

本文引用: 陈泽润, 郭继深, 丰嘉欣, 等. 环状 RNA circ\_0036167 与融合肉瘤蛋白结合发挥抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(2): 101-109. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.02.002.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-02-0101-09

· 实验研究 ·

## 环状 RNA circ\_0036167 与融合肉瘤蛋白结合发挥抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用

陈泽润<sup>1</sup>, 郭继深<sup>1</sup>, 丰嘉欣<sup>2</sup>, 胡雅婷<sup>3</sup>, 欧涛<sup>3</sup>, 朱杰宁<sup>4</sup>, 李晖<sup>5</sup>, 徐金东<sup>5</sup>, 方咸宏<sup>4</sup>, 单志新<sup>1,5</sup>

(1. 南方医科大学第二临床医学院, 广东省广州市 510280; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 3. 华南理工大学医学院, 广东省广州市 510006; 4. 广东省心血管病研究所, 5. 广东省人民医院医学研究部, 广东省广州市 510080)

**[摘要]** [目的] 研究环状 RNA circ\_0036167 对心肌成纤维细胞纤维化表型的调控作用及可能机制。[方法] 对心衰患者及器官捐献者心肌组织进行 Masson 三色染色以检测心肌胶原水平。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 circ\_0036167 及其宿主 MYO9A 在心衰心肌中的表达。通过放线菌素 D 和 RNase R 处理实验鉴定人心肌细胞 AC16 中 circ\_0036167 的 RNA 稳定性。利用重组 circ\_0036167 腺病毒感染 C57BL/6 小鼠心肌成纤维细胞 (mCF), 在 RNA 和蛋白水平检测纤维化相关基因 COL1A1、COL3A1 和 ACTA2 的表达。利用 EdU 染色和 Transwell 细胞迁移实验鉴定 circ\_0036167 对 mCF 增殖和迁移能力的影响。基于生物信息学预测和 RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP) 实验验证 circ\_0036167 与融合肉瘤蛋白 (FUS) 的结合作用。检测敲低 mCF 中 FUS 表达对 circ\_0036167 调控心肌纤维化相关基因表达的影响。[结果] Masson 三色染色显示心衰心肌发生明显的纤维化 ( $P < 0.001$ )。RT-qPCR 结果显示 circ\_0036167 在心衰心肌中表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而宿主基因 MYO9A 表达无显著差异。放线菌素 D 和 RNase R 消化实验证实 circ\_0036167 具有环状 RNA 典型的 RNA 稳定性。过表达 circ\_0036167 可显著抑制 mCF 的增殖、迁移能力和纤维化相关基因的表达。RIP 实验证实 circ\_0036167 可与 FUS 结合。敲低 mCF 后 FUS 的表达可促进 mCF 中纤维化相关蛋白表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 并可减弱 circ\_0036167 对纤维化相关基因表达的抑制作用 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。[结论] FUS 可介导 circ\_0036167 发挥抑制 mCF 心肌纤维化表型的作用。

**[关键词]** 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞; 环状 RNA; 融合肉瘤蛋白

[中图分类号] R329.21; R5

[文献标识码] A

### Circular RNA circ\_0036167 combined with fused in sarcoma to inhibit the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts

CHEN Zerun<sup>1</sup>, GUO Jishen<sup>1</sup>, FENG Jiabin<sup>2</sup>, HU Yating<sup>3</sup>, OU Tao<sup>3</sup>, ZHU Jiening<sup>4</sup>, LI Hui<sup>5</sup>, XU Jindong<sup>5</sup>, FANG Xianhong<sup>4</sup>, SHAN Zhixin<sup>1,5</sup>

(1. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China;

2. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 3. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 4. Guangdong Cardiovascular Institute, 5. Research Center of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effect of circ\_0036167 on the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts and the potential mechanism involved. **Methods** Masson's trichrome staining was performed in the myocardium of patients with heart failure (HF) and healthy organ donors. Levels of circ\_0036167 and its host gene of MYO9A were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the myocardium of HF patients and healthy organ do-

[收稿日期] 2022-07-06

[修回日期] 2022-10-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82070254、82200325); 广州市科技计划项目(202102080093); 广东省自然科学基金项目(2022A1515012522、2022A1515012175、2021A1515220122); 广东省卫健委课题(A2021002、A2022334); 广东省人民医院心血管专项(2020XXG003); 广东省人民医院自然培育项目(KY0120220028)

[作者简介] 陈泽润, 硕士研究生, 主要研究方向为心肌重构的分子调控机制, E-mail: 1054431895@qq.com。通信作者单志新, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为非编码 RNA 与心肌重构, E-mail: shanzhixin@gdph.org.cn。

nors. Actinomycin D treatment and RNase R exonuclease digestion were used to test the stability of circ\_0036167 in AC16 cells. The myocardial fibroblasts (mCF) of C57BL/6 mice were infected with recombinant circ\_0036167 adenovirus, and the expression of fibrosis related genes COL1A1, COL3A1 and ACTA2 were detected at RNA and protein levels. EdU staining and transwell migration assay were performed to detect the effects of circ\_0036167 on mCF proliferation and migration activities. According to the results of bioinformatic prediction, RNA binding protein immunoprecipitation (RIP) assay was performed to confirm the interaction between circ\_0036167 and fused in sarcoma (FUS) protein. Effect of FUS knockdown on inhibition of fibrosis-related genes expression by circ\_0036167 in mCF was determined. **Results** Masson's trichrome staining showed that the cardiac fibrosis was significantly increased in the myocardium of HF patients ( $P < 0.001$ ). Circ\_0036167 was found markedly increased in the myocardium of HF patients ( $P < 0.05$ ), with no significant difference in its host gene of MYO9A. In response to actinomycin D treatment and RNase R exonuclease digestion, circ\_0036167 was more stable than MYO9A. Over-expression of circ\_0036167 suppressed proliferation and migration of mCF, and inhibited RNA and protein expression of fibrosis-related genes in mCF. RIP assay revealed the interaction between circ\_0036167 and FUS protein. Knock-down of FUS could increase fibrosis-related genes expression ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and significantly attenuated the inhibitory effect of circ\_0036167 on fibrosis-related gene expression in mCF ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ). **Conclusion** FUS mediates the anti-fibrotic effect of circ\_0036167 in mCF.

