

miRNA-204 靶向 LC3B 在 Ang II 诱导的心肌肥厚中的作用

黄炯华,戴文军,林育辉,伍金雷,谢文杰,陈永权
(广州医科大学附属第三医院心血管内科 510150)

[摘要] **目的** 探讨体外血管紧张素 II (Ang II) 诱导原代大鼠心肌细胞肥大中 miRNA-204 靶向自噬微管相关蛋白轻链 3B (LC3B) 表达的作用。**方法** 以原代大鼠心肌细胞为研究对象,根据不同的处理分为对照组、Ang II 组、联合 1 组(心肌细胞给予人 Ang II 刺激同时感染阴性对照慢病毒载体)和联合 2 组(心肌细胞给予人 Ang II 刺激同时感染 miRNA-204 慢病毒过表达载体)。各组在干预治疗后 48~72 h,行激光共聚焦检测心肌细胞肥大变化,荧光定量 PCR 探测 miRNA-204 的表达,蛋白印迹测定 LC3B 的表达;同时,双荧光素酶活性基因报告验证 miRNA-204 的靶基因。**结果** 与对照组比较,Ang II 组心肌细胞相对表面积明显增大,同时 LC3B 蛋白表达明显升高、miRNA-204 表达上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与联合 1 组比较,联合 2 组能明显减少 LC3B 蛋白表达,同时使心肌细胞相对表面积缩小($P<0.05$)。进一步的荧光素酶活性报告基因实验结果提示,miRNA-204 能结合 LC3B 的非翻译区的野生型片段减少荧光素酶活性($P<0.05$);但不能结合其突变型片段灭活荧光素酶活性($P>0.05$)。**结论** miRNA-204 能抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大,其作用是通过靶向 LC3B 的表达实现的。

[关键词] 微 RNA-204;心肌肥厚;血管紧张素 II;原代大鼠心肌细胞

[中图分类号] R541.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)09-1175-04

Role of miRNA-204 targeted LC3B in Ang II induced myocardial hypertrophy

Huang Jionghua, Dai Wenjun, Lin Yuhui, Wu Jinlei, Xie Wenjie, Chen Yongquan

(Department of Cardiology, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University,

Guangzhou, Guangdong 510150, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of miRNA-204 targeted LC3B expression on Ang II induced cardiomyocytes hypertrophy. **Methods** The primary neonatal rat cardiomyocytes served as the research objects and divided into the control group, Ang II group, combination-treated group 1 (cardiomyocytes were given Ang II stimulation, meanwhile infected by negative control lentivirus vector), combination-treated group 2 (cardiomyocytes were given Ang II stimulation, meanwhile infected by lentivirus carrying miRNA-204 overexpression vector) according to different treatments. About 48 h to 72 h after intervention treatment, the cardiomyocyte hypertrophy change was detected by confocal microscopy, the expression of miRNA-204 was analyzed by real time PCR, the protein expression of LC3B was measured by Western blot and targeted gene of miRNA-204 was demonstrated by dual-luciferase reporter assay system. **Results** Compared with the control group, the cardiomyocyte relative surface area in the Ang II group was significantly enlarged, the protein expression of LC3B was significantly increased, the expression of miRNA-204 was up-regulated, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Whereas comparing the combination-treated group 1 with combination-treated group 2, the protein expression of LC3B in the latter was down-regulated and the cell area was reduced ($P<0.05$). The further luciferase activity report gene experiment results suggested that miRNA-204 was able to bind to LC3B 3'-UTR and decreased the luciferase activities ($P<0.05$), but not to bind its mutated fragment for inactivating luciferase activity ($P>0.05$). **Conclusion** miRNA-204 is able to inhibit Ang II induced cardiomyocytes hypertrophy, its action is realized by targeting the expression of LC3B.

