

微小 RNA-678 调控心肌梗死相关转录因子 FoxP1 的表达研究

周依蒙 郑鹏翔 戴晓勇 华 玮

【摘要】 目的:探索心肌梗死相关微小 RNA(microRNA, miR)-678 的功能及其调控的下游靶基因。 方法:利用 H2C9 心肌细胞建立缺血缺氧模型,研究 H2C9 细胞氧糖剥夺后 miR-678 的表达;利用细胞转染技术过表达 miR-678,检测 H2C9 细胞增殖情况;在 microRNA 数据库中,寻找 miR-678 可能结合的下游靶基因的 3'非编码序列,并利用细胞转染技术在 H2C9 细胞中导入外源性 miR-678 模拟物或者抑制剂,验证 miR-678 对靶基因的调控。 结果:miR-678 可促进 H2C9 细胞增殖,在心肌细胞缺血后下调;数据库检索发现 miR-678 序列能配对 FoxP1 基因 mRNA 的 3'序列;在 H2C9 细胞中导入外源性 miR-678 模拟物能下调 FoxP1 蛋白,而导入外源性 miR-678 抑制剂能上调 FoxP1 蛋白。 结论:缺血心肌细胞 miR-678 的表达水平下调,miR-678 在心肌细胞中可能的下游靶点为 FoxP1 蛋白。

【关键词】 心肌梗死;微小 RNA;微小 RNA-678;FoxP1

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.01.012

Myocardial infarction-related expression of transcription factor FoxP1 regulated by microRNA-678 ZHOU Yimeng¹, ZHENG Pengxiang¹, DAI Xiaoyong², HUA Wei². 1. Department of Cardiology, 2. Department of Emergency Medicine, Yangpu Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200090, China

【Abstract】 Objective: To study the function of miR-678 related to myocardial infarction (MI) and the downstream target genes regulated by it. **Methods:** We investigated the expression of miR-678 after deprivation of oxygen and glucose, using the ischemic model of H2C9 cardiomyocytes in vitro. After overexpression of miR-678 by using transfection technology, we determined the proliferation of H2C9 cells. To explore the possible 3' non-coding sequences of downstream target genes binding by miR-678, we scanned the online database of microRNAs. We transfected exogenous mimic or inhibitor of miR-678 into H2C9 cells to validate the target gene regulated by miR-678. **Results:** MiR-678 could promote the proliferation of H2C9 cells and was down-regulated after myocardial ischemia. We searched the database and found that the 3' sequences of FoxP1 mRNA could clearly match with miR-678. Transfection of exogenous miR-678 mimic or inhibitor into H2C9 cells could down-regulate or up-regulate FoxP1 protein. **Conclusions:** The expression of miR-678 in ischemic cardiomyocyte is down-regulated, and the possible downstream target of miR-678 in cardiomyocyte is FoxP1 protein.

【Key words】 Myocardial infarction; microRNA; miR-678; FoxP1

微小 RNA(microRNA, miR)具有一定的组织细胞特异性,与疾病的发生和发展密切相关^[1],参与心肌肥大、心肌纤维化、心律失常和心肌梗死等多

种疾病过程^[2-6]。本研究通过建立 H2C9 心肌细胞氧糖剥夺模型,获得缺血心肌细胞,并通过芯片技术分析心肌细胞差异 miRNA,探讨 miR-678 在心肌细胞中的功能和其下游靶基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RNA 提取试剂 TRIzol (瑞士 Roche 公司);

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会(20134376)

作者单位:200090 上海,同济大学附属杨浦医院心内科(周依蒙,郑鹏翔);急诊科(戴晓勇,华玮)

RNA 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司);实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);CCK-8 细胞增殖试剂盒(中国碧云天公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天公司);脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);FoxP1 抗体(中国生工生物工程公司);羊抗兔二抗(中国麦约尔公司);H2C9 心肌细胞(中国科学院上海生命研究院细胞库)。

1.2 方法

1.2.1 分组 为研究 miR-678 在 H2C9 心肌细胞氧糖剥夺模型中的表达变化,将细胞分为氧糖剥夺组、对照组。为研究 miR-678 对 H2C9 心肌细胞增殖的影响,将细胞分为过表达 miR-678 组、对照组,每组样品分别在培养 24 h 和 48 h 时检测。为研究 miR-678 对 H2C9 心肌细胞中 FoxP1 蛋白的调控,将细胞分为 miR-678 抑制剂组、抑制剂对照组、miR-678 过表达组、过表达对照组。

