

MicroRNA-99a 促进新生小鼠心肌细胞增殖

顾蓉¹, 李巧玲¹, 牡丹², 徐标¹

(南京大学医学院附属南京鼓楼医院 1. 心内科, 2. 影像科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] microRNA-99a; 心肌细胞; 细胞增殖

[摘要] **目的** 有效地促进心肌细胞增殖为亟待发展的治疗策略。本研究拟观察高表达 microRNA-99a (miR-99a) 对体外培养心肌细胞增殖的影响并对其相关机制进行探讨。**方法** 利用高表达 miR-99a 的慢病毒载体转染体外培养的乳鼠心肌细胞, 诱导其在乳鼠心肌细胞中高表达。采用噻唑蓝法、EDU 法检测乳鼠心肌细胞增殖能力; Western blot 检测乳鼠心肌细胞 ERK1/2 蛋白表达及其蛋白磷酸化水平。**结果** miR-99a 在乳鼠心肌细胞高表达后, 噻唑蓝法、EDU 法检测结果均表明: miR-99a 转染组细胞增殖能力明显高于空病毒转染对照组 ($P < 0.05$)。Western blot 检测发现 miR-99a 病毒转染组 ERK1/2 蛋白磷酸化水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** miR-99a 高表达能促进乳鼠心肌细胞增殖, 其机制可能部分通过激活 Erk1/2 通路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Overexpression of microRNA-99a Promotes the Proliferation of Cardiomyocytes

GU Rong¹, LI Qiao-Ling¹, MU Dan², and XU Biao¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Radiology, Affiliated Nanjing Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

[KEY WORDS] MicroRNA-99a; Cardiomyocytes; Cell Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** Promoting cardiac regeneration is therapeutic strategy to be developed urgently. In present study, we investigated the effects of overexpression of microRNA-99a(miR-99a) on cardiomyocytes proliferation of neonatal mice as well as its potential mechanism. **Methods** Cardiomyocytes of neonatal mice were infected by lentiviral-miR-99a(LV-miR-99a). Cardiomyocytes proliferation were identified by thiazolyl blue (MTT) and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EDU) assay. Western blot was used to assess the protein expression of Erk1/2 and its phosphorylation levels in cardiomyocytes. **Results** MTT assay and EDU assay both showed that cardiomyocytes proliferation were significantly higher in miR-99a over-expression group than in the control group ($P < 0.05$). The phosphorylation levels of erk1/2 was also significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-99a overexpression can promote cardiomyocytes proliferation. This effect may be partly mediated through activation of erk1/2.

人体心肌细胞更新速度很慢,不足以在心肌损伤时修复心肌、恢复功能,因此如何有效地促进心肌细胞的增殖就成为亟待发展的治疗策略。既往研究表明,ERK1/2 参与细胞的增殖和分化。MicroRNA (miRNA) 是包含 21 ~ 23 个核苷酸的小 RNA,在转录后的基因表达方面发挥重要调控作用。越来越多的证据表明 miRNA 在心脏中发挥保护作用,如 miR-210 和 miR-1 通过促进血管新生和

抑制心肌细胞凋亡在心肌梗死后改善心功能^[1-3]。研究证实抑制剂 U0126 在肿瘤细胞中能够特异性的阻断 MEK1/2,进而阻止 miR-99a 的下调,提示 MEK1-ERK1/2 与 miR-99a 之间存在一定的相互作用^[4,5]。有研究表明体外培养的心肌细胞暴露于缺氧环境引起细胞凋亡时 miR-99a 表达下降^[1],提示 miR-99a 与缺氧诱导的心肌细胞凋亡相关。Eulalio 等^[6]通过高通量 microRNA 库筛选鉴定出 miR-99a

