

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-04-0332-05

## D-半乳糖诱导的心肌细胞自噬下降与 microRNA 的表达变化有关

朱光荣, 丁宁, 杨安宁, 杨松昊, 王楠, 侯苗苗, 谢琳, 蒋袁絮, 田珏, 姜怡邓, 杨晓玲

(宁夏医科大学基础医学院, 宁夏回族自治区银川市 750004)

[关键词] 衰老心肌细胞; 自噬; microRNA

[摘要] 目的 探讨 microRNA(miRNA)和衰老心肌细胞自噬之间的关系。方法 使用 0、4、8、16、20 g/L D-半乳糖刺激大鼠心肌细胞 H9c2 衰老, 刺激 3、6、9 天后,  $\beta$ -半乳糖苷酶染色法检测细胞衰老水平; 电镜观察 D-半乳糖刺激衰老大鼠心肌细胞自噬体形成; 分别采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)及蛋白质印迹法(Western blot)检测衰老大鼠心肌细胞与正常 H9c2 细胞中 miRNA-30a、miRNA-126、miRNA-204 及自噬蛋白 LC3B II/LC3B I 表达水平。结果 与对照组比较, 随着药物浓度的升高及刺激天数的增加, 细胞染色逐渐加深, 在 D-半乳糖浓度为 8 g/L 刺激 9 天时, 细胞染色最明显; 电镜结果显示, D-半乳糖诱导衰老心肌细胞自噬体减少; Western blot 结果显示, 衰老心肌细胞 LC3B II/LC3B I 水平降低; 实时荧光定量 PCR 结果显示, 诱导衰老组心肌细胞中, miRNA-30a、miRNA-126 表达水平明显下降, miRNA-204 表达水平明显上升。结论 D-半乳糖诱导的衰老心肌细胞自噬水平降低的过程中, 存在 miRNA-30a、miRNA-126 表达水平的降低以及 miRNA-204 表达水平的增加, miRNA 的差异表达可能是衰老心肌细胞自噬水平变化的重要机制。

[中图分类号] R977.3

[文献标识码] A

### The decreasing of autophagy in cardiomyocytes induced by D-galactose is related to the changes of microRNA expression

ZHU Guang-Rong, DING Ning, YANG An-Ning, YANG Song-Hao, WANG Nan, HOU Miao-Miao, XIE Lin, JIANG Yuan-Xu, TIAN Jue, JIANG Yi-Deng, YANG Xiao-Ling

(School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[KEY WORDS] Aging cardiomyocytes; Autophagy; microRNA

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between microRNA (miRNA) and autophagy in aged myocardial cells induced by D-galactose. **Methods** The D-galactose with 0, 4, 8, 16, 20 g/L was used to induce the rat myocardial cells to senescence respectively, and being stimulated 3, 6, 9 days later, the aging level of H9c2 was detected by the beta-galactosidase staining; the formation of autophagosomes in aging rat cardiomyocytes induced by D-galactose was detected by electron microscope; the mRNA expression level of miRNA-30a, miRNA-126, miRNA-204 and protein expression level of LC3B II/LC3B I in aging rat cardiomyocytes and H9C2 cells was detected by quantitative real-time (qRT-PCR) and Western blot methods respectively. **Results** Compared with the control group, the cell staining was gradually deepened with the increase of drug concentration and the stimulation days, and when D-galactose concentration was 8 g/L for 9 days, cell staining was the most obvious; electron microscopy showed that the autophagy in aging cardiomyocytes induced by D-galactose was decreased; Western blot results showed that the level of LC3B II/LC3B I in aging cardiomyocytes was reduced; qRT-PCR results showed that in the aging cardiomyocytes group the expression levels of miRNA-30a and miRNA-126 were decreased and miRNA-204 was significantly increased. **Conclusion** In the process of the autophagy level decreasing in senescent cardiomyocytes induced by D-galactose, there exists a reducing in miRNA-30a, miRNA-126 expression level and an increasing in miRNA-204 expression level, the differential expression of miRNAs may be an important mechanism of autophagy in senescent cardiomyocytes.