[Key words] microRNA-204; myocardial hypertrophy; angiotensin II; neonatal rat cardiomyocytes

心脏在各种压力(如压力负荷、体内神经体液因子等)刺激下,促进心脏代偿性心肌肥厚,最终会进展成为心力衰竭。既往研究表明,左心室肥厚是心脑血管事件的独立危险因素^[1]。为此,探索抑制心脏肥厚的新机制有望为心力衰竭的防治提供重要的线索。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 在压力负荷诱导心脏肥厚的发生、发展及维持中有着至关重要的作用。有研究表明,微 RNA (microRNA, miRNA) 是生物体内源的非编码 RNA,其通过结合基因非编码区域的互补片段(3'-URT)来分解或抑制基因转录表达^[2]。此外,压力负荷诱导的大鼠心脏肥厚的组织 miRNA 基因芯片测定表明,miRNA-204 表达下调^[3];而作者前期研究发现,压力负荷诱导的心脏肥厚其心肌组织中存在自噬微管相关蛋白轻链 3B (LC3B) 表达上调^[4],体外 Ang II 诱导的原代大鼠心肌细胞肥大中,LC3B 表

达结果与体内一致^[5]。通过网络基因信息软件 targetscan 预测,LC3B 是 miRNA-204 的靶基因。然而,miRNA-204 在心肌细胞中,是否靶向作用 LC3B 的表达及其对 Ang II 诱导的心肌肥厚是否有调控作用尚不明确。本研究以 Ang II 诱导原代大鼠心肌细胞肥大模型,探讨 miRNA-204 靶向 LC3B 表达在心肌肥厚中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:1~3 d 的 SD 乳鼠由广州医科大学实验动物中心提供,体质量 5~10 g。(2)试剂及仪器:E. Z. N. ATM Blood DNA Kit 反应试剂盒购自美国 Omega 公司;pGL3 荧光报告质粒及内对照质粒 pRL-TK 购自 invitrogen 公司;Ang II 购自美国 Sigma 公司;Alexa Fluor555 Phalloidin 购自美国 Invitrogen 公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;Prime-

Script II 1st Strand cDNA Synthesis kit 购自日本 Takara 公司;定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ II Kit 购自日本 Takara 公司;NP-40 裂解液购自上海 Beyotime 公司;单克隆抗体 LC3B 购自 Cell Signaling Technology 公司;单克隆抗体 GAPDH 购自 Epitomics 公司;免疫二抗体购自武汉 BOI-WORLD 公司;曝光液购自上海 Beyotime 公司;阴性对照慢病毒载体、miRNA-204 慢病毒过表达载体由上海吉玛公司构建;Zeiss LSM 710 的激光共聚焦仪购自德国公司。

1.2 方法

1.2.1 携带 LC3B 非编码区域野生型片段和突变型片段质粒构建

通过 E. Z. N. ATM Blood DNA Kit 反应试剂盒的操作方法从大鼠血样品中获取基因组 DNA。大鼠 LC3B 3'-URT 野生型片段和突变型片段通过融合 PCR 方法从大鼠基因组 DNA 中获取,同时予 ECOR I 和 Xba I 酶切野生型片段、突变型片段和 pGL3 荧光报告载体,用连接酶连接构建获得相应质粒,分别命名为 pGL3-LC3B 3'-URT-Wild Type 和 pGL3-LC3B 3'-URT-Mutant。

1.2.2 细胞培养和治疗分组

原代大鼠心肌细胞通过胰酶消化出生 1~3 d 的 SD 乳鼠心脏获取,参照文献[6]报道进行培养。根据不同的处理分成 4 组:对照组(心肌细胞未予特殊处理)、Ang II 组(心肌细胞给予 1 μmol/L Ang II 刺激)、联合 1 组(心肌细胞给予 Ang II 刺激同时感染阴性对照慢病毒载体)、联合 2 组(心肌细胞给予 Ang II 刺激同时感染 miRNA-204 慢病毒过表达载体)。慢病毒感染心肌细胞以 4×10⁵ 心肌细胞数加进 20 μL 病毒液和凝聚胶使得其终浓度为 5 μg/mL。而 pGL3 携带 LC3B 3'-URT-Wild Type 或 3'-URT-Mutant 质粒及内对照质粒 pRL-TK 转染心肌细胞时则根据 Lipofectamine LTX and PLUS Reagents 试剂盒说明书进行。