[收稿日期] 2014-06-09

[基金项目] 国家自然科学基金(81200092);南京市医学科技发展资金(南京市卫生青年人才培养工程 QRX11158)资助

[作者简介] 顾蓉,博士,主治医师,研究方向为心肌梗死后心力衰竭的发病机制及治疗,E-mail 为 gurong.nju@163.com。李巧玲,博士,住院医师,研究方向为心肌梗死后心力衰竭的发病机制及治疗,E-mail 为 lqldoctor@126.com。通讯作者徐标,博士,主任医师,研究方向为心力衰竭的发病机制及治疗,E-mail 为 xubiao@medmail.com.cn。

可能增加乳鼠心肌细胞 DNA 合成和胞质分裂。本课题组前期研究^[7]发现 miR-99a 高表达可以通过 mTOR/P70/S6K 信号通路减少细胞凋亡、增加自噬改善心肌梗死后的心室重构和心功能,但其对于心肌细胞增殖能力是否具有直接影响尚未阐明。故本研究通过体外转染 miR-99a,观察其对体外培养的乳鼠心肌细胞增殖的影响,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠,由南京医科大学动物实验中心提供。

1.2 材料

胎牛血清(Gibco);高糖 DMEM 培养基(Gibco);胰蛋白酶(1:250)及胶原蛋白酶 I (Gibco);5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)(Sigma);光学显微镜(BX51 型)(Olympus);荧光显微镜(Imager A1 型)(Zeiss);EdU 免疫荧光试剂盒(Invitrogen);miR-99a 病毒载体的构建(Genepharma Shanghai),阴性对照片段:TTCTCCGAACGTGTCACGT。

1.3 新生小鼠心肌细胞分离、纯化及培养

参照文献[8,9]方法。新生 1~2 天小鼠断颈处死,在 75% 酒精中浸泡 8 s 后快速取出心脏,用冰 HBSS 漂洗数次,剪除周围的结缔组织、心房。用眼科剪充分剪成小于 1 mm³ 的碎片。吸干 HBSS,加入 0.125% 含 EDTA 的胰酶,冰箱 4℃ 闭光过夜(< 24 h)消化。吸干胰酶,加入事先配好的胶原酶 II 溶液,置 37℃ 恒温水浴摇床上,120 r/min,视胶原酶 II 溶液变浑浊至组织全部被消化(约 10 min),加入 10% FBS 的 DMEM 培养基迅速中和胶原酶 II。将上一步中含有心肌细胞的悬液以室温,2 kr/min,离心 5 min,吸净上清。在细胞沉淀中加入 DMEM 低糖 10% FBS 完全培养基并重悬,将含有心肌细胞的悬液置于若干个培养皿中,在 37℃、5% CO₂,饱和湿度下培养 1.5 h,使成纤维细胞贴壁,此时心肌细胞在悬液中,少数心肌细胞贴壁。吸出心肌细胞悬液,调整好细胞浓度接种到六孔板中(浓度 5 × 10⁸ cells/L)(板中预铺多聚赖氨酸包被过的玻片),细胞培养箱在 37℃、5% CO₂,饱和湿度下培养 24 h。24 小时后改为含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。

1.4 最佳感染复数的筛选

阴性对照病毒(LV-scramble)[GFP:绿色荧光蛋白(green fluorescent protein)]与 miR-99a 病毒

(LV-99a-GFP)由 Genepharma 公司构建。将原代培养的细胞置于仅含 0.5% FBS DMEM 培养基中。用不同感染复数(multiplicity of infection,MOI)的重组慢病毒颗粒(0、20、50、100 及 200)加入培养基中感染细胞,并于 24 h 后更换含有 0.5% FBS 的培养基。感染 48 h 后分别用荧光显微镜观察 GFP 基因感染细胞的绿色荧光强度及流式细胞仪检测 miR-99a 感染率,确定最佳 MOI 值。

1.5 实验分组

原代心肌细胞培养 24 h 后,随机分为 2 组,每孔按测定好的感染复数(MOI)50:1 加入慢病毒溶液:①正常对照组:LV-scramble;②miR-99a 感染组:LV-miR-99a。24 h 后,弃去培养基,PBS 冲洗 2 次,更换新的含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 继续培养。

