

过表达 miR-29a 对大鼠心肌细胞凋亡的影响

张振辉¹, 黎 佼², 刘本荣³, 李爱群³, 刘世明^{2,3}

(广州医学院第二附属医院 1. 重症医学科, 2. 心血管内科, 3. 广州心血管疾病研究所, 广东省广州市 510260)

[关键词] 微小 RNA; 细胞凋亡; 半胱氨酸蛋白酶 3; 半胱氨酸蛋白酶 9

[摘要] **目的** 探讨 microRNA-29a(miR-29a)对大鼠心肌细胞凋亡的调控作用。**方法** 体外培养新生 SD 大鼠心肌细胞,合成人 miR-29a 的拟似物(mimic)。用 Lipofectamine RNAiMAX 转染 miR-29a 的 mimic 进入心肌细胞,转染 48 h 后用荧光定量 PCR 方法检测心肌细胞 miR-29a 的表达变化,流式细胞仪检测细胞凋亡水平变化,Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 前体的表达变化。**结果** 心肌细胞转染 miR-29a 的 mimic 48 h 后,心肌细胞中 miR-29a 的表达水平较对照组明显升高($P < 0.05$);心肌细胞的凋亡水平也明显升高,凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 前体的含量则明显下降($P < 0.05$)。**结论** 在大鼠心肌细胞中过表达 miR-29a 能促进心肌细胞凋亡,其机制可能是通过 Caspase-3 和 Caspase-9 途径起作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Overexpression of MicroRNA-29a Regulates Cells Apoptosis in Rat Cardiomyocytes

ZHANG Zhen-Hui, LI Jiao, LIU Ben-Rong, LI Ai-Qun, and LIU Shi-Ming

(Intensive Care Unit, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

[KEY WORDS] MicroRNA; Cell Apoptosis; Caspase-3; Caspase-9

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of microRNA-29a (miR-29a) on apoptosis in rat cardiomyocytes.

Methods In our study, newborn rats cardiomyocytes was isolated, cells were transfected with miR-29a mimic by lipofectamine RNAiMAX, and then real time RT-PCR was used to measure the level of miR-29a, flow cytometry (FCM) was used to detect the cells apoptosis, and western blot was used to detect the protein expressive level of Caspase-3 and Caspase-9.

Results MiR-29a mimics could upregulate the level of miR-29a in rat cardiomyocytes after 48h of transfecting, accompanied with the increase of cells apoptosis rate, and descent of the protein level of caspase-3 and caspase-9 in cardiomyocytes when compared to the control group($P < 0.05$).

Conclusion Our study demonstrated that the overexpression of miR-29a may regulate cells apoptosis of rat cardiomyocytes, and the mechanisms among it may be concerned with Caspase-3 and Caspase-9 pathway.

微小 RNA (microRNAs, miRNA) 是一类长度约 19 ~ 25 nt 的单链非编码 RNA 分子,由一段具有发夹结构的长约 70 nt 的单链 RNA 前体(pre-miRNA)剪切后生成^[1]。每一种 miRNA 可以通过调控多个靶 mRNA 表达,对生物体的基因表达调控发挥着极其重要的作用^[2]。研究发 miRNA 在发育调控、细胞增殖与凋亡、造血等方面均可发挥作用^[3-5],对于多种心脏疾病同样起调控作用^[6,7]。

许多心脏疾病如慢性缺血性心脏病、慢性超负

荷心脏病、心肌炎、心肌梗死等可导致心肌细胞凋亡,心肌细胞凋亡在心室重构(ventricular remodel)和心力衰竭发病过程中起重要作用,抑制凋亡可延缓心力衰竭的发展^[8]。miRNA 在调控细胞凋亡方面作用显著,其中有研究报道,miR-29 在肝癌组织中的表达下调,进一步的机制研究证实 miR-29 可调控肝癌细胞的存活^[9],但 miR-29 是否参与调控心肌细胞凋亡目前仍缺乏报道,本研究通过合成 miR-29a(miR-29 的主要成员)的拟似物(mimic),将其转

[收稿日期] 2012-07-16

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81201453),广东省自然科学基金项目(9151052002000006);广州市医药卫生科技项目(201102A213020)

[作者简介] 张振辉,博士,副主任医师,研究方向为心血管重症,E-mail 为 drzhzh@126.com。通讯作者刘世明,教授,博士研究生导师,研究方向为心血管重构的基础研究和防治,E-mail 为 gzliushiming@126.com。

染至体外培养的乳鼠心肌细胞中,观察 miR-29a 对心肌细胞凋亡水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生 1~2 天 SD 大鼠,雌雄不拘,由广东省实验动物中心提供。

