

## 环状 RNA\_circRNA\_005647 通过结合 miR-99b-5p 抑制心肌细胞中肥厚相关基因的表达

严钰敏<sup>1</sup>, 袁淑菁<sup>2</sup>, 张铭<sup>3</sup>, 朱杰宁<sup>3</sup>, 符永恒<sup>3</sup>, 方咸宏<sup>3</sup>, 单志新<sup>1,2,3</sup>

(1. 南方医科大学药学院, 广东省广州市 510515; 2. 华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006;

3. 广东省临床药理学重点实验室 广东省人民医院, 广东省广州市 510080)

[关键词] 心肌肥厚; 环状 RNA; circRNA\_005647; 微小 RNA; miR-99b-5p

[摘要] **目的** 研究环状 RNA circRNA\_005647 抑制心肌肥厚相关基因表达的作用机制。**方法** 建立血管紧张素 II (Ang II) 灌注诱导的心肌肥厚小鼠模型。原代分离获得 C57BL/6 乳小鼠心肌细胞(NMVC), Ang II 处理 NMVC 建立心肌细胞肥大模型。利用 NMVC, 分别感染 circRNA\_005647 重组腺病毒(rAd-circRNA\_005647)和转染 miR-99b-5p 模拟物来研究对 NMVC 肥大的影响。通过双荧光素酶报告基因实验和 RNA Pull-down 实验验证 circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 的结合作用。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 NMVC 中心肌肥厚相关基因的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 在 Ang II 诱导的小鼠心肌肥厚模型和心肌细胞肥大模型中, circRNA\_005647 及其宿主基因肌球蛋白 IXA(Myosin IX)表达升高。过表达 circRNA\_005647 可抑制 Ang II 诱导的 NMVC 中肥厚相关基因心房钠泵(ANP)和肌球蛋白重链 7(Myosin heavy chain 7)基因表达升高。circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 间存在结合作用。过表达 circRNA\_005647 可抑制 miR-99b-5p 促心肌细胞肥大的作用。**结论** circRNA\_005647 通过结合 miR-99b-5p 发挥抑制心肌细胞肥大的作用。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

### CircRNA\_005647 inhibits the expression of hypertrophy-related genes in cardiomyocytes by sponging miR-99b-5p

YAN Yumin<sup>1</sup>, YUAN Shujing<sup>2</sup>, ZHANG Ming<sup>3</sup>, ZHU Jiening<sup>3</sup>, FU Yongheng<sup>3</sup>, FANG Xianhong<sup>3</sup>, SHAN Zhixin<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Pharmacology & Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] cardiac hypertrophy; circular RNA; circRNA\_005647; microRNA; miR-99b-5p

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of circRNA\_005647 on suppressing the expression of hypertrophy associated genes and the potential mechanism. **Methods** Mouse model of cardiac hypertrophy induced by angiotensin II (Ang II) perfusion was constructed. Primary isolation and culture of C57BL/6 neonatal mouse ventricular cardiomyocytes (NMVC) and Ang II induced cell model of cardiac hypertrophy was also established. NMVC were infected with rAd-circRNA\_005647 and transfected miR-99b-5p mimic to increase circRNA\_005647 and miR-99b-5p levels, respectively. Dual luciferase reporter assay and RNA Pull-down assay were performed to identify the interaction between circRNA\_005647 and miR-99b-5p, respectively. mRNA and protein expression of hypertrophy associated genes were determined by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and Western blot assay, respectively. **Results** circRNA\_005647 and its host gene of myosin IXA (Myosin IX) were increased in the hypertrophic mouse myocardium and in Ang II-treated NMVC. Overexpression of circRNA\_005647 could significantly suppress Ang II-induced increases of hypertrophy-related genes,

[收稿日期] 2020-06-20

[修回日期] 2020-08-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81770264);广东省医学科研基金项目(B2020215);广州市科技计划项目(202002030013)

[作者简介] 严钰敏, 硕士研究生, 主要研究方向为心肌重构分子调控机制, E-mail 为 1012712237@qq.com。通信作者单志新, 博士后, 研究员, 博士研究生导师, 主要研究非编码 RNA 与心肌重构, E-mail 为 shanzhixin@gdph.org.cn。

including atrial natriuretic peptide (Anp) and myosin heavy chain 7 (Myh7), in NMVC. The interaction between circRNA\_005647 and miR-99b-5p was identified. Over-expression of circRNA\_005647 blocked the expression of hypertrophy associated genes induced by miR-99b-5p in NMVC. **Conclusion** circRNA\_005647 exerts an inhibitory effect on cardiac hypertrophy by sponging miR-99b-5p.