1.6 RT-PCR 验证 miR-99a 在细胞内的高表达

吸净待收集的细胞培养上清,加入 Trizol,用刮匙充分刮下细胞,转入 1.5 mL EP 管中。振荡器上剧烈震荡 15 s,室温静置 10 min;加入占总体积 1/5 的氯仿,剧烈震荡 15 s,室温静置 10 min;12 kr/min,4℃ 离心 15 min。转移上层水相层(约 400 μL)至一新标记好的 1.5 mL EP 管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温静置 10 min;15 kr/min,4℃ 离心 10 min,弃上清。加入 1 mL 预冷的 80% 乙醇(DEPC-H₂O 配制)洗涤管底 RNA 沉淀一次。吸净乙醇,加入适当体积的 DEPC 水溶解 RNA。55℃ 左右促溶 10 min,得到的 RNA 溶液置于 -70℃ 冰箱保存待用。

心肌细胞 mRNA 的 microRNA 特异性反转录:采用 ABI 公司的 Taqman 探针和 Takara 公司的逆转录酶 AMV 反转录 RNA。反应条件:室温 10 min,42℃ 1 h,冰上 2 min。茎环实时定量 PCR(stem-loop quantitative real time PCR):采用 Takara 公司的 Taqman 实时定量 PCR 试剂盒。

实时 PCR 反应条件:95℃ 30 s,循环程序为 95℃ 5 s,60℃ 34 s,共 40 个循环。

1.7 Western blot 检测两组细胞中 ERK1/2 及其蛋白磷酸化水平

病毒按 50:1 感染心肌细胞,病毒感染 72 h 后用 0.125% 的胰酶消化,收集细胞,PBS 洗涤 2 次(1500 r/min,5 min),采用 RIPA 法裂解细胞,加入细胞裂解液(1 mmol/L PMSF,1% 蛋白酶抑制剂),采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,每孔上样 20 μg 总蛋白的细胞裂解产物,10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。停止电泳后,取出凝胶,于 4℃ 100 V 条件下转膜 2 h。然后用脱脂奶粉

37℃ 封闭 1 h, 充分洗膜后加相应稀释的一抗溶液 ERK1/2 抗体(bioworld), p-ERK1/2 抗体(Cell Signaling Technology), 4℃ 过夜。充分洗膜后加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记来源兔二抗(bioworld), 室温孵育 1 h, 洗膜后加入辣根过氧化物酶的荧光底物(Millipore 公司) 于暗室内曝光, 观察相应蛋白条带表达情况。用凝胶成像及分析系统分析蛋白显色的密度值。

1.8 噻唑蓝比色法测定细胞增殖能力

采用噻唑蓝(MTT, 凯基生物公司) 法测定培养细胞增殖能力。将心肌细胞以每孔 3×10^3 个细胞接种至 96 孔板, 每孔加入 150 μ L 含 0.5% FBS 的 DMEM 培养基中, 培养 24 h 后小心弃去上清, pH 7.4 的磷酸缓冲液冲洗, 再次加入以上培养基 12 h 后, 按“1.3.3”分组情况感染慢病毒, 每组设 4 个复孔, 12 h 更换 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续于孵箱培养, 36 h 后, 更换培养基(每孔 100 μ L), 每孔再加入 MTT 溶液 50 μ L, 37℃ 继续孵育 4 h 终止培养, 小心吸弃孔内上清, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO), 震荡 5 min, 使结晶物充分溶解, 用酶标仪在 490 nm 处测定各孔光密度(optical density, OD) 值。

1.9 心肌细胞 DNA 合成检测

参照试剂盒采用 EDU 免疫荧光分析法检测心肌细胞 DNA 合成情况。感染 24 h 后, 换用 50 μ mol/L EdU 培养基孵育 48 h, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.2% 甘氨酸孵育 10 min, PBS 冲洗两次, 0.5% Triton X-100 透化细胞, PBS 冲洗, Apollo 染色反应液避光孵育 30 min, 再次 PBS 冲洗, Hoechst 避光孵育 10 min, 0.5% Triton X-100 冲洗 3 次, 随后在荧光显微镜下成像。

