

本文引用: 赵安职, 郭晶, 陈丽文, 等. miR-25-3p 通过 BTG2/SOD2 轴促进心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(4): 328-334; 351.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2022)30-04-0328-08

miR-25-3p 通过 BTG2/SOD2 轴促进心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达

赵安职¹, 郭晶², 陈丽文³, 黄智琪⁴, 陈泽润⁵, 朱杰宁⁶, 张梦珍⁶, 张铭⁶, 徐金东⁶, 单志新^{1,6}

(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. 广东省心血管病研究所, 广东省广州市 510080; 4. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省广州市 510006; 5. 南方医科大学第二临床医学院, 广东省广州市 510280; 6. 广东省临床药理学重点实验室 广东省人民医院 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080)

[关键词] 心肌纤维化; 心脏成纤维细胞; miR-25-3p; BTG2; SOD2

[摘要] 目的 研究微小 RNA (microRNA, miRNA) miR-25-3p 对心肌成纤维细胞纤维化表型的调控及机制。方法 血管紧张素 II (Ang II) 灌注小鼠构建心肌纤维化模型。用 miRNA 表达谱芯片检测纤维化的小鼠心肌中表达水平有差异的 miRNA。原代分离法获得 C57BL/6 小鼠心肌成纤维细胞 (mCF), 建立 Ang II 处理 mCF 的心肌纤维化细胞模型。mCF 转染 miR-25-3p mimic 后检测纤维化相关基因的表达。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-25-3p 与 B 细胞易位基因 2 (BTG2) 的 3' 端非翻译区 (3'UTR) 的结合作用。放线菌素 D 实验验证 BTG2 对超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 稳定性的作用。结果 miR-25-3p 在 Ang II 灌注诱导的小鼠心肌和 Ang II 处理的 mCF 中表达升高。转染 miR-25-3p mimic 可使 mCF 中的 I 型胶原 $\alpha 1$ (COL1A1)、III 型胶原 $\alpha 1$ (COL3A1) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 基因表达显著增加。双荧光素酶报告基因实验和功能实验证实 BTG2 是 miR-25-3p 的下游靶基因, 并参与介导 miR-25-3p 促进 mCF 中纤维化相关基因表达的作用。机制研究证实 BTG2 可通过增加 SOD2 mRNA 的稳定性而上调其表达。结论 miR-25-3p 通过抑制 BTG2 的表达来下调 SOD2 的水平进而增强纤维化相关基因的表达, 发挥促进心肌纤维化的作用。

[中图分类号] R329.21; R5

[文献标识码] A

MiR-25-3p promotes the expression of fibrosis-related genes in cardiac fibroblasts through BTG2/SOD2 axis

ZHAO Anzhi¹, GUO Jing², CHEN Liwen³, HUANG Zhiqi⁴, CHEN Zerun⁵, ZHU Jiening⁶, ZHANG Mengzhen⁶, ZHANG Ming⁶, XU Jindong⁶, SHAN Zhixin^{1,6}

(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 Cardiovascular Institute, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 4. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 5. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China; 6. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Pharmacology & Guangdong Provincial People's Hospital & Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] myocardial fibrosis; cardiac fibroblasts; miR-25-3p; BTG2; SOD2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of microRNA miR-25-3p on fibrosis-related gene expression in cardiac fibroblasts and mechanism involved. **Methods** A mouse model of cardiac fibrosis induced by angiotensin II (AngII) infusion was constructed, and the differentially expressed miRNAs in the fibrotic mouse myocardium were detected by miRNA chip array. Primary isolation and culture of C57BL/6 mouse cardiac fibroblasts (mCF) were performed, and a cell model of

[收稿日期] 2021-08-21

[修回日期] 2021-11-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770264, 82070254); 广东省自然科学基金项目(2021A151011554); 广东省医学科研基金项目(B2020215); 广州市科技计划项目(202002030013, 202002030039, 202102080093)

[作者简介] 赵安职, 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 1316396150@qq.com。通信作者单志新, 研究员, 博士研究生导师, 主要研究方向为非编码 RNA 与心肌重构, E-mail 为 shanzhixin@gdph.org.cn。

myocardial fibrosis was established based on AngII-treated mCF. The effect of miR-25-3p mimic on the expression of fibrosis-related genes in mCF was studied. The dual luciferase reporter gene assay was performed to verify the binding of miR-25-3p on the 3'-untranslated region (3'UTR) of the B-cell translocation gene 2 (BTG2) gene. Actinomycin D experiment was performed to detect the effect of BTG2 on the stability of superoxide dismutase 2 (SOD2) mRNA in mCF. **Results** Expression of miR-25-3p was increased in the myocardium of AngII-infused mice and AngII-treated mCF. miR-25-3p could enhance the expression of fibrosis-related genes, including collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), collagen type III alpha 1 chain (COL3A1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in mCF. BTG2 was confirmed to be a target gene of miR-25-3p, and BTG2 mediated the effect of miR-25-3p on promoting fibrosis-related gene expression in mCF. In addition, BTG2 could enhance the expression of SOD2 by increasing the stability of SOD2 mRNA in mCF. **Conclusion** MiR-25-3p inhibited the level of SOD2 through targeting BTG2 in mCF, resulting in enhancing fibrosis-related gene expression and promoting myocardial fibrosis.