[**KEY WORDS**] myocardial fibrosis; cardiac fibroblasts; circular RNA; fused in sarcoma

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是一种以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积及异常分布为特征的病理过程,其可导致心脏正常结构破坏并引起心功能障碍<sup>[1]</sup>。心肌纤维化与充血性心力衰竭、心肌梗死、扩张型心肌病等多种心血管病密切相关<sup>[2]</sup>。基因表达的改变参与疾病的发生发展过程,而表观遗传方式调控基因的表达在心肌纤维化的发生、发展进程中发挥了重要的作用<sup>[3-4]</sup>。

表观遗传调控方式包括DNA甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA调控等,非编码RNA包括环状RNA(circular RNA, circRNA)、长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和微小RNA(miRNA, miRNA)等<sup>[5-6]</sup>。circRNA是由前体mRNA反向剪接而成,存在于真核细胞内的一类高度保守的闭合环状RNA<sup>[7]</sup>。circRNA不具备5'末端帽子结构和3'末端poly(A)尾巴结构,具有比线性转录本更好的稳定性<sup>[8]</sup>。circRNA发挥生物学功能的方式多样,可以通过特异性吸附miRNA发挥作用,在转录水平调节亲本基因表达,与RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBP)结合发挥作用,以及通过翻译蛋白或微肽来发挥生物学作用<sup>[9-10]</sup>。已有多项研究表明circRNA在心肌肥厚、纤维化、心肌梗死、心衰、心肌缺血再灌注中发挥重要的作用<sup>[11-15]</sup>。

融合肉瘤蛋白(fused in sarcoma, FUS)是TET蛋白家族的成员,是一种多功能的DNA/RNA结合蛋白,主要存在于细胞核内<sup>[16-17]</sup>。近期研究发现FUS参与心血管疾病的发病过程,例如lncRNA-TUG1通过与FUS结合影响线粒体功能而促进心肌梗死的发生<sup>[18]</sup>;lncRNA CTBP1-AS2通过募集FUS

增加Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)mRNA的稳定性,从而增加TLR4水平来促进心肌肥厚过程<sup>[19]</sup>。目前尚未见FUS参与心肌纤维化过程调控的研究报道。

本研究证实,来自于宿主基因肌球蛋白IXA(myosin IXA, MYO9A)以胞质分布为主的circ\_0036167在心肌纤维化时表达升高,并具有抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用<sup>[20]</sup>。那同样来自于宿主基因MYO9A以胞核分布为主的circ\_0036167在心肌纤维化中是否发挥作用?本研究将对此进行探讨并研究circ\_0036167通过结合FUS对心肌成纤维细胞纤维化表型的调控作用,或可为心肌纤维化治疗提供新的干预靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 心肌组织标本

本研究中相关的临床样本均已通过广东省人民医院伦理委员会批准(批准号:GDREC2016255H),心衰患者和健康器官捐献者的心肌组织标本均由广东省心血管病研究所提供,上述标本均签署知情同意书,病例资料同以往报道<sup>[21]</sup>。

### 1.2 实验动物

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

### 1.3 主要试剂

澳洲胎牛血清、细胞培养基DMEM/F12(Bio Ind公司);胰蛋白酶(Gibco公司);Masson三色染

色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);2×SYBR Green Mix、逆转录试剂盒(TaKaRa 公司);核质分离试剂盒、转染试剂 Oligo、Trizol(Invitrogen 公司);放线菌素 D(上海生工生物工程股份有限公司);核糖核酸外切酶(Ribonuclease R, RNase R)(广州吉赛生物科技有限公司);蛋白裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);蛋白定量试剂盒、4×loading buffer、蛋白 Marker(Thermo 公司);ECL 化学发光检测试剂盒(Millipore 公司);si-FUS(广州睿博生物技术有限公司);PVDF 膜(Whatman 公司);RIP 试剂盒(广州伯信生物科技有限公司);FUS、GAPDH、COL3A1 抗体(Protein Technology 公司); $\alpha$ -SMA、COL1A1 抗体(Abcam 公司);PCR 引物由广州睿博公司合成(表 1)。

表 1. PCR 引物  
Table 1. PCR primers

基因	引物序列	扩增产物/bp
COL1A1	F:5'-CTGGTCCTGTTGGAAGTCGT-3' R:5'-CAGATGCACCTGTTTCTCCA-3'	201
COL3A1	F:5'-CAATGTAAAGAAGTCTCTGAAG-3' R:5'-CAAACAGGCCAATGTCCAC-3'	240
ACTA2	F:5'-CTGTGCTATGTCGCTCTGGA-3' R:5'-ATAGGTGGTTTCGTGGATGC-3'	192
circ_0036167	F:5'-TCAGAGCCATGGTTGCTTTC-3' R:5'-TCTGTCTTCGTGTCTTGGGA-3'	277
MYO9A	F:5'-TGGAGAGGACTACCGCTTC-3' R:5'-CCAGTGGTGGTTATCATACA-3'	329
GAPDH	F:5'-CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3' R:5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'	200

#### 1.4 Masson 三色染色

剪取大小适中的心肌组织块,用多聚甲醛固定 12 h,第二天进行脱水、浸蜡和包埋等系列操作,并将上述处理的组织切成厚度为 4  $\mu$ m 的石蜡切片,经 Masson 染色试剂盒染色后用于观察心肌组织胶原沉积情况,选择 8 个单独的视野计算胶原体积分数(collagen volume fraction, CVF), $CVF(\%) = \text{胶原面积} / \text{总面积} \times 100\%$ 。

