

# lncRNA MIR155HG 通过调控 miR-133a-3p/Furin 轴对心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成的影响

司胜勇, 李治菁, 缪思斯, 刘莉

(贵州医科大学附属医院高血压科, 贵州省贵阳市 550004)

[关键词] 长链非编码 RNA; MIR155 宿主基因; miR-133a-3p; 弗林蛋白; 心肌梗死; 心肌成纤维细胞  
[摘要] 目的 探讨长链非编码 RNA MIR155 宿主基因(lncRNA MIR155HG)对心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成的影响及分子机制。方法 构建小鼠心肌梗死模型。分离心肌成纤维细胞,然后分为沉默对照组、沉默 MIR155HG 组、沉默 MIR155HG 和抑制物对照组、沉默 MIR155HG 和干扰 miR-133a-3p 组、沉默 MIR155HG 和过表达弗林蛋白(Furin)组。实时荧光定量 PCR 检测 MIR155HG、miR-133a-3p 和 Furin 表达水平;MTT 法检测细胞活力;Transwell 实验检测细胞迁移;Western blot 检测细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A(P21)、血管内皮生长因子(VEGF)、I 型胶原蛋白(Col-1)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达;荧光素酶报告实验检测 MIR155HG 和 miR-133a-3p 以及 miR-133a-3p 和 Furin 的靶向关系。结果 在心肌梗死模型小鼠心脏组织中 MIR155HG、Furin 高表达,miR-133a-3p 低表达( $P < 0.05$ )。抑制 MIR155HG 表达后心肌成纤维细胞的细胞活力、迁移细胞数及 Cyclin D1、VEGF、Col-1、 $\alpha$ -SMA 表达水平显著降低,P21 表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。MIR155HG 靶向调控 miR-133a-3p,miR-133a-3p 靶向调控 Furin。抑制 miR-133a-3p 表达和过表达 Furin 逆转了抑制 MIR155HG 表达对心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成相关蛋白的抑制作用。结论 抑制 MIR155HG 表达可抑制心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成,其机制可能与调节 miR-133a-3p/Furin 轴有关。

[中图分类号] R542.2

[文献标识码] A

## Effects of lncRNA MIR155HG on proliferation, migration, differentiation and collagen synthesis of myocardial fibroblasts by regulating miR-133a-3p/Furin axis

SI Shengyong, LI Zhijing, MIU Sisi, LIU Li

(Department of Hypertension, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[KEY WORDS] long non-coding RNA; MIR155 host gene; miR-133a-3p; Furin; myocardial infarction; myocardial fibroblast

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of long non-coding RNA MIR155 host gene (lncRNA MIR155HG) on proliferation, migration, differentiation and collagen synthesis of myocardial fibroblasts and its molecular mechanism.

**Methods** Mouse myocardial infarction model was constructed. Myocardial fibroblasts were isolated and divided into silent control group, silent MIR155HG group, silent MIR155HG and inhibitor control group, silent MIR155HG and interference miR-133a-3p group, silent MIR155HG and over-expressed Furin group. The expression levels of MIR155HG, miR-133a-3p and Furin were detected by quantitative real-time PCR. Methyl thiazolyl tetrazolium colorimetry was used to detect cell viability. Cell migration was detected by Transwell experiment. Western blot was used to detect the expressions of cyclin D1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type 1 (Col-1) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). Targeting relationships between MIR155HG and miR-133a-3p, between miR-133a-3p and Furin were detected by luciferase report experiment. **Results** In the heart tissue of myocardial infarction model mice, MIR155HG and Furin were highly expressed, and miR-133a-3p was lowly expressed ( $P < 0.05$ ). After inhibiting MIR155HG expression, the cell viability, migration cell number and cyclin D1, VEGF, Col-1,  $\alpha$ -SMA expression levels of myocardial fibroblasts were significantly decreased, while P21 expression level was significantly

[收稿日期] 2019-12-13

[修回日期] 2020-04-01

[基金项目] 贵州省科技创新人才团队项目(黔科合平台人才[2020]5014)

[作者简介] 司胜勇,硕士研究生,主治医师,研究方向为高血压与睡眠呼吸暂停,E-mail 为 79560419@qq.com。

increased ( $P < 0.05$ ). MIR155HG targetedly regulated miR-133a-3p, and miR-133a-3p targetedly regulated Furin. Inhibition of miR-133a-3p expression and overexpression of Furin reversed the inhibition effect of inhibiting MIR155HG expression on proliferation, migration, differentiation and collagen synthesis related proteins of myocardial fibroblasts.

**Conclusion** Inhibition of MIR155HG expression can inhibit the proliferation, migration, differentiation and collagen synthesis of myocardial fibroblasts, which may be related to the regulation of miR-133a-3p/Furin axis.