1.2.2 制备心肌细胞氧糖剥夺模型 将长势良好的 H2C9 细胞接种到 6 孔板内,贴壁生长至 70%覆盖培养板底面,更换培养基为含 10%胎牛血清的无糖培养基,将细胞放入 Hypoxia 缺氧培养罐(美国 Stem Cell 公司)中,注入纯氮气充分赶出空气,置于 37℃细胞培养箱内继续培养 4 h 后取出。

1.2.3 心肌细胞 RNA 提取及逆转录 TRIzol 直接裂解 H2C9 心肌细胞,按照操作说明提取细胞总 RNA,紫外吸收法测定 RNA 浓度。应用逆转录试剂盒,将 RNA 逆转录为 cDNA。

1.2.4 荧光定量 PCR 分析 采用 20 μL 体系进行 PCR 扩增,扩增条件:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 20 s,72℃延伸 20 s,40 个循环后,获得样本 Ct 值,采用 2^{-ΔCt}法计算目的基因的相对表达量。

定量引物序列 rno-miR-678-RT: 5'-CTCAAC TGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCT CCAGT-3'; rno-miR-678-F: 5'-ACACTCCAGCTG GGGTCTCGGGGCAAGGAC-3'。

1.2.5 细胞转染 将长势良好的 H2C9 细胞接种到 6 孔板内,贴壁生长至 70%覆盖培养板底面,更换新培养基,配制 RNA/脂质体转染混悬液,滴加入培养孔中,miR-678 过表达组转入 miR-678 模拟物,miR-678 抑制剂组转入 miR-678 抑制剂,两对照组各转入模拟物对照或抑制剂对照(每组转染剂量均为 100 pmol/孔)。转染 48 h 后,收集细胞。

1.2.6 细胞增殖 将长势良好的 H2C9 细胞接种到 96 孔板内,按每孔约 1 000 个细胞接种,第 2 天更换新培养基,配制 RNA/脂质体转染混悬液,滴加入培养孔中,miR-678 过表达组转入 miR-678 模拟物,对照组转入随机序列模拟物(各组转染剂量 10 pmol/孔)。分别继续培养 24 h 与 48 h,培养孔内加入 CCK-8 原液,在 1.5 h 后酶标仪测定波长为 450 nm 时的光密度值(OD 值)。

1.2.7 心肌细胞蛋白提取和免疫印迹 加入蛋白裂解液,从 H2C9 细胞中提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,调整上样量。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白后,湿转法将蛋白转到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭,FoxP1 抗体(1 : 500)4℃孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,ECL 显色。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析或 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-678 在 H2C9 心肌细胞氧糖剥夺模型中下调

miR-678 在 H2C9 细胞缺糖缺氧 4 h 后表达下调。miR-678 的相对表达量(以 U6 为内参)在氧糖剥夺组为 0.029 ± 0.002 6,在对照组为 0.039 ± 0.003 8,氧糖剥夺组较对照组显著下调(*P* = 0.018),提示 miR-678 可能与心肌梗死相关。

2.2 过表达 miR-678 能促进 H2C9 心肌细胞增殖

H2C9 心肌细胞经过 4 h 氧糖剥夺处理后,细胞核染色质聚集,生长受到抑制,并发生凋亡,由此推断 miR-678 可能与心肌细胞增殖相关。利用转染技术,向 H2C9 心肌细胞导入外源 miR-678,继续培养 24 ~ 48 h,应用 CCK-8 试剂盒(测定波长 450 nm 处的 OD 值)检测细胞的增殖情况。与对照组相比,过表达 miR-678 组在 24 h 和 48 h 时细胞增殖均显著增加,差异有统计学意义(*P* < 0.001),见表 1。

| 表 1 H2C9 心肌细胞增殖情况 | | |
|-------------------|--------------|--------------|
| | OD 值(24 h) | OD 值(48 h) |
| 对照组 | 0.20 ± 0.003 | 0.31 ± 0.005 |
| 过表达 miR-678 组 | 0.31 ± 0.009 | 0.61 ± 0.004 |
| <i>P</i> 值 | <0.001 | <0.001 |

胞分化、凋亡和衰老等生物学过程^[7-8],其中 FoxP1 主要在心脏、肺、脑、胸腺和肌肉组织中表达,心脏 FoxP1 的主要功能是调控心肌细胞的成熟和增殖^[9]。根据检索分析结果,我们进一步发现 FoxP1 的 3'UTR 区自第 19 个碱基开始的连续 8 个碱基(序列为 5'-CCCCGAGA-3')能和成熟的 miR-678 分子自第 2 个碱基开始的 8 个碱基(序列为 5'-UCUCGGGG-3')完全配对,这表明 Foxp1 基因 mRNA 有可能是 miR-678 的下游靶点,见图 1。

miR 在细胞内结合特定 mRNA 的 3' 端非翻译区(3'UTR)序列,通过抑制该 mRNA 的翻译过程而调控基因表达。根据 miRDB (<http://www.mirdb.org/>) 和 microRNA. org (<http://www.microRNA.org/microRNA/home.do>) 在线数据库的检索结果,发现了几个可能的 miR-678 下游靶基因,其中包括 FoxP1 基因。Fox 基因家族是一个功能广泛的转录因子家族,涉及胚胎发育、糖脂代谢、细