#### 1.5 小鼠心肌成纤维细胞的原代分离、传代培养和处理

参照已报道的方法<sup>[22]</sup>,将小鼠心脏置于灭菌过的 PBS 溶液中,用眼科剪取出其完整的心脏,对组织进行适当的修剪并转移至 50 mL 离心管中。用 0.125% 胰蛋白酶消化组织块,经过数次消化后离心弃上清,重悬细胞沉淀后转移到 T75 细胞培养瓶稳定培养。将分离得到的小鼠心肌成纤维细胞(mouse

cardiac fibroblasts, mCF) 传代培养到 P2 代,随后进行铺板和实验处理。采用免疫荧光法鉴定 mCF 中  $\alpha$ -SMA 表达,阳性率达到 95% 以上符合实验要求。

#### 1.6 环状 RNA 稳定性实验

提取人心肌细胞 AC16 的总 RNA,分别将 1.5  $\mu$ g RNA 加与不加 RNase R 消化 10 min,逆转录后直接进行 RT-qPCR 反应,分别检测 circ\_0036167 及其宿主基因 MYO9A mRNA 的水平。利用 2.5 mg/L 放线菌素 D 处理 AC16 细胞不同时间(0、4、8、12、16、20 及 24 h),提取总 RNA 进行 RT-qPCR 反应,检测 circ\_0036167 和 MYO9A mRNA 的水平。

#### 1.7 重组腺病毒的制备

circ\_0036167 的序列来自其宿主基因 MYO9A 的外显子 7~15 序列。按报道的方法<sup>[20]</sup>,在 pAd-Track-cmv 载体的多克隆位点中定向插入 circ\_0036167 的模板 DNA 后,在 BJ5183 大肠杆菌与腺病毒骨架质粒 pAd-Easy-1 通过重组。重组成功后,circ\_0036167 腺病毒质粒被 Pac I 内切酶线性化,并在 HEK293 细胞中包装、扩增腺病毒。实验时以 rAd-GFP 作为对照组腺病毒(circ\_0036167 和 rAd-GFP 的感染复数(multiplicity of infection, MOI)均是 5)。

#### 1.8 RT-qPCR 检测

Trizol 法提取 mCF 中的总 RNA,取 2  $\mu$ g RNA,加入 5×PrimeScript RT Master Mix,混匀,逆转录得到 cDNA。取 1  $\mu$ L cDNA,加入 2×SYBR Green Mix 5  $\mu$ L 及相应引物,在 ViiA 7 Quantitative PCR System 进行定量 PCR,检测 circ\_0036167 以及纤维化相关基因的 mRNA 水平(GAPDH 为内参照),采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。

#### 1.9 Western blot 检测

用 PBS 清洗 mCF 细胞板,弃 PBS 后加入适宜体积的 RIPA 裂解液,于冰上裂解细胞 30 min,收集裂解液,于 12 000×g、4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,离心结束后测各样品的浓度,蛋白定量后 99  $^{\circ}$ C 加热变性 10 min,变性完成后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳实验,然后将蛋白电转至 PVDF 膜上,37  $^{\circ}$ C、5% 脱脂牛奶封闭 1 h,根据蛋白分子大小裁剪 PVDF 膜条带,分别用相应的一抗[anti-COL1A1、anti-COL3A1、anti-FUS(1:1 500); anti- $\alpha$ -SMA(1:2 500); anti-GAPDH(1:5 000)]于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,12 h~16 h 后用同一种属的二抗(1:2 500)室温孵育 50 min,最后进行曝光。

#### 1.10 RNA 结合蛋白免疫沉淀实验

用 PBS 清洗细胞,加入裂解液裂解细胞约 30 min,收集细胞。利用 RNA 结合蛋白免疫沉淀实验(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)试

剂盒去除 DNA 后将细胞裂解样品分为 IP、IgG、Input 三组,分别加入 5  $\mu$ g IP (Flag 抗体, FUS 与 Flag 标签融合表达)和 IgG 抗体,垂直混匀器 4  $^{\circ}$ C 孵育 16 h,随后加入磁珠进行免疫沉淀,免疫沉淀约 3 h 结束。所得的洗脱液利用苯酚-氯仿-异戊醇提取 RNA,最后定量检测 FUS 结合的 circ\_0036167。

### 1.11 EdU 检测细胞增殖能力

将 mCF 均匀接种于 confocal 皿中,稳定生长后用重组腺病毒感染细胞。24 h 后避光加入 EdU 增殖试剂盒中的试剂 A,放置 4~6 h,4% 多聚甲醛室温固定 4 h。固定完成后 PBS 清洗,甘氨酸溶液脱色后加入 0.5% Triton X-100 通透,然后加入 Apollo 染色工作液,静置 30 min,滴加 1~2 滴含 DAPI 的封片剂并均匀覆盖 confocal 皿上,激光共聚焦显微镜观察拍照。

### 1.12 流式细胞术检测细胞周期

将 mCF 均匀接种于 6 孔板中,稳定生长后用重组腺病毒感染细胞。24 h 后取细胞悬液,70% 乙醇固定 4 h。固定后 PBS 清洗,避光,37  $^{\circ}$ C、PI 染色 30~40 min,采用流式细胞术检测细胞周期。

### 1.13 Transwell 细胞迁移能力检测

将 mCF 均匀接种于 Transwell 板的小室中,用适宜剂量的重组腺病毒感染,4 h 后补充等量含 10% 血清完全培养基。24 h 后趋化处理 5~8 h,室

温下 4% 多聚甲醛固定 3~4 h,结晶紫染色 1~3 h 至细胞全部染上紫色。PBS 清洗,恒温箱烘干,显微镜观察和采集图像,并进行分析。

### 1.14 统计学分析

用 GraphPad Prism 8 软件统计分析。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间比较用  $t$  检验,多组间比较用单因素方差分析,并用 Bonferroni 校正的  $t$  检验行组间两两比较。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 circ\_0036167 在心衰患者心肌标本中表达上调