心肌梗死是临床上常见的急危重症,高血压是导致心肌梗死的主要原因<sup>[1]</sup>。心肌梗死后成纤维细胞持续增殖、分化,细胞外基质沉积,最终导致心肌发生纤维化,引起心功能障碍<sup>[2]</sup>。因此,研究心肌梗死后心肌纤维化的发病机制,为预防及治疗心肌梗死后心肌纤维化提供研究方向和治疗靶点。研究发现长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和微小 RNA(micro RNA, miRNA, miR)均参与调控心肌纤维化、心肌梗死的发生发展<sup>[3]</sup>。MIR155 宿主基因(MIR155 host gene, MIR155HG)是一种 lncRNA。研究表明慢性心力衰竭患者血清中 MIR155HG 高表达,且表达水平随病情严重程度逐渐升高<sup>[4]</sup>。研究报道 miR-155 与心肌梗死的预后有关<sup>[5]</sup>。自发性高血压大鼠心肌组织中 miR-133a 表达下调,伴随转化生长因子  $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )蛋白表达升高和胶原合成增加;miR-133a 可能参与自发性高血压大鼠的心肌纤维化<sup>[6]</sup>。心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌 miR-133a 表达下调,过表达 miR-133a 减少心肌梗死后的心肌凋亡<sup>[7]</sup>。敲除 circRNA NCX1 通过 miR-133a-3p 可抑制心肌细胞凋亡和缺血性心肌损伤<sup>[8]</sup>。有研究报道沉默弗林蛋白(Furin)基因能通过抑制心肌成纤维细胞增殖、迁移、胶原合成,增加细胞外基质分解和抑制细胞外基质沉积,降低心肌梗死过程中的心肌纤维化过程<sup>[9]</sup>。然而 MIR155HG 对心肌成纤维细胞的增殖、迁移、分化和胶原合成的影响及其机制尚不清楚。本实验旨在研究 MIR155HG 对心肌成纤维细胞的增殖、迁移、分化和胶原合成的影响及其机制是否与 miR-133a-3p 和 Furin 有关。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,SPF 级,体质量 20 g 左右,购买于南京医科大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(苏)2013-0032。1~3 日龄 SD 新生大鼠乳鼠,SPF 级,雄性,购自于苏州大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(苏)2012-0045。

### 1.2 试剂与仪器

胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;Trizol 试剂、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂盒购自美国 Progema 公司;四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法试剂盒、蛋白提取试剂盒、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒购自碧云天生物技术研究所;抗体购自美国 Abcam 公司;Transwell 小室、Matrigel 胶购于美国 BD 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京 Solarbio 公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。Thermo FC 酶标仪购自美国 Thermo 公司;荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

### 1.3 心肌梗死模型的建立

将 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、心肌梗死模型组。采用冠状动脉左前降支结扎术建立心肌梗死模型,具体参照文献<sup>[9]</sup>;用 3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉小鼠,在胸骨左缘纵切开皮肤 1.5 cm,暴露心脏,在左心耳下缘 2~3 mm 处用 8-0 的聚丙烯缝线结扎冠状动脉。造模成功标准为心电图 ST 段抬高。假手术组只开胸,不结扎。心肌梗死手术 4 周后麻醉小鼠,取出心脏,-80 °C 冻存备用。

### 1.4 心肌成纤维细胞的分离培养鉴定

SD 新生大鼠乳鼠用 75% 乙醇消毒,无菌条件下开胸取出心脏;用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)清洗,去除多余结缔组织,胰酶消化,收集细胞悬液,离心去上清;加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞,将细胞于 37 °C 培养箱中培养 90 min,去除未贴壁细胞,收集贴壁细胞;倒置显微镜下观察,细胞呈梭形、多角形,细胞质透明,细胞核大,呈椭圆形,常含有 2~3 个核,即为心肌成纤维细胞。将心肌成纤维细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,2 天换液 1 次,待细胞融合至 90% 左右时,进行消化传代,取 3~4 代细胞用于后续实验。

### 1.5 细胞转染与分组

将 MIR155HG 沉默对照质粒、MIR155HG 沉默质粒转染至心肌成纤维细胞中,分别记为沉默对照组、沉默 MIR155HG 组;将 MIR155HG 沉默质粒分别与 miR-133a-3p 抑制物对照质粒、miR-133a-3p 抑制物、Furin 过表达质粒共转染至心肌成纤维细胞中,分别记为沉默 MIR155HG 和抑制物对照组、沉默 MIR155HG 和干扰 miR-133a-3p 组、沉默 MIR155HG 和过表达 Furin 组。转染均按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒进行操作。

### 1.6 HE 染色和 Masson 染色

心脏取出离体后用 4% 多聚甲醛固定 24 h,常规石蜡脱水包埋切片。石蜡包埋好的标本以 5 μm 厚度连续切片,60 °C 干燥处理;二甲苯溶液连续脱蜡 2 次,每次 30 min,然后以不同浓度的乙醇浸泡处理后置于蒸馏水。按照试剂盒说明进行 HE 染色、Masson 染色。

### 1.7 qRT-PCR 检测 MIR155HG、miR-133a-3p 和 Furin 的表达水平

提取假手术组和心肌梗死模型组小鼠心脏 RNA。各组细胞培养 48 h 后提取总 RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,按照 qRT-PCR 试剂盒使用说明进行 PCR,每个样品设 3 个重复,循环条件为 95 °C 5 min,95 °C 30 s,60 °C 30 s;72 °C 30 s,共 40 个循环;60 °C 延长 5 min。相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。MIR155HG 和 Furin 以 GAPDH 为内参,miR-133a-3p 以 U6 为内参, MIR155HG 上游引物序列:5'-CCCAAATCTAGGTTCAAGTTC-3',下游引物序列:5'-CATCTAAGCCTCACAACAAC-3';Furin 上游引物序列:5'-ACTAACACTGTGCCCTGGTGGAG-3',下游引物序列:5'-ACCCTGGACAGGTAGTTGGGTA-3';GAPDH 上游引物序列:5'-TGTGGCCATCAATCACCCCTT-3',下游引物序列:5'-CTCCACGACGTACTCAGCG-3';miR-133a-3p 上游引物序列:5'-GGCCTTTGGTCCCCTCAAC-3',下游引物序列:5'-CAGTGGGTGTCGTGGAGT-3';U6 上游引物序列:5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTA-3',下游引物序列:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3';引物由上海生工生物工程公司合成。