1.2.3 激光共聚焦检测

心肌细胞收集后用 3.7% 多聚甲醛在常温下孵育,并用 PBS-T 稀释的 1% Trion X 进行孵育 15 min 破膜。然后,心肌细胞用 Alexa Fluor555 Phalloidin(按 1:35 稀释)孵育 25 min 进行染色;最后,再加入浓度为 300 nmol/L 的 DAPI 溶液进行复染色 5 min。心肌细胞图像通过 Zeiss LSM 710 的激光共聚焦仪获取。每个样品获取 5 个不同视野的图片,并通过 Image-Pro Plus 6.0 软件计算平均细胞表面积,处理各组分别与对照组的平均心肌细胞表面积进行比较获取倍数值后进行统计分析。

1.2.4 荧光定量聚合酶链(qRT-PCR)检测

心肌细胞总 RNA 通过 Trizol 获取,cDNA 则根据试剂盒 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis kit 说明书操作方法获得。同时,定量 PCR 根据试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ II Kit 操作说

明在购自瑞士 Roche 公司的荧光定量 PCR 仪进行测定。U6 作为 miRNA-204 的内对照,相对表达水平通过计算 2^{-ΔΔCT} 方法获取。其相关引物序列如下,U6 逆转录引物序列:5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3';荧光定量 PCI 引物序列上游:5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3',下游:5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3'。miRNA-204 逆转录引物序列:5'-GTC GTA TCC AGT GCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGC ACT GGA TAC GAC AGG CAT AG-3';荧光定量 PCI 引物序列上游:5'-GCC CTT CCC TTT GTC ATC-3',下游:5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'。

1.2.5 细胞蛋白抽提和蛋白印迹检测

心肌细胞收集后采用 NP-40 裂解液进行抽提,蛋白浓度通过 BCA 法测定。约取样品 40 μg 蛋白进行电泳分离和转膜。将承载有目的蛋白膜用 5% 脱脂奶粉进行封闭 1 h,然后加入单克隆抗体 LC3B 和单克隆抗体 GAPDH 于 4 °C 孵育过夜。孵育过夜的蛋白膜用 PBS-T 液洗涤后,加入免疫二抗体进行孵育免疫共沉淀反应。免疫复合物通过曝光液进行曝光获取底片。LC3B 蛋白表达量用内对照蛋白 GAPDH 标准化后计算获得。

1.2.6 双荧光素酶活性基因报告测定

为了更好地评价 miRNA-204 是否调控 LC3B 的表达,作者进行双荧光素酶基因报告测定。心肌细胞以每孔 5×10⁴ 数量种植到 24 孔板中进行培养。(1)将 miRNA-204 模拟物和对照物、miRNA-204 抑制物和对照物通过试剂盒 Lipofectamine® RNAiMAX Reagent 在心肌细胞进行转染 12 h;(2)根据 Lipofectamine LTX and PLUS Reagents 试剂盒说明书进行操作,同时将 3'-URT-Wild Type 或 3'-URT-Mutant 质粒及内对照质粒 pRL-TK 共转染进心肌细胞并孵育 48 h;(3)将心肌细胞收集,在 Lumat LB9507 荧光细胞收集仪测定海肾素酶和萤火虫素酶的活性。通过内对照载体 pRL-TK 提供海肾素酶活性的表达来标准化萤火虫素酶活性的表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用 Shpiro-Wilk 检验是否符合正态分布,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