Masson 染色结果显示,心衰患者心肌胶原沉积显著增加( $P<0.001$ ;图 1A)。定量 PCR 结果显示,相较于健康器官捐献者,心衰患者心肌中 circ\_0036167 表达显著上调( $P<0.05$ ),而其宿主基因 MYO9A 表达无明显差异(图 1B)。为确认 circ\_0036167 的表达,分别使用 circ\_0036167 和 MYO9A 的检测引物对人心肌 cDNA 和基因组 DNA (gDNA)进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示,从人 cDNA 和 gDNA 中可扩增到 MYO9A 产物,而 circ\_0036167 只能从人 cDNA 中扩增到(图 1C)。DNA 测序结果显示,circ\_0036167 的 PCR 检测产物中包含特征接头序列:AGGAAGAGAAGTACAGATTGCTTCACGGT(图 1D)。

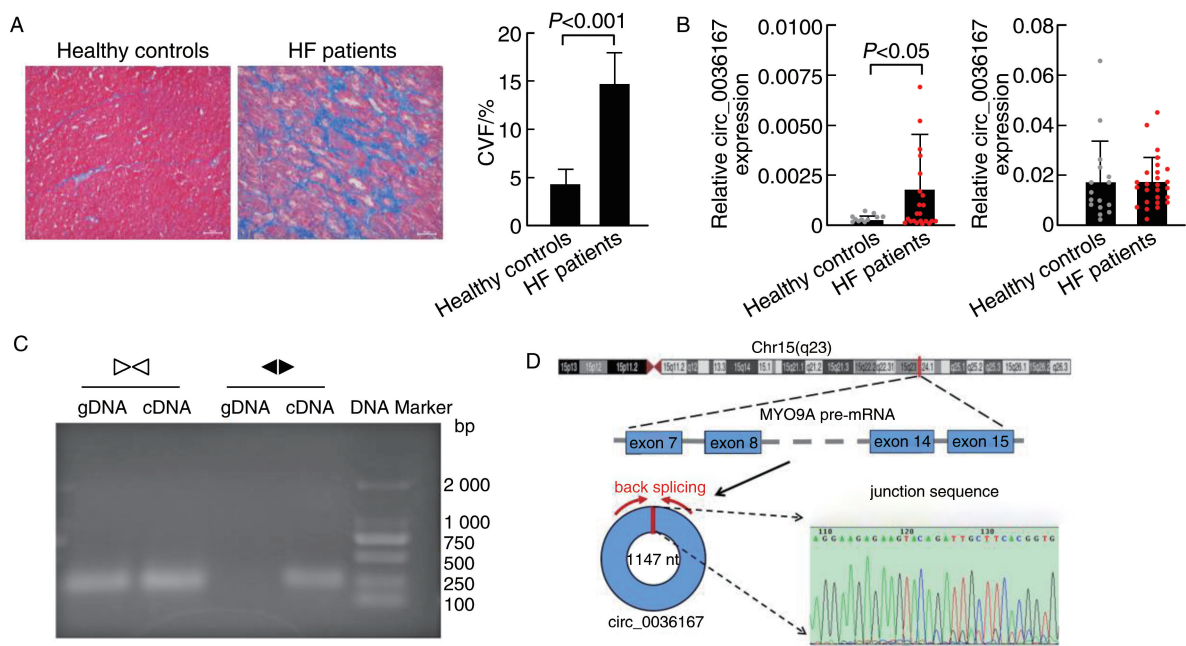


图 1. circ\_0036167 在心衰患者心肌中表达增加

A: Masson 染色,标尺是 100  $\mu$ m,  $n=5$ ; B: 定量 PCR 检测 circ\_0036167 在心衰患者心肌中的表达。C: 分别结合正向( $\blacktriangleleft$ )、反向( $\blacktriangleright$ )引物从人 cDNA 和基因组 DNA 中进行 PCR 扩增 MYO9A 和 circ\_0036167, circ\_0036167 序列来自于宿主基因 MYO9A 的第 7~15 外显子; D: Sanger DNA 测序结果显示检测的 circ\_0036167 接头序列正确。

Figure 1. Up-regulation of circ\_0036167 in the myocardium of patients with heart failure

2.2 circ\_0036167 在人心肌细胞中的定位及其特性

AC16 细胞核质 RNA 的定量 PCR 结果显示, circ\_0036167 主要定位于细胞核中(图 2A)。RT-qPCR 结果显示,经 RNase R 消化后,AC16 细胞中 MYO9A mRNA 水平明显下降( $P < 0.01$ ),而 circ\_0036167 降低不明显(图 2B);AC16 细胞经放线菌素 D 处理不同时间后,MYO9A mRNA 水平呈时间依赖性降低,而 circ\_0036167 未见明显降低(图 2C)。

2.3 circ\_0036167 抑制心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达

利用构建的重组 circ\_0036167 腺病毒感染 mCF

24 h,荧光显微镜下观察到重组 circ\_0036167 腺病毒共表达的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达充分,提示 circ\_0036167 在 mCF 中可有效表达(图 3A)。定量 PCR 结果显示,腺病毒介导 circ\_0036167 在 mCF 中有效过表达,并可抑制 mCF 中纤维化相关基因 COL1A1、COL3A1 和 ACTA2 mRNA 表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ;图 3B)。Western blot 结果显示,过表达 circ\_0036167 的 mCF 中,纤维化相关 COL1A1、COL3A1 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达显著降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ;图 3C)。