心肌肥厚分为生理性肥厚和病理性肥厚,其中病理性肥厚主要是由于高血压、心肌梗死、肥胖和糖尿病等疾病引起的,随着心脏增大,心室增大,并且心室壁上的工作负荷压力降低,这有助于在病理状况下维持心输出量,但过度的病理性肥厚最终可导致心力衰竭和心源性猝死<sup>[1-3]</sup>。参与心肌肥厚过程的信号通路和分子调控网络相当复杂,对其转化为心力衰竭的过程尚未完全阐明<sup>[2]</sup>。

近来越来越多的研究表明非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA) 是心血管疾病发生发展的重要参与者<sup>[4]</sup>。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一大类共价闭合环状非编码 RNA,与传统线性 RNA 分子不同,环状 RNA 无 5' 末端帽子和 3' poly(A) 尾巴,不受核酸外切酶的影响而具有高度稳定性,广泛且丰富存在于真核细胞中。多项研究表明 circRNA 在心血管疾病发生发展中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。

Yang 等<sup>[7]</sup>发现 circRNA CACR 在糖尿病性心脏病模型和糖尿病患者血清中表达均升高,它可以作为 miR-214-3p 分子海绵上调靶基因 Caspase-1 表达介导其促心肌细胞焦亡表型。circRNA HRCR 通过吸附 miR-223,解除 miR-223 对其下游靶基因 ARC 的抑制作用,促进 ARC 的表达,从而抑制心肌肥厚及心力衰竭<sup>[8]</sup>。课题组发现, circRNA\_000203 通过吸附 miR-26b-5p 和 miR-140-3p,导致心肌细胞中 GATA 结合蛋白 4 (GATA binding protein 4, GATA4) 表达增加来介导 circRNA\_000203 促进心肌肥厚的作用<sup>[9]</sup>。

课题组<sup>[10]</sup>前期利用糖尿病小鼠心肌组织进行 circRNA 表达谱分析,发现多个差异表达的 circRNA,其中来源于宿主基因肌球蛋白 IXA (myosin IXA, Myo9a) 基因的 circRNA\_005647 在心肌组织中表达增强。序列分析结果显示, circRNA\_005647 与同源的人 hsa\_circ\_0036176 均为 1 226 nt,有 92.7% 的序列相似性 ([https://circinteractome.nia.nih.gov/circular\\_rna.html](https://circinteractome.nia.nih.gov/circular_rna.html))。实验证实 circRNA\_005647 可通过结合 miR-27b-3p 解除对下游靶基因过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ ) 的抑制作用,从而发挥抑制小鼠心肌纤维化的作用<sup>[9]</sup>,但尚不清楚 circRNA\_005647 对心肌肥厚的调控作用及机制。

本文通过构建血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 灌注诱导小鼠心肌肥厚模型及 Ang II 处理的小鼠心肌细胞肥大模型,观察 circRNA\_005647 在心肌肥厚时的表达水平,利用腺病毒介导过表达 circRNA\_005647,并探究其对心肌细胞肥大表型的调控作用和机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

1~3 天的 SPF 级 C57BL/6 乳小鼠,雌雄不限,由广州中医药大学实验动物中心提供,许可证号为 SCXK(粤)2013-0034。

### 1.2 主要试剂

人 Ang II (Sigma 公司);特级澳洲胎牛血清、DMEM/F12 细胞培养基和 0.25% EDTA-胰蛋白酶 (Gibco 公司);限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I、*Xho* I 和 *Kpn* I (NEB 公司);BJ5183 *E. coli*、DH5 $\alpha$  *E. coli*、pAdTrack-CMV 载体和 pAd-Easy I (Coloncancer 公司);质粒提取试剂盒 (Omega 公司);DNA 凝胶回收试剂盒 (Qiagen 公司);Lipofectamine 2000 和 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司);SYBR Green Mix、SDS loading buffer (TaKaRa 公司);miR-99b-5p 模拟物 (RiBio 公司);SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (Thermo Scientific 公司);蛋白相对分子质量标准 (Invitrogen 公司);抗 GAPDH、抗兔和抗小鼠抗体 (Protein Technology 公司);心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, Anp) 抗体 (Bio-world 公司); $\beta$ -肌球蛋白重链 ( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\beta$ -MHC) 抗体 (Sigma 公司);BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo 公司);PVDF 膜 (Whatman 公司);荧光素酶活性检测试剂盒 (Promega 公司);RAP 试剂盒 (广州伯信公司);链霉亲和素磁珠 (NEB 公司);其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。PCR 引物由 Invitrogen 公司合成 (表 1)。

### 1.3 Ang II 灌注诱导小鼠心肌肥厚模型

按小鼠体质量计算,将 1.46 mg/(kg·d) Ang II 用 0.9% 盐水配制,载入渗透缓释泵 (对照组用等量生理盐水处理)。麻醉小鼠,将胶囊缓释泵插入小鼠背部,固定胶囊渗透泵,缓释泵将 Ang II 释放入小鼠体内,术后饲养 14 天。