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约为 19 ~ 25 个核苷酸的小的内源性非编码 RNA^[1]。已知 miRNA 可以通过抑制靶基因的翻译参与多种生物学过程和疾病进程^[2-6]。心肌在发生纤维化时常会伴随着心肌细胞外基质积累, 胶原蛋白的组成成分和比例明显改变, 心肌因此会变得更加僵硬, 导致心肌的节律性舒张和收缩都会异常困难, 继而会诱导出房性和室性心律失常, 更严重的还会导致心力衰竭或心脏急剧骤停, 严重危害人的健康^[7-9]。miRNA 参与调节心肌纤维化进程, 本研究组既往的研究发现 miR-199a-5p 通过靶向沉默信息调节因子 1 (Sirtuin-1, SIRT1) 促进心肌纤维化相关基因表达^[10]; 而 miR-23b-3p 通过靶向转化生长因子 β III 型受体 (TGF- β type III receptor, TGFBR3) 促进心肌纤维化相关基因表达^[11]。有研究证实 miR-25-3p 通过靶向肿瘤抑制因子 B 细胞易位基因 2 (B-cell translocation gene 2, BTG2) 促进肿瘤细胞增殖, 这为三阴性乳腺癌的诊断和治疗提供新的靶点^[12], 但其在心肌纤维化中的作用尚不清楚。

BTG2 是 BTG/TOB 基因家族中鉴定出的第一个基因, 在癌细胞的细胞周期调控、增殖、分化、凋亡中发挥重要作用^[13-15]。它可以作为肿瘤抑制因子保护细胞不发生致癌转化, 主要通过转录辅助因子关联来调节基因表达, 此外还可以在转录后水平上通过控制信使 RNA (mRNA) 的稳定性来调节基因表达^[16]。目前也有研究表明 BTG2 可以参与心血管疾病过程, 例如 BTG2 在 H_2O_2 的刺激下可以通过抑制 Akt/Erk 信号激活 GSK-3 β 和亲环素 D 而调节心肌细胞的坏死^[17], 也有研究显示 miR-21 可能通过靶向 BTG2 保护小鼠心肌和 H9c2 细胞免受阿霉素诱导的毒性损伤^[18]。

既往研究显示 miR-25-3p 可能参与心肌纤维化^[19-20]和肝纤维化^[21]的发病过程, 但 miR-25-3p 对心肌纤维化调控作用的报道不一致, 因而需要进一

步明确其调控心肌纤维化的作用及机制。本文研究了 miR-25-3p 对小鼠心肌成纤维细胞 (mouse cardiac fibroblasts, mCF) 中纤维化相关基因表达的调控作用, 并证实 miR-25-3p 通过靶向 BTG2/SOD2 轴发挥促心肌纤维化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

由广州中医药大学动物中心提供的 1 ~ 3 天的 SPF 级 C57BL/6 乳小鼠, 许可证号为 SCXK (粤) 2013-0034。本文的动物实验通过广东省人民医院伦理委员会审批 [批准号: 粤医科伦理 2017015A 号]。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基、澳洲胎牛血清、0.25% EDTA-胰蛋白酶 (Gibco) 和 Ang II 粉末 (Sigma); 2 \times SYBR Green Mix、逆转录试剂盒 (TaKaRa); Lipofectamine 2000 及 Oligo、Trizol 试剂 (Invitrogen); RIPA 裂解液 (碧云天); 蛋白定量试剂盒、4 \times loading buffer 和蛋白 Marker (Thermo); ECL 化学发光检测试剂盒 (Millipore); miR-25-3p、U6 引物、miR-25-3p mimic 和 BTG2 siRNA (由广州锐博公司设计合成); 质粒提取试剂盒 (Omega); PVDF 膜 (Whatman); 荧光素酶活性检测试剂盒 (Promega 公司); DNA 凝胶回收试剂盒 (Qiagen 公司); COL3A1、GAPDH 抗体、兔抗和鼠抗 (Protein Technology); COL1A1 抗体 (Thermo); α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (Abcam); BTG2 抗体 (Proteintech); 超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD2) 抗体 (Cell Signaling Technology); p-Smad3 抗体 (Signalway antibody); Smad3 抗体 (Signalway antibody); PCR 引物由 Invitrogen 公司合成 (表 1)。

表 1. PCR 引物序列
Table 1. The primers used in PCR assay

基因	序列(5'→3')	产物长度
COL1A1	F:GGCAAAGATGGACTCAACGG R:AGTAACGGCCACCATCTTGA	196 bp
COL3A1	F:CTGGCGGCTTTTCACCATAT R:TCTCCGCTCTTGAGTTCAGG	190 bp
Acta2	F:CACTACCATGTACCCAGGCA R:CATTTCGGGTGGACAATGGA	216 bp
BTG2	F:GGGTTTCCTCTCCAGTCTCC R:ACCTTGCTGATGATGGGGTC	192 bp
GAPDH	F:CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG R:CCACCCTGTTGCTGTAGCC	200 bp
miR-25-3p	RT:GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGA GTCGGCAATTGCACTGGATACGACTC AGACCG F:CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA R:GTGCGTGTCTGCGAGTC	70 bp
U6	RT:GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGA GTCGGCAATTGCACTGGATACGAC F:GTCCGCGTGTCTCGCTTCGGCAGC R:GTGCGTGTCTGCGAGTC	160 bp