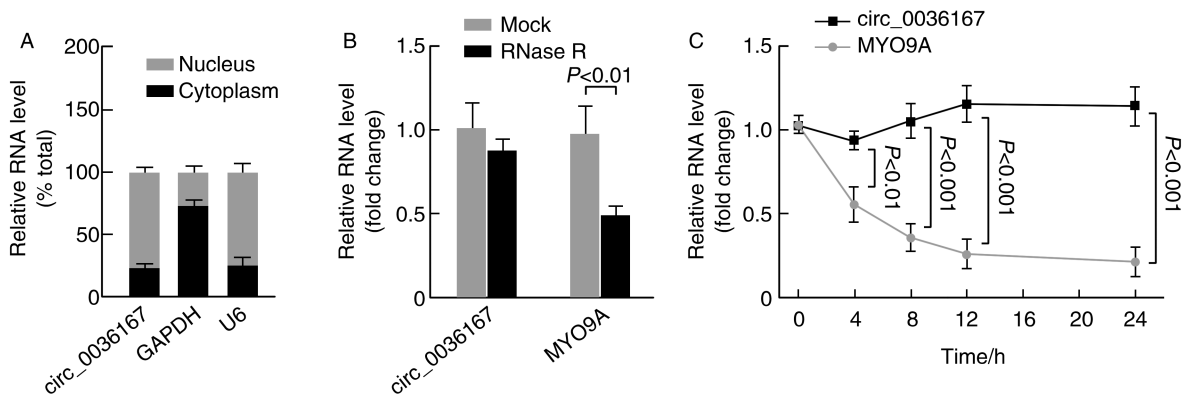


图 2. circ\_0036167 在人心肌细胞 AC16 中的分布及 RNA 稳定性鉴定 ( $n=3$ )

Figure 2. Distribution of circ\_0036167 in human cardiomyocyte AC16 and identification of its RNA stability

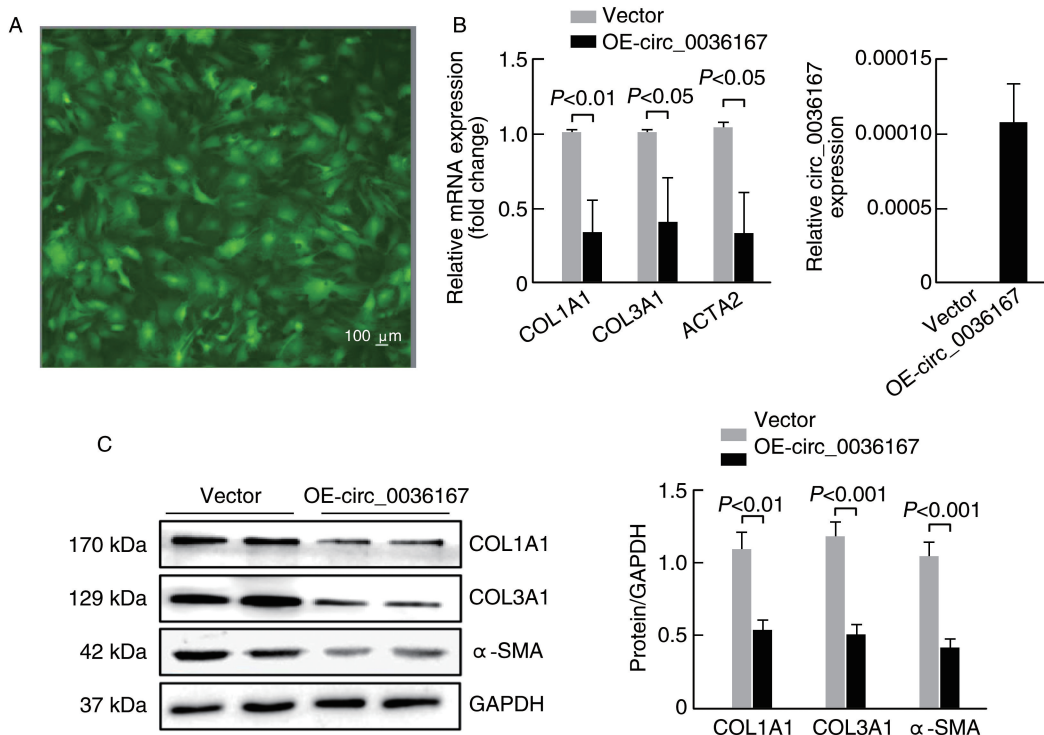


图 3. circ\_0036167 能够抑制 mCF 中纤维化相关基因表达 ( $n=3$ )

Figure 3. Circ\_0036167 inhibits the expression of fibrosis-related genes in mCF

## 2.4 过表达 circ\_0036167 抑制小鼠心肌成纤维细胞的增殖和迁移能力

EdU 染色结果显示,过表达 circ\_0036167 可显著抑制 mCF 的增殖能力( $P < 0.01$ ;图 4A)。流式细

胞术检测结果显示,过表达 circ\_0036167 可显著降低 S 期 mCF 的比例( $P < 0.05$ ;图 4B)。Transwell 细胞迁移实验结果显示,过表达 circ\_0036167 可显著抑制 mCF 的迁移能力( $P < 0.05$ ;图 4C)。

