

MiRNA-27b对血管紧张素Ⅱ诱导肥大心肌细胞凋亡相关因子表达的影响

陈运起 吴钟伟 李堪董 赵圣吉

【摘要】 目的:观察微小 RNA-27b (miR-27b) 对血管紧张素Ⅱ (AngⅡ) 诱导肥大心肌细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达的影响。 **方法:**将 H9c2 小鼠心肌细胞分为 4 组,分别为正常对照组、AngⅡ 诱导组、miR-27b mimics 组和阴性核苷酸组。各组细胞建模培养后分别检测心肌细胞凋亡率, Bax、Bcl-2 蛋白和 miR-27b 的表达, 监测心肌细胞内活性氧 (ROS) 水平的变化以及总超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。 **结果:**免疫荧光染色可见 AngⅡ 诱导组心肌细胞均较正常对照组明显肥大, 细胞表面积增大, 而 miR-27b mimics 组细胞肥大明显改善 ($P<0.05$)。与正常对照组比较, AngⅡ 诱导组 Bax 蛋白表达上调, 而 Bcl-2 蛋白和 miR-27b 表达明显下调 ($P<0.05$)。与 AngⅡ 诱导组比较, miR-27b mimics 组 Bax 蛋白表达则减少, 而 Bcl-2 蛋白和 miR-27b 表达增加 ($P<0.05$)。与正常对照组相比, AngⅡ 诱导组凋亡率显著增加 ($P<0.01$), 而与 AngⅡ 诱导组比较, miR-27b mimics 组凋亡率明显改善 ($P<0.05$)。AngⅡ 诱导组心肌细胞 ROS 水平较正常对照组上升, 而总 SOD 活性下降, 2 组间比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 AngⅡ 诱导组比较, miR-27b mimics 组 ROS 水平下降, 而总 SOD 活性增加 ($P<0.05$)。 **结论:**miR-27b 可能通过调控细胞凋亡的基因转录, 参与心肌细胞肥大的发生发展。

【关键词】 心肌肥大; 血管紧张素Ⅱ; miRNA-27b; 细胞凋亡

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.03.009

Effects of miRNA-27b on expression of apoptosis related factors in hypertrophic cardiomyocytes induced by angiotensin Ⅱ CHEN Yunqi, WU Zhongwei, LI Kandong, ZHAO Shengji
Department of Cardiology, Hainan West Central Hospital, Danzhou 571700, China

【Abstract】 Objective: To determine the effect of microRNA-27b (miR-27b) on apoptosis rate and apoptosis-related protein expression of hypertrophic cardiomyocytes induced by angiotensin Ⅱ (AngⅡ). **Methods:** H9c2 mouse cardiomyocytes were divided into normal control group, AngⅡ-induced group, miR-27b mimics group, and negative nucleotide group. In each group, apoptosis rate of cardiomyocytes, expressions of Bax, Bcl-2 and miR-27b, and changes of ROS level and total SOD activity were assessed after modeling and cell culture. **Results:** Immunofluorescence staining showed that myocardial cells were larger and cell surface area was greater in AngⅡ-induced group than those in normal control group. These features of cell hypertrophy induced by AngⅡ was significantly improved in miR-27b mimics group ($P<0.05$). Compared with normal control group, AngⅡ induced an up-regulation of Bax protein expression and a down-regulation of Bcl-2 protein expression and miR-27b ($P<0.05$), which were reversed in miR-27b mimics group ($P<0.05$). Similarly, compared with normal control group, apoptosis rate was increased in AngⅡ-induced group ($P<0.01$), which was improved in miR-27b mimics group ($P<0.05$). In addition, AngⅡ induced an increase in ROS level and a decrease in total SOD activity in the myocardial cells ($P<0.05$ and $P<0.01$,

基金项目:海南省自然科学基金(820RC781)

作者单位: 571700 儋州,海南西部中心医院心血管内科

通信作者:陈运起, E-mail: lrt359191@163.com

respectively). ROS level was lower while SOD activity was higher in miR-27b mimics group than in AngII-induced group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Our results suggest that miR-27b may participate in the development of cardiomyocyte hypertrophy by regulating gene transcription of apoptosis.