1.3 血管紧张素 II 灌注诱导小鼠心肌纤维化模型

0.9% 盐水用于配制 Ang II 溶液,首先给小鼠称重,然后按 1.46 mg/(kg·d)(28 天)的剂量将配好的 Ang II 溶液加入到渗透缓释泵中存储(对照组中加入等量的生理盐水),麻醉小鼠后在背部插入胶囊缓释泵并固定牢靠,胶囊缓释泵会慢慢地将 Ang II 溶液释放入小鼠体内,共计饲养 28 天,这样便可以成功构建小鼠心肌纤维化模型。

1.4 Masson 三色染色

首先在腹腔内注射戊巴比妥以麻醉小鼠,随后剪取大小适中的左心室心肌组织,第一步先用 10% 福尔马林固定液固定,接着依次进行脱水、透明、浸蜡和包埋等系列操作,并将经过上述处理的组织切成厚度约 4 μm 大小的连续石蜡切片,经过 Masson 三色染色后用于观察,在各个角度共选择 8 个单独的代表性视野计算各处理组胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)比例, CVF(%) = 胶原面积/总面积 × 100%, 由此便可以比较 Ang II 灌注组小鼠与假手术组小鼠心肌纤维化程度。

1.5 新生小鼠心肌成纤维细胞的分离、培养和处理

获取出生 1~3 天的 SPF 级 C57BL/6 乳小鼠心脏,置于灭菌过的 PBS 溶液中,去除残留血液后将

心脏转移入一新的 50 mL 离心管中剪碎至适宜大小便于消化。然后采用新鲜配置并高压、过滤后的不含 EDTA 的 0.125% 胰蛋白酶对剪碎的组织块进行消化,经过大概 4~5 次反复消化后即得到充分消化且含有大量细胞的混悬液。离心弃上清,重悬细胞沉淀后均匀转移到 T75 细胞培养瓶稳定培养 90 min,由于心肌细胞和成纤维细胞自身生长特性存在明显差异,静止培养 90 min 即可很好地将两种细胞分离开来,这样便可以获得实验所需的 mCF,将分离得到的 mCF 传代培养到 P2 代后进行铺板处理。

1.6 mRNA 表达谱芯片检测

分别将过表达 BTG2 的 mCF 及对照细胞进行 mRNA 表达谱分析。mRNA 表达谱芯片杂交、结果分析由上海康成公司协助完成。简述如下:将富集后的总 RNA 采用随机引物转录、扩增成为荧光标记的 cRNA 探针。cRNA 探针与 Arraystar mRNA Array (8×15K) 表达谱芯片上的寡核苷酸片段杂交后采用 Agilent Scanner G2505C 扫描并用 Agilent Feature Extraction Software 11.0.1.1 分析杂交结果。

1.7 qRT-PCR 检测

Trizol 法提取 mCF 中的总 RNA。按照 1 μg 总 RNA,加入相应体积的 RNA,并加入 4 μL 5×PrimeScript RT Master Mix 进行反转录得到 cDNA,按照 10 μL 体系进行实时定量 PCR 检测 BTG2 以及纤维化相关基因的 mRNA 水平(GAPDH 为内参照)。取 1 μg 总 RNA,加入 4 μL 5×PrimeScript RT Buffer、1 μL RT Enzyme Mix 和 0.2 μL 特异 miR-25-3p RT 引物和内参照 U6 RT 引物进行 miRNA 成熟体逆转录。得到成熟体 cDNA 后,以 U6 为内参照,检测 miR-25-3p 水平。

1.8 Western blot 检测

首先用适宜体积的 RIPA 裂解液裂解细胞约 15~20 min,离心吸取上清,使用蛋白定量试剂测定各样品的浓度后进行蛋白定量分装,99 °C 加热变性 10 min。变性完成后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳实验,蛋白先进行电泳可以依据相对分子质量大小分离开来,然后经过电转将蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭 1 h 后,分别用相应的一抗抗体对 PVDF 膜 4 °C 孵育过夜,各种抗体的稀释比如下:anti-COL1A1、anti-COL3A1、anti-SOD2、anti-p-Smad3、anti-Smad3(1:1 000);anti-α-SMA(1:3 000);anti-BTG2(1:500);anti-GAPDH(1:5 000)。洗膜 3 次后,用对应种属的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,采用 ECL 发光试剂盒显影,并用 Image J 进行灰度分析。

1.9 双荧光素酶报告基因检测

将 BTG2 的 3'UTR 包含与 miR-25-3p 之间潜在的结合位点的 BTG2 3'UTR 序列分别构建到 pGL3-promoter 载体中,以构建重组荧光素酶报告质粒 pGL3-BTG2W1W2。并利用定点诱变试剂盒将 BTG2 的 3'UTR 与 miR-25-3p 之间的两个结合位点序列进行突变以构建相应的含有单个突变 miR-25-3p pGL3-promoter-BTG2-T1W2 和 pGL3-promoter-BTG2-W1T2,以及包含两个突变位点的载体 pGL3-promoter-BTG2-T1T2。将 200 ng 重组荧光素酶报告质粒、50 nmol/L miR-25-3p mimic 和 20 ng pRL-TK 内参质粒共转染进入胚肾(HEK)293 细胞中,转染 24 h 后,测定萤火虫荧光素值(FL)和海肾荧光素值(RL)活性。用 FL/RL 的相对比值来判断 miR-25-3p 与 BTG2 基因 3'UTR 的结合作用。