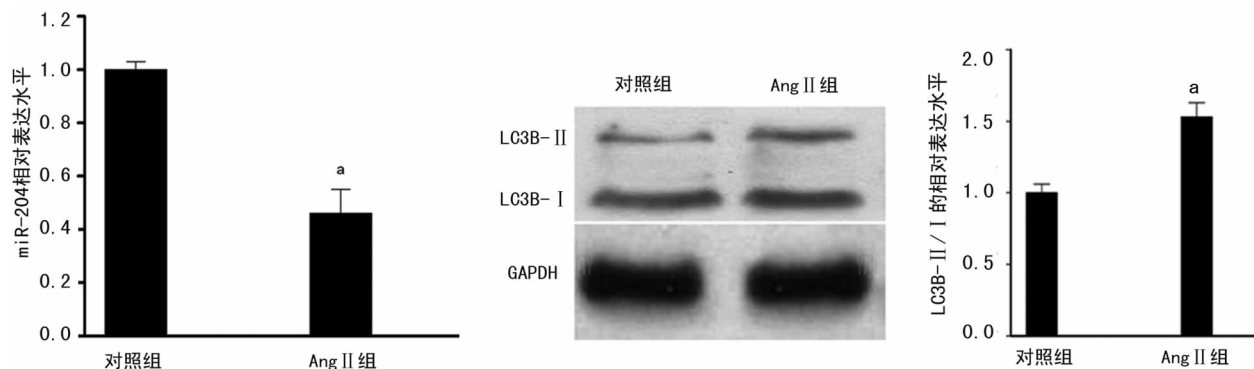
2.1 对照组与 Ang II 组心肌细胞表面积比较

浓度为 1 μmol/L 的 Ang II 刺激心肌细胞 48 h,心肌细胞表面积较对照组明显增大,通过 Image-Pro Plus 6.0 测定平均细胞表面积进行比较,Ang II 组平均细胞表面积较对照组增多,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1。



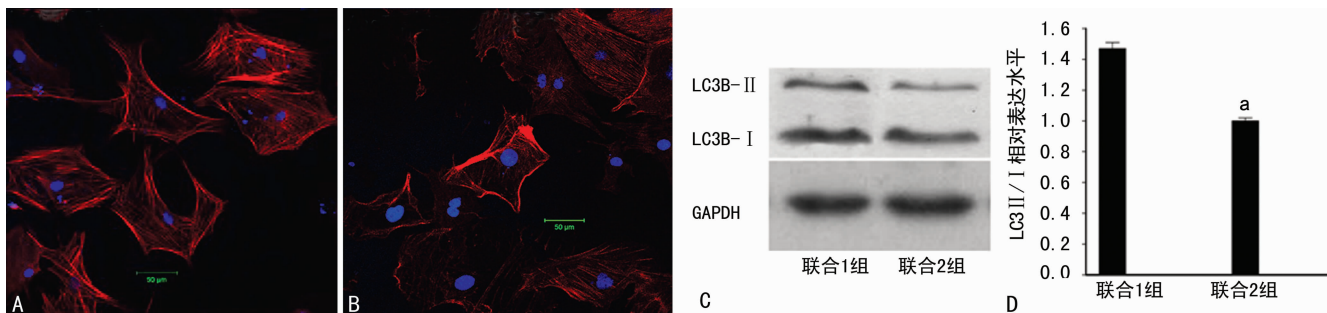
A: 对照组; B: Ang II 组; C: 两组细胞表面积比较; ^a: *P*<0.05, 与对照组比较。

图 1 对照组与 Ang II 组心肌细胞表面积比较



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 对照组与 Ang II 组肥大心肌细胞中 miRNA-204 和 LC3B 表达水平比较



A: 联合 1 组; B: 联合 2 组; C: 两组蛋白印迹检测; D: 两组细胞 LC3B 表达比较; ^a: $P < 0.05$, 与联合 1 组比较。

图 3 联合 1、2 组心肌细胞表面积和 LC3B 表达比较

表 1 双荧光素酶活性分析 miRNA-204 靶向 LC3B 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

报告基因载体	miRNA 对照组	miRNA-204 模拟物	siRNA 对照组	miRNA-204 抑制物
PGL 3.0-WT-LC3B	1.00 ± 0.04	0.66 ± 0.07 ^a	1.00 ± 0.15	1.41 ± 0.06 ^b
PGL 3.0-MT-LC3B	1.00 ± 0.03	1.04 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.05 ± 0.02