### 1.8 MTT 法检测细胞活力

各组细胞培养 24、48、96 h 后,每孔分别加入 20 μL 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h 后弃去上清液,每孔加入二甲基亚砷 150 μL,振荡反应 10 min 使沉淀溶解,用酶标仪于波长 570 nm 处检测吸光度 (absor-

bance, A) 值。细胞活力 (%) = 实验组 A 值/空白对照组 A 值 × 100%。实验重复 3 次。

### 1.9 Transwell 实验检测细胞迁移

收集各组细胞,无血清培养后,取 200 μL 接种于 Transwell 小室上层,培养 24 h 后,吸去培养液,用棉签轻轻擦去上层细胞,PBS 洗涤,4% 多聚甲醛固定 30 min,再用 0.1% 结晶紫染色 10 min。倒置显微镜下每孔随机选取 5 个视野进行拍照和计数,每组重复 3 次。

### 1.10 Western blot 法检测蛋白表达

各组细胞培养 48 h 后提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至聚偏二氟乙烯膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,再分别加入一抗 (1 : 1 000),4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜;加入二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 90 min,TBST 洗涤,ECL 发光液显影;用 ChemiDoc XRS + 成像系统检测,Quantity One 凝胶分析软件测定各组蛋白条带的灰度值,蛋白相对表达水平 = 目的条带灰度值/β-actin 条带灰度值。每个蛋白样品设 3 个重复。

### 1.11 荧光素酶报告实验检测 MIR155HG 和 miR-133a-3p 以及 miR-133a-3p 和 Furin 的靶向关系

构建含 miR-133a-3p 结合位点的 MIR155HG 和 Furin 野生型和突变型荧光素酶表达载体,将其分别与模拟物对照质粒和 miR-133a-3p 模拟物共转染至心肌成纤维细胞中。按照说明书检测荧光素酶活性,实验重复 3 次。

### 1.12 统计学分析

实验数据经 SPSS 20.0 分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较行 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心肌梗死模型小鼠心肌组织 HE 染色和 Masson 染色鉴定结果

心肌梗死小鼠心肌组织切片经 HE 染色处理后,可见梗死部位大量炎症细胞浸润,胶原纤维异常增生堆积,心肌纤维断裂,排列结构紊乱。Masson 染色观察组织切片,心肌组织中蓝色胶原增多明显,清晰可见纤维化;坏死组织逐渐溶解,梗死病灶逐渐扩大;心肌组织红染,胶原纤维蓝染,明显可见

纤维化范围(图 1)。

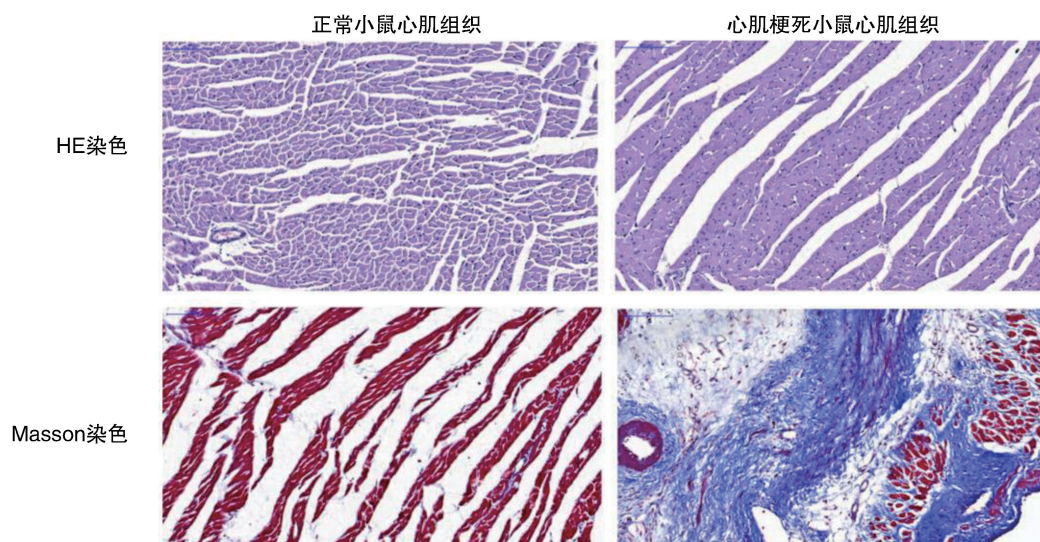


图 1. 心肌梗死模型小鼠 HE 染色和 Masson 染色鉴定图(200×)

Figure 1. HE staining and Masson staining identification of myocardial infarction model mice (200×)

## 2.2 MIR155HG、miR-133a-3p 和 Furin 在心肌梗死模型小鼠心脏组织中的表达

与假手术组相比,心肌梗死模型组小鼠心脏组织中 MIR155HG 表达水平显著升高,miR-133a-3p 表达水平显著降低,Furin 表达水平显著升高( $P < 0.05$ ;表 1)。

表 1. qRT-PCR 检测 MIR155HG、miR-133a-3p 和 Furin 在心肌梗死模型小鼠心脏组织中的表达( $n=3$ )