1.10 RNA 稳定性实验

将 mCF 分别用对照腺病毒、BTG2 腺病毒感染过夜,每孔细胞均加入 1 μ L 的 2 g/L 放线菌素 D 溶液,放线菌素 D 分别处理细胞 0 h、4 h、8 h、12 h 和

24 h,实时定量 PCR 检测 SOD2 mRNA 表达水平,以验证 BTG2 对 SOD2 mRNA 稳定性有无影响。

1.11 统计学处理

本文涉及到的统计分析均应用 GraphPad Prism 8 软件处理。计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,并用 Bonferroni 校正的 *t* 检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义,所有结果都至少有 3 次以上的重复数据。

2 结果

2.1 miR-25-3p 在心肌纤维中表达上调

Masson 染色结果发现,AngII 灌注后小鼠心肌纤维化程度显著增加(图 1A)。qRT-PCR 结果验证了 miR-25-3p 在发生纤维化的小鼠心肌中显著升高(图 1B)。在 Ang II 处理的 mCF 中与纤维化相关的 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 的表达均上调(图 1C),且 miR-25-3p 的表达亦显著升高(图 1D)。

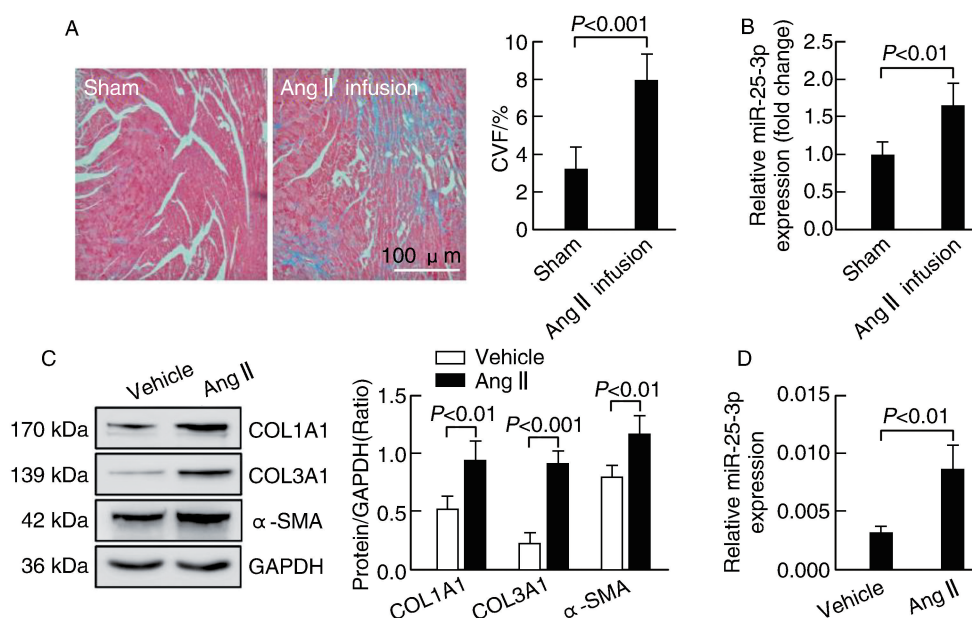


图 1. miR-25-3p 在心肌纤维中的表达

A 为 Masson 染色显示 Ang II 灌注小鼠心肌纤维化程度;B 为 qRT-PCR 检测 miR-25-3p 在发生纤维化小鼠心肌中的表达;

C 为 Western blot 检测 Ang II 处理的 mCF 中 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 的表达;D 为 qRT-PCR 定量分析 Ang II 处理的 mCF 中 miR-25-3p 的相对表达。

Figure 1. Expression of miR-25-3p in cardiac fibrosis

2.2 miR-25-3p 增强 mCF 中纤维化相关基因的表达

为了研究 miR-25-3p 对纤维化相关基因表达的影响,采用 Lipofectamine 试剂分别向 mCF 中转染

Scramble 和 miR-25-3p mimic。Western blot 结果显示,转染 miR-25-3p-mimic 可显著增加 mCF 中与纤维化相关基因 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 的表达(图 2)。