【Key words】 Cardiomyocyte hypertrophy; Angiotensin II; MiRNA-27b; Apoptosis

微小 RNA-27b (miR-27b) 与多种心脏病的发生发展密切相关^[1-2]。早期研究认为, 心肌细胞过度表达 miR-27b 可以诱导小鼠心肌肥大和功能障碍^[3], 但近期研究发现 miR-27b 过表达对小鼠心功能和心肌有保护作用^[4]。miR-27b 参与多种疾病细胞凋亡的调控^[5-6], 但 miR-27b 对心肌肥大细胞凋亡的影响及机制的相关研究较少。本研究通过建立血管紧张素 II (AngII) 诱导心肌细胞肥大模型, 观察 miR-27b 对心肌细胞凋亡及其相关因子的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和实验分组

H9c2 小鼠心肌细胞购于上海中国科学院细胞库, 培养于含 NaHCO_3 1.5 g/L 的 DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司, 12800017)。细胞培养条件: 10% 优质胎牛血清, 5% CO_2 , 恒温 37 °C, 平均 3 d 进行 1 次传代培养。实验分为 4 组。正常 H9c2 小鼠心肌细胞为正常对照组。AngII 诱导组: 根据文献报道及预实验结果, 选用 2×10^{-6} mol/L 的 AngII 干预 48 h, 诱导心肌肥大模型。miR-27b mimics 组: 培养 H9c2 小鼠心肌细胞并给予 2×10^{-6} mol/L 的 AngII 干预, 然后加入 miR-27b mimics 转染。阴性核苷酸组: 培养 H9c2 小鼠心肌细胞并给予 2×10^{-6} mol/L 的 AngII 干预, 然后加入阴性随机核苷酸片段进行转染。各组细胞均继续培养 48 h 后收集细胞及培养基上清液进行指标测定。

1.2 试剂

RNA 快速提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 逆转录试剂盒、U6 引物套装购自广州锐博生物有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒购自美国 BD 公司; Bcl-2 和 Bax 抗体均购自美国 CST 公司; 总超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测试剂盒 (WST-8 法)、细胞内活性氧 (ROS) 检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 免疫荧光实验

收集培养后的心肌细胞, 4% 多聚甲醛固定,

清洗后用 0.5% TritonX-100 处理细胞, 加入 2 mL 封闭液 (含有 1% BSA + 22.52 g/L 甘氨酸 + 0.1% Tween 20 的 PBST), 室温封闭 1 h。滴加 α -actinin 一抗, 室温孵育 1 h, 清洗完毕后加入相应荧光二抗, 37 °C 培养箱处理 1 h, 滴加 DAPI (5 $\mu\text{g/mL}$) 室温孵育 5 min, 滴加抗荧光淬灭剂并放在载玻片上, 荧光显微镜观察拍照, 并选取视野计算单个细胞面积及相同面积下细胞数。

1.4 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡

去除细胞上清液, 清洗细胞后用无胰酶消化液消化细胞 2~3 min, 1 000 转/min 离心 5 min。用 100 μL 的 $1 \times$ binding buffer 重悬细胞后, 加入 5 μL 的 Annexin-V FITC 和 5 μL 的 PI 染料, 室温避光放置染色处理 15 min, 再加入 400 μL 的 $1 \times$ binding buffer 并用 400 目筛网过滤, 1 h 内用流式细胞仪检测凋亡情况。