Table 1. Expressions of MIR155HG, miR-133a-3p and Furin in the heart of mice with myocardial infarction detected by qRT-PCR ( $n=3$ )

分组	MIR155HG	miR-133a-3p	Furin
假手术组	1.00±0.15	1.00±0.08	1.00±0.17
心肌梗死模型组	3.43±0.21	0.29±0.06	3.53±0.23
<i>t</i>	28.248	21.300	26.538
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

## 2.3 抑制 MIR155HG 表达对心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成的影响

与沉默对照组相比,沉默 MIR155HG 组心肌成纤维细胞中 MIR155HG 表达水平、培养 48 和 96 h 的细胞活力、迁移细胞数及细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、I 型胶原蛋白 (collagen type 1, Col-1)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -

SMA) 表达水平均显著降低,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, P21) 表达水平显著升高( $P < 0.05$ ;图 2、图 3、表 2)。

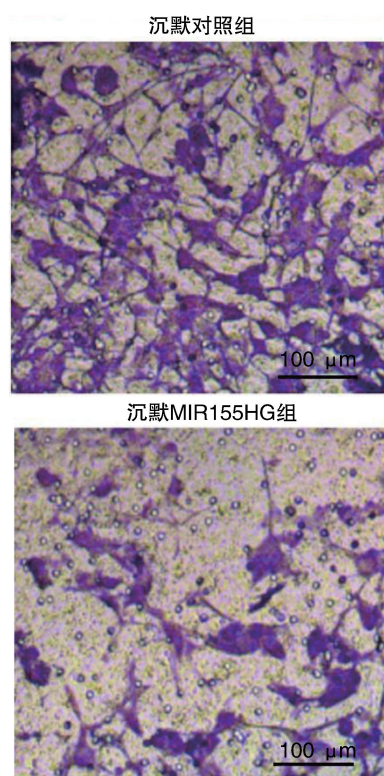


图 2. Transwell 实验检测 2 组心肌成纤维细胞迁移

Figure 2. Myocardial fibroblast migration in two groups detected by Transwell experiment

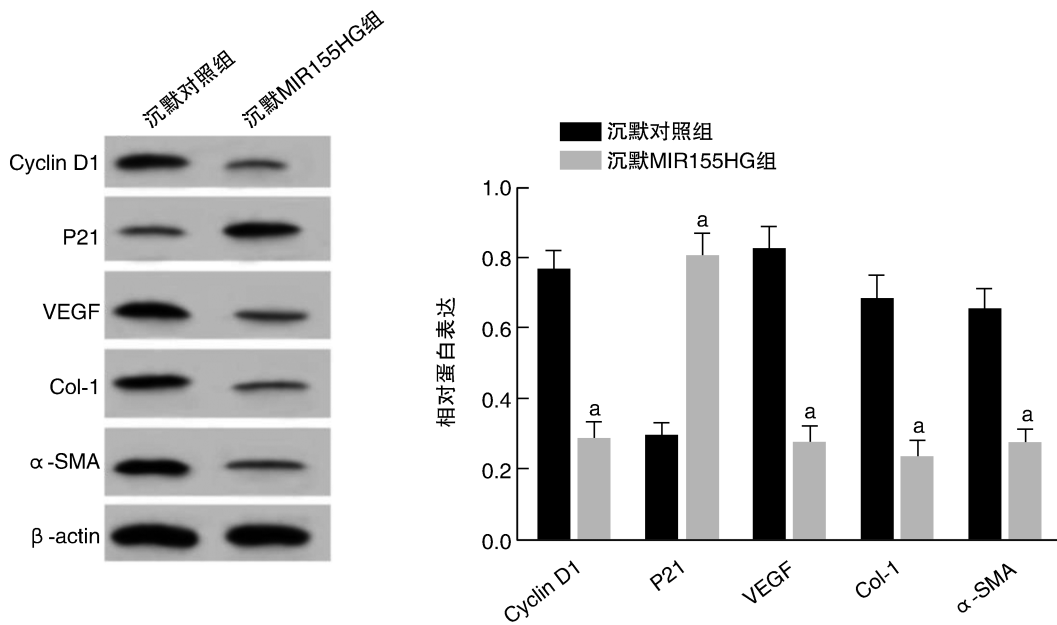


图 3. Western blot 检测心肌成纤维细胞 Cyclin D1、P21、VEGF、Col-1 和 α-SMA 蛋白表达 (n=3) a 为 P<0.01, 与沉默对照组比较。

Figure 3. Expressions of Cyclin D1, P21, VEGF, Col-1 and α-SMA protein in myocardial fibroblasts in two groups detected by Western blot (n=3)

表 2. 抑制 MIR155HG 表达对心肌成纤维细胞增殖和迁移及其相关蛋白表达的影响 (n=3)

Table 2. Effect of inhibition of MIR155HG expression on myocardial fibroblast proliferation and migration, and the expression of related proteins (n=3)

分组	MIR155HG	细胞活力 (A <sub>570 nm</sub> )			迁移细胞数/ (个/HP)
		24 h	48 h	96 h	
沉默对照组	1.00±0.07	0.32±0.03	0.82±0.08	1.39±0.12	98.51±8.90
沉默 MIR155HG 组	0.32±0.05	0.31±0.02	0.37±0.06	0.75±0.07	45.67±6.84
t	23.715	0.832	13.500	13.820	14.122
P	0.000	0.418	0.000	0.000	0.000