表 1. PCR 引物序列  
Table 1. Primer sequences for PCR assay

基因	序列
Myh7	F:5'-GACCAGATGAATGAGCACCG-3' R:5'-TCCTCCAGTTGCCTCTTGAG-3'
Anp	F:5'-GAGGTGCCTCCCTGGACTG-3' R:5'-TCTGGGCTCCAATCCTCTGA-3'
Myo9a	F:5'-TTTCTGGGATGACTGGCATT-3' R:5'-GACTGGGTGTTGGAGAAAGC-3'
Gapdh	F:5'-CAAGAAGGTGTTGAAGCAGG-3' R:5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'
circRNA_005647	F:5'-GTTAGCATTCCACCTTAAACAG-3' R:5'-CTTCTCCATCACTTACATTC-3'
miR-99b-5p	RT:5'-GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGG AGTCGGCAATTGCACTGGATACGAC- CGCAAGGTC-3' F:5'-CACCCGTAGAACCGACCTTGGC-3' R:5'-GTCCGTGCTGGAGTC-3'
U6	RT:5'-GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGG AGTCGGCAATTGCACTGGATACGAC-3' F:5'-GTCCGGTCTGCTCGCTTCGGCAGC-3' R:5'-GTCCGTGCTGGAGTC-3'

#### 1.4 乳小鼠心肌细胞的原代分离培养

无菌取新生 1~3 天的 SPF 级别 C57BL/6 乳小鼠心脏,0.125% 胰酶消化后用差速贴壁法分离心肌细胞与心肌成纤维细胞。将心肌细胞培养于提前用 1% 明胶包被的 12 孔板中,分离后的心肌成纤维细胞用加入双抗(100 U/mL 青霉素、100 g/L 链霉素)和 10% 血清的 DMEM/F12 培养基,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24 h 后更换为完全培养基,稳定培养至 48 h。分别用 Ang II、rAd-circRNA\_005647、100 nmol/L 阴性对照、miR-99b-5p 模拟物(miR-99b-5p mimic)处理乳小鼠心肌细胞(neonatal mouse ventricular cardiomyocytes, NMVC),24 h 后结束实验。

#### 1.5 Ang II 处理乳小鼠心肌细胞诱导心肌细胞肥大模型

用 PBS 将 Ang II 粉末配制为 10 μmol/L 的储存液,用含 1% 血清培养基培养心肌细胞 12 h 后更换为 50 nmol/L Ang II 的 1% 血清培养基,培养箱培养 48 h 后收集细胞。

#### 1.6 实时荧光定量 PCR 检测 circRNA\_005647、Myo9a、Myh7 和 Anp 表达水平

Trizol 法提取乳小鼠心肌细胞总 RNA。取 1.5 μg 总 RNA,加入 5×Prime Script RT Master Mix 4 μL (反转录试剂盒),以 Oligo(dT) primer 和随机引物反转录出 cDNA 用于检测 circRNA\_005647、Myo9a、

Myh7 和 Anp 表达水平。取 1.0 μg 总 RNA,用 miR-99b-5p 的特异 RT 引物反转录出 cDNA 以检测 miR-99b-5p 水平。分别以 GAPDH 及 U6 作为内参照,在 vii A7 Quantitative PCR System (Applied Biosystems, 美国)进行 PCR 反应和分析。以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 circRNA\_005647、miR-99b-5p、Myo9a、Myh7 和 Anp 的相对表达水平。

#### 1.7 Western blot 检测肥厚相关基因的蛋白表达水平

将乳小鼠心肌细胞置于冰上,加入 RIPA 蛋白裂解液裂解,于 4 °C、10 000×g 离心 10 min。取上清液测浓度,分装并加入 4×SDS loading buffer,混匀,99 °C 加热 10 min 使蛋白变性,保存于 -80 °C 备用。收集得到的蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至聚偏二氟乙烯膜上,5% 脱脂奶粉液常温封闭 1.5 h。根据蛋白相对分子质量大小分别用相应的一抗 anti-β-MHC(1:1 000)、anti-Anp(1:1 000)和 anti-GAPDH(1:5 000)4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜,用相应的二抗 anti-rabbit(1:5 000)和 anti-mouse(1:5 000)常温孵育 1 h。ECL 发光试剂盒显影,Image J 进行图像灰度分析。

#### 1.8 双荧光素酶报告实验检测 circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 的结合作用

以 pGL3-promoter 为载体,构建包含 circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 潜在结合序列的重组质粒 pGL3-circRNA\_005647 和包含相应结合序列突变的 pGL3-circRNA\_005647-mut。将重组质粒和 miR-99b-5p 共转染至 HEK293 细胞中,根据萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶荧光强度比值(FL/RL)的改变判断 circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 是否存在结合作用。