1.2 乳鼠原代心室肌细胞的分离、培养

取新生 SD 大鼠,常规酒精消毒,剪开胸腔,超净工作台中无菌条件下取心尖部,放入冰冷的无钙镁的 PBS 缓冲液中漂洗 3~5 次。将心室组织剪成约 1 mm³ 碎片后,0.25% 胰蛋白酶 3~5 mL,37℃ 水浴分次消化。收集各次消化的上清液,于离心机 1 kr/min 室温离心 10 min。弃上清,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液制成单细胞悬液,接种于 10 cm 培养皿中。37℃、5% CO₂ 培养箱(Thermo 公司)培养 90 min。利用差速贴壁原理,吸出细胞悬液(内含心肌细胞),调整浓度为 3 × 10⁵ mL,接种于 60 mm 培养皿或 6 孔板中培养。前 48 h 加 5-BrdU 0.1 mmol/L 抑制非心肌细胞生长。培养至第 4 天后去血清培养过夜,第 5 天的心肌细胞用于实验。

1.3 实验试剂

DMEM 培养基(高糖)、Opti-MEM 转染培养基、胎牛血清(GIBCO 公司);转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX、RNA 裂解液 Trizol、荧光定量 SYBR Green qPCR 试剂盒(Invitrogen 公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司),Caspase-3、Caspase-9 和 GAPDH 的抗体(santa cruz 公司)。

1.4 寡核苷酸序列设计与合成

大鼠 miR-29a 的拟似物(mimic)根据其成熟体序列(miRBase accession No.: MI0000863)合成。双链 RNA 的阴性对照(NC)为与哺乳动物基因组没有同源性的序列,该序列是吉玛公司设计的。所有寡核苷酸由上海吉玛公司合成。

1.5 细胞转染

实验分为对照组、miR-29a 拟似物转染阴性对照组(negative control,简称 NC)、miR-29a 拟似物转染组(简称 miR-29a)。miRNA 的转染采用转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX,给 6 孔板中培养的心肌细胞更换新鲜的 DMEM 培养基(不含 FBS 和抗生素,每孔 2 mL)。将 miRNA 稀释于 200 μL Opti-MEM 培养基中;每管加入 8 μL Lipofectamine RNAi MAX,轻柔混匀,室温放置 15 min;将 RNAi MAX 与 siRNA 的稀释液加入 6 孔板的各孔细胞中,混匀后

培养箱中培养 48 h,48 h 后按实验需要处理细胞。miRNA 的终浓度为 50 nmol/L 或 100 nmol/L。

1.6 miRNA 的表达水平检测

细胞总 RNA 提取按 Trizol 试剂盒说明书操作。miR-29a 的 QPCR 定量检测采用 U6 作为内参照,采用 miR-29a 的特异性引物进行 RT 反应(反应条件:16℃ 30 min;42℃ 40 min;85℃ 5 min),产物再进行 PCR 扩增,反应条件:95℃ 3 min;45 个 PCR 循环(95℃ 15 s;60℃ 20 s;72℃ 20 s;78℃ 20 s),在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行反应,获得 Ct 值后,应用比较 Ct 法进行相对定量,目标基因的相对定量用 2^{-ΔΔCt} 计算。

1.7 心肌细胞凋亡水平检测

用不含 EDTA 的胰酶消化后收集心肌细胞,500 r/min 4℃ 离心 10 min,弃上清;将细胞悬于标记缓冲液中;加入 Annexin V-FITC,避光室温反应 15 min;加入标记缓冲液,用流式细胞仪观察细胞凋亡情况。

1.8 心肌细胞凋亡相关蛋白的表达

采用 Western blot 方法检测凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 前体的表达变化,裂解细胞获得细胞总蛋白并定量,采用 1 × TAE 电泳缓冲液恒压电泳,电泳时间根据 Marker 的位置确定;恒流转膜 2.5 h;一抗和二抗分别室温孵育 2 h;用 ECL solution 显影,洗片机冲洗胶片,扫描仪扫描胶片后用 Bio-Rad 的胶片灰度分析软件分析。

1.9 数据处理与统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析处理,所有计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 转染 miR-29a mimic 能过表达 miR-29a

心肌细胞转染 miR-29a mimic,48 h 后 QPCR 方法检测 miR-29a 成熟体的表达量,结果显示,miR-29a 表达明显升高(*P* < 0.01),提示转染 miRNA mimic 可成功过表达 miRNA(表 1)。

2.2 过表达 miR-29a 促进心肌细胞凋亡

心肌细胞转染 miR-29a mimic 50 nmol/L 或 100 nmol/L 后,采用 Annexin V-FITC 经流式细胞仪检测,与对照组和阴性对照组比较,miR-29a 50 和 100 nmol/L 组细胞的凋亡率由 2.9% 分别上升至 20.2% 和 30.5%,提示过表达 miR-29a 可促进心肌细胞凋亡(图 1)。

