

高表达 microRNA-22 对缺氧心肌细胞的保护作用及机制

凌琳¹, 凌子成², 顾少华³

(1.苏州大学附属第一医院心血管内科,江苏省苏州市 215006;2.扬州大学医学院,
江苏省扬州市 225000;3.昆山市第三人民医院,江苏省昆山市 215300)

[关键词] microRNA-22; 心肌细胞; 细胞特性

[摘要] **目的** 观察高表达 microRNA-22 对体外培养的缺氧心肌细胞的保护作用及机制。**方法** 用携带 microRNA-22 的腺病毒载体和空载体转染体外缺氧条件下培养的原代心肌细胞,检测高表达 microRNA-22 后心肌细胞生物学特性的改变。采用 MTT 检测细胞活力,EdU 检测细胞 DNA 合成能力,Caspase-3 检测细胞凋亡情况。**结果** 表达 microRNA-22 的腺病毒载体成功转染原代心肌细胞,流式细胞仪检测绿色荧光蛋白阳性细胞比例>95%,高表达 microRNA-22 从蛋白水平显著下调 PTEN 表达。与空载腺病毒组相比,高表达 microRNA-22 组细胞核增殖明显增加,细胞生长更快,细胞活力增加,细胞凋亡减少。**结论** 体外高表达 microRNA-22 能保护缺氧条件下的心肌细胞。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Over-expression of microRNA-22 protects cardiomyocytes from ischemic injury

LING Lin¹, LING Zi-Cheng², GU Shao-Hua³

(1.Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China; 2.Medical School of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225000, China; 3.The Third People's Hospital of Kunshan, Kunshan, Jiangsu 215300, China)

[KEY WORDS] MicroRNA-22; Cardiomyocyte; Cell activities

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protection effect of microRNA-22 on ischemic cardiomyocyte. **Methods** Cardiomyocytes were transfected with microRNA-22 and cell activities were assessed. MTT was used to assess cell activities, EdU to assess DNA proliferation and Caspase-3 to assess cell apoptosis. **Results** MicroRNA-22 was transduced successfully using adeno-virus. The transduction efficiency reached 95%. Over-expression of microRNA-22 down-regulated PTEN level. Over-expression of microRNA-22 increased cell activities, DNA proliferation and decreased cell apoptosis. **Conclusion** Over-expression of microRNA-22 protected cardiomyocytes from ischemic injury.

急性心肌梗死是心肌缺血坏死性疾病,严重危害人民群众生命安全^[1]。心肌梗死后,大量心肌细胞由于缺血、缺氧及细胞代谢障碍,最终发生细胞凋亡、坏死、自噬或功能障碍^[2-5];在长期左心室压力负荷下,最终导致心室扩张及心力衰竭^[6-7]。在急性心肌梗死后,减少心肌细胞凋亡,延缓心室重构从而改善心功能,是心肌修复的关键^[8-9]。近年来研究表明 microRNA 在人类或动物心脏疾病,如心肌缺血、心肌肥厚中起重要的调节作用^[10-11]。microRNA-22 是新近发现的 microRNA 家族的一员,在心肌及骨骼肌中

广泛表达^[12-13]。主动脉弓缩窄压力负荷模型中,microRNA-22 基因敲除小鼠心脏收缩功能失代偿更显著,心脏扩张程度增加,同时心肌细胞编码骨架蛋白的肌营养不良蛋白基因(Dystrophin)、LIM 域结合蛋白 3(Ldb3)及肌联蛋白(Titin)表达减少;心肌对多巴酚丁胺的正性肌力反应消失,胞浆内 Ca²⁺瞬变电流减少,同时 Ca²⁺依赖的 ATP 酶活性下降;提示 microRNA-22 对于心脏应力条件下心肌细胞正常结构维持及 Ca²⁺电流稳定起重要调节作用^[14-15]。目前,关于 microRNA-22 对缺血缺氧心肌细胞的保护作用

[收稿日期] 2017-02-17

[修回日期] 2017-06-25

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目(BK20140296);苏州市科教兴卫项目(KJXW2013004);苏州大学校级青年教师自然科学基金项目(SDY2013A29)