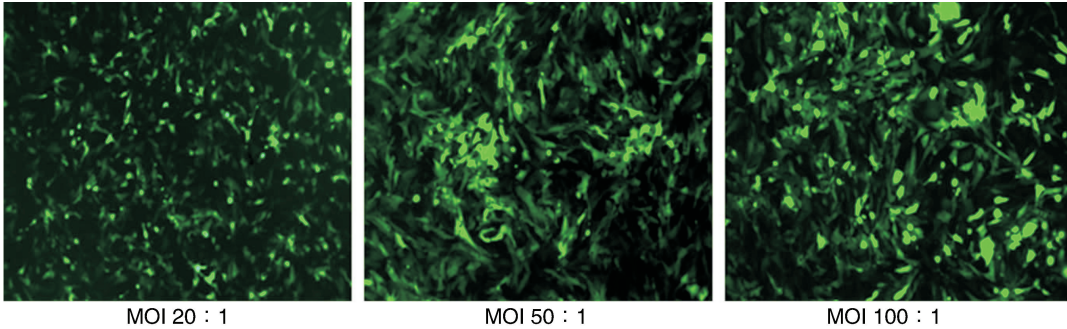


图 2. 最佳感染复数的筛选
Figure 2. The efficiency of lentiviral delivery identified by flow cytometry

2.3 病毒感染后 miR-99a 在心肌细胞的表达

慢病毒感染 72 h 后与 LV-scramble 组(对照组)

1.10 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 统计学软件处理数据, 采用两样本均数间比较的 t 检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 心肌细胞鉴定

体外培养的小鼠心室肌细胞在光学显微镜下能够观察到心肌细胞搏动明显。培养 48 h 后, 经 4% 多聚甲醛固定处理后予 α -actin 心肌特异性染色, 并在共聚焦显微镜下观察(图 1): 青色为 DAPI 表示细胞核; 蓝色为 α -actin 表示心肌细胞骨架结构。经过计数, 心肌细胞纯度高达 95% 左右。

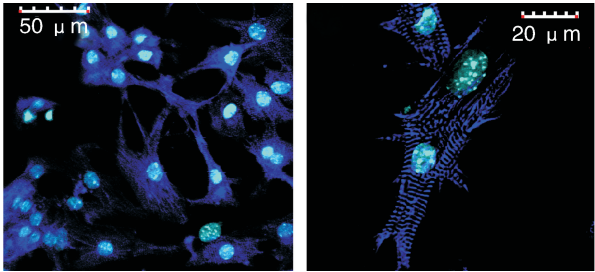


图 1. 新生小鼠心肌细胞 α -actin 染色
Figure 1. α -actin staining of neonatal cardiomyocytes

2.2 最佳感染复数的筛选

用 MOI 为 0、20、50、100 的重组慢病毒颗粒感染细胞, 感染 72 h 后, 经流式细胞术检测感染效率。当 $MOI \leq 50$ 时, 慢病毒的感染效率与病毒剂量呈明显的正相关。MOI 为 50 时, 转染效率为 86% 左右。MOI 在 50 以上时, 感转染效率趋于稳定, 均在 86% 以上, 由此确定最佳 MOI 值为 50(图 2)。

