI组NRON的表达增加，心肌病理损伤程度、心肌纤维化程度加重，colⅠ的表达增加，TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3蛋白表达增加；与MI组相比，MI+shNRON组NRON的表达下降，心肌病理损伤程度、心肌纤维化程度减轻，colⅠ的表达下降，TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3蛋白表达下降。**结论** lncRNA NRON下调可减轻MI小鼠心肌病理损伤，抑制心肌纤维化，其分子机制可能与抑制TGF-β/Smad信号通路有关。

关键词 长链非编码RNA；NRON；TGF-β/Smad；心肌梗死；心肌纤维化
中图分类号 R542.2 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646（2025）10-0926-05
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20251014.1640.008
DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2025.10.011

lncRNA NRON induces myocardial fibrosis in mice with myocardial infarction by regulating the TGF-β/Smad signaling pathway

YANG Chao[1,2], SU Tao[1], JIA Di[1], LIN Yan[3], CHENG Hao[4], ZHANG Qi[5], LIANG Jing[6], ZHANG Chunjing[1,2]
(1. Department of Biochemistry, School of Medical Technology, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China; 2. Postdoctoral Research Station, Qiqihar Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Qiqihar 161006, China; 3. Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China; 4. Department of Clinics, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China; 5. Department of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China; 6. Department of Pharmacy, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract **Objective** To investigate the effect and mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) NRON on myocardial fibrosis in mice with myocardial infarction (MI). **Methods** Thirty-two C57/BL6 mice were randomly assigned to a Sham group, MI group, MI+shNRON group or MI+NC group, with eight mice in each group. The expression level of lncRNA NRON in myocardial tissue of mice was detected by real-time quantitative PCR. Hematoxylin and eosin staining, Masson's trichrome staining, and immunohistochemistry were used to detect the degree of myocardial injury, myocardial fibrosis, and the expression level of collagen Type Ⅰ (colⅠ). Western blotting was used to detect the protein expression levels of TGF-β1, p-Smad2, and p-Smad3 in myocardial tissue of the mice. **Results** Compared with the Sham group, the expression of NRON, colⅠ, TGF-β1, p-Smad2, and p-Smad3 proteins were increased in the MI group. Compared with the MI group, the expression of NRON, the degree of myocardial damage and fibrosis, the expression of colⅠ, TGF-β1, p-Smad2, and p-Smad3 proteins were decreased in the MI+shNRON group. **Conclusion** Down-regulation of lncRNA NRON can alleviate myocardial injury and inhibit myocardial fibrosis in mice with MI, and the molecular mechanism may be related to inhibition of the TGF-β/Smad signaling pathway.

Keywords long non-coding RNA; NRON; TGF-β/Smad; myocardial infarction; myocardial fibrosis

基金项目：黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目（2023-KYYWF-0860）
作者简介：杨超（1986-），女，讲师，博士.
通信作者：张春晶，E-mail：cjzhang2005@163.com
收稿日期：2024-10-12
网络出版时间：2025-10-15 13:45:12

心肌梗死(myocardial infarction,MI)是心肌组织严重持续缺血引起的,其发病率与死亡率均较高[1-2]。心肌纤维化(myocardial fibrosis,MF)是MI后的主要病理改变,也是引起心室重塑进而诱发心力衰竭、心律失常甚至猝死的关键原因。因此,抑制MF是改善MI患者预后、治疗MI的重要手段之一[3]。研究[4]表明,多种信号通路参与MF的发生发展,其中,转化生长因子β(transforming growth factor-β,TGF-β)/Smad信号通路被认为是MF发生的关键通路。

长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)是一类转录本长度超过200 nt的功能性RNA分子,在MI、MF等多种心血管疾病中发挥重要调控作用[5]。LUO等[6]研究发现,lncRNA SAIL在MF中表达显著降低,过表达*SAIL*可减少心肌胶原沉积,减少纤维化相关基因的转录,抑制MF进程。ZHANG等[7]研究发现,lncRNA CFAR作为一种新的促纤维化因子,在心脏中通过调控miR-449a-5p/LOXL3/mTOR通路发挥促纤维化作用。研究[8]发现lncRNA NRON可结合抑制活化T细胞核因子NFAT进而抑制T细胞激活。本课题组前期研究[9]证实,NRON可通过与电压依赖性阴离子通道蛋白VDAC结合并抑制其表达,影响MI后细胞凋亡的发生,但NRON在MF中的作用尚不清楚。本研究拟探讨NRON对MI诱导MF的影响及可能的作用机制,以期为临床提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