2.4 MIR155HG 与 miR-133a-3p 的靶向关系

通过 LncBase 网站预测显示 MIR155HG 与 miR-133a-3p 存在结合位点(图 4)。荧光素酶报告实验显示,与模拟物对照组相比,miR-133a-3p 模拟物组中转染 MIR155HG 野生型(wild type, WT)

表达载体的细胞荧光素酶活性显著降低(P<0.05;表 3);而转染 MIR155HG 突变型(mutant type, MUT)表达载体的细胞荧光素酶活性无显著差异。与沉默对照组相比,沉默 MIR155HG 组 miR-133a-3p 表达水平显著升高(P<0.05;表 4)。

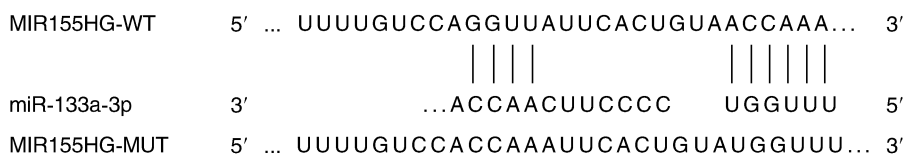


图 4. MIR155HG 与 miR-133a-3p 的结合位点  
Figure 4. Binding site of MIR155HG to miR-133a-3p

表 3. 双荧光素酶活性检测心肌成纤维细胞中 MIR155HG 与 miR-133a-3p 的靶向关系 ( $n=3$ )

Table 3. Targeting relationship between MIR155HG and miR-133a-3p in myocardial fibroblasts detected by dual luciferase activity ( $n=3$ )

分组	荧光素酶活性	
	MIR155HG-WT	MIR155HG-MUT
模拟物对照组	1.00±0.09	1.03±0.12
miR-133a-3p 模拟物组	0.31±0.07	1.01±0.13
<i>t</i>	18.155	0.339
<i>P</i>	0.000	0.739

## 2.5 MIR155HG 通过靶向 miR-133a-3p 调控 Furin 的表达

通过 StarBase 网站预测显示 Furin 与 miR-133a-3p 存在结合位点(图 5)。荧光素酶报告实验显示,与模拟物对照组相比,miR-133a-3p 模拟物组中

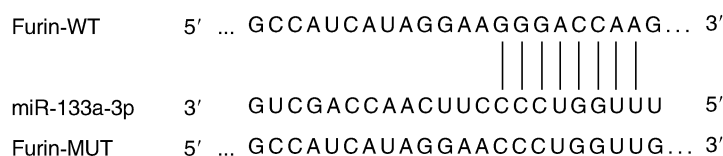


图 5. miR-133a-3p 与 Furin 的结合位点

Figure 5. Binding site of miR-133a-3p to Furin

表 5. 双荧光素酶活性检测心肌成纤维细胞中 miR-133a-3p 与 Furin 的靶向关系 ( $n=3$ )

Table 5. Targeting relationship between miR-133a-3p and Furin in myocardial fibroblasts detected by dual luciferase activity ( $n=3$ )

分组	荧光素酶活性	
	Furin-WT	Furin-MUT
模拟物对照组	1.00±0.08	1.01±0.11
miR-133a-3p 模拟物组	0.35±0.06	0.98±0.13
<i>t</i>	19.500	0.529
<i>P</i>	0.000	0.604

## 2.6 MIR155HG 通过 miR-133a-3p/Furin 分子轴调控心肌成纤维细胞的细胞生物学行为

与沉默对照组相比,沉默 MIR155HG 组心肌成纤维细胞培养 48、96 h 的细胞活力、迁移细胞数及 Cyclin D1、VEGF、Col-1、 $\alpha$ -SMA 表达水平显著降低, P21 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与沉默 MIR155HG 组相比,沉默 MIR155HG 和干扰 miR-

133a-3p 组 Furin 野生型表达载体的细胞荧光素酶活性显著降低 ( $P < 0.05$ ; 表 5); 而转染 Furin 突变型表达载体的细胞荧光素酶活性无显著差异。与沉默对照组相比,沉默 MIR155HG 组 Furin 表达水平显著降低; 与沉默 MIR155HG 和抑制物对照组相比,沉默 MIR155HG 和干扰 miR-133a-3p 组 Furin 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ; 表 6)。

表 4. qRT-PCR 检测心肌成纤维细胞中 MIR155HG 表达对 miR-133a-3p 表达的影响 ( $n=3$ )

Table 4. Effect of MIR155HG expression on miR-133a-3p expression in myocardial fibroblasts by qRT-PCR ( $n=3$ )

分组	miR-133a-3p
沉默对照组	1.00±0.18
沉默 MIR155HG 组	3.04±0.25
<i>t</i>	19.866
<i>P</i>	0.000

133a-3p 组、沉默 MIR155HG 和过表达 Furin 组心肌成纤维细胞培养 48、96 h 的细胞活力、迁移细胞数及 Cyclin D1、VEGF、Col-1、 $\alpha$ -SMA 表达水平显著升高, P21 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ; 图 6、图 7、表 7)。

表 6. 抑制 MIR155HG 和 miR-133a-3p 表达对 Furin 表达的影响 ( $n=3$ )

Table 6. Effect of inhibition of MIR155HG and miR-133a-3p expression on Furin expression ( $n=3$ )