1.5 Western blot法检测凋亡相关蛋白Bax和Bcl-2的表达

收集各组 H9c2 细胞于 1.5 mL EP 管中, 离心后弃上清液, PBS 洗 3 次, 每管中加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 离心取上液, BCA 法测蛋白浓度, 用裂解液调整蛋白浓度, 加蛋白 loading buffer 加热进行变性, 每孔上样 10 μL 。电泳, 转膜, 封闭, 加入相应的一抗、二抗、ECL 显色。采用 Image Lab 3.0 软件对免疫印迹图的灰度值分析, 实验重复 3 次。

1.6 实时定量聚合酶链反应检测心肌细胞miR-27b的表达

采用 Trizol 结合柱法提取细胞总 RNA, 采用 miR-27b 特异性 stem-loop 逆转录引物和 U6 逆转录引物分别逆转录 RNA, 然后使用 U6 作为内参, SYBR Green 方法相对定量分析 miR-27b 的差异, 实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析。

1.7 流式细胞检测心肌细胞ROS水平的变化

收集细胞并用胰酶消化, 900 转/min 离心 3 min, 之后用无血清培养基重悬清洗 2 遍后再加入用无血清培养基按照 1 : 3 000 的比例稀释的

2',7'-二氢二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA), 37 °C 培养箱中孵育 20 min, 之后弃去培养液, 用无血清的培养液洗涤细胞 3 次以充分去除未进入细胞的 DCFH-DA, 流式分析平均荧光强度 (MFI)。

1.8 总SOD活性检测试剂盒(WST-8法)检测总SOD活性

收集细胞并用 PBS 清洗, 加入 SOD 样品制备液 200 μ L 处理, 冷冻离心机 4 °C 12 000 转 /min 离心 10 min, 配制 WST-8 酶工作液和反应启动工作液, 37 °C 孵育 30 min 后 450 nm 测定吸光度, 计算 SOD。

1.9 统计学分析

运用 SPSS 22.0 软件进行结果分析, 数据以均数 \pm 标准差表示, 数据分析用单因素分析法, 以双侧检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组心肌细胞免疫荧光染色实验比较

采用 α -actinin 免疫荧光染色可见 Ang II 诱导组较正常对照组心肌细胞明显肥大, 细胞表面积增大, 相同视野里心肌细胞个数明显减少, 心肌细胞 α -actinin 成有规则的条索状排列, 表明 Ang II 诱导组小鼠心肌肥大细胞模型诱导成功。见图 1、表 1。

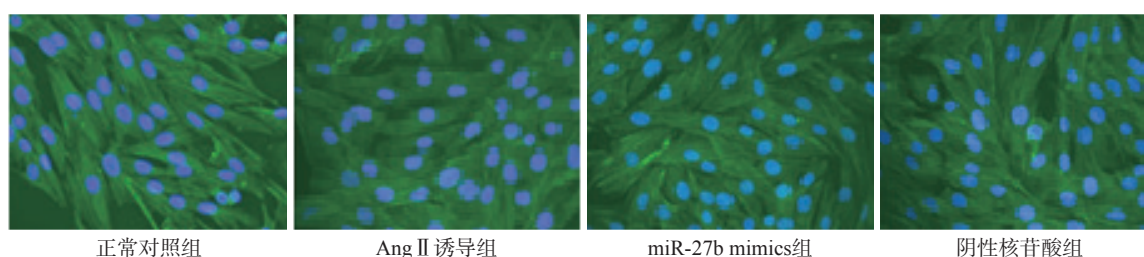


图1 4组H9c2小鼠心肌细胞免疫荧光染色对比

表1 4组H9c2小鼠心肌细胞面积和个数对比

组别	心肌细胞面积/ mm^2	心肌细胞个数
正常对照组	$(0.36 \pm 0.05) \times 10^{-3}$	$1\,935 \pm 227$
AngII 诱导组	$(1.62 \pm 0.22) \times 10^{-3(1)}$	$907 \pm 86^{(1)}$
miR-27b mimics组	$(0.75 \pm 0.11) \times 10^{-3(2)}$	$1\,285 \pm 160^{(2)}$
阴性核苷酸组	$(1.55 \pm 0.31) \times 10^{-3}$	915 ± 102