C57BL/6J品系成年雄性小鼠32只,体重22~25 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司。小鼠在标准条件下饲养:室温20~25 ℃、湿度50%~60%、正常饮水饮食。本研究获得齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会批准。

1.2　动物分组及建模

将32只小鼠随机分成假手术(Sham)组、MI组、MI+敲减NRON(MI+shNRON)组和MI+阴性对照(MI+NC)组,每组8只。Sham组仅开胸不结扎,MI组制备MI模型,MI+shNRON组先向小鼠左心室内注射100 μL敲减NRON慢病毒[1×10^8 TU/mL,汉恒生物科技(上海)有限公司],再进行MI造模。MI+NC组先向小鼠左心室内注射阴性对照慢病毒,再进行MI造模。所有小鼠标准饲养28 d后处死,取出心脏组织用于后续实验。小鼠MI模型制备具体方法:将小鼠麻醉后固定,剃除小鼠胸部及腋下毛发,气管插管,连入呼吸机,于第3、4肋间打开胸腔充分暴露心脏,持针器持取7-0结扎线结扎冠状动脉左前降支,阻断血流。观察心电图出现ST段抬高,则表明结扎位置正确,MI模型建立成功。完成后关闭胸腔,逐层缝合肌肉及皮肤。

1.3　HE染色检测心肌组织病理损伤

小鼠心脏组织用生理盐水清洗,经4%多聚甲醛固定,石蜡包埋后,切成厚度为5 μm的切片,用HE染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)进行染色。在显微镜下观察心肌细胞结构及心肌组织病理损伤变化。

1.4　Masson染色检测心肌组织纤维化程度

小鼠心脏组织清洗后,浸泡在4%多聚甲醛中固定,然后经石蜡包埋,切片,脱蜡,Masson染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)染色后封片,在光学显微镜下观察蓝染心肌胶原纤维的分布及数量。

1.5　免疫组织化学染色检测心肌组织Ⅰ型胶原蛋白(collagenⅠ,colⅠ)的表达

小鼠心脏组织经清洗、固定、石蜡包埋、切片后,进行脱蜡水化,微波加热法进行抗原修复,山羊血清封闭后加入一抗colⅠ抗体(1 ∶ 500稀释,苏州博奥龙科技有限公司),4 ℃孵育过夜。次日加入生物素标记的二抗,37 ℃孵育20 min。滴加适量辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 ℃孵育20 min。二氨基联苯胺显色5 min,苏木素复染3 min后,脱水,封片,置于显微镜下观察切片。

1.6　实时定量PCR检测NRON的表达水平

取出小鼠心肌组织,用TRIzol法提取总RNA,用反转录试剂盒(日本TOYOBO公司)将总RNA逆转录成cDNA,并以cDNA为模板采用SYBR Green染料(瑞士Roche公司)法检测NRON的表达水平。反应条件为95 ℃ 3 min,95 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,45个循环。引物序列:NRON,正向,5'-CAAATCCAGTTGCAAGGACC-3',反向,5'-AGCTCAGTCCTAGGGTAGG-3';*β-actin*,正向,5'-CCACTGCCGCATCCTCTT-3',反向,5'-GGTCTTTACGGATGTCAACG-3';以*β-actin*为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量。

1.7　Western blotting

取小鼠心肌组织,加入RIPA裂解液(南京碧云

天生物技术有限公司）后离心，取上清，用BCA试剂盒（南京碧云天生物技术有限公司）测定蛋白浓度。制备SDS-PAGE凝胶，取等质量蛋白上样，电泳、转膜，用5%脱脂奶粉室温封闭2 h，分别加入一抗TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3（1 ∶ 1 000稀释，成都正能生物技术有限责任公司），4 ℃过夜，用PBST漂洗3次，加入二抗（1 ∶ 1 000稀释，成都正能生物技术有限责任公司），室温孵育1 h，ECL发光剂（北京索莱宝科技有限公司）显影，采用ImageJ软件分析蛋白灰度值。

1.8　统计学分析

应用GraphPad Prism7.0软件对数据进行分析，计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，2组间比较采用t检验，多组间比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