相比, LV-miR-99a 组(实验组) 细胞内 miR-99a 的表达量水平增高, 约为对照组表达量的 22 倍($P <$

0.05;图3)。

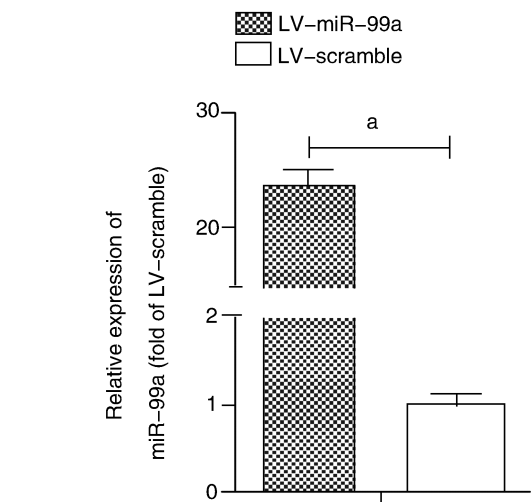


图3. RT-PCR 检测两组细胞的 miR-99a 表达量 a 为 $P < 0.05$,与 LV-scramble 组比较。

Figure 3. MiR-99a expression in both group was assessed by TaqMan RT-PCR

2.4 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平

慢病毒感染 72 h 后, LV-miR-99a 感染组细胞内 ERK1/2 的磷酸化水平较 LV-scramble 组相应蛋白的表达水平增高,为对照组的 2.05 倍 ($P < 0.05$;图4)。

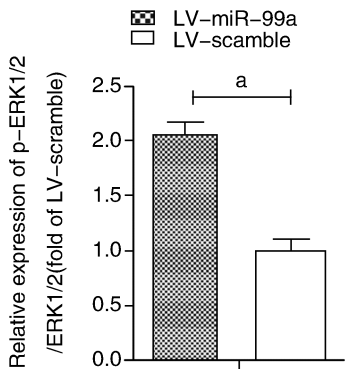
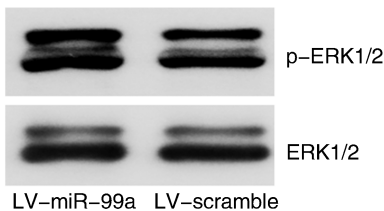


图4. Western blot 检测两组细胞中 ERK1/2 及其蛋白磷酸化水平 a 为 $P < 0.05$,与 LV-scramble 组比较。

Figure 4. The protein expression of ERK1/2 and p-ERK1/2 in both group was assessed by Western blot

2.5 miR-99a 对乳鼠心肌细胞增殖的影响

通过 MTT 检测细胞增殖结果发现, LV-miR-99a 感染心肌细胞 72 h 后与空病毒实验对照组 (LV-scramble) 相比, OD 值明显增加,为对照组的 1.25 倍 ($P < 0.05$;图5)。

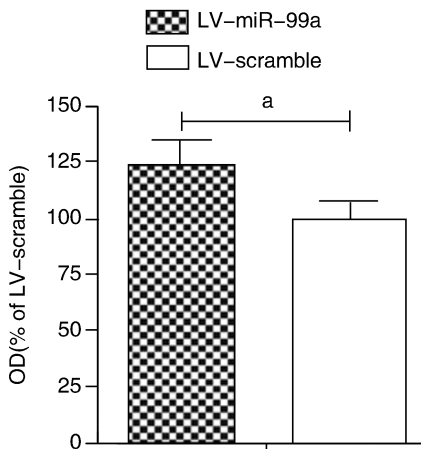


图5. MTT 比色法测定心肌细胞增殖 a 为 $P < 0.05$,与 LV-scramble 组比较。

Figure 5. The proliferation of cardiomyocytes was identified by MTT

2.6 EDU 免疫荧光分析

荧光显微镜下可见对照组 (LV-scramble) 与 miR-99a 转染组 (LV-miR-99a) EDU 阳性细胞呈红色,阴性的细胞呈蓝色。对照组阳性细胞数为 10 个细胞/100 个细胞, miR-99a 慢病毒感染组阳性细胞数为 16 个细胞/100 个细胞,与对照组相比, LV-miR-99a 组的 EDU 阳性细胞数明显增加 ($P < 0.05$;图6)。

3 讨论

传统观念认为人类心脏是终末分化器官,不具有再生潜能。而最近的研究使人们再次审视了这一观点。有两个研究直接地证实人类心肌细胞的更新潜能。研究者^[10]利用冷战时期核爆炸产生的大气中的¹⁴C 整合到植物中被人类通过食物链摄取,而¹⁴C 结合分裂细胞 DNA 的原理证实了成人心肌具有自我更新潜能。另一项由 Kajstura 等^[11]对用胸腺嘧啶脱氧核苷类似物 (IdU) 治疗的肿瘤病人进行心脏解剖来研究 DNA 合成速率。IdU 可以整合到新生的 DNA 中,并使细胞对放射治疗敏感。研究者发现这类病人的心肌细胞 DNA 合成显著增多。总之,这些研究都提供了强大的证据证实人类成体