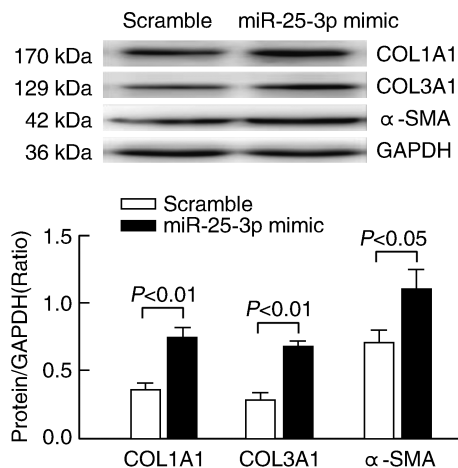


图2. miR-25-3p 增强 mCF 中纤维化相关基因的表达

Figure 2. miR-25-3p enhances fibrosis-related genes expression in mCF

2.3 BTG2 作为 miR-25-3p 靶基因的鉴定

利用生物信息学网站 (<https://www.mirbase.org/>; <https://starbase.sysu.edu.cn/>) 的 TargetScan、miRanda 和 PicTar 等软件预测结果显示 miR-25-3p 序列与 BTG2 基因的 3'UTR 序列存在特异性结合位点(图 3A)。双荧光素酶检测结果显示,miR-25-3p 显著降低了荧光素酶活性,但当突变 miR-25-3p 种子序列与 BTG2 3'UTR 的 1 280 ~ 1 287 位点互补结合时,则荧光素酶活性降低不明显(图 3B)。miR-25-3p 不仅可以显著抑制 mCF 中 BTG2 mRNA 的表达,也能显著降低 BTG2 的蛋白水平(图 3C 和 3D)。Western blot 结果显示,当 miR-25-3p mimic 和 BTG2 siRNA 转染 mCF 时,miR-25-3p mimic 和 BTG2 siRNA 可一致性地增强 mCF 中各纤维化指标相关的 COL1A1、COL3A1 和 α-SMA 的表达(图 3E)。此外,腺病毒介导过表达 BTG2 可以逆转 miR-25-3p 诱导的 mCF 中 COL1A1、COL3A1 和 α-SMA 表达增加(图 3F)。

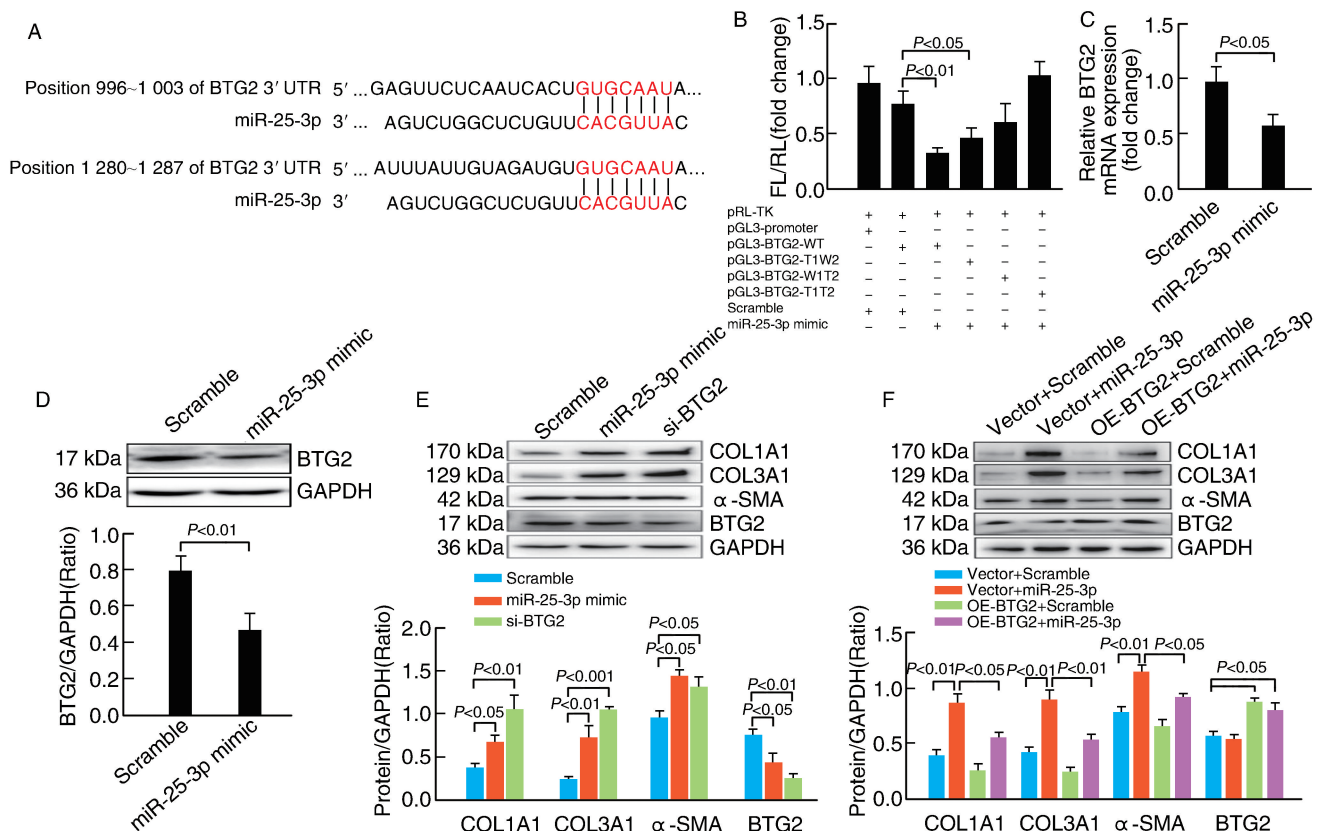


图3. BTG2 介导 miR-25-3p 发挥促 mCF 纤维化表型

A 为生物信息学预测 miR-25-3p 序列与 BTG2 基因的结合位点;B 为双荧光素酶报告基因实验证实 miR-25-3p 序列与 BTG2 间有特异性结合作用;C 为 qRT-PCR 定量分析 mCF 转染 miR-25-3p mimic 后 BTG2 mRNA 的表达水平;D 为 Western blot 及灰度分析 mCF 转染 miR-25-3p mimic 后 BTG2 的蛋白表达水平;E 为 Western blot 及灰度分析 mCF 分别转染 miR-25-3p mimic 和 BTG2 siRNA 时, mCF 中各纤维化指标 COL1A1、COL3A1 和 α-SMA 表达水平变化;F 为 Western blot 及灰度分析腺病毒介导过表达 BTG2 可以逆转 miR-25-3p 诱导的 mCF 中 COL1A1、COL3A1、α-SMA 表达增加。