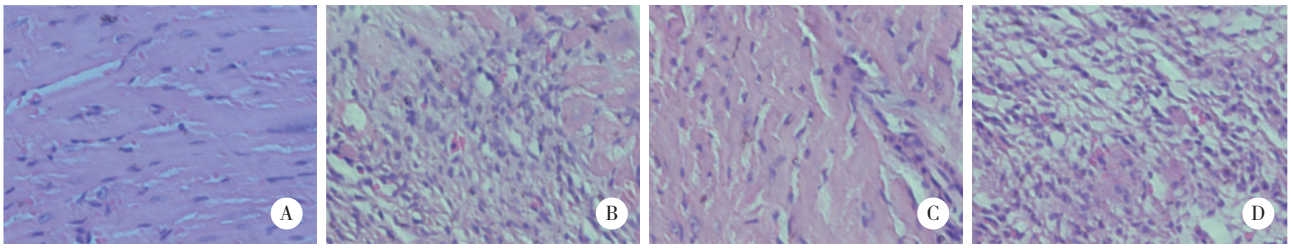
2　结果

2.1　各组NRON的表达水平比较

实时定量PCR结果显示，与Sham组（1.00 ± 0.38）相比，MI组NRON表达（2.16 ± 0.46）升高，与MI组相比，MI+shNRON组NRON表达（1.38 ± 0.33）下降，差异有统计学意义（均$P < 0.05$）。MI+NC组（2.08 ± 0.32）与MI组相比，NRON表达无统计学差异（$P > 0.05$）。

2.2　各组心肌组织病理学改变比较

HE染色结果显示，Sham组心肌组织排列整齐，未见炎症浸润现象；MI组心肌细胞排列紊乱，间质增多，炎症细胞浸润明显；MI+shNRON组心肌组织有显著恢复现象，少见炎症细胞浸润；MI+NC组与MI组相比并无改善，见图1。



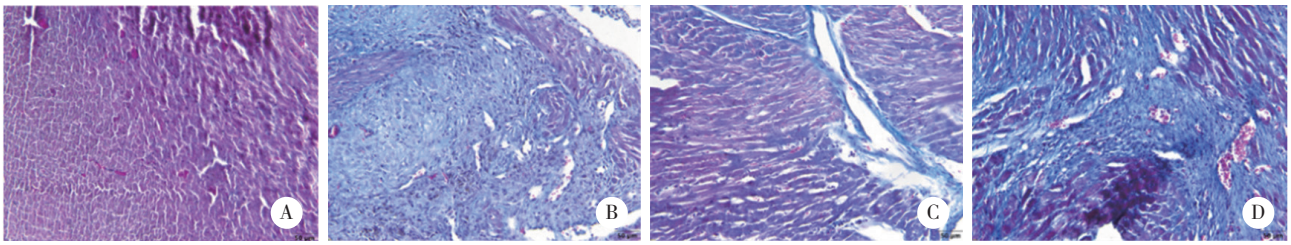
A，Sham group；B，MI group；C，MI+shNRON group；D，MI+NC group.

图1　各组心肌组织病理变化 ×200

Fig.1　Pathological changes of myocardial tissue in each group ×200

2.3　各组心肌组织纤维化程度比较

Masson染色结果显示，Sham组心肌组织几乎无纤维化现象；MI组胶原沉积明显，可见大量蓝染纤维，纤维化程度严重；MI+shNRON组纤维化程度减轻，只有少量胶原沉积现象；MI+NC组仍有严重纤维化现象，见图2。



A，Sham group；B，MI group；C，MI+shNRON group；D，MI+NC group.

