

mi R34a 通过调控乙醛脱氢酶 2 参与心肌细胞凋亡及心室重构

范 凡, 孙爱军, 卜丽萍, 邹云增, 葛均波

(复旦大学附属中山医院心内科 上海市心血管病研究所, 上海市 200032)

[关键词] 心肌细胞凋亡; ALDH2; microRNA

背景和目的 乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 是一种内源性心肌保护因子, 通过代谢 4-HNE 等毒性醛类在心肌梗死过程中起抗心肌细胞凋亡并改善心室重构作用。miRNA 在很多生物的生理和病理过程中发挥重要作用, 影响细胞凋亡、增殖, 并与许多疾病相关。我们前期研究发现, ALDH2 在心肌缺氧早期呈显著下降趋势。本研究拟从 microRNA 角度探讨 ALDH2 下降的机制, 并探索内源性抑制 ALDH2 下降的作用靶点。**方法** 利用实时定量 PCR 研究缺氧心肌细胞中 miR34a 及 ALDH2 mRNA 的表达情况, 同时利用 Western blot 检测 ALDH2 蛋白表达, 以观察 miR34a 与 ALDH2 在缺氧心肌细胞中变化趋势是否相关。在此基础上, 利用 microRNA 特异模拟及抑制技术调控 miR34a 的表达, 同时利用 siRNA 及高表达病毒转染技术调控 ALDH2 表达, 观察 miR34a 与 ALDH2 的改变是否都能够改变心肌细胞缺氧后凋亡的反应情况。进一步利用 miR34a 特异模拟剂和抑制剂分别上调和下调 microRNA 的表达后, 检测心肌细胞内 ALDH2 表达变化, 以证实 miR34a 可以抑制 ALDH2 的翻译表达。进而, 我们将采用荧光报告基因质粒技术, 构建 GFP 后带有 ALDH2 3' UTR 的报告质粒, 同时与 miR34a 模拟剂共转染至 HEK293 细胞后观察 GFP 荧光亮度, 从而得到 miR34a 与 ALDH2 3' UTR 结合的直接证据。**结果** 在心肌细胞缺氧早期 (48 h 以内), 我们发现 ALDH2 蛋白水平于 6 h 开始下降而其 mRNA 水平于 48 h 才出现显著降低, 表明 ALDH2 蛋白在缺氧早期的下降并不是由转录水平调控引起的, 提示可能存在转录后水平调节。接下来我们对缺氧状态下 miR34a 变化趋势进行观察, 发现 miR-NA34a 于 2 h 上升至对照组 10 倍左右, 直至 4 h 仍保持在 4 倍左右水平 ($P < 0.05$), 提示其可能参与心肌细胞缺氧的早期调节。ALDH2 与 miR34a 之间是否存在联系? ALDH2 的下降是否由 miR34a 引起? 为证实以上猜想, 我们利用 miR34a 模拟剂转染心肌细胞, 上调其表达后 Western blot 检测发现 ALDH2 蛋白表达水平下降, 同时利用 miR34a 抑制剂下调其表达后发现 ALDH2 上升, 这样我们从正反两方面同时证明 miR34a 能够调控 ALDH2 蛋白表达。前期实验已证实上调 ALDH2 具有抗凋亡作用而下调则加重凋亡。为探讨 miR34a 与 ALDH2 在功能上的相关性, 我们对心肌细胞转染其模拟或抑制剂, 给予缺氧 24 h 处理, 诱发凋亡后进行 TUNEL 检测, 发现 miR34a 高表达组凋亡水平较高而低表达组则凋亡较轻, 从功能上证实 miR34a 与 ALDH2 关系符合预期。**结论** 心肌细胞缺血缺氧早期 ALDH2 的下降是由 miR34a 对其翻译过程的抑制引起。阻滞 miR34a 对 ALDH2 的抑制, 可能成为早期发挥 ALDH2 心肌保护作用的关键节点。

范凡, E-mail 为 fanfanff@yahoo.cn

(此文编辑 文玉珊)