

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.16.010

miR-152 靶向 AT1R 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖及胶原合成的影响 *

王晓景¹ 张明星² 徐 超¹ 管倩倩¹ 曹艺敏¹ 陈小亮^{3Δ}

(1 武汉市普仁医院(武汉科技大学附属普仁医院)心血管内科 湖北 武汉 430060;

2 武警湖北省总队医院 心胸外科 湖北 武汉 430060; 3 湖南省郴州市第一人民医院 心内科 湖南 郴州 423000)

摘要 目的:探讨微小 RNA-152(miR-152)靶向血管紧张素受体(AT1R)对血管紧张素 II (Ang II)诱导的大鼠心肌成纤维细胞增殖及胶原合成的影响。**方法:**采用 1 μmol/L Ang II 刺激体外培养的大鼠心肌成纤维细胞,通过噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖情况,蛋白免疫印迹(Western blot)检测成纤维细胞中胶原蛋白 I(Collagen I)、胶原蛋白 III(Collagen III)以及 AT1R 蛋白表达的影响,实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测成纤维细胞中 miR-152 和 AT1R mRNA 的表达。在 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中分别转染 miR-152 mimic 和 mimic control、AT1R siRNA 和 siRNA control 以及共转染 miR-152 mimic 和 AT1R 过表达载体,以同样的方法检测细胞增殖和胶原合成情况。双荧光素酶报告基因实验检测 miR-152 和 AT1R 靶向结合关系。**结果:**Ang II 刺激能够促进心肌成纤维细胞增殖,上调成纤维细胞中胶原蛋白 Collagen I 和 Collagen III 的表达,同时能够抑制 miR-152 的表达,促进 AT1R mRNA 和蛋白的表达。在 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中,过表达 miR-152 或沉默 AT1R 均能够上调细胞增殖活力,促进胶原合成。双荧光素酶报告基因实验检测结果显示 AT1R 是 miR-152 靶基因,miR-152 能够负向调控 AT1R 的表达。在 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中,同时过表达 miR-152 和 AT1R 能够逆转单独过表达 miR-152 导致的细胞增殖抑制作用,回调胶原蛋白 Collagen I 和 Collagen III 合成抑制作用。**结论:**miR-152 能够抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成,其作用机制可能是通过靶向 AT1R 的表达实现的。

关键词:miR-152; AT1R; Ang II; 心肌纤维化; 胶原合成

中图分类号:R-33; R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)16-3055-07

Effect of miR-152-Targeted AT1R on AngII-induced Proliferation and Collagen Synthesis of Cardiac Fibroblasts*

WANG Xiao-jing¹, ZHANG Ming-xing², XU Chao¹, GUAN Qian-qian¹, CAO Yi-min¹, CHEN Xiao-liang^{3Δ}

(1 Department of Cardiovascular Medicine, Wuhan Puren Hospital(Puren Hospital affiliated to Wuhan University of Science and Technology), Wuhan, Hubei, 430060; 2 Cardiothoracic Surgery Department, Hubei Provincial Armed Police Corps Hospital, Wuhan, Hubei, 430060; 3 Department of Cardiology, First People's Hospital of Chenzhou City, Chenzhou, Hunan, 423000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of microRNA-152 (miR-152)-targeted angiotensin receptor (AT1R) on angiotensin II (AngII)-induced rat cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis. **Methods:** Rat cardiac fibroblasts were cultured in vitro and stimulated with 1 μmol/L AngII. The proliferation of fibroblast was detected by MTT assay, the expression of collagen I (Collagen I), collagen III (Collagen III) and AT1R protein in the fibroblasts were detected by western blotting, real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to detect the expression of miR-152 and AT1R mRNA in the fibroblasts. MiR-152 mimic and mimic control, AT1R siRNA and siRNA control were transfected and co-transfected with miR-152 mimic and AT1R overexpression vectors in AngII-induced cardiac fibroblasts, respectively, the cell proliferation and collagen synthesis were detected in the same manner. The dual luciferase reporter gene assay was used to detect the targeted binding relationship of miR-152 and AT1R. **Results:** AngII stimulation can promote the proliferation of cardiac fibroblasts, up-regulate the expression of collagen Collagen I and Collagen III in the fibroblasts, and inhibit the expression of miR-152 and promote the expression of AT1R mRNA and protein. Overexpression of miR-152 or silencing AT1R in AngII-induced cardiac fibroblasts can upregulate cell proliferation and promote collagen synthesis. The results of the dual luciferase reporter gene assay showed that AT1R is a miR-152 target gene, and miR-152 can negatively regulate the expression of AT1R. Simultaneous overexpression of miR-152 and AT1R in AngII-induced cardiac fibroblasts can reverse the inhibition of cell proliferation induced by overexpression of miR-152 alone, and up-regulate the inhibition of collagen Collagen I and Collagen III synthesis. **Conclusion:** miR-152 can inhibit the proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts induced by AngII, and its mechanism may be related to target the expression of AT1R.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81102437);郴州市科技局项目(czkj2016060)