[作者简介] 凌琳,博士,主治医师,主要研究方向为心肌梗死后心肌修复的基础与临床研究,E-mail 为 Linglin@suda.edu.cn。

尚未见报道。本研究中,我们用携带 microRNA-22 的腺病毒载体转染体外缺氧条件下培养的原代心肌细胞,在体外观察高表达 microRNA-22 对缺氧心肌细胞的保护作用,为 microRNA-22 进一步用于心肌修复提供理论及实践基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57/BL6 雄性乳鼠,1~3 天龄,购自苏州大学实验动物中心,正常饲料喂养,12/12 节律光照,自由饮水。本研究遵循美国国家卫生机构发布的《实验动物保护和应用指南》(1996 年修订);所有实验动物使用和实验操作遵循苏州大学附属第一医院动物实验管理委员会的相应规定。

1.2 仪器和试剂

超净工作台(苏净集团安泰公司),CO₂ 培养箱(Thermo),相差显微镜(OLYMPUS CK40),荧光显微镜(ZEISS),高速离心机(Hevaeus),超低温冰箱(Thermo),流式细胞仪(Thermo)。

1.3 小鼠原代心肌细胞分离培养和缺氧模型构建

无菌条件下取心脏,剪碎后加入 0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA 消化,分次收集消化液,离心后接种于 25 cm² 培养瓶,37℃、5%CO₂ 饱和湿度孵箱中培养;原代心肌细胞于缺氧实验前更换含 1%胎牛血清的培养液培养 24 h 后更换缺氧缓冲液,其后将细胞置于配气(95%N₂+5%CO₂)饱和的容器中,37℃培养模拟缺氧环境。

1.4 高表达 microRNA-22 腺病毒载体转染细胞

腺病毒载体构建成功后,以不同 MOI 转染心肌细胞,采用 Taqman RT-PCR 检测 microRNA-22 表达水平,流式细胞仪检测绿色荧光 GFP 强度,确定最佳转染条件;进一步采用 qRT-PCR 验证 microRNA-22 表达情况,采用 Western blot 检测下游 PTEN 蛋白表达情况。实验细胞分为空载腺病毒组和高表达 microRNA-22 组。

1.5 细胞活力测定

单细胞悬液接种于 96 孔板内,待细胞贴壁生长后,各孔加入 MTT 工作液孵育,以二甲基亚砜(DMSO)为空白对照,酶标分光光度计测定各孔光吸收值。测定结果与每孔内活细胞数呈正相关,可直接反映出细胞活力。

1.6 细胞 DNA 合成能力测定

采用 Promega 公司的 Click-iT[®] EdU 试剂盒检

测细胞 DNA 合成情况。按照试剂盒说明操作,当细胞融合度达到 60%左右,加入浓度为 20 μmol/L 的 EdU 溶液,与细胞共同培养 12 h 后洗涤固定,破膜显色,荧光显微镜下观察细胞 EdU 表达情况。蓝色为细胞核,红色为核增殖细胞核,计数核增殖细胞核数量即可反映细胞 DNA 合成能力。随机观察 10 个视野,计算每个视野下 EdU 阳性细胞的百分比。

1.7 Caspase-3 检测细胞凋亡活性

采用 Promega 公司的 Caspase Assay System 比色法检测半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)活性,可反映细胞凋亡情况。具体操作流程见试剂盒说明。取生长状态良好的细胞,经过洗涤及裂解后,将含有裂解蛋白的细胞上清液取出,加入 50 μL 的反应液及底物液,37℃避光孵育 4 h 后用酶标仪在 λ=405 nm 测定其吸光度。以试剂盒中提供的裂解液和反应液作为空白对照。样品 OD 值=所测 OD 值-空白对照 OD 值。

1.8 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件包完成所有数据的处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 Student's-t 检验,多组均数比较采用 ANOVA 方差分析,采用 χ^2 检验进行分析, $P < 0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高表达 microRNA-22 腺病毒转染心肌细胞后下调 PTEN 表达

采用高表达 microRNA-22 的腺病毒载体转染原代心肌细胞,流式细胞仪检测绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞比例>95%,提示细胞成功表达共转染的 GFP(图 1)。

转染后,进一步采用 qRT-PCR 验证 microRNA-22 表达情况,结果提示高表达 microRNA-22 的腺病毒转染后,与空载腺病毒组相比,microRNA-22 表达明显升高 10.75 倍,提示转染成功(图 2)。

进一步 Western blot 结果提示,高表达 microRNA-22 后,从蛋白水平显著下调 PTEN 表达,验证 PTEN 为 microRNA-22 调控的下游靶基因(图 3)。

2.2 高表达 microRNA-22 增加心肌细胞 DNA 合成

转染成功后,EdU 检测两组细胞核增殖情况(红色为 DNA 合成阳性细胞核,蓝色为所有细胞核)。与空载腺病毒组相比,高表达 microRNA-22 组细胞核增殖明显增加($P < 0.05$;图 4)。