[收稿日期] 2016-10-17

[修回日期] 2017-03-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81560242, 81360063); 宁夏教育厅项目(NGY2015092)

[作者简介] 朱光荣, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化病理生理学, E-mail 为 960988710@qq.com。通讯作者杨晓玲, 博士, 副教授, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 yangwj04@126.com。

衰老是机体的一种退行性变化,表现为对外界环境的适应能力减弱,而自噬贯穿于衰老的全过程<sup>[1]</sup>。心肌细胞是一种长寿命分裂后期细胞,心肌细胞的自噬对于维持心脏功能和代谢具有重要的作用<sup>[2]</sup>。研究显示:miRNA(miRNA)可以通过调控自噬形成的不同阶段影响自噬水平<sup>[3-4]</sup>,但 miRNA 是否影响衰老心肌细胞的自噬水平,目前尚不清楚。本研究通过用 D-半乳糖刺激大鼠心肌细胞构建衰老心肌模型,探讨 miRNA 和 D-半乳糖诱导的衰老心肌细胞自噬之间的关系,为临床心脏疾病的诊断和治疗提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

大鼠心肌细胞 H9c2(上海中科院细胞库);LC3B 兔单克隆抗体(Abcam 公司);山羊抗兔辣根过氧化物酶标抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)高糖培养基(Thermo 公司);胎牛血清(Sigma 公司);cDNA 反转录试剂盒(Thermo 公司);实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(Takara 公司);总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);总蛋白提取试剂盒(凯基公司);BCA 蛋白含量检测试剂盒(凯基公司);溶酶体  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(碧云天公司)等。

### 1.2 大鼠心肌细胞 H9c2 细胞培养

使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养大鼠心肌细胞 H9c2,培养时细胞置于 5%CO<sub>2</sub>、95%空气、37℃培养箱中培养,每 2 天更换 1 次培养基,在细胞融合度为 80%左右时使用含有 0.25%胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。当细胞传至 3 代后,将细胞接种于 6 孔板中,接种密度为  $2 \times 10^5$ ,待细胞融合度为 60%左右时进行实验。

### 1.3 建立大鼠心肌细胞衰老模型

第 1 天,取对数生长的 H9c2 细胞,胰酶消化后按照每孔  $1 \times 10^8$  个/L 密度接种于 3 块 6 孔板中,过夜贴壁后,更换含有 D-半乳糖的完全培养基,浓度分别为 0、4、8、16、20 g/L,每孔加 2 mL,隔天换液,分别培养 3、6、9 天后,按照  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒说明书进行染色检测细胞衰老水平。将正常大鼠心肌细胞 H9c2 命名为 Y-NC,D-半乳糖诱导的衰老大鼠心肌细胞命名为 O-NC。

### 1.4 $\beta$ -半乳糖苷酶染色法鉴定细胞衰老水平

按照碧云天使用说明书对细胞衰老水平进行鉴

定,即 D-半乳糖刺激衰老一定时间后,PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL  $\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液,常温固定 15 min,PBS 洗涤细胞 3 次,加入 1 mL 染色工作液,37℃孵育过夜,普通光学显微镜下观察。染色结果判定,在光学显微镜下观察到变成蓝色表达的  $\beta$ -半乳糖苷酶的细胞,计数 100 个细胞中该阳性细胞比例。

### 1.5 电镜观察大鼠心肌细胞自噬体的产生

取生长良好的大鼠心肌细胞(Y-NC)及 D-半乳糖诱导衰老心肌细胞(O-NC),按照  $1 \times 10^{10}$  个/L 的密度接种于 100 mm 培养皿中,待其贴壁后,PBS 洗涤细胞 2 次,使用细胞刮收集细胞后,加入 2%戊二醛固定,更换 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液,然后加入 1%锇酸浸泡,酒精脱水,环氧丙烷浸透,包埋,制作超薄切片后,置于电镜下观察细胞超微结构。

### 1.6 荧光定量 PCR 检测大鼠心肌细胞 miRNA 的表达水平

取对数生长的正常细胞株及 D-半乳糖诱导衰老细胞株,胰酶消化后细胞接种于 6 孔板中,每组接种 3 孔,待细胞融合至 80%左右时,PBS 洗涤细胞 2 次,按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,并按照 cDNA 反转录试剂盒说明书合成 cDNA;miRNA-30a、miRNA-126、miRNA-204 引物由广州锐博生物科技有限公司合成,内部参照物为 U6,引物购自广州锐博生物科技有限公司。条件为:94℃预变性 10 min,94℃变性 30 s、58℃退火 30 s、72℃延长 30 s,扩增 40 个循环。94℃预变性 10 min,94℃变性 30 s、58℃退火 30 s、72℃延长 30 s,扩增 40 个循环。

### 1.7 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3B II/LC3B I 的表达水平

取对数生长的正常细胞株及 D-半乳糖诱导衰老细胞株,胰酶消化后细胞接种于 100 mm 培养皿中,每组接种 4 块皿,待细胞融合至 80%左右时,PBS 洗涤细胞 2 次,使用总蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,4℃、12000 r/min 离心 15 min,收集上清,使用 BCA 法测定蛋白浓度。然后将每组蛋白定量至 30  $\mu$ g,经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,80 V 30 min,120 V 60 min,15 V 恒压转膜 10 min,经一抗 4℃过夜,二抗室温孵育 2 h 后,加入显色底物,以  $\beta$ -actin 为内参,凝胶成像分析仪上成像分析,计算灰度值比值。