作者简介:王晓景(1979-),女,本科,主治医师,研究方向:心血管内科,E-mail: dc112018@163.com,电话:13986168877

Δ 通讯作者:陈小亮(1975-),男,硕士,主任医师,研究方向:心血管内科,E-mail: 2290304514@qq.com,电话:0735-2343626

(收稿日期:2018-11-23 接受日期:2018-12-18)

Key words: miR-152; AT1R; AngII; Myocardial fibrosis; Collagen synthesis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)16-3055-07

前言

心肌纤维化是缺血性心脏病、高血压、心肌病和其他心血管疾病终末期心脏重塑中发生的重要病理变化,可引起心脏泵功能受损,最终导致心力衰竭^[1]。心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)的过度增殖和细胞外基质蛋白质如 I 型胶原蛋白(Collagen I)和 III 型胶原蛋白(Collagen III)的过度沉积是心肌纤维化的主要特征^[2]。据此,抑制心肌成纤维细胞过度增殖、减少胶原沉积是抑制心肌纤维化改善心血管疾病中心肌重塑的关键环节。血管紧张素 II (Angiotensin, Ang II)有助于胶原合成和心肌成纤维细胞增殖,在心肌纤维化中起重要作用^[3,4]。miRNA 是长度 18 至 25 个核苷酸的保守非编码 RNA,其通过与靶基因的 3' 非翻译区(Untranslated region, 3'UTR)中的互补序列碱基配对通过 mRNA 切割或翻译抑制来负调节基因表达^[5]。最近的研究表明 miRNA 在心肌纤维化的发病机制中起重要作用^[6,7]。

miR-152 是一种敏感的心脏应激标志物,使用 miRNA 阵列检测的研究显示糖尿病诱发的心肌病中 miR-152 显著上调^[8]。此外,在腹膜纤维化的大鼠模型中,腹膜中 miR-152 的表达下调明显,提示 miR-152 可能与腹膜纤维化的发病机理有关^[9]。这些研究提示 miR-152 可能在心脏纤维化中起重要作用。既往研究显示 Ang II 能够通过血管紧张素受体蛋白(Angiotensin II Type 1 Receptor, AT1R)参与调节心肌纤维化的发生^[10-12],而我们前期通过生物信息学软件预测发现 miR-152 和 AT1R 存在靶向结合位点。因此,本研究探讨了 miR-152 是否通过靶向调控 AT1R 的表达进而影响 Ang II 诱导心肌成纤维细胞的增殖和胶原蛋白的合成,以期抑制心肌纤维化提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠心肌成纤维细胞购自上海赛百慷生物技术股份有限公司;胰蛋白酶购自北京宝泰克生物科技有限公司,批号:2016056;Ang II 购自美国 Sigma 公司,批号:01542;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,批号:21063328;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:160126;二甲基亚砜购自美国 Amresco 公司,批号:320A0326;MTT 试剂购自北京索莱宝科技有限公司,批号:321E0518;二甲基联苯胺显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZLI-9032;Trizol 提取 RNA 试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,批号:AXF39396;荧光定量 PCR 检测试剂盒购自大连 Takara 公司,批号:B6038A;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司,批号:E1913;miR-152 mimic、mimic control、miR-152 inhibitor、inhibitor control 购自广州锐博生物科技有限公司;AT1R siRNA、siRNA、AT1R 过表达载体及空载均由上海吉玛制药技术有限公司构建;脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000、cDNA 合成试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,批号分别为:

11668029、C28025033;AT1R 抗体、Collagen I 抗体、Collagen III 抗体购自美国 R&D 公司,批号分别为:560331、1064253、512856,辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物公司,批号:E030122。

1.2 心肌成纤维细胞培养

大鼠心肌成纤维细胞培养在含 15%胎牛血清的 DMEM 培养基(含青霉素+链霉素双抗),培养条件为:体积分数为 5%的 CO₂、37℃恒温培养。隔天更换新的培养液,当细胞生长汇合度达 80%后以 0.25%胰蛋白酶消化细胞进行传代培养,取传至第三代的细胞用于后续实验。

1.3 细胞处理和分组

取处于对数生长期的大鼠心肌成纤维细胞,根据不同的处理进行分组:NC 组(心肌成纤维细胞未给予特殊处理),Ang II 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理),miR-NC 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理同时转染 mimic control),miR-152 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理同时转染 miR-152 mimic),si-AT1R 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理同时转染 AT1R siRNA),si-NC 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理同时转染 siRNA control),miR-152 inhibitor 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理同时转染 miR-152 inhibitor),inhibitor NC 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理同时转染 inhibitor control),miR-152+AT1R 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理同时转染 miR-152 mimic 和 AT1R 过表达载体),miR-152+Vector 组(心肌成纤维细胞给予 1 μmol/L Ang II 处理同时转染 miR-152 mimic 和空载)。细胞转染根据 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行操作。