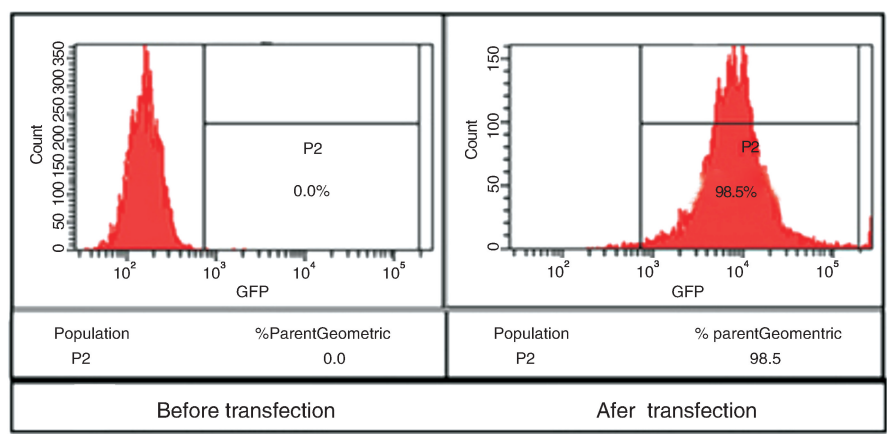


图 1. 腺病毒转染阳性率
Figure 1. Positive rate of adeno-virus transduction

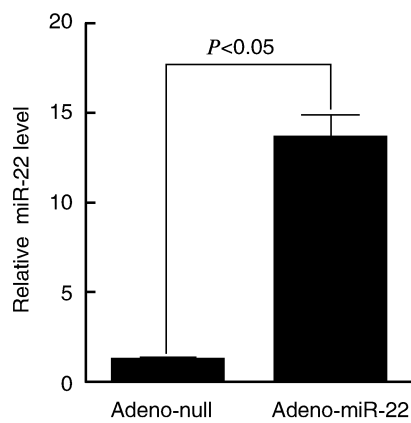


图 2. 腺病毒转染后 microRNA-22 表达量
Figure 2. MicroRNA-22 quantification after adeno-virus transduction

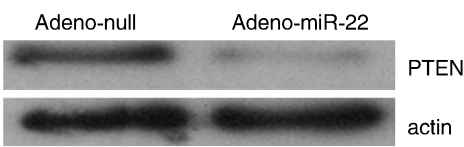


图 3. PTEN 蛋白表达情况
Figure 3. PTEN protein quantification

2.3 高表达 microRNA-22 增加心肌细胞活力,减少细胞凋亡

microRNA-22 转染后对心肌细胞进行细胞学特性观察,绘制细胞生长曲线,采用 MTT 法检测细胞活力, Caspase-3 法检测细胞凋亡。与空载腺病毒组相比,高表达 microRNA-22 组细胞活力增加,细胞生长更快($P < 0.05$,图 5);细胞凋亡减少($P < 0.05$,图 5)。

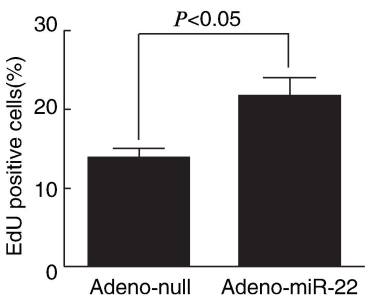
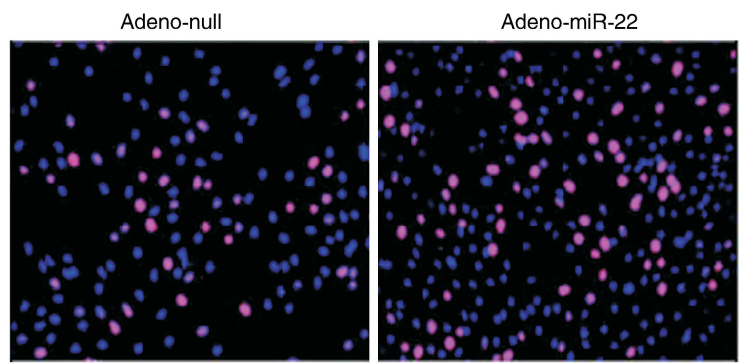


图 4. EdU 检测细胞核增殖情况
Figure 4. Cell DNA proliferation quantification

3 讨论

急性心肌梗死导致心室扩张及心力衰竭^[6-7]。除传统药物外,在分子医学领域积极探索新的心肌

修复方法,是当前的研究热点。
近年来研究表明 microRNA 在人类或动物心脏疾病,如心肌缺血、心肌肥厚中起重要的调节作用。microRNA 是长约 21~23 个核苷酸的内源性非蛋白