#### 1.9 RNA Pull-down 实验检测 circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 的结合作用

Trizol 法提取 100 μg 过表达 circRNA\_005647 的乳小鼠心肌细胞总 RNA;将 125 μL 链霉亲和素磁珠与 25 μL 终浓度为 8 μmol/L 的探针溶液混匀。在室温中,链霉亲和素磁珠与探针溶液的混合液与总 RNA 轻混、孵育 30 min。加入洗脱缓冲液,收集结合的 RNA 复合物。利用 RT-qPCR 检测 circRNA\_005647 的水平。

#### 1.10 统计学方法

利用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用 one way ANOVA 单因素方差分析,并以 Bonferroni 校正的 *t* 检验进行组间两两比较;而两组间比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 判为差异具统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠心肌肥厚和心肌细胞肥大模型中 circRNA\_005647 表达增加

circRNA\_005647 是由 Myo9a 基因转录本中第 2、3、4 外显子通过反向剪接环化形成的,全长 1 226 nt(图 1A)。在 Ang II 灌注诱导的小鼠心肌肥厚模型中,RT-qPCR 检测结果显示肥厚相关基因 Anp 和 Myh7 表达上调,circRNA\_005647 和其宿主基因

Myo9a 表达亦升高(图 1B),Western blot 验证蛋白水平上,Anp 和  $\beta$ -MHC 表达也是升高的(图 1C)。在细胞模型中,用 AngII 处理 NMVC 24 h 后,RT-qPCR 和 Western blot 结果显示肥大相关基因在 mRNA 和蛋白水平上表达均显著上调,circRNA\_005647 和 Myo9a 表达显著增加(图 1D 和 1E)。DNA 测序结果显示 circRNA\_005647 的接头序列正确,证实上述检测的 circRNA\_005647 表达产物是特异的(图 1F)。