1.4 细胞增殖能力检测

心肌成纤维细胞接种于 96 孔板中,置培养箱中继续培养 24 h,将培养基更换为不含血清的培养基继续培养 24 h,采用不同处理因素干预,分别在 0、24、48、72 h 后在没孔细胞中添加浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,置培养箱中继续孵育 4 h,弃上清液,再向没孔细胞中添加 150 μL 二甲基亚砜,于震荡仪上充分震荡 10 min。用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度值(OD 值),以测得的 OD 值表示细胞增殖能力。

1.5 qRT-PCR 检测

心肌成纤维细胞中总 RNA 经 Trizol 试剂提取获得,根据反转录试剂盒说明书合成 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增,分析 PCR 扩增结果并得到 Ct 值,采用 2^{-ΔΔCt} 法以 β-actin 为内参,对细胞中 miR-152、AT1R 相对定量。

1.6 Western blot 检测

收集待测各组成纤维细胞至 EP 管中,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,分别加入细胞裂解液置冰上裂解,提取细胞中总蛋白。通过 BCA 法检测蛋白浓度,取 40 μg 蛋白样品进行电泳分离,电泳结束后转移至硝酸纤维素膜上,将承载有目的蛋白的硝酸纤维素膜在含 5%脱脂奶粉的封闭液中孵育 1 h,分别加入

一抗 4℃ 孵育过夜。PBST 洗膜后加入二抗进行免疫共沉淀反应,反应复合物曝光,获取底片,以 β -actin 为对照蛋白,标准化后计算细胞中 Collagen I、Collagen III 和 AT1R 蛋白表达水平。其中 Collagen I 一抗 1:800 稀释, Collagen III 一抗 1:800 稀释, AT1R 一抗 1:1000 稀释,辣根过氧化物酶标记的二抗 1:3000 稀释。

1.7 双荧光素酶报告基因实验

对数生长期的心肌成纤维细胞接种于 24 孔细胞培养板中,接种密度为 5×10^4 /孔,置 37℃ 培养箱继续培养。将 miR-152 mimic 和对照、miR-152 inhibitor 和对照与 3'-UTR-Wild Type 或 3'-UTR-Mutant 共转染进心肌成纤维细胞,转染后继续培养 48 h,收集各组细胞检测海肾素酶和萤火虫素酶活性,以肾素酶活性/萤火虫素酶活性比值表示相对荧光素酶活性。

1.8 统计学分析

应用统计学软件 SPSS 21.0 进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表

示,多组间比较以单因素方差分析,两两组间比较以 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 对心肌成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成的影响

心肌成纤维细胞经 Ang II 刺激不同时间后,通过 MTT 法检测细胞增殖情况,结果如表 1 所示。与 NC 组比, Ang II 组细胞在 24、48、72 h 时 OD 值显著升高,差异有统计学意义($t_1=13.168, t_2=10.717, t_3=28.823, P < 0.05$),提示 Ang II 能够显著促进心肌成纤维细胞的增殖。在 Ang II 刺激心肌成纤维细胞 48 h 后,以 Western blot 检测细胞中胶原蛋白 Collagen I 和 Collagen III 的表达,结果如表 2 和图 1 所示。与 NC 组比, Ang II 组细胞中 Collagen I 和 Collagen III 的表达明显上调,差异有统计学意义($t_1=82.338, t_2=25.137, P < 0.05$),提示 Ang II 能够诱导心肌成纤维细胞表达胶原蛋白 Collagen I 和 Collagen III。

表 1 Ang II 对心肌成纤维细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of AngII on the proliferation of cardiac fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Groups	0 h	24 h	48 h	72 h
NC	0.10± 0.02	0.20± 0.02	0.40± 0.04	0.72± 0.03
Ang II	0.10± 0.01	0.37± 0.01*	0.75± 0.04*	1.32± 0.02*

注:与 NC 组比, $*P < 0.05$ 。

Note: Compared with the NC group, $*P < 0.05$.

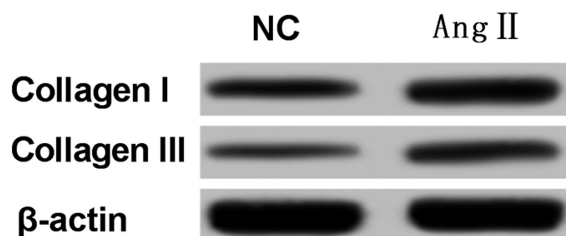


图 1 Western blot 检测细胞中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平

Fig. 1 Western blot analysis of Collagen I and Collagen III protein expression levels in cells

表 2 Ang II 诱导心肌成纤维细胞中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Collagen I protein	Collagen III protein
NC	1.00± 0.02	1.00± 0.03
Ang II	3.56± 0.05*	2.24± 0.08*

注:与 NC 组比, $*P < 0.05$ 。

Note: Compared with the NC group, $*P < 0.05$.