分组	Furin
沉默对照组	1.00±0.08
沉默 MIR155HG 组	0.33±0.06 <sup>a</sup>
沉默 MIR155HG 和抑制物对照组	0.34±0.07
沉默 MIR155HG 和干扰 miR-133a-3p 组	0.89±0.09 <sup>b</sup>
<i>F</i>	197.322
<i>P</i>	0.000

a 为  $P < 0.05$ , 与沉默对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与沉默 MIR155HG 和抑制物对照组比较。

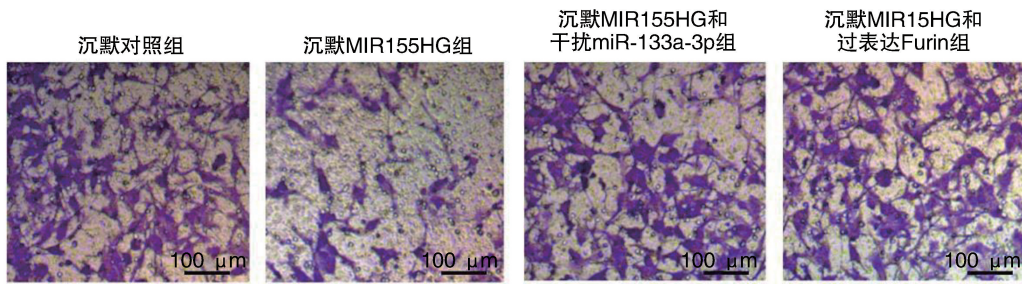


图 6. Transwell 实验检测 4 组心肌成纤维细胞迁移

Figure 6. Myocardial fibroblast migration in four groups detected by Transwell experiment

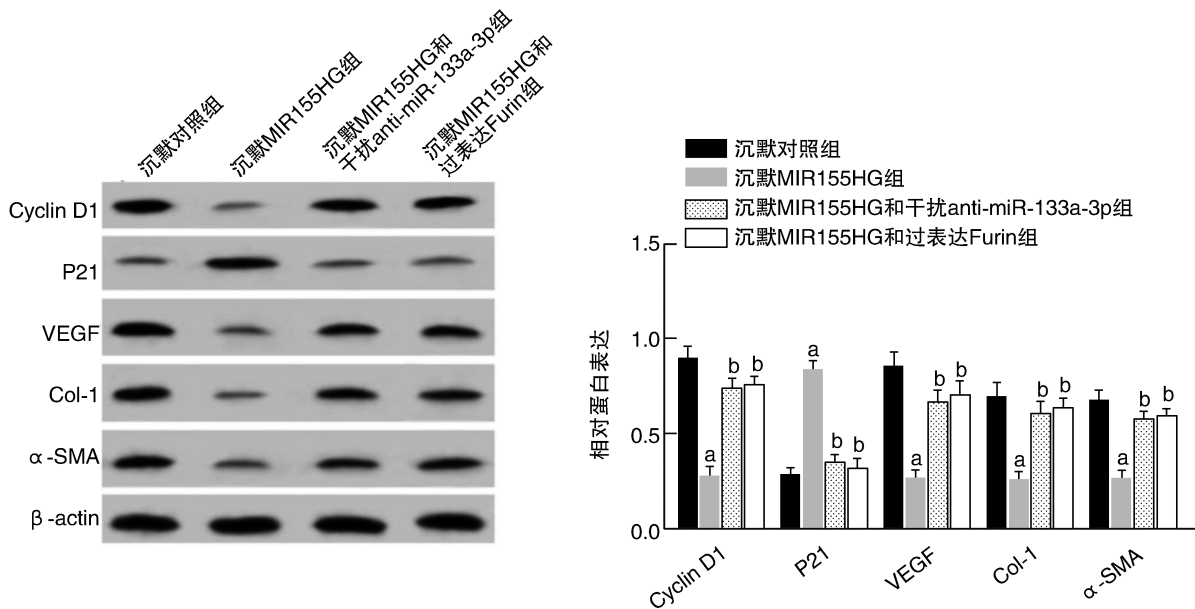


图 7. Western blot 检测 4 组心肌成纤维细胞 Cyclin D1、P21、VEGF、Col-1 和 α-SMA 蛋白表达 (n=3) a 为 P<0.05, 与沉默对照组比较; b 为 P<0.05, 与沉默 MIR155HG 组比较。

Figure 7. Expressions of Cyclin D1, P21, VEGF, Col-1 and α-SMA protein in myocardial fibroblasts in four groups detected by Western blot (n=3)

表 7. MIR155HG 通过 miR-133a-3p/Furin 分子轴调控心肌成纤维细胞增殖和迁移及其相关蛋白表达 (n=3)

Table 7. MIR155HG regulates the proliferation and migration of myocardial fibroblasts and the expression of related proteins through miR-133a-3p/Furin molecular axis (n=3)