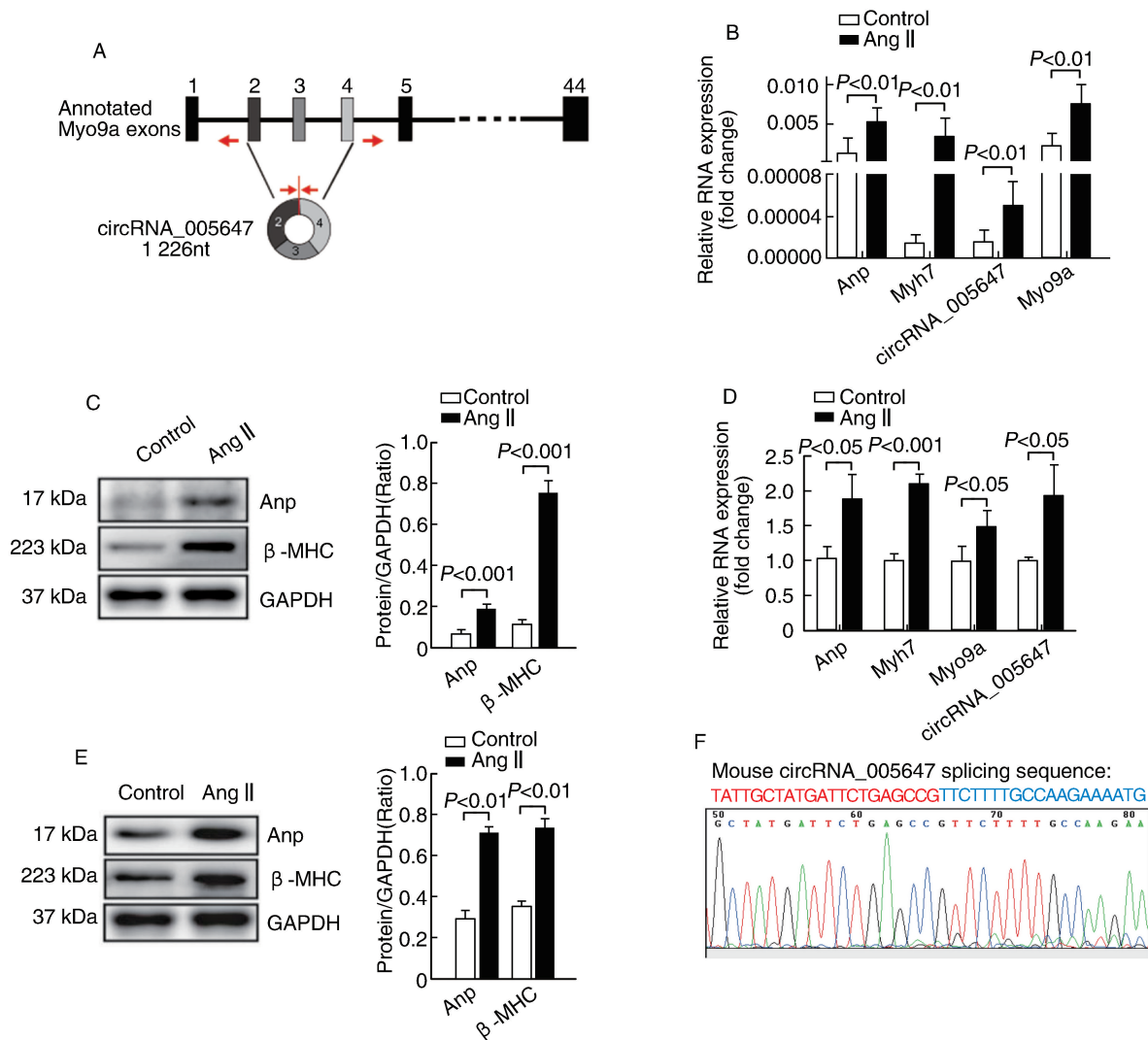


图 1. circRNA\_005647 在心肌肥厚小鼠和心肌细胞肥大模型中表达上调

A 为 Myo9a 转录本外显子构成以及反向剪接形成 circRNA\_005647; B 为心肌肥厚小鼠心肌组织中 Anp、Myh7、circRNA\_005647 及 Myo9a 的 mRNA 相对表达量( $n=5 \sim 6$ ); C 为心肌肥厚小鼠心肌组织中 Anp 和  $\beta$ -MHC 的蛋白表达水平( $n=5$ ); D 为心肌细胞肥大模型中 Anp、Myh7、circRNA\_005647 及 Myo9a 的 mRNA 相对表达量( $n=3$ ); E 为心肌细胞肥大模型中 Anp 和  $\beta$ -MHC 的蛋白表达水平( $n=3$ ); F 为 Sanger DNA 测序检测 circRNA\_005647 的接头序列。

Figure 1. Up-regulation of circRNA\_005647 in hypertrophic myocardium and NMVC treated with Ang II

### 2.2 过表达 circRNA\_005647 抑制心肌细胞肥大模型中肥厚相关基因表达

构建 rAd-circRNA\_005647 腺病毒,过表达 cir-

cRNA\_005647 (OE-circ\_005647) 不影响感染的 NMVC 中其宿主基因 Myo9a 的表达水平(图 2A 和 2B)。在 Ang II 诱导的 NMVC 模型中,Western blot

结果可见,过表达 circRNA\_005647 后使 AngII 处理后 上调的 Anp 和  $\beta$ -MHC 恢复至对照组水平(图 2C)。

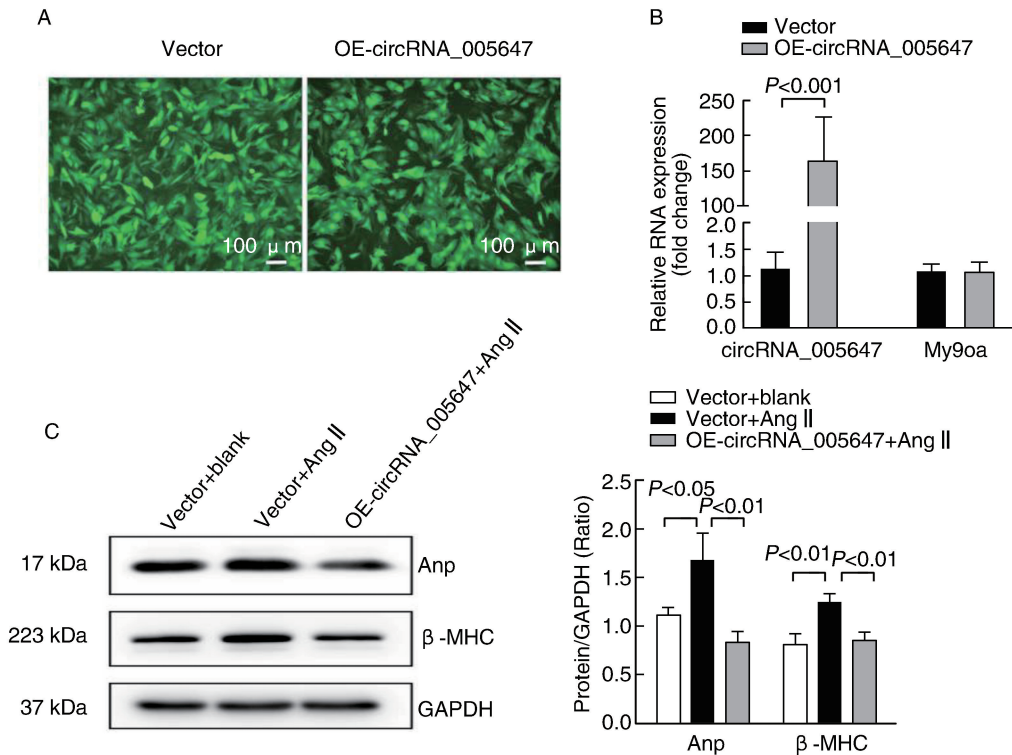


图 2. circRNA\_005647 可抑制 Ang II 诱导的 NMVC 细胞中肥大相关基因表达 ( $n=3$ )