2.2 Ang II 对心肌成纤维细胞 miR-152 和 AT1R 表达的影响

采用 Ang II 刺激心肌成纤维细胞 48 h, 分别以 qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 miR-152 和 AT1R 的表达,见表 3 和图 2。与 NC 组比, Ang II 组心肌成纤维细胞中 miR-152 mRNA

表达显著下调($t=56.338, P < 0.05$), AT1R mRNA 和蛋白表达明显上调($t_1=18.210, t_2=34.457, P < 0.05$),提示 Ang II 干预心肌成纤维细胞能够抑制 miR-152 的表达,促进 AT1R mRNA 和蛋白的表达。

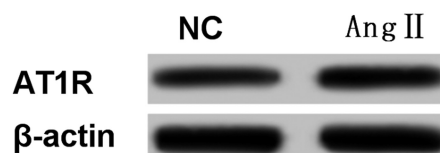


图 2 Western blot 检测心肌成纤维细胞中 AT1R 蛋白水平

Fig. 2 Western blot analysis of AT1R protein levels in cardiac fibroblasts

表 3 Ang II 对心肌成纤维细胞中 miR-152 和 AT1R 的表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of AngII on the expression of miR-152 and AT1R in cardiac fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Groups	miR-152 mRNA	AT1R mRNA	AT1R protein
NC	0.99± 0.01	1.00± 0.04	1.00± 0.03
Ang II	0.53± 0.01*	2.43± 0.13*	2.16± 0.05*

注:与 NC 组比, $*P < 0.05$ 。

Note: Compared with the NC group, $*P < 0.05$.

2.3 过表达 miR-152 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中增殖及胶原蛋白合成的影响

在心肌成纤维细胞中转染 miR-152 mimic 48 h 后, qRT-PCR 检测细胞中 miR-152 的表达水平,结果如表 4 显示。

与 miR-NC 组比, miR-152 组细胞中 miR-152 的水平明显升高 ($t=18.046, P<0.05$), 提示转染 miR-152 mimic 能够成功上调心肌成纤维细胞中 miR-152 的表达。如表 5 所示, 过表达 miR-152 能够抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞的增殖活力, 较 miR-NC 组显著上调 ($t_1=10.410, t_2=7.141, t_3=32.533, P<0.05$)。如表 6 和图 3 所示, 与 miR-NC 组比, miR-152 组细胞 Collagen I、Collagen III 和 AT1R 蛋白表达水平显著降低 ($t_1=17.644, t_2=17.368, t_3=15.935, P<0.05$)。

表 5 过表达 miR-152 能够抑制心肌成纤维细胞的增殖活力 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Overexpression of miR-152 inhibits the proliferation of cardiac fibroblasts ($\bar{x}\pm s$)

Groups	0 h	24 h	48 h	72 h
miR-NC	0.11± 0.02	0.37± 0.02	0.72± 0.04	1.29± 0.01
miR-152	0.10± 0.02	0.20± 0.02*	0.55± 0.01*	0.87± 0.02*

注: 与 miR-NC 组比, * $P<0.05$ 。

Note: Compared with the miR-NC group, * $P<0.05$.

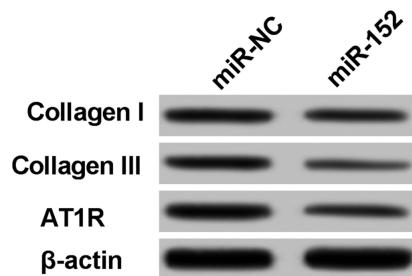


图 3 Western blot 检测心肌成纤维细胞中 Collagen I、Collagen III 和 AT1R 蛋白水平

Fig.3 Western blot analysis of Collagen I, Collagen III and AT1R protein levels in cardiac fibroblasts

2.4 沉默 AT1R 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中增殖及胶原蛋白的表达的影响

在心肌成纤维细胞中转染 AT1R siRNA 48 h 后, qRT-PCR 检测细胞中 AT1R 的表达水平, 结果如表 7 所示。与 si-NC 组比, si-AT1R 组细胞中 AT1R mRNA 的水平明显降低 ($t=21.301, P<0.05$), 提示转染 AT1R siRNA 能够成功沉默心肌成纤维细胞中 AT1R mRNA 的表达。如表 8 所示, 与 si-NC 组比, 沉默 AT1R 能够抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞的增殖活力 ($t_1=12.394, t_2=6.971, t_3=26.332, P<0.05$)。如表 9 和图 4 所示, 与 si-NC 组比, si-AT1R 组细胞 Collagen I、Collagen III 和 AT1R 蛋白表达水平显著降低 ($t_1=13.164, t_2=22.098, P<0.05$)。

表 7 转染 AT1R siRNA 能够沉默心肌成纤维细胞中 AT1R 的表达 ($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Transfection of AT1R siRNA can silence the expression of AT1R in cardiac fibroblasts ($\bar{x}\pm s$)

Groups	AT1R mRNA
si-NC	1.01± 0.04
si-AT1R	0.46± 0.02*

注: 与 si-NC 组比, * $P<0.05$ 。

Note: Compared with the si-NC group, * $P<0.05$.