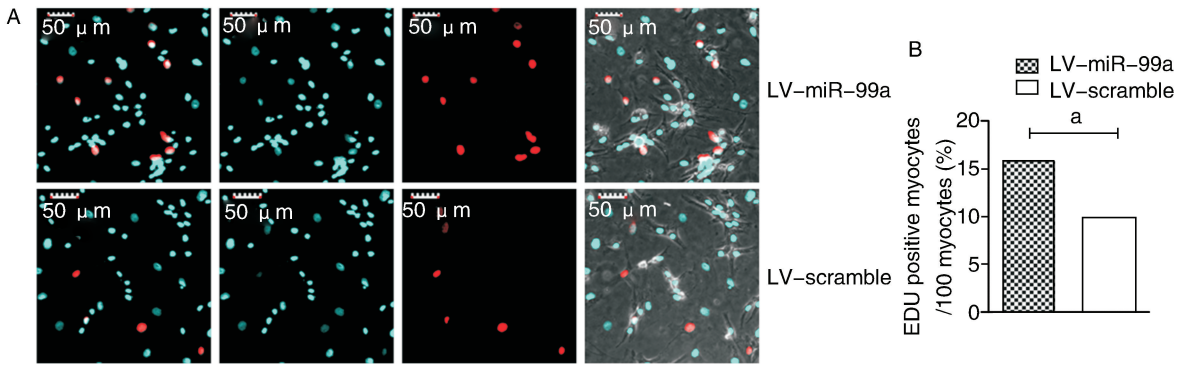


图 6. EDU 免疫荧光法检测心肌细胞 DNA 合成 A 为免疫荧光法检测心肌细胞 DNA 合成。红色代表 EDU 阳性细胞,蓝色代表 DAPI 阳性的细胞核。B 为 EDU 阳性心肌细胞定量分析。

Figure 6. DNA synthesis of cardiomyocytes was assessed by EDU immunofluorescence

心脏核分裂的存在和可能的心肌细胞数目增殖,但是这是一个非常有限而缓慢的过程,并不足以在心肌梗死或心脏受到其它损伤时修复心脏使心脏功能恢复正常。所以,我们需要进一步地研究来调控这一过程,以期获得最大的治疗作用。

本研究小组既往的研究发现^[7], miR-99a 可以通过减少大鼠心肌梗死后心肌细胞凋亡、增加自噬改善心室重构及心功能,增加存活率。而其是否可以直接促进心肌细胞增殖尚不明确。本实验采用体外分离、培养乳鼠心肌细胞的方法来观察 miR-99a 高表达是否对心肌细胞增殖产生影响。直接测定 DNA 合成是细胞增殖检测的最准确方法之一,实验采用 EdU 检测心肌细胞的 DNA 合成情况。为了排除心肌细胞只合成 DNA 而未进行细胞分裂的可能,实验同时采用了 MTT 法间接测定心肌细胞增殖数量。实验结果显示,与对照组相比,miR-99a 转染的心肌细胞 DNA 合成、细胞数量均有增加,证实了 miR-99a 可以直接促进心肌细胞分裂、促使心肌细胞增殖。

体内、体外实验均表明 MEK1-ERK1/2 信号通路的激活能够对抗心脏缺血情况下心肌细胞的凋亡^[12-14]。基因敲除 ERK1/2 的小鼠在生长发育或者病理性刺激作用下心脏发生离心性心肌肥厚 (lengthening),高表达 MEK1 的小鼠的心脏发生向心性肥厚 (width increase),并且这种向心性肥厚是一种代偿性肥厚,小鼠的心功能显著好转,并随着时间的推移,没有失代偿的趋势^[12,15]。体外培养成年鼠心肌细胞,抑制 ERK1/2 后自发性延长,高表达 MEK1/2 后心肌细胞增厚^[13]。因此,Ras 系统的激活导致心脏肥厚、心功能下降、左心室重构涉及了多条通路,而 Ras-Raf-1 介导 MEK1-ERK1/2 通路的激活起着保护心脏重构的作用。既往的研究也表