A 为 NMVC 感染 circRNA\_005647 后共表达 GFP 荧光图;B 为 RT-qPCR 检测 NMVC 中 circRNA\_005647 和 Myo9a 的 mRNA 表达;C 为 Western blot 检测 Ang II 诱导的 NMVC 中 Anp 和  $\beta$ -MHC 的蛋白表达。

Figure 2. circRNA\_005647 inhibits Ang II-induced hypertrophy-related genes expression ( $n=3$ )

### 2.3 circRNA\_005647 通过结合 miR-99b-5p 发挥抑制心肌细胞肥大的作用

根据 Mirdb 数据库 ([www.mirdb.org](http://www.mirdb.org)) 以及 TargetScan-Vert ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) 的序列分析提示, circRNA\_005647 的第 433 ~ 452 bp 与 miR-99b-5p 存在潜在结合作用(图 3A)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与 pGL3-promoter 组对比,重组质粒 pGL3-circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 共转染组 FL/RL 值显著降低,而重组质粒 pGL3-circRNA\_005647-mut 与 miR-99b-5p mimic 共转染组的 FL/RL 值则无显著改变(图 3B)。

RNA Pull-down 实验是通过合成生物素标记的 Biotin-miR-99b-5p 探针以及 circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 结合位点突变的 Biotin-Scramble 探针提取过表达 circRNA\_005647 的 NMVC 总 RNA,利用链霉素亲和素磁珠吸附其生物素探针,孵育后纯化,最后洗脱探针所捕获的 RNA 分子,RT-qPCR 检测并对比 circRNA\_005647 的相对表达量。与 Biotin-Scramble 组比,Biotin-miR-99b-5p 探针可富集

更多的 circRNA\_005647(图 3C);在 Ang II 诱导的心肌肥厚小鼠模型和心肌细胞肥大模型中,miR-99b-5p 表达均上调(图 3D 和 3E);转染了 miR-99b-5p 模拟物的 NMVC 中,心肌细胞肥大相关基因在 mRNA 水平和蛋白水平均表达升高(图 3F 和 3G)。

RT-qPCR 结果显示,miR-99b-5p 水平在过表达 circRNA\_005647 的 NMVC 中降低(图 3H)。同时,过表达 circRNA\_005647 可显著抑制 NMVC 中 miR-99b-5p 引起的 Anp 和  $\beta$ -MHC 表达增加(图 3I)。

## 3 讨论

已证实 circRNA\_005647 具有通过结合 miR-27b-3p 发挥抑制心肌纤维化的作用<sup>[11]</sup>,但 circRNA\_005647 在心肌肥厚中的作用不清楚。本研究证实 Ang II 灌注诱导的小鼠心肌肥厚模型和 Ang II 诱导的 NMVC 中, circRNA\_005647 表达均显著升高,提示 circRNA\_005647 可能参与调控心肌肥厚过程;利用腺病毒介导在 NMVC 中过表达 circRNA\_