表 4 转染 miR-152 mimic 能够上调心肌成纤维细胞中 miR-152 的表达 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Transfection of miR-152 mimic can up-regulate the expression of miR-152 in cardiac fibroblasts ($\bar{x}\pm s$)

Groups	miR-152 mRNA
miR-NC	1.01± 0.04
miR-152	1.85± 0.07*

注: 与 miR-NC 组比, * $P<0.05$ 。

Note: Compared with the miR-NC group, * $P<0.05$.

表 6 过表达 miR-152 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中 Collagen I、Collagen III 和 AT1R 蛋白水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of overexpression of miR-152 on Collagen I, Collagen III and AT1R protein levels in AngII-induced cardiac fibroblasts ($\bar{x}\pm s$)

Groups	Collagen I protein	Collagen III protein	AT1R protein
miR-NC	0.99± 0.04	0.99± 0.05	1.00± 0.04
miR-152	0.57± 0.01*	0.45± 0.02*	0.54± 0.03*

注: 与 miR-NC 组比, * $P<0.05$ 。

Note: Compared with the miR-NC group, * $P<0.05$.

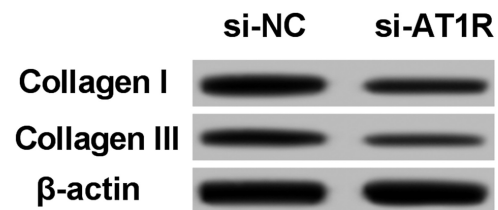


图 4 Western blot 检测心肌成纤维细胞中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白水平

Fig. 4 Western blot analysis of Collagen I and Collagen III protein levels in cardiac fibroblasts

2.5 双荧光素酶报告基因实验验证 AT1R 和 miR-152 的靶向结合关系

我们通过生物信息学软件 mircode 预测 miR-152 和 AT1R 存在结合位点, 结果见图 5 所示。当心肌成纤维细胞共转染 AT1R 3'-UTR 野生型和 miR-152 mimic 和 mimic control 以及 miR-152 inhibitor 和 inhibitor control 时, 转染 miR-152 mimic 较 mimic control 的相对荧光素酶活性下调 ($P<0.05$); 转染 miR-152 inhibitor 较 inhibitor control 的相对荧光素酶活性上调 ($P<0.05$)。当心肌成纤维细胞共转染 AT1R 3'-UTR 突变型时, 其与各自对照组比较相对荧光素酶活性无统计学差异 ($P>0.05$), 见表 10。Western blot 进一步验证 miR-152 能够负向调控 AT1R 的表达, 见表 10 和图 6。

表 8 沉默 AT1R 能够抑制心肌成纤维细胞的增殖活力($\bar{x} \pm s$)Table 8 Silencing AT1R can inhibit the proliferation of cardiac fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Groups	0 h	24 h	48 h	72 h
si-NC	0.11± 0.02	0.36± 0.02	0.72± 0.04	1.30± 0.02
si-AT1R	0.10± 0.02	0.20± 0.01*	0.54± 0.02*	0.87± 0.02*

注:与 si-NC 组比, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with the si-NC group, * $P < 0.05$.表 9 沉默 AT1R 对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$)Table 9 Effect of silencing AT1R on Collagen I and Collagen III protein levels in AngII-induced cardiac fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Collagen I protein	Collagen III protein
si-NC	1.00± 0.03	1.01± 0.02
si-AT1R	0.62± 0.04*	0.55± 0.03*

注:与 si-NC 组比, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with the si-NC group, * $P < 0.05$.