表 1. 心肌细胞转染 miR-29a mimic 后 miR-29a 的表达变化

Table 1. MiR-29a mimic upregulated the level of miR-29a in cardiomyocyte

分 组	n	miR-29a 相对值
对照组	3	1.04 ± 0.26
阴性对照组	3	1.21 ± 0.20
miR-29a 组	3	90.62 ± 12.72 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组和阴性对照组比较。

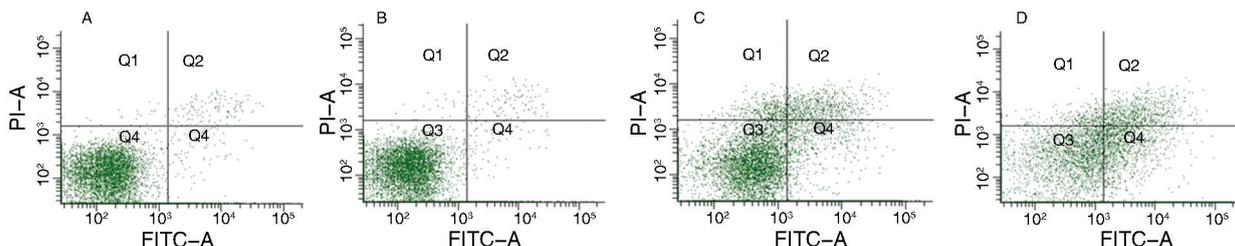


图 1. 过表达 miR-29a 促进心肌细胞凋亡

PI-A 表示细胞被 PI 着色情况, FITC-A 为细胞发 FITC 荧光情况, Q2 象限为早期凋亡, Q4 象限为晚期凋亡即坏死细胞, Q3 象限为正常细胞。细胞凋亡率为 Q2 与 Q4 之和, A 图为正常对照组, B 图为阴性对照组, C 图为 miR-29a mimic 50 nmol/L 组, D 图为 miR-29a mimic 100 nmol/L 组。

Figure 1. Overexpression of miR-29a promoted cells Apoptosis of cardiomyocyte

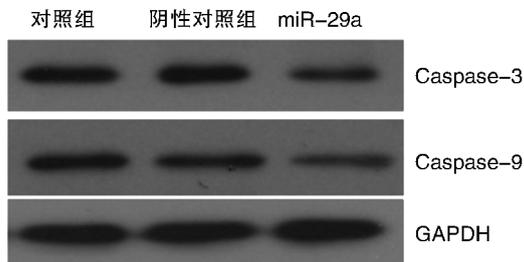


图 2. 过表达 miR-29a 促进凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 的降解

Figure 2. Overexpression of miR-29a promoted the degradation of Caspase-3 and Caspase-9

表 2. 过表达 miR-29a 促进凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 的降解

Table 2. Overexpression of miR-29a promoted the degradation of Caspase-3 and Caspase-9

分 组	n	Caspase-3	Caspase-9
对照组	3	1.04 ± 0.14	0.97 ± 0.04
阴性对照组	3	1.01 ± 0.09	1.03 ± 0.11
miR-29a 组	3	0.56 ± 0.11 ^a	0.67 ± 0.05 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组和阴性对照组比较。

2.3 过表达 miR-29a 促进凋亡相关蛋白降解

心肌细胞转染 miR-29a mimic 100 nmol/L 后, 采用 Western blot 方法检测凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 前体的表达变化, 结果显示, 与对照组比较, Caspase-3 和 Caspase-9 前体的蛋白表达量下降, 提示过表达 miR-29a 可促进 Caspase-3 和 Caspase-9 前体的降解, 进而促进心肌细胞凋亡(图 2 和表 2)。

等^[10]发现心肌缺血预处理时 miRNA21、miRNA221、miRNA224 表达上调, 于动物的心肌缺血区注射这些 miRNAs 能减少心肌缺血再灌注损伤。这表明 miRNA 在心肌损伤、心肌细胞凋亡过程中起了重要的调控作用。

在细胞内有效地过表达目的 miRNA, 目前主要采用脂质体介导的细胞转染、病毒载体感染、电转染等化学、生物学和物理方法, 采用脂质体进行细胞转染是简便有效的常用方法, 本实验采用 invitrogen 公司的 RNA 特异性的转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX, 进一步地提高了细胞的转染效率。化学合成的 miRNA 拟似物 miRNA mimics (双链寡核苷酸), 借助脂质体介导进入细胞内, 能够达到在细胞内过表达 miRNA, 进而抑制靶基因的目的^[11,12]。我们用 Lipofectamine RNAiMAX 转染 miR-29a 的 mimic 进入体外培养的原代心肌细胞, 其中 mimic 是双链结构, 进入细胞胞浆后解开成两条单链, 与 miR-29a 成熟体序列一致的正义链发挥作用, 另一条互补的链被降解, 模拟内源性 miRNA 成熟体在胞浆中的解链成熟过程。有研究使用慢病毒载体感染心肌细胞的方法过表达 miRNA 的前体 (pre-miRNA), 结果可以检测到细胞内 pre-miRNA 有大于 1000 倍的升高, 但检测到的 miRNA 成熟体却只有 1.5 ~ 2.0 倍的升高^[13]。从 pre-miRNA 到成熟体之间还