### 1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 和 SPSS 17.0 软件对实验数据进行分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料采用单因素方差分析,两独立样本的比较采用 *t* 检验,*P* <

0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠心肌细胞衰老模型的建立

D-半乳糖诱导心肌细胞衰老,分别用 0、4、8、16、20 g/L 浓度处理 3、6、9 天后,使用  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒对细胞进行染色,在光学显微镜下对诱导衰老的细胞进行形态学检查,并计数 100 个细胞中染色阳性(蓝色)细胞的个数。如图 1 所示,可以看到  $\beta$ -半乳糖苷酶染色可见对照组细胞(0 g/L)染色阴性,而在 D-半乳糖浓度为 8 g/L,刺激时间为 9 天时,阳性细胞明显增多。据此,该组细胞作为下述研究中的衰老心肌细胞。

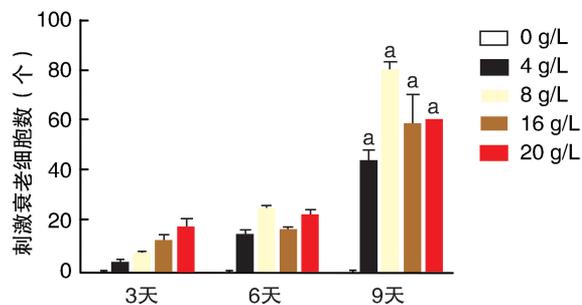


图 1. D-半乳糖诱导的心肌细胞衰老的鉴定 a 为  $P < 0.001$ , 与对照组(0 g/L)比较。

Figure 1. Identification of myocardial cell senescence induced by D-galactose

### 2.2 电镜观察衰老心肌细胞自噬体

电镜结果显示,正常培养的大鼠心肌细胞 H9c2 (Y-NC) 线粒体结构完整,可见多个自噬体形成;D-半乳糖诱导衰老的心肌细胞(O-NC)内可见细胞膜结构不完整,双层膜结构的自噬体形成,新月状或环状,双层或多层膜,内含胞浆成分(图 2)。

### 2.3 miRNA 在衰老心肌细胞中的表达

D-半乳糖诱导的衰老心肌细胞中,其 miRNA-30a, miRNA-126 表达水平低于正常 H9c2 细胞 ( $P < 0.05$ ), miRNA-204 表达水平高于正常 H9c2 细胞 ( $P < 0.05$ ; 图 3)。

### 2.4 LC3B II/LC3B I 在衰老心肌细胞中的表达

Western blot 结果显示(图 4),D-半乳糖诱导的衰老心肌细胞的 LC3B II/LC3B I 的表达水平 ( $0.33890 \pm 0.03673$ ) 明显低于正常 H9c2 细胞中 LC3B II/LC3B I 的表达水平 ( $0.73620 \pm 0.09813$ ;  $P < 0.05$ )。

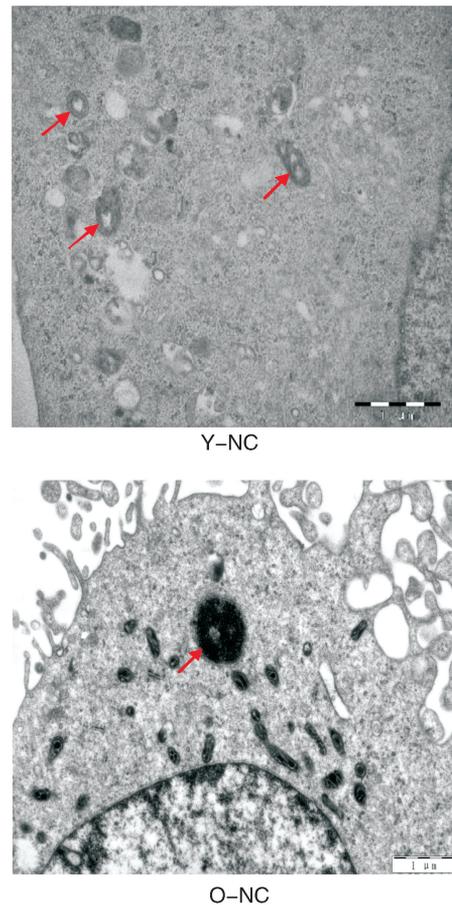


图 2. 电镜显示心肌细胞中自噬体的形成(3000 $\times$ ) Y-NC 示大鼠心肌细胞 H9c2; O-NC 示 D-半乳糖诱导的大鼠心肌细胞;箭头示自噬体。