AT1R 3'-UTR-WT 5'...CUUGUAAAGGUGCU**GCACUGG**...3'
miR-152 3'...GGUUCAAGACAGU**ACGUGACU**...5'
AT1R 3'-UTR-MUT 5'...CUUGUAAAGGUGCU**CGUGACG**...3'

图 5 mircode 软件预测 miR-152 和 AT1R 靶向结合示意图

Fig. 5 Schematic diagram of mircode software predicting miR-152 and AT1R targeting

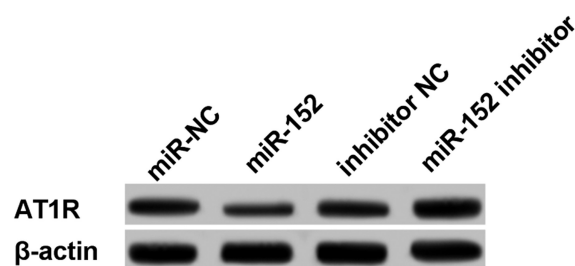


图 6 Western blot 检测心肌成纤维细胞中 AT1R 蛋白水平

Fig. 6 Western blot analysis of AT1R protein levels in cardiac fibroblasts

表 10 miR-152 靶向 AT1R 3'-UTR 区域荧光活性及 AT1R 的蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)Table 10 miR-152 targets AT1R 3'-UTR region fluorescence activity and AT1R protein expression level ($\bar{x} \pm s$)

Groups	AT1R(WT)	AT1R(MUT)	AT1R protein
miR-NC	0.99± 0.10	0.97± 0.02	0.99± 0.11
miR-152	0.36± 0.03*	0.99± 0.07	0.33± 0.03*
inhibitor NC	1.01± 0.03	1.00± 0.05	1.01± 0.03
miR-152 inhibitor	2.20± 0.21*	1.02± 0.02	2.19± 0.22*
F	126.755	0.634	115.416
P	0.000	0.614	0.000

注:与 si-NC 组比, * $P < 0.05$ 。Note: Compared with the si-NC group, * $P < 0.05$.

2.6 miR-152 靶向调控 AT1R 影响 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖及胶原蛋白的合成

在心肌成纤维细胞中共转染 miR-152 mimic 和 AT1R 过表达载体, MTT 实验检测结果如表 11 所示。与 miR-NC 组比, miR-152 组细胞增殖活力明显降低 ($P < 0.05$), 与 miR-152+Vector 组比, miR-152+AT1R 组细胞增殖活力明显升高 ($P < 0.05$), 提示过表达 AT1R 能够回调单独过表达 miR-152 诱导的细胞增殖活力的抑制作用。如表 12 所示和图 7 所示, 与 miR-NC 组比, miR-152 组细胞中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 与 miR-152+Vector 组比, miR-152+AT1R 组细胞中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 提示过表达 AT1R 能够逆转单独过表

达 miR-152 诱导的细胞中 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达的抑制作用。与 miR-NC 组比, miR-152 组细胞中 AT1R mRNA 和蛋白明显降低 ($P < 0.05$), 与 miR-152+Vector 组比, miR-152+AT1R 组细胞中 AT1R mRNA 和蛋白的表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。以上结果进一步表明 miR-152 能够负向调控 AT1R mRNA 和蛋白的表达。

3 讨论

心肌纤维化主要表现为心肌成纤维细胞增殖以及细胞外基质蛋白 I 型和 III 型胶原蛋白沉积, 主要涉及心力衰竭、心律失常、心源性猝死和其他严重并发症^[13]。既往研究表明 Ang II 通过细胞受体促进心肌成纤维细胞的生长和细胞外基质蛋白

表 11 共转染对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖活力的影响($\bar{x} \pm s$)Table 11 Effect of co-transfection on proliferation of myocardial fibroblasts induced by AngII ($\bar{x} \pm s$)

Groups	0 h	24 h	48 h	72 h
miR-NC	0.11± 0.02	0.39± 0.01	0.72± 0.03	1.30± 0.13
miR-152	0.10± 0.02	0.20± 0.02*	0.55± 0.01*	0.88± 0.08*
miR-152+Vector	0.10± 0.02	0.20± 0.03	0.54± 0.02	0.87± 0.08
miR-152+AT1R	0.11± 0.03	0.26± 0.01&	0.63± 0.02&	1.11± 0.11&
F	0.191	64.200	46.667	12.153
P	0.900	0.000	0.000	0.002

注:与 miR-NC 组比, * $P < 0.05$; 与 miR-152+Vector 组比, & $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the miR-NC group, * $P < 0.05$; Compared with the miR-152+Vector group, & $P < 0.05$.

表 12 共转染对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞 Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)Table 12 Effect of co-transfection on the expression of Collagen I and Collagen III proteins in AngII-induced cardiac fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Collagen I protein	Collagen III protein
miR-NC	0.99± 0.10	1.00± 0.04
miR-152	0.53± 0.05*	0.45± 0.03*
miR-152+Vector	0.55± 0.06	0.47± 0.02
miR-152+ AT1R	0.87± 0.09*	0.74± 0.01*
F	26.364	269.467
P	0.000	0.000

注:与 miR-NC 组比, * $P < 0.05$; 与 miR-152+Vector 组比, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the miR-NC group, * $P < 0.05$; Compared with the miR-152+Vector group, * $P < 0.05$.