注: 与正常对照组比较, $^{(1)}P < 0.05$; 与Ang II 诱导组比较, $^{(2)}P < 0.05$

2.2 4组心肌细胞凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和miR-27b的表达水平比较

与正常对照组比较, Ang II 诱导组 Bax 蛋白表达上调, 而 Bcl-2 蛋白和 miR-27b 表达明显下调, 两组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-27b mimics 组与 Ang II 诱导组比较, Bax 蛋白表达则减少, 而 Bcl-2 蛋白和 miR-27b 表达增加, 2 组间比较, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$), 而阴性核苷酸组与 Ang II 诱导组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果提示, Ang II 的诱导促进了心肌细胞凋亡相关蛋白和 miR-27b 的表达, 而抑制 miR-27b 的转录可以减少其表达。见表 2。

表2 4组H9c2小鼠心肌细胞凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和miR-27b的表达对比

组别	Bax	Bcl-2	miR-27b
正常对照组	1.06 ± 0.28	1.26 ± 0.33	1.08 ± 0.30
AngII 诱导组	$1.77 \pm 0.39^{(2)}$	$0.48 \pm 0.11^{(1)}$	$0.32 \pm 0.09^{(1)}$
miR-27b mimics组	$1.35 \pm 0.30^{(3)}$	0.78 ± 0.18	$0.75 \pm 0.24^{(3)}$
阴性核苷酸组	1.78 ± 0.42	0.41 ± 0.11	0.38 ± 0.10

注: 与正常对照组比较, $^{(1)}P < 0.01$, $^{(2)}P < 0.05$; 与Ang II 诱导组比较, $^{(3)}P < 0.05$

2.3 4组心肌细胞凋亡率、ROS水平和总SOD活性比较

与正常对照组相比, Ang II 诱导组凋亡率和心肌细胞 ROS 水平显著增加, 总 SOD 活性下降, 而 miR-27b mimics 组与 Ang II 诱导组比较, 心肌细胞凋亡率、心肌细胞 ROS 水平和总 SOD 活性明显改善 ($P < 0.05$), 阴性核苷酸组则无明显变化。结果提示, Ang II 诱导促进了心肌细胞的凋亡, 而抑制 miR-27b 的转录可以改善心肌细胞的凋亡。见表 3。

表3 4组H9c2小鼠心肌细胞凋亡率、ROS水平和总SOD活性对比

组别	凋亡率/%	ROS水平/%	总SOD活性/ U · mg ⁻¹
正常对照组	15.73 ± 1.69	12.55 ± 1.37	0.28 ± 0.07
Ang II 诱导组	38.36 ± 3.08 ⁽¹⁾	43.80 ± 5.22 ⁽¹⁾	0.61 ± 0.12 ⁽²⁾
miR-27b mimics组	25.71 ± 3.19 ⁽³⁾	29.04 ± 4.11 ⁽³⁾	0.45 ± 0.09 ⁽³⁾
阴性核苷酸组	39.03 ± 3.66	42.75 ± 5.44	0.65 ± 0.15

注：与正常对照组比较，⁽¹⁾ $P < 0.01$ ，⁽²⁾ $P < 0.05$ ；与Ang II 诱导组比较，⁽³⁾ $P < 0.05$

3 讨论

心肌细胞肥大是左室重构的常见病理表现，引起心肌细胞肥大的主要因素包括血流动力学异常和神经内分泌 - 细胞因子系统的激活。其中，后者对心肌肥大起关键的促发作用^[7]。

本实验采用 Ang II 诱导建立心肌细胞肥大模型，结果表明 Ang II 诱导组的单个心肌细胞体表面积较正常对照组明显增大，建模成功。Ang II 诱导心肌细胞肥大后，心肌细胞的凋亡率和凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达与正常对照组相比有明显差异，表明细胞凋亡参与了心肌细胞肥大的病理过程。