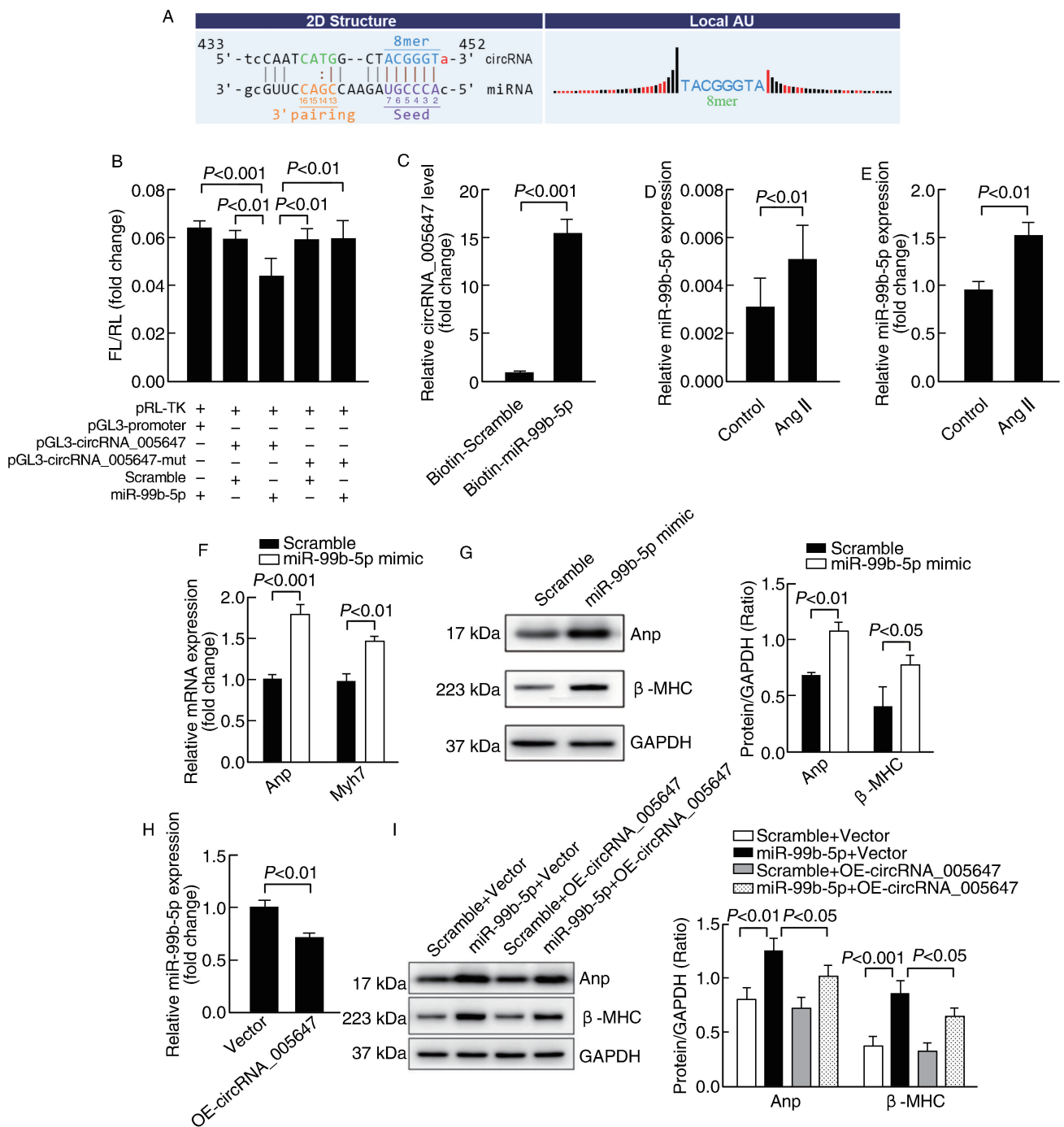


图 3. miR-99b-5p 介导 circRNA\_005647 发挥抑制心肌细胞肥大相关基因表达的作用 (n=3)

A 为生物信息学预测 miR-99b-5p 与 circRNA\_005647 的结合位点;B 为双荧光素酶报告基因实验证实 circRNA\_005647 与 miR-99b-5p 间有特异性结合作用;C 为 RNA Pull-down 实验检测 miR-99b-5p 与 circRNA\_005647 间的结合作用;D 和 E 依次为 RT-qPCR 检测 Ang II 诱导的小鼠心肌组织和肥大的心肌细胞中 miR-99b-5p 表达水平;F 为 RT-qPCR 检测转染 miR-99b-5p 的 NMVC 中 Anp 及 Myh7 的 mRNA 表达水平;G 为 Western blot 检测转染 miR-99b-5p 的 NMVC 中 Anp 和 β-MHC 的蛋白表达水平;H 为 RT-qPCR 检测过表达 circRNA\_005647 的 NMVC 中 miR-99b-5p 的表达水平;I 为 Western blot 检测过表达 circRNA\_005647 和 miR-99b-5p 的 NMVC 中 Anp 和 β-MHC 的蛋白表达。

Figure 3. miR-99b-5p mediates the effect of circRNA\_005647 on inhibiting cardiomyocyte hypertrophy-related genes expression (n=3)

005647 可显著抑制 Ang II 上调的 Anp 和 β-MHC 表达,表明 circRNA\_005647 具有抑制心肌肥厚的作

用。鉴于既往已证实 circRNA\_005647 有抑制小鼠心肌纤维化的作用<sup>[9]</sup>,因此,circRNA\_005647 具有

双重的抑制心肌肥厚和心肌纤维化的作用,可能成为潜在的用于心肌重构治疗研究的干预靶点。

鉴于一些 circRNA 可与特定蛋白质分子(如 U1snRNP)相互作用,增强亲本基因的转录<sup>[12-13]</sup>,因此本研究首先考虑 circRNA\_005647 与其亲本基因 Myo9a 表达是否存在调控作用。本研究证实在 Ang II 诱导的 NMVC 中, circRNA\_005647 和 Myo9a 一致性表达上调,过表达 circRNA\_005647 可逆转 Ang II 的促 NMVC 肥大作用,但并不影响 Myo9a 的表达水平,提示 Myo9a 不参与 circRNA\_005647 抑制 NMVC 肥大的作用。