^a: $P < 0.05$, 与 miRNA 对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 siRNA 对照组比较。

2.2 对照组与 Ang II 组肥大心肌细胞中 miRNA-204 和 LC3B 表达水平比较 心肌细胞予 Ang II 刺激 48 h 后行 miRNA-204 及 LC3B 蛋白表达测定, 与对照组比较, Ang II 组 miRNA-204 表达下调, 而 LC3B 蛋白表达上调, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 联合 1、2 组心肌细胞表面积和 LC3B 表达比较 在 Ang II 诱导的心肌细胞肥大中, 通过慢病毒转染心肌细胞过表达 miRNA-204, 观察其对心肌细胞肥大及 LC3B 表达的作用。结果显示, 联合 1 组相对细胞表面积为 1.82 ± 0.10 , 联合 2 组为 1.04 ± 0.07 , 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与联合 1 组比较, 联合 2 组 LC3B 表达下调 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 LC3B 是 miRNA-204 的靶向基因 当心肌细胞转染 LC3B 3'-UTR 野生型载体后, 同时转染 miRNA-204 模拟物和对照物、miRNA-204 抑制物和对照物时, 转染模拟物较对照物的荧光素酶活性下调 ($P < 0.05$); 转染抑制物较对照物比较荧光素酶活性上调 ($P < 0.05$)。然而, 当心肌细胞转染 LC3B 3'-UTR 突变型载体后, 同时转染 miRNA-204 模拟物和对照物、miRNA-204 抑制物和对照物时, 其与各自的对照物比较荧光素酶活性变化均差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

3 讨 论

Ang II 作为重要的神经体液因子, 是心肌肥厚作用的重要启动子^[7]。本研究通过 Ang II 刺激原代大鼠心肌细胞构建体外心肌细胞肥大模型。本研究结果表明, Ang II 刺激的心肌细胞肥大中, 存在 miRNA-204 表达下调和 LC3B 蛋白表达增高;

同时, 通过慢病毒载体感染心肌细胞过表达 miRNA-204 可抑制 Ang II 诱导的 LC3B 蛋白表达和心肌细胞肥大加剧; 最后, 通过双荧光素酶基因报告测定证实 LC3B 是 miRNA-204 的靶向基因。因此, 实验结果进一步证实, miRNA-204 靶向 LC3B 的表达来抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。

miRNA-204 的表达水平在不同的疾病状态各有差异。在衰老相关的海马神经组织表达上调^[8], 然而在一些肿瘤相关的疾病, 如肾细胞癌^[9]和前列腺癌细胞^[10]中其表达明显下调。关于 miRNA-204 在心血管疾病方面的研究表明, 在心肌细胞缺血再灌注损伤中其表达下调^[11]; 同时在 β -甘油诱导的动脉钙化中, 动脉平滑肌细胞的 miRNA-204 表达下调, 过表达 miRNA-204 可抑制平滑肌细胞向成骨细胞分化进而减轻血管钙化^[12]。既往压力负荷诱导心脏肥厚的心肌组织发现 miRNA-204 表达下调^[3], 本研究在 Ang II 诱导的心肌细胞肥大中, 也发现其表达下调。然而, 其在心肌肥厚的确切作用仍不明确。事实上, miRNA-204 与其他 miRNA 一样, 可以通过结合不同的目的基因的非编码区域的互补片段进而在基因转录水平上调控其表达参与疾病的发生和发展。如 miRNA-204 调控 Runx2 蛋白的表达参与调控平滑肌细胞向成骨细胞分化^[12]; miRNA-204 抑制食管癌细胞 FOXM1 基因的表达, 进而抑制其侵袭及上皮-间质转化^[13]。本研究体外实验发现, Ang II 诱导的心肌细胞肥大, miRNA-204 基因表达上调; 通过慢病毒感染心肌细胞过表达 miRNA-204 可以抑制 LC3B 蛋白的表达, 同时抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。进一步的双荧光素酶基