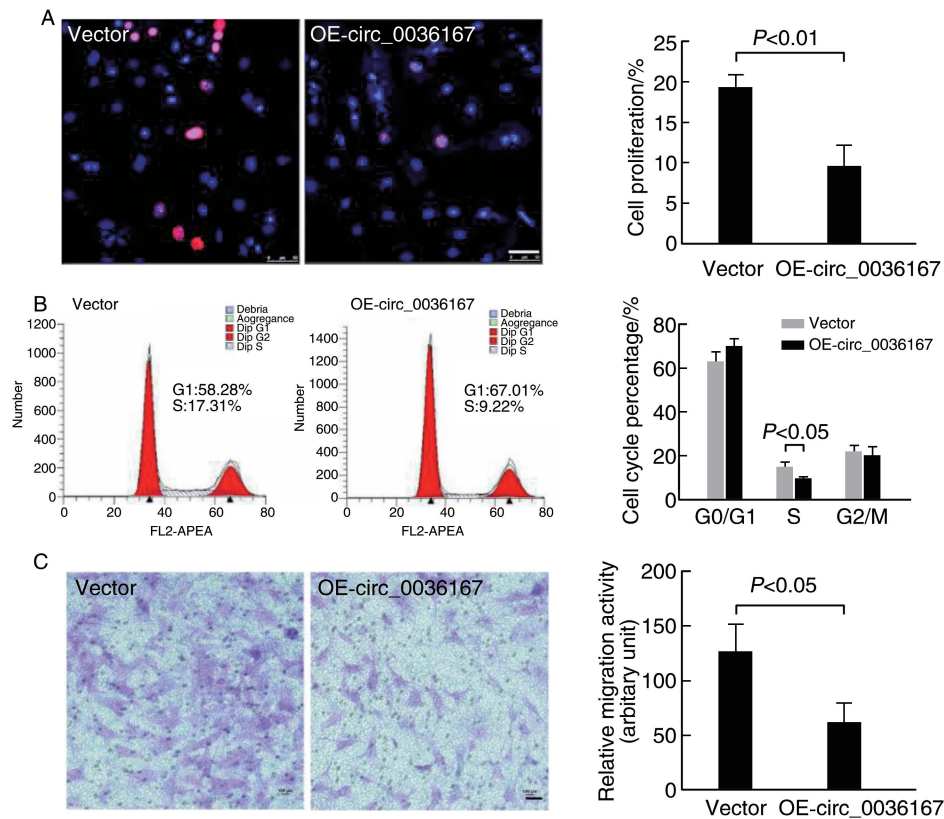


图 4. circ\_0036167 能够抑制 mCF 的增殖和迁移能力( $n=3$ )

A: EdU 荧光染色显示增殖细胞新生成的 DNA (红色), DAPI 示细胞核 (蓝色), 标尺是 50  $\mu\text{m}$ ; B: 流式细胞术检测 mCF 的细胞周期分布;

C: Transwell 迁移实验检测 mCF 的迁移能力, 标尺是 100  $\mu\text{m}$ 。

Figure 4. Circ\_0036167 inhibits the proliferation and migration activity of mCF

## 2.5 FUS 介导 circ\_0036167 发挥抑制心肌成纤维细胞纤维化相关基因表达

生物信息学分析结果显示 circ\_0036167 的-996 ~ -961 碱基 (AGAAGACATACCGGATGACTCCATTGATATCTGTA) 可能是 RNA 结合蛋白 FUS 的结合位点 (<https://circinteractome.nia.nih.gov/bin/circ-searchTest>)。Western blot 结果显示 FUS 在健康器官捐献者和心衰患者心肌中的表达没有显著性差异 (图 5A)。RIP 实验结果证实, FUS 可以特异地结合 circ\_0036167 ( $P < 0.01$ ; 图 5B)。Western blot 结果显示, 沉默 FUS 表达可显著增加纤维化相关蛋白 COL1A1、COL3A1 和  $\alpha$ -SMA 的表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ; 图 5C), 并可有效逆转 circ\_0036167 对纤维化相关蛋白表达的抑制作用 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ; 图 5D)。

## 3 讨论

本研究发现,在心衰心肌中上调表达的 circ\_0036167 具有抑制 mCF 中纤维化相关基因表达的作用。鉴于心肌成纤维细胞的增殖和迁移参与心肌纤维化的发生过程<sup>[23]</sup>, EdU 和 Transwell 细胞迁移实验结果显示过表达 circ\_0036167 可抑制 mCF 的增殖和迁移, 因此, 证实了 circ\_0036167 具有抑制 mCF 纤维化表型的作用。

剪接因子通过作用于 mRNA 前体 (pre-mRNA) 链上 circRNA 序列周围, 可促进 pre-mRNA 剪接生成 circRNA<sup>[24]</sup>。研究显示, RNA 结合蛋白, 例如 QKI<sup>[25]</sup>、HNRNPL<sup>[26-28]</sup>、MBL<sup>[29]</sup> 和 NF90/NF110<sup>[30]</sup>, 可通过与侧翼内含子上的特定基序结合来调节 pre-mRNA 上外显子环化和促进 circRNA 生成。据报道