目前发现,来源外显子的 circRNA 主要分布于细胞质中并可能含有 miRNA 反应元件(MRE)可以特异吸附 miRNA 并调控下游靶基因表达,继而发挥生物学作用<sup>[14]</sup>。利用双荧光素酶报告基因实验证实, circRNA\_005647 的第 433~452 bp 与 miR-99b-5p 存在特异结合作用。RNA Pull-down 实验中 Biotin-miR-99b-5p 探针拉下的 RNA 分子中 circRNA\_005647 富集。而在过表达 circRNA\_005647 的 NMVC 中, miR-99b-5p 水平明显降低,提示 circRNA\_005647 可特异结合并促进 miR-99b-5p 降解。结合以往发现 circRNA\_005647 可通过结合 miR-27b-3p 解除对下游靶基因 PPAR $\gamma$  的抑制作用,从而发挥抑制小鼠心肌纤维化的作用<sup>[9]</sup>,表明 circRNA\_005647 可通过结合不同的 miRNA 分子来调节相应的心肌细胞表型。

miR-99b-5p 属于 miR-99 家族<sup>[15]</sup>,是进化过程中最古老的 miRNA 家族之一,参与调节细胞生长、细胞氧化应激反应、血管生成及 DNA 损伤等,主要通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路发挥作用<sup>[16]</sup>。miR-99b-5p 参与调控心血管疾病过程,有研究证实 miR-99b 可通过激活 Akt 来促进心肌肥厚<sup>[17]</sup>。与以往报道一致<sup>[17]</sup>,本研究证实转染 miR-99b-5p 可显著增强 NMVC 中 Anp 和  $\beta$ -MHC 表达,促进心肌细胞发生肥大作用,并且 circRNA\_005647 可特异吸附 miR-99b-5p,逆转 miR-99b-5p 的促细胞肥大作用。但是介导 circRNA\_005647 发挥抑制心肌肥厚作用的 miR-99b-5p 下游靶基因尚未确定,需进一步的研究证实。

综上,本研究在 Ang II 诱导的心肌肥厚动物模型和心肌细胞肥大模型中,发现 circRNA\_005647 表达明显上调,具有抑制心肌细胞中肥大相关基因表达的作用,明确了 miR-99b-5p 介导 circRNA\_005647 发挥抑制心肌细胞肥大的作用,但其下游作用靶基因还有待于进一步探究。

#### [参考文献]

- [1] Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(9): 1401-1438.
- [2] Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(7): 387-407.
- [3] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 97: 245-262.
- [4] Zhao GA. Significance of non-coding circular RNAs and micro RNAs in the pathogenesis of cardiovascular diseases[J]. J Med Genet, 2018, 55(11): 713-720.
- [5] 徐莹, 田江天, 田进伟, 等. 环状 RNA 在心血管疾病中的研究现状[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(5): 456-460.
- [6] 邓阳欢, 杨建安, 刘银河. 环状 RNA 与获得性动脉疾病的研究现状[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(8): 724-729.
- [7] Yang F, Li AQ, Qin Y, et al. A novel circular RNA mediates pyroptosis of diabetic cardiomyopathy by functioning as a competing endogenous RNA [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 17: 636-643.
- [8] Wang K, Long B, Liu F, et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223 [J]. Eur Heart J, 2016, 37(33): 2602-2611.
- [9] Li H, Xu JD, Fang XH, et al. Circular RNA circRNA\_000203 aggravates cardiac hypertrophy via suppressing miR-26b-5p and miR-140-3p binding to Gata4 [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(7): 1323-1334.
- [10] Tang CM, Zhang M, Huang L, et al. CircRNA\_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by derepressing targets of miR-26b-5p, Col1a2 and CTGF, in cardiac fibroblasts [J]. Sci Rep, 2017, 7: 40342.
- [11] 袁淑菁, 梁景南, 张铭, 等. CircRNA\_005647 通过结合 miR-27b-3p 抑制小鼠心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(11): 1312-1319.
- [12] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long non-coding RNAs [J]. Mol Cell, 2013, 51(6): 792-806.
- [13] Li ZY, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(3): 256-264.
- [14] Werfel S, Nothjunge S, Schwarzmayr T, et al. Characterization of circular RNAs in human, mouse and rat hearts [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 98: 103-107.
- [15] Jakob M, Mattes LM, Küffer S, et al. MicroRNA expression patterns in oral squamous cell carcinoma: hsa-miR-99b-3p and hsa-miR-100-5p as novel prognostic markers for oral cancer [J]. Head Neck, 2019, 41(10): 3499-3515.
- [16] Jin Y, Tymen SD, Chen D, et al. MicroRNA-99 family targets AKT/mTOR signaling pathway in dermal wound healing [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64434.
- [17] Lin Y, Deng WY, Pang JK, et al. The microRNA-99 family modulates hepatitis B virus replication by promoting IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling-induced autophagy [J]. Cell Microbiol, 2017. DOI: 10.1111/cmi.12709.

(此文编辑 秦旭平)