Figure 3. BTG2 mediates the pro-fibrotic effect of miR-25-3p on mCF

2.4 SOD2 介导 BTG2 抑制纤维化相关基因的表达

mRNA 表达谱芯片结果显示,过表达 BTG2 可引起 mCF 中 523 个和 421 个基因呈 1.5 倍以上的升高和降低表达(图 4A),这些差异表达的基因可能参与细胞增殖、蛋白合成、细胞黏附、抗氧化等生物学过程(表 2)。实时定量 PCR 验证芯片结果,检测可能参与心肌纤维化调控相关的基因 Tgfbr3、Smad7 和 SOD2 等的表达,结果显示过表达 BTG2 可

以显著上调 SOD2 表达(图 4B)。Western blot 结果也显示,腺病毒介导过表达 BTG2 可以上调 SOD2 的水平(图 4C)。放线菌素 D 实验显示:用放线菌素 D 进行完全相同的处理,相较于对照组,过表达 BTG2 组检测到更高的 SOD2 mRNA 水平(图 4D)。Western blot 结果显示:沉默 SOD2 可以增强 mCF 中各纤维化指标 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 表达以及激活 Smad3 信号(图 4E)。

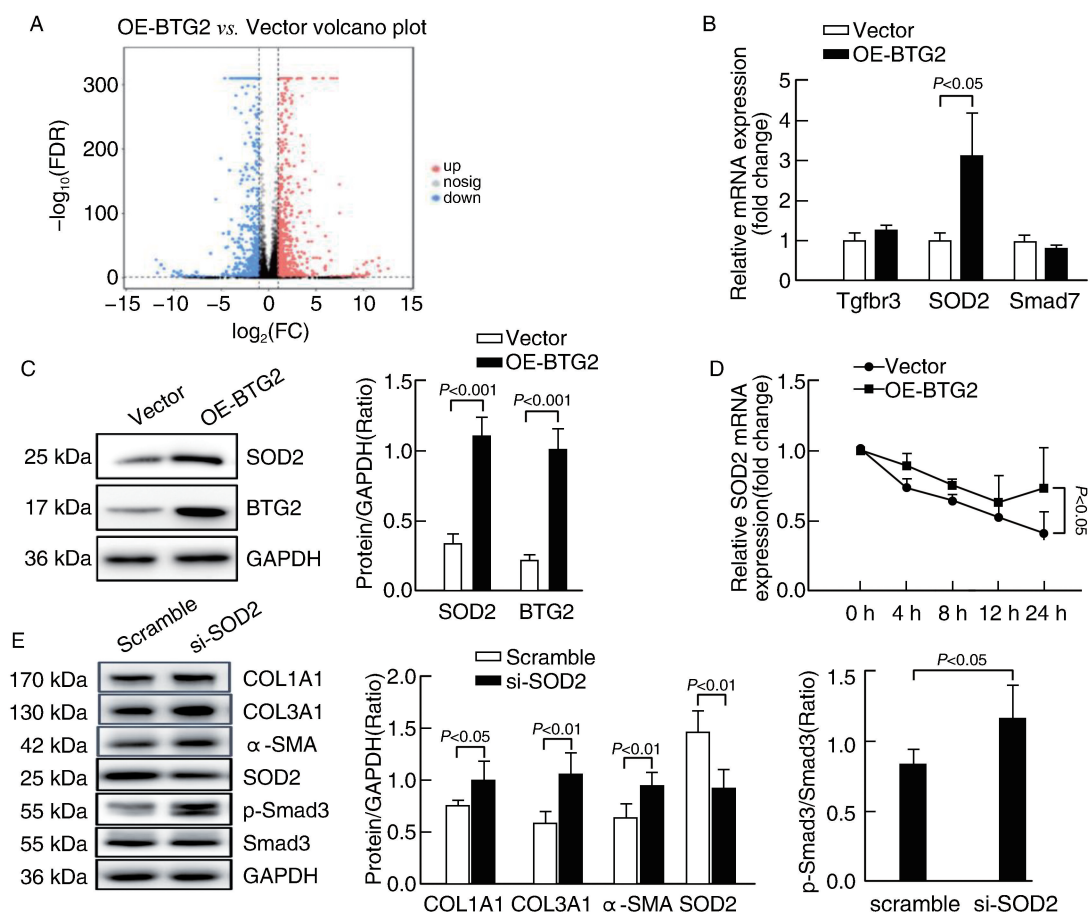


图 4. SOD2 介导 BTG2 抑制 mCF 中纤维化相关基因表达

A 为 mRNA 表达谱芯片分析显示 mCF 中过表达 BTG2 后引起其他基因的显著改变;B 为实时定量 PCR 验证芯片的结果;C 为 Western blot 及灰度分析显示过表达 BTG2 对 SOD2 水平的改变;D 为放线菌素 D 实验显示过表达 BTG2 可稳定 SOD2 mRNA 的水平;E 为 Western blot 及灰度分析检测沉默 SOD2 的 mCF 中各纤维化指标 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 表达增强以及激活 Smad3 信号。

Figure 4. SOD2 mediates the effect of BTG2 on suppressing the fibrosis-related gene expression in mCF