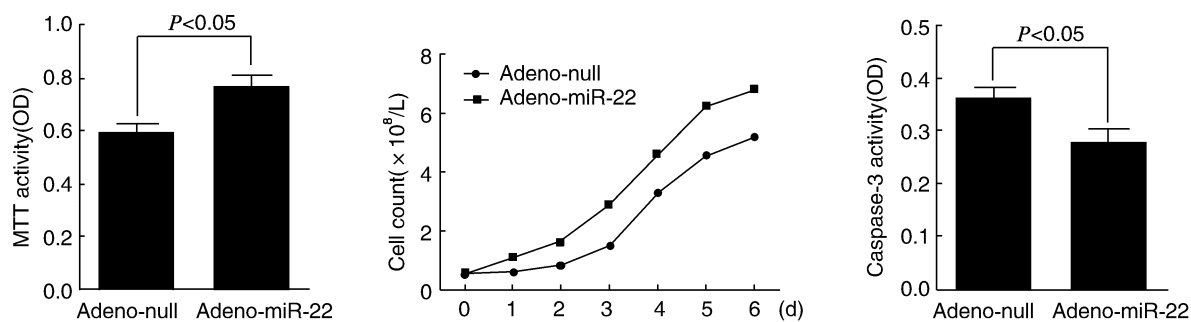


图 5. 心肌细胞活力和凋亡

Figure 5. Cardiomyocyte activity and apoptosis

编码 RNA,通过识别靶基因 mRNA 的 3' 端相应序列,调节靶基因 mRNA 的翻译效率或稳定性,是重要的转录后调控分子,参与调控体内的多种生理和病理过程,包括细胞发育、分化、代谢、生长、增殖和凋亡等^[10-11]。目前已有众多 microRNA 被发现与心肌缺血后心肌修复密切相关。研究表明^[12],心肌缺血再灌注损伤模型中,与对照组相比,microRNA-494 高表达的转基因小鼠梗死面积显著减少,心功能明显改善,其机制为抑制促凋亡基因 PTEN、ROCK1 和 CaMKII δ 表达,激活 PI3K/AKT 通路,减少 Caspase-3 活性及 LDH 释放,从而促进细胞生存,减少细胞凋亡。证实了在心肌缺血再灌注损伤模型中,采用外源性基因导入方法调控 microRNA 能够修复缺血后受损的心肌,改善心功能。更多研究发现,心肌缺血后,过表达 microRNA-1 能够促进心肌细胞凋亡,其机制为抑制抗凋亡基因 Bcl-2 和 IGF-1 表达,诱导细胞进入程序性凋亡过程;而过表达 microRNA-21 能够减少细胞凋亡,其机制为干扰促凋亡基因 PDCD4 和 AP-1 的活性,同时抑制 PTEN 和 SP-1 活性,激活 ERK-MAPK 通路,从而促进细胞生存及细胞因子的分泌,介导心肌梗死后心功能改善^[16-17]。

microRNA-22 作为新近发现的 microRNA 家族的一员,在心肌及骨骼肌中广泛表达^[13-14]。microRNA-22 同时参与调控细胞生存及凋亡过程。在体外脑老化模型中,高表达 microRNA-22 能够减少神经元的降解,增强神经元的活性;能够保护神经元,减少缺血再灌注损伤^[18-19]。

本研究发现,体外培养的原代心肌细胞高表达 microRNA-22 后,心肌细胞活力增加,细胞生长更快,细胞 DNA 增殖能力增强,缺氧诱导的细胞凋亡减少;证实 microRNA-22 可以保护缺氧条件下的心肌细胞。进一步分析发现,高表达 microRNA-22 下调 PTEN 蛋白表达,而 PTEN 基因参与多条细胞生存相关通路,在调控细胞生存及凋亡过程中起重要

作用。提示 microRNA-22 这种细胞保护作用可能是通过调节 PTEN 来实现的。

综上所述,体外培养的原代心肌细胞高表达 microRNA-22 后,心肌细胞活力增加,缺氧诱导的细胞凋亡减少;高表达 microRNA-22 能减轻心肌细胞缺氧损伤。

[参考文献]