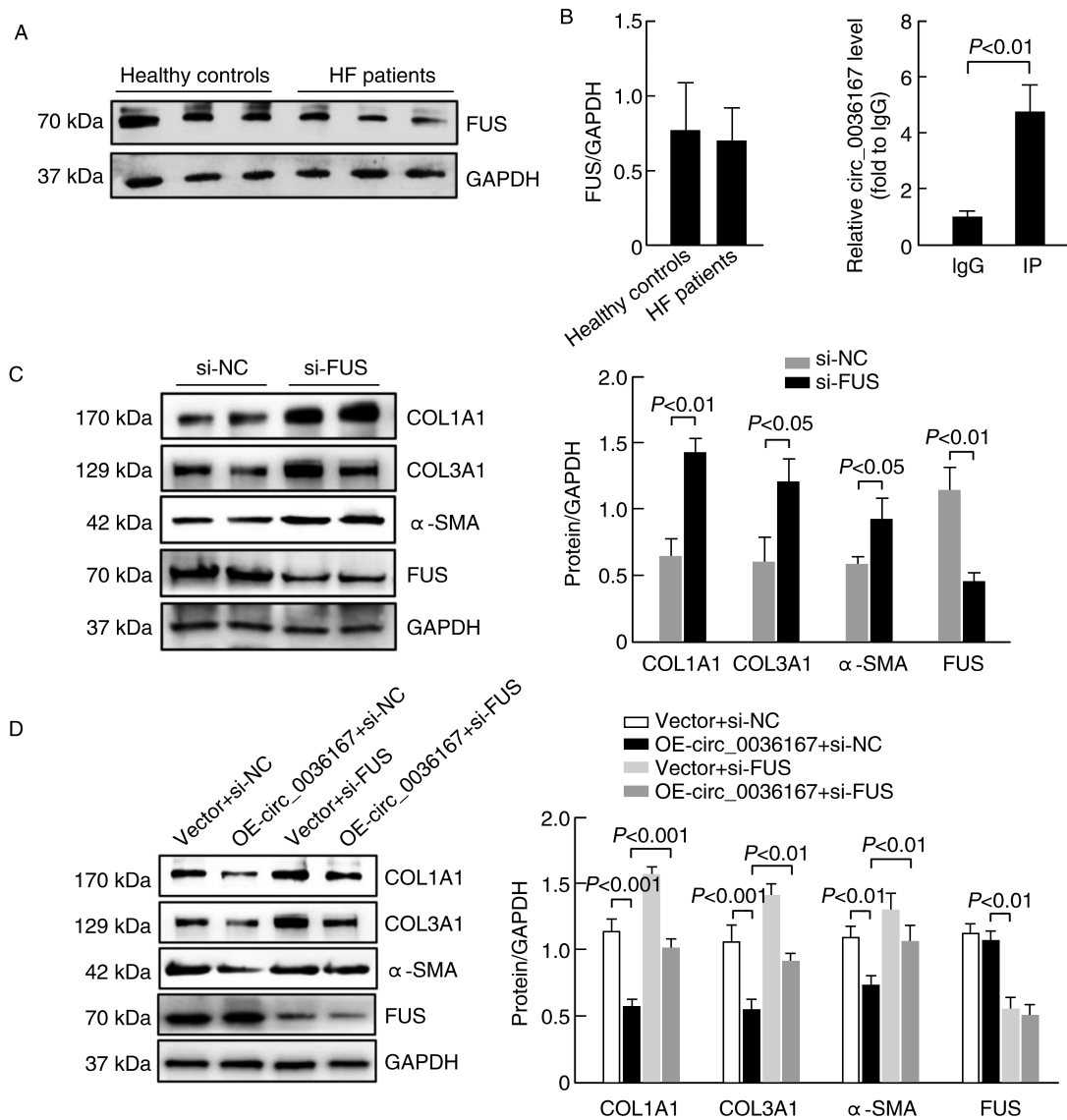


图 5. FUS 介导 circ\_0036167 抑制纤维化相关基因的表达

A: Western blot 检测心衰患者心肌中 FUS 的表达 ( $n=5$ ); B: 定量 PCR 检测 FUS 结合 circ\_0036167 的水平; C: Western blot 检测沉默 FUS 表达后 mCF 中纤维化相关蛋白的表达; D: Western blot 检测沉默 FUS 表达后过表达 circ\_0036167 对纤维化相关蛋白表达的影响 ( $n=3$ )。

Figure 5. FUS mediates the effect of circ\_0036167 on inhibiting the fibrosis-related genes expression in mCF

大约有 103 个 RBP 可以影响 RNA 的环化反应<sup>[30]</sup>。本研究结果发现,相较于健康器官捐献者,心衰患者心肌中 circ\_0036167 表达显著上调,而其宿主基因 MYO9A 表达无明显差异,这提示 circ\_0036167 的表达增加是调节其成环相关的 RNA 结合蛋白表达/活性增加所导致的,但具体机制有待于进一步研究证实。心肌纤维化时 circ\_0036167 表达增加,并且 circ\_0036167 具有抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用,但并不能逆转心肌纤维化,可能的原因是 circ\_0036167 本身表达水平不高,其抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用温和,所以,心肌纤维化时内源性表达增加的 circ\_0036167 不能抑制心

肌纤维化的进程。

本课题组既往报道了小鼠源性宿主基因 MYO9A 的 circRNA\_000203 通过特异性结合 miR-26b-5p 和 miR-140-3p 发挥促进心肌肥厚的作用<sup>[31]</sup>。而人 MYO9A 来源以胞质分布为主的 circ\_0036167 在心肌纤维化时表达升高,并具有抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用<sup>[20]</sup>。虽然本研究中 circ\_0036167 来源于同一宿主基因 MYO9A,以胞核分布为主,但也具有抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用,这提示宿主基因同源的不同 circRNA 可以具有不同的生物学功能和分子机制。

FUS 是异质核糖核蛋白 (hnRNP) 复合体的

组成成分,有多种生物学功能,包括对 mRNA 剪接、加工和运输<sup>[17]</sup>。研究表明,FUS 能够与一些转录起始因子结合,对转录的起始及转录过程均产生影响<sup>[32]</sup>;FUS 能够与新生的 mRNA 前体结合,并在 RNA 聚合酶 II 和 U1 小核核糖核蛋白之间充当介质作用,从而耦合 mRNA 转录和剪接过程<sup>[33]</sup>。近期研究发现 FUS 参与心血管疾病的发病过程<sup>[18-19]</sup>,但尚不清楚 FUS 在心肌纤维化过程中的调控作用和机制。

本研究通过 RIP 实验证实了 FUS 与 circ\_0036167 存在直接的结合作用,并发现 FUS 在健康捐献者心肌和心衰心肌中表达无显著性差异,过表达 circ\_0036167 不影响 FUS 水平,提示 circ\_0036167 不影响 FUS 表达。沉默 FUS 可促进心肌成纤维细胞纤维化相关基因的表达,同时沉默 FUS 可减弱 circ\_0036167 发挥抑制 mCF 中心肌纤维化相关基因表达的作用,提示 FUS 介导了 circ\_0036167 发挥抑制心肌纤维化的作用。推测 circ\_0036167 与 FUS 相互结合影响了 FUS 的生物学功能来发挥抑制心肌纤维化的作用,但具体的分子机制有待于进一步研究证实。

本研究阐明了来源于人 MYO9A 基因的 circ\_0036167 在心衰患者心肌中表达增加,细胞水平上验证了 circ\_0036167 通过结合 FUS 发挥抑制 mCF 心肌纤维化表型的作用。后续将继续在整体水平明确 circ\_0036167 发挥抑制心肌纤维化的作用,并阐明 circ\_0036167 与 FUS 结合调控下游靶分子参与心肌纤维化调控的分子机制。