分组	细胞活力 (A <sub>570 nm</sub> )			迁移细胞数/ (个/HP)
	24 h	48 h	96 h	
沉默对照组	0.31±0.08	0.83±0.08	1.43±0.11	99.58±8.72
沉默 MIR155HG 组	0.32±0.07	0.35±0.07 <sup>a</sup>	0.78±0.05 <sup>a</sup>	46.31±6.38 <sup>a</sup>
沉默 MIR155HG 和干扰 miR-133a-3p 组	0.29±0.06	0.75±0.06 <sup>b</sup>	0.79±0.06	89.34±8.16 <sup>b</sup>
沉默 MIR155HG 和过表达 Furin 组	0.31±0.07	0.78±0.07 <sup>b</sup>	1.12±0.07 <sup>b</sup>	93.41±8.24 <sup>b</sup>
F	0.288	88.652	149.714	84.392
P	0.834	0.000	0.000	0.000

a 为 P<0.05, 与沉默对照组比较; b 为 P<0.05, 与沉默 MIR155HG 组比较。

### 3 讨论

心肌梗死是严重危害人类健康的心血管疾病,给人类造成了沉重的社会负担,心肌梗死后心肌成纤维细胞的增殖迁移能力增加并分化为肌样成纤维细胞,促进了心肌梗死并增加心肌纤维化程度<sup>[10]</sup>。研究发现 lncRNA 可参与调控心肌细胞凋亡和心肌纤维化过程,与心肌梗死发生发展有密切关系<sup>[11]</sup>。研究发现敲低 MIR155HG 抑制了喉鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[12]</sup>。MIR155HG 是 miR-155 的宿主基因,miR-155 可通过 TGF- $\beta$ 1/Smad2 信号通路调节心脏纤维化<sup>[13]</sup>。本实验结果显示,在心肌梗死模型小鼠心脏组织中 MIR155HG 高表达,抑制 MIR155HG 表达后心肌成纤维细胞的细胞活力、迁移细胞数、Cyclin D1 表达水平显著降低,P21 表达水平显著升高。Cyclin D1、P21 是细胞周期调控蛋白,Cyclin D1 是正调控因子,过表达可引起细胞过度增殖;P21 是负调控因子,高表达则抑制细胞增殖。本实验结果表明抑制 MIR155HG 表达可抑制心肌成纤维细胞增殖和迁移。

VEGF 能够促进血管内皮细胞增殖并诱导血管生成,有研究报道 VEGF 对急性心肌梗死大鼠有保护作用<sup>[14]</sup>。Col-1、 $\alpha$ -SMA 是心肌纤维化的重要标记物,其高表达促进细胞纤维化;研究报道异丙肾上腺素诱发的大鼠心肌梗死,Col-1、 $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta$  的表达上调,下调其表达可减轻异丙肾上腺素诱发的心肌梗死大鼠的线粒体和溶酶体功能障碍<sup>[15]</sup>。本实验结果显示,抑制 MIR155HG 表达后心肌成纤维细胞 VEGF、Col-1、 $\alpha$ -SMA 表达水平显著降低,说明抑制 MIR155HG 表达可抑制心肌成纤维细胞胶原合成,对心肌梗死有保护作用。

研究表明 lncRNA 可作为内源性 RNA 调控 miRNA 的表达。本实验结果显示,MIR155HG 靶向调控 miR-133a-3p,且抑制 miR-133a-3p 表达逆转了抑制 MIR155HG 表达对心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成相关蛋白的抑制作用。研究报道 miR-133a-3p 过表达可抑制肝星状细胞纤维化标志物  $\alpha$ -SMA 的表达<sup>[16]</sup>。芪丹利心丸可能通过 miR-133a/TGF- $\beta$ 1/结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)信号通路防治心肌梗死大鼠心肌纤维化<sup>[17]</sup>,表明 miR-133a-3p 具有防治心肌梗死、心肌纤维化的作用。综上,MIR155HG 可能通过调控 miR-133a-3p 影响心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成。

研究报道 miR-24 通过调控靶基因 Furin 抑制心脏成纤维细胞合成 Col-1、 $\alpha$ -SMA,进而抑制心脏成纤维细胞增殖和迁移<sup>[18]</sup>。还有研究报道 miR-24 在心肌梗死后心肌组织中低表达,miR-24 能改善心肌梗死后心功能<sup>[19]</sup>;说明无论在小鼠心肌梗死模型还是在大鼠心肌成纤维细胞中其作用是相同的。本实验结果显示,miR-133a-3p 靶向调控 Furin,在心肌梗死模型小鼠心脏组织中 Furin 高表达,表明 Furin 高表达与心肌梗死密切相关。本实验还发现 MIR155HG 靶向调控 miR-133a-3p,过表达 Furin 逆转了抑制 MIR155HG 表达对心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成相关蛋白的抑制作用,提示 MIR155HG 可能通过调控 miR-133a-3p 进而调控 Furin 的表达影响心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成。

综上所述,抑制 MIR155HG 表达可抑制心肌成纤维细胞增殖、迁移、分化和胶原合成,其机制可能与 miR-133a-3p/Furin 轴有关。

#### [参考文献]

- [1] 王敏臣. 老年高血压合并急性心肌梗死的临床研究[J]. 中国临床新医学, 2015, 8(2): 131-133.
- [2] 杨小溪, 魏玲. 心肌梗死后心肌纤维化发病机制及其防治研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(3): 239-243.
- [3] 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.
- [4] 韩虎魁, 李刚, 李其勇, 等. 血清 lncRNA MIR155HG 在慢性心力衰竭患者中的表达及临床意义[J]. 四川医学, 2019, 40(4): 325-329.
- [5] 郭营波, 马健, 蒋卫东. 血清 miR-155、HIF1 $\alpha$  的表达与急性心肌梗死患者预后的关系[J]. 河北医药, 2019, 41(14): 2150-2153.
- [6] 谭文鹏, 杨侃, 陈晔明, 等. 自发性高血压大鼠心肌组织 microRNA-133a 与 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达的改变及意义[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(4): 748-751.
- [7] 李安莹, 杨侃, 杨琼. microRNA-133a 在心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌细胞中的表达及抗凋亡作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(10): 1001-1008.
- [8] Li M, Ding W, Tariq MA, et al. A circular transcript of ncx1 gene mediates ischemic myocardial injury by targeting miR-133a-3p[J]. Theranostics, 2018, 8(21): 5855-5869.
- [9] 李艳, 王静, 袁琛, 等. Furin 基因对高血压心肌梗死细胞增殖、迁移以及作用机制的研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(9): 913-916.
- [10] 孔春燕, 唐其柱. 成纤维细胞在心肌梗死后炎症和修复中的作用[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(5): 182-185.