3 讨论

本研究证实 miR-25-3p 在心肌纤维化的整体和细胞模型中表达增加,且发现 miR-25-3p 特异性增加 mCF 中纤维化相关基因 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 表达。这之前报道的选择性降低 miR-25 表达可改善小鼠压力超载心衰模型的心功能障碍和纤维化一致^[19]。

本研究通过多个实验证据支持 miR-25-3p 通过靶向 BTG2 发挥增加心肌纤维化的作用。首先,利用 TargetScan、miRanda 和 PicTar 等 miRNA 靶基因预测软件显示 BTG2 是 miR-25-3p 的潜在靶基因,双荧光素酶检测结果显示 miR-25-3p 能特异性结合于 BTG2 mRNA 3'UTR 的两个位点上。此外,miR-25-3p mimic 可以在 mRNA 和蛋白水平上一致性地抑制 BTG2 的表达。再者,沉默 BTG2 表达的 BTG2

表 2. BTG2 调控 mCF 中差异表达的基因

Table 2. Dys-regulated genes in mCF by over-expression of BTG2

差异倍数	上调	基因符号	差异倍数	下调	基因符号
4.55	Up	Ptges	-2.97	Down	Tgfb2
3.23	Up	Fgf23	-2.79	Down	Itga8
3.11	Up	Slc22a4	-2.71	Down	Acta2
3.03	Up	Tgtp2	-2.46	Down	Fgfr2
2.62	Up	Ddx60	-2.23	Down	Igfbp2
2.02	Up	Xdh	-2.13	Down	Bmp4
1.95	Up	Sod2	-2.07	Down	Slit3
1.84	Up	Tgfb3	-1.52	Down	Smad7

siRNA 可与 miR-25-3p mimic 一致性地促进纤维化相关基因的表达,而腺病毒介导过表达 BTG2 可逆转 miR-25-3p 促进纤维化相关基因表达的作用。

BTG2 作为抗肿瘤家族的一员,已被发现可以参与到心血管疾病的发展进程中。例如之前有文献报道 BTG2 通过减少胞质中的 RNA 积累而负性调控心肌肥大^[22]。在本研究中发现 BTG2 可以在 mRNA 及蛋白水平上一致性地上调 mCF 中 SOD2 的表达, RNA 稳定性实验结果证实 BTG2 可能是通过增加 SOD2 mRNA 稳定性来增加 SOD2 蛋白表达的。

锰超氧化物歧化酶(SOD2 或 MnSOD)是一种基于线粒体基质的抗氧化酶,负责清除局部产生的自由基,它将这些自由基在各种酶的帮助下转化为水,以维持生存^[23]。众所周知,氧化与抗氧化的失衡会引发氧化应激,氧化应激又与纤维化疾病的发生发展有密切关系,例如在氧化应激的状态下会引起肾脏纤维化^[24]。同时, SOD2 作为一种维持机体正常功能所必需的抗氧化酶,可抵抗衰老小鼠心脏中的氧化应激,抑制纤维化和心肌细胞凋亡^[25]。有研究发现心肌特异性敲除 SOD2 的小鼠心肌中线粒体可大量产生 ROS,进而发生了扩张型心肌病^[26]。本研究发现沉默 SOD2 可激活 mCF 中 Smad3 信号,上调纤维化相关基因表达,该结果和以往报道一致性地证实了 SOD2 具有抑制心肌纤维化的作用,同时提示 BTG2/SOD2 轴可介导 miR-25-3p 发挥促进心肌纤维化的作用。

综上,本研究阐明了 miR-25-3p 通过抑制靶基因 BTG2 的表达来下调 SOD2 的水平,进而增强 mCF 中纤维化相关基因的表达,发挥促进心肌纤维化的作用,提示 miR-25-3p 可能作为预防和治疗心脏纤维化的潜在靶点。

[参考文献]

- [1] 谭真真, 陈晋波, 王丹, 等. 微小 RNA 在泡沫细胞形成中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(1): 30-36.
- [2] 杨惠林, 徐士欣, 张军平, 等. 外泌体中的微小 RNA 在动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(1): 75-80.
- [3] HENNING R J. Cardiovascular exosomes and microRNAs in cardiovascular physiology and pathophysiology[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2021, 14(2): 195-212.
- [4] MISKA E A. How microRNAs control cell division, differentiation and death[J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(5): 563-568.
- [5] LI Y Q, LIANG Y J, ZHU Y J, et al. Noncoding RNAs in cardiac hypertrophy[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2018, 11(6): 439-449.
- [6] 李达, 彭卫平, 沈莉, 等. miRNA-133 与冠心病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(8): 851-854.
- [7] KONG P, CHRISTIA P, FRANGOGIANNIS N G. The pathogenesis of cardiac fibrosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(4): 549-574.
- [8] DZESHKA M S, LIP G Y, SNEZHITSKIY V, et al. Cardiac fibrosis in patients with atrial fibrillation: mechanisms and clinical implications[J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 66(8): 943-959.
- [9] 李丽, 吴立玲. 心脏间质细胞在心肌纤维化中的作用机制及研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(8): 652-660.
- [10] 张灼, 朱杰宁, 肖珍, 等. 微小 RNA-199a-5p 通过靶向 SIRT1 促进心肌纤维化相关基因表达[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(10): 1781-1787.
- [11] 杨真祯, 朱文思, 肖珍, 等. 微小 RNA-23b-3p 通过靶向 TGFBR3 促进人心房肌成纤维细胞纤维化相关基因表达[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(1): 119-125.
- [12] XU Y, LI W, LIANG G, et al. Platelet microparticles-derived miR-25-3p promotes the hepatocyte proliferation and cell autophagy via reducing B-cell translocation gene 2[J]. J Cell Biochem, 2020. DOI: 10.1002/jcb.29825.
- [13] MAO B, ZHANG Z, WANG G. BTG2: a rising star of tumor suppressors (review)[J]. Int J Oncol, 2015, 46(2): 459-464.
- [14] DURIEZ C, MOYRET-LALLE C, FALETTE N, et al. BTG2, its family and its tutor[J]. Bull Cancer, 2004, 91(7/8): E242-E253.
- [15] TSUI K H, CHIANG K C, LIN Y H, et al. BTG2 is a tumor suppressor gene upregulated by p53 and PTEN in human bladder carcinoma cells[J]. Cancer Med, 2018, 7(1): 184-195.