有研究发现，细胞凋亡与心肌细胞肥大的严重程度相关^[8]，推测细胞凋亡在左室重构中发挥重要作用。细胞凋亡参与心肌细胞肥大的分子机制尤其是基因信号的转录调控机制尚不清楚，多种微小 RNA 可能参与心肌细胞凋亡的调控^[9]。miR-27b 与多种肿瘤、多种心脏疾病的发生发展密切相关^[10-11]。心肌细胞过度表达 miR-27b 可以改善小鼠心肌肥大和功能障碍^[12]。miR-27b 也参与多种疾病细胞凋亡的调控。缺氧 / 复氧时，miR-27 表达下调加重心肌细胞损伤，而过表达 miR-27 可通过调节细胞活性和凋亡减轻心肌细胞损伤^[13]。本研究结果显示，给予 miR-27b mimics 转录后，能够改善 Ang II 诱导的心肌细胞肥大，miR-27b 可能通过调控细胞凋亡的基因转录，参与心肌细胞肥大的发生发展，miR-27b 可能是抑制心肌细胞肥大的潜在靶点。

参 考 文 献

[1] Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, et al. The magic and mystery of

microRNA-27 in atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2012, 222(2):314-323.

- [2] Polyakova EA, Zarakskii MI, Mikhaylov EN, et al. Association of myocardial and serum miRNA expression patterns with the presence and extent of coronary artery disease: a cross-sectional study[J]. Int J Cardiol, 2021, 322:9-15.
- [3] Wang J, Song Y, Zhang Y, et al. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice[J]. Cell Res, 2012, 22(3):516-527.
- [4] Xiang JF, Yu JC, Zhu JY. Up-regulation of miR-27 extenuates lipopolysaccharide-induced injury in H9c2 cells via modulating ICAM1 expression[J]. Genes Genomics, 2019, 41(12):1467-1474.
- [5] Zhou YZ, Li SH, Chen P, et al. MicroRNA-27b-3p inhibits apoptosis of chondrocyte in rheumatoid arthritis by targeting HIPK2[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):1766-1771.
- [6] Liu F, Zhang S, Zhao Z, et al. MicroRNA-27b up-regulated by human papillomavirus 16 E7 promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting polo-like kinase2 in cervical cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(15):19666-19679.
- [7] Li S, Zhu Z, Xue M, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and dysfunction via SIRT1[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(6):1241-1252.
- [8] Li XY, Le HT, Sato F, et al. Dec1 deficiency protects the heart from fibrosis, inflammation, and myocardial cell apoptosis in a mouse model of cardiac hypertrophy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 532(4):513-519.
- [9] Zhang XN, Dong SY, Jia QJ, et al. The microRNA in ventricular remodeling: the miR-30 family[J]. Biosci Rep, 2019, 39(8):BSR20190788.
- [10] Zhang J, Cao Z, Yang G, et al. MicroRNA-27a (miR-27a) in solid tumors: a review based on mechanisms and clinical observations[J]. Front Oncol, 2019, 9:893.
- [11] Ding L, Ni J, Yang F, et al. Promising therapeutic role of miR-27b in tumor[J]. Tumour Biol, 2017, 39(3):1010428317691657.
- [12] Zhang M, Cheng K, Chen H, et al. MicroRNA-27 attenuates pressure overload-Induced cardiac hypertrophy and dysfunction by targeting galectin-3[J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 689:108405.
- [13] Zhang XL, An BF, Zhang GC. MiR-27 alleviates myocardial cell damage induced by hypoxia/reoxygenation via targeting TGFBR1 and inhibiting NF-κB pathway[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2019, 35(10):607-614.

(收稿:2022-08-20 修回:2023-02-17)

(本文编辑:丁媛媛)