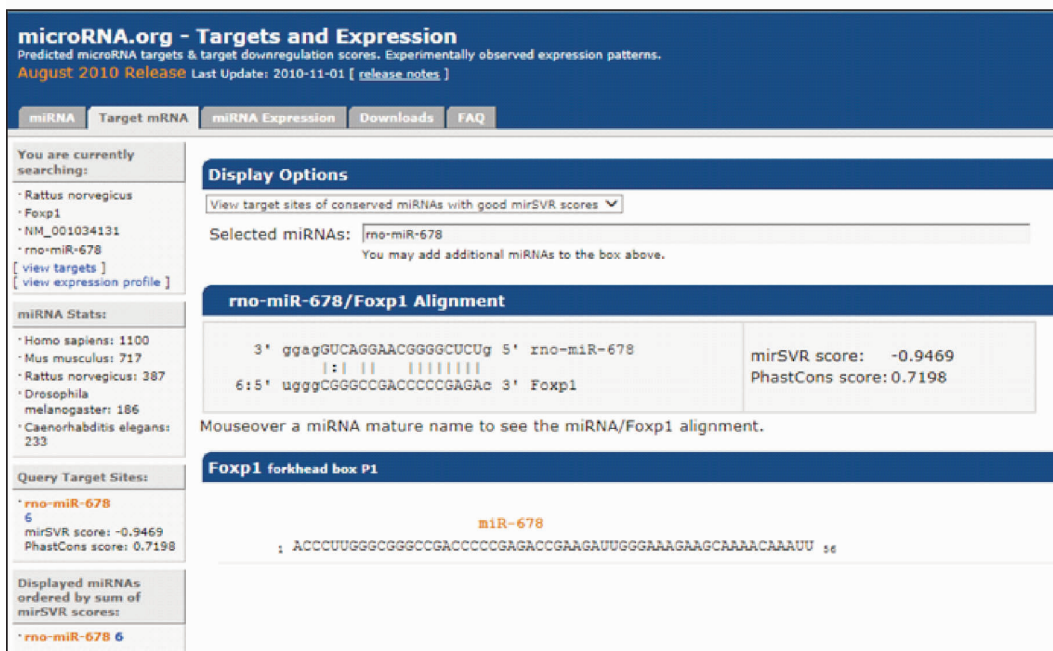
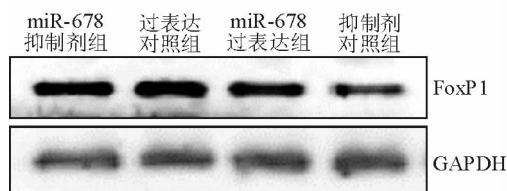


图1 microRNA.org 和 miRDB 数据库比对 FoxP1 与 miR-678 序列

利用细胞转染技术,向 H2C9 心肌细胞分别导入 miR-678 抑制剂和模拟物,继续培养 48 h 后,检测 FoxP1 蛋白在细胞中的表达情况。转染 miR-678 抑制剂的细胞内 FoxP1 蛋白显著增加,转染外源 miR-678 模拟物的细胞内 FoxP1 蛋白显著降低,见图 2。结果说明,细胞内转录因子 FoxP1 的表达翻译受到 miR-678 的调控,过表达 miR-678 抑制了 FoxP1 的蛋白翻译,而 miR-678 抑制剂能解除 miR-678 对 FoxP1 在翻译水平上的负调控作用。



**图 2 miR-678 调控 H2C9 心肌细胞
转录因子 FoxP1 的表达**

3 讨论

心肌组织富含 miRNA,如 miR-1、miR-7、miR-26a、miR-30c、miR-126、miR-133 等^[10],心肌特异性表达的有 miR-208^[11]。在病理状态下,心肌 miRNA 表达有很大不同^[12];miR-21、miR-320、miR-1 都与心肌缺血及再灌注损伤有关^[13-15];随着病程进展,心肌 miRNA 的种类和数量也会发生变化^[16-17]。