(下转第 1059 页)



- 2018, 276: 189-194.
- [10] Bedi Jr KC, Snyder NW, Brandimarto J, et al. Evidence for intramyocardial disruption of lipid metabolism and increased myocardial ketone utilization in advanced human heart failure[J]. *Circulation*, 2016, 133(8): 706-716.
- [11] Peña JM, Aspberg S, MacFadyen J, et al. Statin therapy and risk of fracture: results from the JUPITER randomized clinical trial[J]. *JAMA Intern Med*, 2015, 175(2): 171-177.
- [12] Ridker PM, Lonn E, Paynter NP, et al. Primary prevention with statin therapy in the elderly: new Meta-analyses from the contemporary JUPITER and HOPE-3 randomized trials[J]. *Circulation*, 2017, 135(20): 1979-1981.
- [13] Khera AV, Demler OV, Adelman SJ, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein particle number, and incident cardiovascular events: an analysis from the JUPITER trial (justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating Rosuvastatin) [J]. *Circulation*, 2017, 135(25): 2494-2504.
- [14] Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 290: 140-205.
- [15] Stegman B, Shao M, Nicholls SJ, et al. Coronary atheroma progression rates in men and women following high-intensity statin therapy: a pooled analysis of REVERSAL, ASTEROID and SATURN [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 254: 78-84.
- [16] Prasad M, Sara JD, Widmer RJ, et al. Triglyceride and triglyceride/HDL (high density lipoprotein) ratio predict major adverse cardiovascular outcomes in women with non-obstructive coronary artery disease[J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(9): e009442.
- [17] Vallée A, Lelong H, Lopez-Sublet M, et al. Association between different lipid parameters and aortic stiffness: clinical and therapeutic implication perspectives [J]. *J Hypertens*, 2019, 37(11): 2240-2246.
- [18] Ronsein GE, Hutchins PM, Isquith D, et al. Niacin therapy increases high-density lipoprotein particles and total cholesterol efflux capacity but not ABCA1-specific cholesterol efflux in statin-treated subjects [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(2): 404-411.
- [19] Chandra A, Neeland IJ, Das SR, et al. Relation of black race between high density lipoprotein cholesterol content, high density lipoprotein particles and coronary events (from the Dallas Heart Study) [J]. *Am J Cardiol*, 2015, 115(7): 890-894.
- [20] 徐瑞霞, 郭远林, 张彦, 等. 多甘烷醇联合阿托伐他汀治疗对高脂血症患者高密度脂蛋白颗粒的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(2): 149-152.
- [21] 万进东, 王丹, 刘森, 等. 血浆致动脉硬化指数对早发急性冠状动脉综合征患者 PCI 术后预后的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(7): 705-710.
- [22] 李超, 白明, 彭瑜, 等. 非高密度脂蛋白胆固醇与冠状动脉病变严重程度的相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(4): 344-348.
- (此文编辑 许雪梅)

(上接第 1033 页)

- [11] 郝凯丽, 路兴爱, 武宏春, 等. 心肌梗死相关 lncRNA 的筛选及表达模式分析 [J]. *复旦学报(自然科学版)*, 2018, 57(6): 740-748.
- [12] Cui W, Meng W, Zhao L, et al. TGF- $\beta$ -induced long non-coding RNA MIR155HG promotes the progression and EMT of laryngeal squamous cell carcinoma by regulating the miR-155-5p/SOX10 axis [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(6): 2005-2018.
- [13] Zhang D, Cui Y, Li B, et al. miR-155 regulates high glucose-induced cardiac fibrosis via the TGF- $\beta$  signaling pathway [J]. *Mol Biosyst*, 2016, 13(1): 215-224.
- [14] 冯艳, 李延民, 李静. 血管内皮生长因子对急性心肌梗死大鼠保护作用的研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(14): 1982-1984.
- [15] Radhiga T, Senthil S, Sundaresan A, et al. Ursolic acid modulates MMPs, collagen-I,  $\alpha$ -SMA, and TGF- $\beta$  expression in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2019, 38(7): 785-793.
- [16] 李亮, 张传山, 毕晓娟, 等. miR-133a-3p 重组腺相关病毒的构建及抑制 LX-2 细胞  $\alpha$ -SMA 基因表达 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(6): 625-628.
- [17] 陈慧洋, 娄利霞, 赵一舟, 等. 芪丹利心丸对心肌梗死大鼠左心室心肌组织 miR-133a/TGF- $\beta$ 1/CTGF 信号通路的影响 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(20): 66-71.
- [18] 赵玉明, 李艳星, 朱晓锋, 等. miR-24 对心脏成纤维细胞生长和迁移的影响及机制研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(16): 3039-3044.
- [19] 王珏, 黄伟聪, 郑亮承, 等. MicroRNA-24 对心肌梗死后心肌细胞凋亡的调控作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(4): 590-596.
- (此文编辑 曾学清)