图2　各组心肌组织纤维化程度 ×200

Fig.2　The degree of myocardial fibrosis in each group ×200

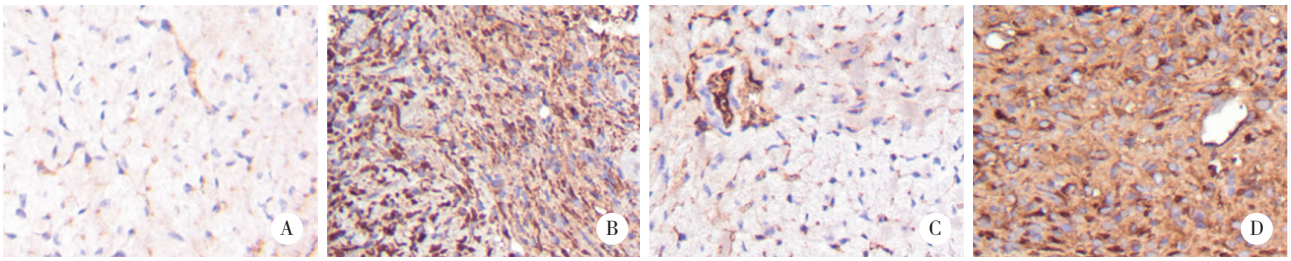
2.4　各组心肌组织col Ⅰ的表达水平比较

免疫组织化学检测结果显示，Sham组心肌组织col Ⅰ的表达极少；MI组可见大量棕黄色col Ⅰ的阳性染色，col Ⅰ表达显著升高；MI+shNRON组仅有少量

colⅠ阳性染色，colⅠ表达下降；MI+NC组colⅠ表达仍较高，见图3。

2.5　各组心肌组织TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3蛋白表达水平比较

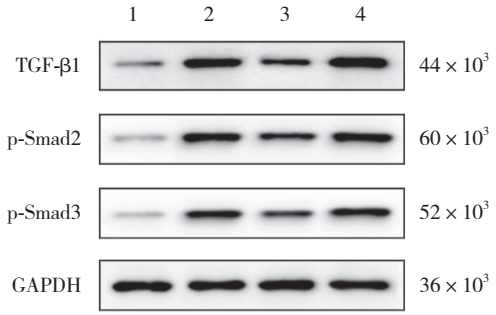
Western blotting结果显示，与Sham组（1.00 ± 0.00）相比，MI组TGF-β1（1.76 ± 0.17）、p-Smad2（1.91 ± 0.17）、p-Smad3（1.89 ± 0.05）蛋白的表达显著升高（$P < 0.05$）。与MI组相比，MI+shNRON组TGF-β1（1.24 ± 0.13）、p-Smad2（1.39 ± 0.09）、p-Smad3（1.54 ± 0.05）蛋白的表达显著下降（$P < 0.05$）。与MI组相比，MI+NC组TGF-β1（1.81 ± 0.40）、p-Smad2（1.98 ± 0.11）、p-Smad3（1.90 ± 0.09）蛋白的表达无统计学差异（$P > 0.05$），见图4。



A，Sham group；B，MI group；C，MI+shNRON group；D，MI+NC group.

图3　各组心肌组织colⅠ的表达水平　×200

Fig.3　The expression level of collagen Type Ⅰ in myocardial tissue of each group　×200



1，Sham group；2，MI group；3，MI+shNRON group；4，MI+NC group.

图4　各组心肌组织TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3蛋白表达水平

Fig.4　The protein expression levels of TGF-β1，p-Smad2，and p-Smad3 in myocardial tissue of each group

3　讨论

MI具有高致死率且发病迅速，可诱发心力衰竭甚至猝死。MF是MI后胶原过度沉积的结果，MI早期胶原的沉积可形成瘢痕组织从而防止心脏破裂，但过度沉积使心肌大范围纤维化，可引起心肌僵硬度增加，心肌收缩和舒张功能障碍，最终导致心力衰竭。抑制MF并减缓心室重构是治疗MI的重要策略。

lncRNA功能失调可导致癌症、心血管等多种疾病的发生。NRON被认为是*NFAT*的抑制因子，可以调控*NFAT*的去磷酸化和核转运进程[10]。研究[11-12]发现，NRON在多种组织和细胞中表达，包括骨骼组织、血管平滑肌细胞等，通过与不同的靶点结合发挥多种功能。本课题组前期研究[9]发现敲减NRON可显著抑制MI后细胞凋亡的发生，本研究进一步探讨了NRON对MI诱导的MF的影响，与之前的MI造模时间不同，本研究选取MI后28 d检测小鼠心肌组织中NRON的表达变化，前期研究[9]已证实NRON在MI后7 d表达上调，本研究进一步证实NRON在MI后28 d表达仍显著上调，再次提示NRON可能对MI具有重要调控作用。HE染色、Masson染色、免疫组织化学检测结果显示，敲减NRON可明显缓解由MI导致的心肌排列紊乱和炎症细胞浸润现象，减轻纤维化程度并抑制colⅠ的表达。这表明NRON可有效改善心肌损伤，抑制MF的发生，提示NRON可能是治疗MF的重要靶点。

MF的发病机制尚未完全明确，研究[13]发现TGF-β是介导纤维化发生发展的关键因子。TGF-β在体内有多种亚型，其中TGF-β1是最强有力的促纤维化因子，也是心脏中主要存在的亚型。TGF-β1下游信号通路中最为经典的是Smad依赖性TGF-β1信号传导通路，在正常情况下，TGF-β1以无活性的前体形式存在，当心肌缺血缺氧时，TGF-β1迅速活化并与受体结合，促进Smad2/3蛋白磷酸化，磷酸化的

Smad2/3与Smad4蛋白结合形成Smad复合物，并转移至细胞核，诱导纤维化相关基因的表达，促进胶原蛋白沉积，发挥促纤维化的作用[14]。已有研究[15]报道，lncRNA是影响TGF-β/Smad信号转导的重要调节因子，TANG等[16]鉴定出lncRNA GAS5是一种由TGF-β诱导的成纤维细胞活化的调节因子。GAS5直接结合Smad3，并加速Smad3的去磷酸化，抑制TGF-β/Smad信号通路。本研究结果显示，特异性敲减NRON可显著逆转由MI导致的TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3蛋白的病理性增高，提示敲减NRON可能通过影响TGF-β/Smad信号通路，发挥抑制MF的作用。