明在胚胎干细胞、血管平滑肌细胞中 ERK1/2 的激活可促进细胞增殖^[16,17]。

在本实验中,我们发现高表达的 miR-99a 可以促进乳鼠心肌细胞增殖。其促进细胞增殖的通路目前尚不明确,Turcatel 等^[18]报道 miR-99a 可能通过调控 TGF- β 通路促进小鼠乳腺上皮细胞增殖。而在我们的研究中 Western blot 结果显示在高表达 miR-99a 组,p-ERK1/2 表达水平明显增高。这提示 miR-99a 高表达可能通过激活 ERK1/2 等效应分子,促进心肌细胞增殖。

实验结果为 miR-99a 应用于慢性心力衰竭等心脏疾病的治疗提供了进一步的理论基础,提示 miR-99a 有可能通过促进心肌细胞增殖成为抑制心室重构、维持心脏结构和改善心脏功能的新的有效途径。

[参考文献]

- [1] Hu S, Huang M, Li Z, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease[J]. Circulation, 2010, 122(11 Suppl): 124-131.
- [2] Tang Y, Zheng J, Sun Y, et al. MicroRNA-1 regulates myocyte apoptosis by targeting bcl-2 [J]. Int Heart J, 2009, 50(3): 377-387.
- [3] Williams AH, Valdez G, Moresi V, et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice [J]. Science, 2009, 326(5959): 1549-554.
- [4] Oneyama C, Aozasa K, Okada M. MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways [J]. Oncogene, 2011, 30(32): 3489-501.
- [5] Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, et al. microRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian [J]. Circulation, 2011, 123(9): 999-1009.

- [6] Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration [J]. *Nature*, 2012, 492(7 429): 376-381.
- [7] Li Q, Xie J, Li R, et al. Overexpression of microRNA-99a attenuates heart remodelling and improves cardiac performance after myocardial infarction [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(5): 919-928.
- [8] Goldenberg I, Shainberg A, Jacobson KA, et al. Adenosine protects against angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiocyte cultures [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 252(1-2): 133-139.
- [9] Chen J, Larsson L, Haugen E, et al. Effects of autoantibodies removed by immunoadsorption from patients with dilated cardiomyopathy on neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Eur J Heart Fail*, 2006, 8(5): 460-467.
- [10] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans [J]. *Science*, 2009, 324(5 923): 98-102.
- [11] Kajstura J, Urbanek K, Perl S, et al. Cardiomyogenesis in the adult human heart [J]. *Circ Res*, 2010, 107(2): 305-315.
- [12] Kehat I, Meloche S, Molkentin JD. ERK1/2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth [J]. *Circ Res*, 2011, 108(2): 176-183.
- [13] Lips DJ, Doevendans OF, Molkentin JD. MEK1-ERK2 Signaling Pathway Protects Myocardium From Ischemic Injury In vivo [J]. *Circulation*, 2004, 109(16): 1938-941.
- [14] Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) in cardiac hypertrophy and cell death [J]. *Circ Res*, 2002, 91(9): 776-781.
- [15] Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice [J]. *The EMBO J*, 2000, 19(23): 6341-350.
- [16] Garavito NM, Pena DA, Camargo Bonatto JM, et al. Activation of protein kinase C delta by RACK peptide promotes embryonic stem cell proliferation through ERK 1/2 [J]. *J Proteomics*, 2013, 94: 497-512.
- [17] Liu G, Hitomi H, Rahman A, et al. High sodium augments angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation through the ERK 1/2-dependent pathway [J]. *Hypertension Research*, 2014, 37(1): 13-18.
- [18] Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, et al. MIR-99a and MIR-99b modulate TGF-β-induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells [J]. *Plos One*, 2012, 7(1): e31032.

(此文编辑 李小玲)