(下转第 351 页)

- 554-557.
- [4] RAHBARI-OSKOU F, CHAPMAN A. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), angiopoietin-2 (Ang-2) and endocan; novel biomarkers of disease progression involving polycystic kidney disease[J]. *Am J Nephrol*, 2018, 47(4): 228-230.
- [5] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 非 ST 段抬高型急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南(2016)[J]. *中华心血管病杂志*, 2017, 45(5): 359-376.
- [6] 程 诚, 王 鑫. 冠心病合并 2 型糖尿病患者 PCI 术后支架内再狭窄危险因素分析[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2018, 10(2): 196-198.
- [7] ZUK G, CIECWIERZ D, DREWLA P, et al. Challenging treatment of in-stent restenosis in a coronary bifurcation by implantation of a bioresorbable scaffold under optical coherence tomography guidance[J]. *Cardiol J*, 2019, 26(3): 304-306.
- [8] WANG J L, QIN Z, WANG Z J, et al. New predictors of in-stent restenosis in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention with drug-eluting stent[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2018, 15(2): 137-145.
- [9] 张 静, 赵会连. PCI 术前 Lp(a)、MAU 蛋白水平与冠心病术后冠状动脉再狭窄的关系研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(18): 2834-2836.
- [10] ZHAO L, DAI C, GONG Q. Changes of endocan and its effect on hepatic stem cells during the rapid proliferation process of residual liver after ALPPS procedure[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(6): 817-825.
- [11] YANG C, SONG H W, LIU W, et al. Protective effects of chymostatin on paraquat-induced acute lung injury in mice[J]. *Inflammation*, 2018, 41(1): 122-133.
- [12] 韦 皓, 许玉霞, 秦 莉, 等. HIF-1 α 通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对心肌缺血-再灌注大鼠心肌损伤的保护机制分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(10): 13-16.
- [13] LIU D W, ZHANG Y N, HU H J, et al. Downregulation of microRNA-199a-5p attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cytotoxicity in cardiomyocytes by targeting the HIF-1 α -GSK3 β -mPTP axis[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5335-5344.
- [14] 张本凯, 王 政, 朱 峰, 等. PHD2/HIF-1 α 介导 β -AR 调控大鼠心肌梗后心力衰竭[J]. *中华急诊医学杂志*, 2020, 29(2): 239-242.
- [15] 仇慧颖, 耿 威. 冠心病患者血清 miR-34a 和 HIF-1 α 水平与冠状动脉侧支循环形成的相关性研究[J]. *重庆医学*, 2019, 48(12): 2139-2141.
- (此文编辑 曾学清)

(上接第 334 页)

- [16] YUNIATI L, SCHEIJEN B, VAN DER MEER L T, et al. Tumor suppressors BTG1 and BTG2: beyond growth control[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5379-5389.
- [17] CHOI Y W, PARK T J, KIM H S, et al. Signals regulating necrosis of cardiomyoblast by BTG2 (/TIS21/PC3) via activation of GSK3 β and opening of mitochondrial permeability transition pore in response to H₂O₂[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(3): 559-565.
- [18] TONG Z, JIANG B, WU Y, et al. MiR-21 protected cardiomyocytes against doxorubicin-induced apoptosis by targeting BTG2[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7): 14511-14525.
- [19] JEONG D, YOO J, LEE P, et al. miR-25 tough decoy enhances cardiac function in heart failure[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(3): 718-729.
- [20] LIU Q, WANG Y, YANG T, et al. Protective effects of miR-25 against hypoxia/reoxygenation induced fibrosis and apoptosis of H9c2 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(4): 1225-1234.
- [21] GENZ B, COLEMAN M A, IRVINE K M, et al. Overexpression of miRNA-25-3p inhibits Notch1 signaling and TGF- β -induced collagen expression in hepatic stellate cells[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8541.
- [22] MASUMURA Y, HIGO S, ASANO Y, et al. Btg2 is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy through a decrease in cytosolic RNA[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28592.
- [23] FUKAI T, USHIO-FUKAI M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(6): 1583-1606.
- [24] SU H, WAN C, SONG A, et al. Oxidative stress and renal fibrosis: mechanisms and therapies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 585-604.
- [25] KWAK H B, LEE Y, KIM J H, et al. MnSOD overexpression reduces fibrosis and pro-apoptotic signaling in the aging mouse heart[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2015, 70(5): 533-544.
- [26] IKEGAMI T, SUZUKI Y, SHIMIZU T, et al. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(3): 729-736.
- (此文编辑 许雪梅)