#### [参考文献]

- [1] KONG P, CHRISTIA P, FRANGOGLIANNIS N G. The pathogenesis of cardiac fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(4): 549-574.
- [2] FRANGOGLIANNIS N G. Cardiac fibrosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(6): 1450-1488.
- [3] FERRARI S, PESCE M. Cell-based mechanosensation, epigenetics, and non-coding RNAs in progression of cardiac fibrosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 28.
- [4] FELISBINO M B, MCKINSEY T A. Epigenetics in cardiac fibrosis: emphasis on inflammation and fibroblast activations [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3(5): 704-715.
- [5] STRATTON M S, MCKINSEY T A. Epigenetic regulation of cardiac fibrosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 92: 206-213.
- [6] ZARZOUR A, KIM H W, WEINTRAUB N L. Epigenetic regulation of vascular diseases [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(6): 984-990.
- [7] DONG Y, HE D, PENG Z, et al. Circular RNAs in cancer: an emerging key player [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 2.
- [8] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V W, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-691.
- [9] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [10] ZHANG Z, YANG T, XIAO J. Circular RNAs: promising biomarkers for human diseases [J]. *EBioMedicine*, 2018, 34: 267-274.
- [11] 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.
- [12] TANG C M, ZHANG M, HUANG L, et al. CircRNA\_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by depressing targets of miR-26b-5p, Col1a2 and CTGF, in cardiac fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40342.
- [13] WARD Z, PEARSON J, SCHMEIER S, et al. Insights into circular RNAs: their biogenesis, detection, and emerging role in cardiovascular disease [J]. *RNA Biol*, 2021, 18(12): 2055-2072.
- [14] KISHORE R, GARIKIPATI V N S, GONZALEZ C. Role of circular RNAs in cardiovascular disease [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 76(2): 128-137.
- [15] 严钰敏,袁淑菁,张铭,等.环状 RNA\_005647 通过结合 miR-99b-5p 抑制心肌细胞中肥厚相关基因的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(1): 10-16.
- [15] YAN Y M, YUAN S J, ZHANG M, et al. CircRNA\_005647 inhibits the expression of hypertrophy-related genes in cardiomyocytes by sponging miR-99b-5p [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(1): 10-16.
- [16] YAMAGUCHI A, TAKANASHI K. FUS interacts with nuclear matrix-associated protein SAFB1 as well as Matrin3 to regulate splicing and ligand-mediated transcription [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35195.
- [17] KAMELGARN M, CHEN J, KUANG L, et al. Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(10): 2004-2014.
- [18] WANG Y W, DONG H Z, TAN Y X, et al. HIF-1 $\alpha$ -regulated lncRNA-TUG1 promotes mitochondrial dysfunction and pyroptosis by directly binding to FUS in myocardial infarction [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 178.
- [19] LUO X, HE S, HU Y, et al. Sp1-induced lncRNA CTBP1-AS2 is a novel regulator in cardiomyocyte hypertrophy

- by interacting with FUS to stabilize TLR4[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2019, 42: 21-29.
- [20] 黄智琪, 严钰敏, 郭晶, 等. 环状 RNA circ\_0036176 结合 miR-218-5p 发挥抑制心肌纤维化的作用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(1): 61-69.  
HUANG Z Q, YAN Y M, GUO J, et al. Circular RNA circ\_0036176 inhibiting myocardial fibrosis via sponging miRNA-218-5p[J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(1): 61-69.
- [21] 温艺红, 杨真祯, 张铭, 等. CircRNA\_100395 通过结合 miR-144-3p 抑制心肌成纤维细胞中纤维化相关基因的表达[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2020, 41(6): 875-883.  
WEN Y H, YANG Z Z, ZHANG M, et al. CircRNA\_100395 inhibits expression of myocardial fibrosis-related genes in human atrial myofibroblasts via sponging miR-144-3p[J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41(6): 875-883.
- [22] 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.  
ZHAO A Z, GUO J, CHEN L W, et al. MiR-25-3p promotes the expression of fibrosis-related genes in cardiac fibroblasts through BTG2/SOD2 axis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(4): 328-334.
- [23] TAO H, SHI K H, YANG J J, et al. Epigenetic regulation of cardiac fibrosis[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(9): 1932-1938.
- [24] ZHENG X, HUANG M, XING L, et al. The circRNA circSEPT9 mediated by E2F1 and EIF4A3 facilitates the carcinogenesis and development of triple-negative breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 73.
- [25] CONN S J, PILLMAN K A, TOUBIA J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs[J]. *Cell*, 2015, 160(6): 1125-1134.
- [26] FEI T, CHEN Y, XIAO T, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies HNRNPL as a prostate cancer dependency regulating RNA splicing[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(26): E5207-E5215.
- [27] LI Y, CHEN B, ZHAO J, et al. HNRNPL circularizes ARHGAP35 to produce an oncogenic protein[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(13): 2001701.
- [28] XU P, ZHANG J, WANG M, et al. hnRNPL-activated circANKRD42 back-splicing and circANKRD42-mediated crosstalk of mechanical stiffness and biochemical signal in lung fibrosis[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(6): 2370-2387.
- [29] ASHWAL-FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI N R, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55-66.
- [30] LI X, LIU C X, XUE W, et al. Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection[J]. *Mol Cell*, 2017, 67(2): 214-227. e7.
- [31] LI H, XU J D, FANG X H, 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.
- [32] TAN A Y, MANLEY J L. TLS inhibits RNA polymerase III transcription[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(1): 186-196.
- [33] YU Y, REED R. FUS functions in coupling transcription to splicing by mediating an interaction between RNAP II and U1 snRNP[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(28): 8608-8613.
- (此文编辑 文玉珊)