因报告检测证实,miRNA-204 可结合 LC3B 基因的 3'-URT 片段,抑制其表达。本研究结果表明,miRNA-204 可抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大,其作用可能是通过靶向 LC3B 基因表达而实现。

参考文献

- [1] Okwuosa TM, Soliman EZ, Lopez F, et al. Left ventricular hypertrophy and cardiovascular disease risk prediction and reclassification in blacks and whites: the Atherosclerosis Risk in Communities Study[J]. *Am Heart J*, 2015, 169(1):155-61. e5.
- [2] Broughton JP, Pasquinelli AE. A tale of two sequences: microRNA-target chimeric reads [J]. *Genet Sel Evol*, 2016, 48(1):31-37.
- [3] Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart; do they play a role in cardiac hypertrophy [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(6):1831-1840.
- [4] Huang JH, Sun W, Huang H, et al. miR-34a modulates angiotensin II-Induced myocardial hypertrophy by direct inhibition of ATG9A expression and autophagic activity [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e94382.
- [5] Huang J, Pan W, Ou D, et al. LC3B, a protein that serves as an autophagic marker, modulates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66(6):576-583.
- [6] Takemoto M, Node K, Nakagami H, et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(10):1429-1437.
- [7] Schlüter KD, Wenzel S. Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 119(3):311-325.
- [8] Danka Mohammed CP, Rhee H, Phee BK, et al. miR-204 downregulates EphB2 in aging mouse hippocampal neurons [J]. *Aging Cell*, 2016, 15(2):380-388.
- [9] Xiong F, Liu K, Zhang F, et al. miR-204 inhibits the proliferation and invasion of renal cell carcinoma by inhibiting RAB22A expression [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5):3000-3008.
- [10] Ding M, Lin B, Li T, et al. A dual yet opposite growth-regulating function of miR-204 and its target XRN1 in prostate adenocarcinoma cells and neuroendocrine-like prostate cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10):7686-7700.
- [11] Xiao J, Zhu X, He B, et al. MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1):35-39.
- [12] Cui RR, Li SJ, Liu LJ, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(2):320-329.
- [13] Sun Y, Yu X, Bai Q. miR-204 inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXM1 in esophageal cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10):12775-12783.
- (收稿日期:2016-08-24 修回日期:2016-11-07)
- (上接第 1174 页)
- [5] Martinez-Martinez E, Rodriguez C, Galan M, et al. The lysyl oxidase inhibitor(β -aminopropionitrile) reduced leptin profibrotic effects and ameliorates cardiovascular remodeling in diet-induced obesity in rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 92(3):96-104.
- [6] Wei M, Ong L, Smith MT, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complication of human diabetes [J]. *Heart Lung Circ*, 2003, 12(1):44-50.
- [7] 郑国营. 糖尿病心肌病舒张功能不全的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(9):1647-1649.
- [8] Maclver DH, Townsend M. A novel mechanism of heart failure with normal ejection fraction [J]. *Heart*, 2008, 94(4):446-449.
- [9] Ozasa N, Furukawa Y, Morimoto T, et al. Relation among left ventricular mass, insulin resistance, and hemodynamic parameters in type 2 diabetes [J]. *Hypertens Res*, 2008, 31(3):425-432.
- [10] Van HL, Hamdani N, Handoko ML, et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension [J]. *Circulation*, 2008, 117(14):1445-1451.
- [11] Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology [J]. *Matrix Biol*, 1998, 16(7):387-398.
- [12] Sivakumar P, Gupta S, Sarkar S, et al. Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 307(1):159-167.
- [13] Lopez B, Querejeta R, Gonzalez A, et al. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure [J]. *Hypertension*, 2009, 53(2):236-253.
- [14] Xiao Y, Nie X, Han P, et al. Decreased copper concentrations but increased lysyl oxidase activity in ischemic hearts of rhesus monkeys [J]. *Metallomics*, 2016, 8(9):973-980.
- [15] Gonzalez-Santamaria J, Villalba M, Busnadiego O, et al. Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 109(1):67-78.
- (收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-11-16)