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2015, 131: e29-e322.
- [2] Huttin O, Coiro S, Selton-Suty C, et al. Prediction of left ventricular remodeling after a myocardial infarction: role of myocardial deformation: a systematic review and Meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0168349.
- [3] Shah AM, Hung CL, Shin SH, et al. Cardiac structure and function, remodeling, and clinical outcomes among patients with diabetes after myocardial infarction complicated by left ventricular systolic dysfunction, heart failure, or both [J]. *Am Heart J*, 2011, 162: 685-691.
- [4] Dhalla NS, Rangi S, Babick AP, et al. Cardiac remodeling and subcellular defects in heart failure due to myocardial infarction and aging [J]. *Heart Fail Rev*, 2012, 17: 671-681.
- [5] Manrique A, Lemarchand P, Delasalle B, et al. Predictors of ventricular remodelling in patients with reperfused acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction candidates for bone marrow cell therapy: insights from the BONAMI trial [J]. *Eur J Nucl Med Mol I*, 2016, 43: 740-748.
- [6] Huttin O, Mandry D, Eschalier R, et al. Cardiac remodeling following reperfused acute myocardial infarction is linked to the concomitant evolution of vascular function as assessed by cardiovascular magnetic resonance [J]. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2017, 19: 2-4.

- [7] Ertl G, Brenner S, Angermann CE. Cardiac remodeling after myocardial infarction: clinical practice update [J]. *Herz*, 2017, 42: 107-120.
- [8] Roubille F, Lacampagne A. New drug avenues for cardioprotection in patients with acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2014, 14: 73-77.
- [9] Song M, Jang H, Lee J, et al. Regeneration of chronic myocardial infarction by injectable hydrogels containing stem cell homing factor SDF-1 and angiogenic peptide Ac-SDKP [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 2 436-445.
- [10] Bauters C, Pinet F. MicroRNAs as circulating biomarkers of left ventricular remodeling after myocardial infarction [J]. *Cardiology*, 2016, 133: 262-263.
- [11] Martinez-Fernandez A. MicroRNA therapy for the failing heart [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014, 7: 393-394.
- [12] Wang X, Zhang X, Ren XP, et al. MicroRNA-494 targeting both pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury [J]. *Circulation*, 2010, 122: 1 308-318.
- [13] Xiong J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12: 247-258.
- [14] Song SJ, Ito K, Ala U, et al. The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 87-101.
- [15] Gurha P, Abreu-Goodger C, Wang T, et al. Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction [J]. *Circulation*, 2012, 125: 2 751-761.
- [16] Ono K, Kuwabara Y, Han J. MicroRNAs and cardiovascular diseases [J]. *FEBS J*, 2011, 278: 1 619-633.
- [17] Chen J, Wang DZ. microRNAs in cardiovascular development [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 12: 949-957.
- [18] Jovicic A, Zaldivar Jolissaint JF, Moser R, et al. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e54222.
- [19] Yu H, Wu M, Zhao P, et al. Neuro-protective effects of viral over-expression of microRNA-22 in rat and cell models of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116: 233-241.
- (此文编辑 许雪梅)

(上接第 988 页)

- [10] Umehara H, Kimura T, Ohtsuka S, et al. Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3 [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (11): 2 705-711.
- [11] Esfandiari F, Fathi A, Gourabi H, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition promotes proliferation and neuronal differentiation of human-induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(17): 3 233-243.
- [12] Huang J, Guo X, Li W, et al. Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40 716.
- [13] Cui B, Huang L, Fang YQ, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation [J]. *Microvasc Res*, 2011, 81(1): 143-150.
- [14] Choi JH, Hur J, Yoon CH, et al. Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3 β activity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 49 430-438.
- [15] Hibbert B, Lavoie JR, Ma X, et al. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition augments diabetic endothelial progenitor cell abundance and functionality via cathepsin B: a novel therapeutic opportunity for arterial repair [J]. *Diabetes*, 2014, 63(4): 1 410-421.
- [16] Ma X, Hibbert B, Dhaliwal B, et al. Delayed re-endothelialization with rapamycin-coated stents is rescued by the addition of a glycogen synthase kinase-3 β inhibitor [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 338-345.
- [17] Hibbert B, Ma X, Pourdjabbar A, et al. Inhibition of endothelial progenitor cell glycogen synthase kinase-3 β results in attenuated neointima formation and enhanced re-endothelialization after arterial injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 16-23.
- [18] Dai X, Yan X, Zeng J, et al. Elevating CXCR7 improves angiogenic function of EPCs via Akt/GSK-3 β /Fyn-mediated Nrf2 activation in diabetic limb ischemia [J]. *Circ Res*, 2017, 120(5): e7-e23.
- (此文编辑 许雪梅)