本研究利用 miRNA 芯片技术从氧糖剥夺心肌梗死模型中,筛选出一批 miRNA,其中 miR-21、miR-30、miR-92、miR-218 等均被既往研究所证实,我们新发现 miR-678 可能与心肌梗死相关。检索 miR-678 相关文献,仅有 1 篇文献报道 miR-678 在肾小管细胞中表达^[18],但下游靶基因及功能仍不清楚。本研究发现并验证 miR-678 分子与心肌梗死发生相关,并且可能参与了心肌细胞增殖的过程。miRNA 通过调控下游靶基因发挥其生物学功

能。miRNA 识别并结合特定 mRNA 的 3' 非翻译区(3'UTR 序列)中的 miRNA 识别元件,抑制或者沉默该 mRNA 的翻译过程,从而调控基因表达。我们通过检索国际权威在线数据库,发现 miR-678 成熟体与 FoxP1 基因 3'UTR 序列有连续 8 个碱基完全配对,另外,相邻的连续 6 个碱基中有 5 个碱基也能配对,这段序列可能是 miR-678 在 FoxP1 基因上的调控元件。细胞实验结果也表明,FoxP1 蛋白表达受 miR-678 调控。

FoxP1 是 Fox 转录因子超家族 P 亚族的成员,主要在心脏和肌肉组织中表达。以往研究表明,FoxP1 蛋白与胚胎心脏和心肌发育密切相关,参与糖脂代谢、细胞分化、细胞凋亡和免疫调节等多种生物学功能,FoxP1 异常表达与肿瘤关系密切^[19-20]。有研究发现,FoxP1 基因敲除小鼠的心脏发育不良^[9],而在左心发育不全综合征的患者中 FoxP1 表达水平也较低^[21],由此可见 FoxP1 对心肌细胞的生长分化有重要作用。本研究表明,miR-678 可能参与对转录因子 FoxP1 的调控,在心肌生长中发挥重要功能,值得进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, et al. MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(4):293-302.
- [2] Sayed D, Hong C, Chen IY, et al. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2007, 100(3):416-424.
- [3] Carè A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy[J]. Nat Med, 2007, 13(5): 613-618.
- [4] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2[J]. Cell, 2007, 129(2):303-317.
- [5] 张荣,董德利,杨宝峰. 心律失常调节的新靶点——microRNA 的研究进展与应用前景[J]. 药学报, 2011, 46(1):6-11.
- [6] 张莹,张勇,蔡本志,等. microRNA 在犬心房纤颤模型中的变化[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 41(2):92-94.
- [7] Weigel D, Jackle H. The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors?[J]. Cell, 1990, 63(3):455-456.
- [8] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review)[J]. Int J Oncol, 2004, 25(5):1495-1500.
- [9] Wang B, Weidenfeld J, Lu MM, et al. Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation [J]. Development, 2004, 131(18):4477-4487.
- [10] Lagos-quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. Curr Biol, 2002, 12(9):735-739.
- [11] Ji X, Takahashi R, Hiura Y, et al. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury[J]. Clin Chem, 2009, 55(11):1944-1949.
- [12] Navickas R, Gal D, Laucevicius A, et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review[J]. Cardiovasc Res, 2016, 111(4):322-337.
- [13] Dong S, Cheng Y, Yang J, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction[J]. J Biol Chem, 2009, 284(43): 29514-29525.
- [14] Ren XP, Wu J, Wang X, et al. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20[J]. Circulation, 2009, 119(17):2357-2366.
- [15] Wang L, Yuan Y, Li J, et al. MicroRNA-1 aggravates cardiac oxidative stress by post-transcriptional modification of the antioxidant network[J]. Cell Stress Chaperones, 2015, 20(3):411-420.
- [16] 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.
- [17] Tian J, An X, Niu L. Role of microRNAs in cardiac development and disease [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(1):3-8.
- [18] Kim JE, Jung HJ, Lee YJ, et al. Vasopressin-regulated miRNAs and AQP2-targeting miRNAs in kidney collecting duct cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308(7): F749-F764.
- [19] 姜文,杨琴,李新枝,等. FOXP1 在肿瘤演进中的研究进展[J]. 四川解剖学杂志, 2010, 18(3):38-40.
- [20] 胡成如,王靖华. FOXP1 在肿瘤发生和发展中的作用[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(11):1052-1055.
- [21] Chanh SW, Mislankar M, Misra C, et al. Genetic abnormalities in FOXP1 are associated with congenital heart defects[J]. Hum Mutat, 2013, 34(9):1226-1230.

(收稿:2017-07-29 修回:2017-10-19)

(本文编辑:丁媛媛)