3 讨论

在 miRNA 与心肌损伤、凋亡的研究中, Yin

需经历出核、剪切等过程,如果细胞内有关 miRNA 成熟所需的蛋白分子或酶功能等存在障碍,反而会影 响 miRNA 过表达的效果。我们通过转染 miR-29a 经 QPCR 验证发现,心肌细胞中 miR-29a 成熟体的表达量较对照组明显上升,成功在心肌细胞内过表达 miR-29a。

本实验结果显示,miR-29a 的过表达能促进心肌细胞的凋亡,在进一步的机制研究中,我们发现 Caspase-3 和 Caspase-9 的前体水平均下降,提示心肌细胞的凋亡可能是通过降解 Caspase-3 和 Caspase-9 实现的。在哺乳动物细胞凋亡过程中 Caspases 家族的激活起关键作用。Caspases 家族成员在正常细胞中以无活性的前体形式合成与储存,根据其在级联反应中的位置及 N 端序列上的特点不同,可将其分为两类:上游 Caspases (起始 Caspases,包括 Caspase-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13) 和下游 Caspases (效应 Caspases,包括 Caspase-3, 6, 7)^[14]。凋亡信号可激活 Caspase 级联反应:上游 Caspase-8, 9,10 等激活下游 Caspase-3,6,7,激活的效应 Caspases 再作用于细胞骨架蛋白、DNA 修复调节因子、细胞周期调节成分及 Bcl-2 家族的某些成员,使之失活破坏,从而导致细胞 DNA 修复功能丧失,失去正常增殖分化能力形成凋亡^[15]。既往的研究表明,高葡萄糖在正常氧供条件下、过氧化氢等因素均可促进体外培养的心肌细胞凋亡,并且也是通过 Caspases 家族途径起作用^[16,17],而本研究则证实了 miR-29a 参与这一调控作用及可能的机制。

综上所述,通过细胞转染的方法,使用脂质体在大鼠原代心肌细胞中过表达 miR-29a,能促进心肌细胞的凋亡,其机制可能与促进 Caspase-3 和 Caspase-9 前体的降解有关,本研究为证实 miRNA 参与心肌细胞凋亡调控,进而影响心脏重构提供了有利的实验依据。

[参考文献]

- [1] Eckstein F. Small non-coding RNAs as magic bullets[J]. Trends Biochem Sci, 2005, 30(8): 445-452.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [3] Pasquinelli AE. MicroRNAs: deviants no longer [J]. Trends Genet, 2002, 18(4): 171-173.

- [4] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila[J]. Cell, 2003, 113(1): 25-36.
- [5] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science, 2004, 303(5 654): 83-86.
- [6] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. Nature, 2005, 436: 214-220.
- [7] Srivastava D, Olson EN. A genetic blueprint for cardiac development[J]. Nature, 2000, 407(6 801): 221-226.
- [8] 杨永曜,李隆贵. 心肌细胞凋亡与心室重构的关系[J]. 心脏杂志, 2006, 18(1): 95-97.
- [9] Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2010, 51(3): 836-845.
- [10] Yin C, Salloum FN, Kukreja RC. A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70 [J]. Circ Res, 2009, 104(5): 572-575.
- [11] Xiao J, Yang B, Lin H, et al. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4[J]. J Cell Physiol, 2007, 212(2): 285-292.
- [12] Wang Z, Luo X, Lu Y, et al. miRNAs at the heart of the matter[J]. J Mol Med, 2008, 86(7): 771-783.
- [13] Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling[J]. Circ Res, 2009, 104(2): 170-178.
- [14] Boatright KM, Saivesen GS. Caspase activation[J]. Biochem Soc Symp, 2003, 70(3): 233-242.
- [15] Laugwitz KL, Moretti A, Weig H J, et al. Blocking Caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(17): 2 051-063.
- [16] 周艳芳,郑晓伟,齐国先. 高葡萄糖在正常氧及缺氧条件下对乳鼠心肌细胞存活与凋亡的不同影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(2): 89-92.
- [17] 肖卫民,蒋碧梅,石永忠,等. 过氧化氢通过线粒体通路和死亡受体通路诱导心肌细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(3): 185-188.

(此文编辑 李小玲)