综上所述，NRON参与MI后MF的发生发展，敲低NRON可显著缓解心肌组织病理损伤，减轻纤维化程度并延缓心室重构，具体机制可能与抑制TGF-β/Smad信号通路相关。本研究为lncRNA在MF中的作用提供了新的证据。

参考文献：

[1] SAITO Y，OYAMA K，TSUJITA K，et al. Treatment strategies of acute myocardial infarction：updates on revascularization，pharmacological therapy，and beyond [J]. J Cardiol，2023，81 (2)：168-178. DOI：10.1016/j.jjcc.2022.07.003.

[2] DAMLUJI AA，VAN DIEPEN S，KATZ JN，et al. Mechanical complications of acute myocardial infarction：a scientific statement from the American heart association [J]. Circulation，2021，144 (2)：e16-e35. DOI：10.1161/cir.0000000000000985

[3] TALMAN V，RUSKOAHO H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration [J]. Cell Tissue Res，2016，365 (3)：563-581. DOI：10.1007/s00441-016-2431-9.

[4] FRANGOGIANNIS NG. Cardiac fibrosis [J]. Cardiovasc Res，2021，117 (6)：1450-1488. DOI：10.1093/cvr/cvaa324.

[5] 谭冰，方凌燕，陈明华，等. 长链非编码RNA FGD5-AS1调节miR-195-5p/PIM1轴对高糖诱导的心肌细胞损伤的影响 [J]. 中国医科大学学报，2024，53 (6)：487-494. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2024.06.002.

[6] LUO SJ，ZHANG MY，WU H，et al. SAIL：a new conserved anti-fibrotic lncRNA in the heart [J]. Basic Res Cardiol，2021，116 (1)：15. DOI：10.1007/s00395-021-00854-y.

[7] ZHANG MY，ZHANG BW，WANG XH，et al. LncRNA CFAR promotes cardiac fibrosis via the miR-449a-5p/LOXL3/mTOR axis [J]. Sci China Life Sci，2023，66 (4)：783-799. DOI：10.1007/s11427-021-2132-9.

[8] SHARMA S，FINDLAY GM，BANDUKWALA HS，et al. Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2011，108 (28)：11381-11386. DOI：10.1073/pnas.1019711108.

[9] 高涵，张春晶，李淑艳，等. 长链非编码RNA-NRON对小鼠心肌梗死后细胞凋亡的作用机制研究 [J]. 中国医科大学学报，2024，53 (3)：218-223. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2024.03.005.

[10] HOEPFNER J，LEONARDY J，LU D，et al. The long non-coding RNA NRON promotes the development of cardiac hypertrophy in the murine heart [J]. Mol Ther，2022，30 (3)：1265-1274. DOI：10.1016/j.ymthe.2021.11.018

[11] JIN F，LI J，ZHANG YB，et al. A functional motif of long noncoding RNA Nron against osteoporosis [J]. Nat Commun，2021，12 (1)：3319. DOI：10.1038/s41467-021-23642-7.

[12] DU M，WANG C，YANG LY，et al. The role of long noncoding RNA Nron in atherosclerosis development and plaque stability [J]. iScience，2022，25 (3)：103978. DOI：10.1016/j.isci.2022.103978.

[13] MARTELOSSI CEBINELLI GC，PAIVA TRUGILO K，BADARÓ GARCIA S，et al. TGF-β1 functional polymorphisms：a review [J]. Eur Cytokine Netw，2016，27 (4)：81-89. DOI：10.1684/ecn.2016.0382.

[14] HU HH，CHEN DQ，WANG YN，et al. New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis [J]. Chem Biol Interact，2018，292：76-83. DOI：10.1016/j.cbi.2018.07.008.

[15] YOUSEFI F，SHABANINEJAD Z，VAKILI S，et al. TGF-β and WNT signaling pathways in cardiac fibrosis：non-coding RNAs come into focus [J]. Cell Commun Signal，2020，18 (1)：87. DOI：10.1186/s12964-020-00555-4.

[16] TANG R，WANG YC，MEI XH，et al. LncRNA GAS5 attenuates fibroblast activation through inhibiting Smad3 signaling [J]. Am J Physiol Cell Physiol，2020，319 (1)：C105-C115. DOI：10.1152/ajpcell.00059.2020.

（编辑　于　溪）