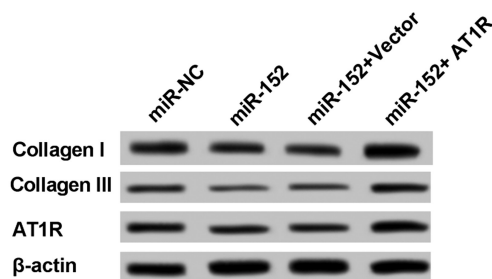


图 7 Western blot 检测心肌成纤维细胞中 Collagen I、Collagen III 和 AT1R 蛋白水平

Fig.7 Western blot analysis of Collagen I, Collagen III and AT1R protein levels in cardiac fibroblasts

的表达,在心肌重塑中发挥重要作用^[14]。本实验通过 Ang II 刺激心肌成纤维细胞后,发现细胞增殖活性显著升高,细胞中胶原蛋白 Collagen I 和 Collagen III 表达水平也明显上调,与之前的研究相一致。

miRNA 广泛参与心肌纤维化的发病机制,如 miR-133a^[15]、miR-203^[16]、miR-21^[17]和 miR-29b^[18]在内的几种 miRNA 通过控制胶原合成和降解,成纤维细胞增殖以及关键信号通路参与心脏纤维化调节。多项研究表明抑制 AT1R 能够阻碍心肌成纤维细胞的增殖,在心肌纤维化中发挥重要作用^[19,20]。在本研究中,miR-152 在由 Ang II 诱导的心肌纤维化模型中显著下调,AT1R mRNA 和蛋白表达显著上调。此外,在 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中过表达 miR-152 能够减弱细胞增殖活力,降低

表 13 共转染对 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞 AT1R mRNA 和蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$)Table 13 Effect of co-transfection on the mRNA and protein levels of AT1R induced by AngII in cardiac fibroblasts ($\bar{x} \pm s$)

Groups	AT1R mRNA	AT1R protein
miR-NC	1.00± 0.05	1.02± 0.01
miR-152	0.49± 0.03*	0.53± 0.01*
miR-152+Vector	0.54± 0.02	0.54± 0.02
miR-152+ AT1R	1.11± 0.07&	1.08± 0.06*
F	137.425	254.357
P	0.000	0.000

注:与 miR-NC 组比, * $P < 0.05$; 与 miR-152+Vector 组比, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the miR-NC group, * $P < 0.05$; Compared with the miR-152+Vector group, * $P < 0.05$.

细胞中胶原合成,抑制细胞中 AT1R 的表达。同样,在 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中沉默 AT1R 能够减弱细胞增殖活力,降低细胞中胶原合成。表明 Ang II 诱导的心肌纤维化部分是涉及 miR-152 及 AT1R 的途径介导的,且提示 miR-152 和 AT1R 的表达呈负相关。在癌症研究领域,miR-152 被认为是细胞存活和增殖的关键调节因子。在肝癌中,研究显示 miR-152 通过靶向 DcR3 和相关信号传导途径的激活抑制细胞增殖^[21]。Li 等发现 miR-152 通过靶向 PIK3R3 在结直肠癌中起肿瘤抑制剂的作用^[22]。在本研究中,miR-152 在心肌成纤维细胞增殖中同样起

抑制作用。

研究表明 AT1R 受体阻滞可以阻碍心肌梗死后心肌纤维化的发生。AT1R 参与负性心脏重塑过程,AT1R 过表达可诱导心脏肥大和心脏功能障碍^[23],而 AT1R 的抑制可预防心脏肥大、间质纤维化、血管生成和心脏损伤^[24]。但 miR-152 和 AT1R 在心肌纤维化中的作用目前尚未见报道。本课题组前期通过生物信息学预测发现 miR-152 和 AT1R 3'-UTR 序列存在互补关系,且本实验结果显示在心肌成纤维细胞中 miR-152 和 AT1R 的表达明显呈负相关。本实验进一步通过双荧光素酶报告基因实验验证了 AT1R 是 miR-152 的靶基因,且 miR-152 能够负向调节 AT1R 的表达。为探讨 miR-152 靶向 AT1R 介导心肌纤维化过程,本实验在 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞中通过共转染同时过表达 miR-152 和 AT1R,探讨对心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响,结果显示过表达 miR-152 和 AT1R 能够缓解由过表达 miR-152 引起的心肌成纤维细胞的增殖抑制作用,回调由过表达 miR-152 导致的胶原合成抑制作用。这些结果表明 miR-152 靶向 AT1R 调节 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成。

综上所述,本研究表明 Ang II 能够诱导大鼠心肌成纤维细胞中 miR-152 的表达。miR-152 可能通过调节靶基因 AT1R 介导 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原合成,是 Ang II 介导的心肌纤维化的新调节因子,可作为心肌纤维化的新型治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Ravassa S, López B, Querejeta R, et al. Phenotyping of myocardial fibrosis in hypertensive patients with heart failure. Influence on clinical outcome[J]. J Hypertens, 2017, 35(4): 853-861
- [2] Xu X, Tan X, Tampe B, et al. Epigenetic balance of aberrant Rasal1 promoter methylation and hydroxymethylation regulates cardiac fibrosis[J]. Cardiovasc Res, 2015, 105(3): 279-291
- [3] Wang T, Pan D, Zhang Y, et al. Luteolin antagonizes angiotensinII-dependent proliferation and collagen synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2015, 16(5): 430-439
- [4] 侯永兰, 李石林, 刘玲玲. MicroRNA-137 与 Ang II 在自发性高血压大鼠心脏重构中的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(7): 52-56
- [5] Ludwig N, Leidinger P, Becker K, et al. Distribution of miRNA expression across human tissues [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(8): 3865-3877
- [6] 高雨秋, 焦磊, 张莹. MicroRNA 及 lncRNA 在心肌纤维化中的研究进展[J]. 中国医药导报, 2017, 14(21): 38-41
- [7] Zhou Y, Deng L, Zhao D, et al. MicroRNA-503 promotes angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting Apelin-13[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(3): 495-505
- [8] Adeghate E, Singh J. Structural changes in the myocardium during diabetes-induced cardiomyopathy [J]. Heart Fail Rev, 2014, 19(1): 15-23
- [9] Lin F, Wu X, Zhang H, et al. A microrna screen to identify regulators of peritoneal fibrosis in a rat model of peritoneal dialysis [J]. Bmc Nephrology, 2015, 16(1): 48-57
- [10] Yu X, Li H, Murphy T A, et al. AngiotensinII Type 1 Receptor Autoantibodies in Postural Tachycardia Syndrome [J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(8): e008351
- [11] 霍苗苗, 程变巧, 林伟国, 等. 扶正化痰方对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝纤维化及 ACE-Ang II-AT1R 轴的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2018, 42(2): 114-119
- [12] Tadevosyan A, Xiao J, Surinkaew S, et al. Intracellular Angiotensin-II Interacts With Nuclear Angiotensin Receptors in Cardiac Fibroblasts and Regulates RNA Synthesis, Cell Proliferation, and Collagen Secretion[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(4): e004965
- [13] Broberg C S, Burchill L J. Myocardial factor revisited: The importance of myocardial fibrosis in adults with congenital heart disease[J]. Int J Cardiol, 2015, 189(1): 204-210
- [14] Zhang Z Z, Cheng Y W, Jin H Y, et al. The sirtuin 6 prevents angiotensin II-mediated myocardial fibrosis and injury by targeting AMPK-ACE2 signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(42): 72302-72314
- [15] 谭文鹏, 李文杰, 黄兆琦. 上调 miR-133a 表达水平对自发性高血压大鼠心肌纤维化的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(6): 1142-1146
- [16] He Q, Wang C M, Qin J Y, et al. Effect of miR-203 expression on myocardial fibrosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(4): 837-842
- [17] Zhou X L, Xu H, Liu Z B, et al. miR-21 promotes cardiac fibroblast-to-myofibroblast transformation and myocardial fibrosis by targeting Jagged1[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(8): 3816-3824
- [18] Zhang Y, Huang X R, Wei L H, et al. miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- β /Smad3 signaling[J]. Mol Ther, 2014, 22(5): 974-85
- [19] 李晓亚, 卜夏威, 曹晓倩, 等. 鳖甲煎口服液对肝纤维化大鼠 ACE-Ang II-AT1R 轴的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40(4): 270-273
- [20] Gao Y, Kang L, Li C, et al. Resveratrol Ameliorates Diabetes-Induced Cardiac Dysfunction Through AT1R-ERK/p38 MAPK Signaling Pathway[J]. Cardiovasc Toxicol, 2016, 16(2): 130-137
- [21] 谢优, 史振鸿, 熊货杰, 等. 微小 RNA-152 靶向 DcR3 对 HepG2 细胞相关信号通路的作用[J]. 实用医技杂志, 2015, 22(9): 915-918
- [22] Li B, Xie Z, Li B. miR-152 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting PIK3R3 [J]. Tumour Biol, 2016, 37(8): 1-10
- [23] Lukowski R, Straubinger J, Ruth P. Cyclic GMP/cGMP-dependent protein kinase type I signaling and cysteine-rich LIM-only protein 4 in AngII/AT1R-induced heart hypertrophy and fibrosis [J]. Bmc Pharmacol Toxicol, 2015, 16(S1): 1-2
- [24] Yang C, Liu Z, Liu K, et al. Mechanisms of Ghrelin anti-heart failure: inhibition of Ang II-induced cardiomyocyte apoptosis by down-regulating AT1R expression[J]. Plos One, 2014, 9(1): e85785