Figure 2. The formation of autophagy in cardiac muscle cells was showed by electron microscope(3000 $\times$ )

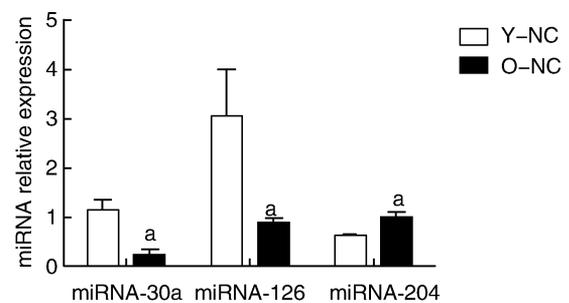


图 3. 心肌细胞中 miRNA 表达水平 a 为  $P < 0.05$ , 与 Y-NC 比较。

Figure 3. The mRNA expression level of miRNA in cardiac muscle cell

## 3 讨论

衰老是机体代谢的必然阶段,在一个完整的个体中其组织、细胞甚至分子水平都会发生非常明显的变化<sup>[5]</sup>。作为机体血液输送的唯一器官,衰老对

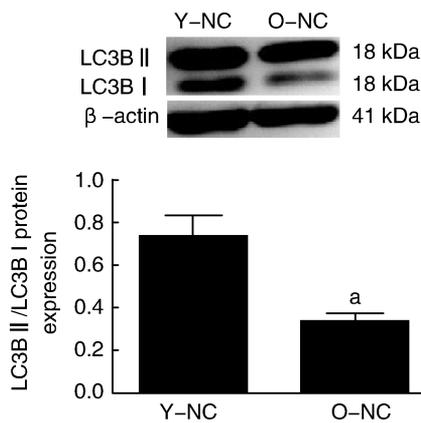


图 4. 心肌细胞中 LC3B II/LC3B I 表达水平 Y-NC 为正常大鼠心肌细胞 H9c2; O-NC 为 D-半乳糖诱导的大鼠心肌细胞。a 为  $P < 0.01$ , 与 Y-NC 比较。

Figure 4. The protein expression level of LC3B II/LC3B I in cardiac muscle cell

心肌细胞尤为重要。如有人研究证实伴随着衰老的进程,血浆 Klotho 蛋白水平逐渐降低,冠状动脉因失去 Klotho 基因的保护作用而出现粥样硬化<sup>[6]</sup>;目前存在很多有关衰老的学说,如自由基学说、遗传突变学说、线粒体损伤学说等<sup>[7]</sup>。研究衰老常用的模型有 D-半乳糖致衰老模型<sup>[8]</sup>、臭氧损伤模型<sup>[9]</sup>、去胸腺衰老模型<sup>[10]</sup>、自然衰老模型<sup>[11]</sup>等。与其它几种衰老模型比较,D-半乳糖刺激衰老模型的方法简便易行,周期较短,价格低廉,结果稳定,已成为国内公认的刺激衰老模型。本实验使用 D-半乳糖诱导大鼠心肌细胞 H9c2 衰老时发现,短时间(3、6 天)低浓度(4 g/L)的 D-半乳糖刺激细胞衰老的程度并不明显,而随着 D-半乳糖浓度及天数的增加, $\beta$ -半乳糖苷酶也随之增多,在 8 g/L 浓度下的 D-半乳糖刺激心肌细胞 9 天后,其诱导效应达到最大水平。提示一定浓度的 D-半乳糖可以在一定时间内有效刺激心肌细胞发生衰老,表明成功构建出 D-半乳糖衰老心肌细胞模型。

自噬是一个分解代谢过程,对细胞内稳态的维持和营养调控具有重要作用<sup>[12]</sup>。而当细胞衰老时,会发生自噬水平降低<sup>[13-14]</sup>。LC3B 是自噬体中的核心成分,其功能可以作为类似于“适配器”那样将细胞碎片等物质传递给自噬体,新合成的 LC3B 前体经过处理后形成暴露出甘氨酸的可溶性的 LC3B I,一旦自噬被诱导,LC3B I 与磷脂酰乙醇胺共价结合,形成了 LC3B II,结合在自噬体的膜上<sup>[15-16]</sup>。LC3B II 介导自噬体与溶酶体发生融合后内容物的降解,而使 LC3B 无法进行切割形成 LC3B I,可以很好的避免自噬体与溶酶体发生结合,从而避免自噬

体内容物的降解。这样,通过对 LC3B 蛋白的修饰可以调节自噬的最终过程<sup>[15]</sup>。因此,LC3B II 与 LC3B I 比值成为自噬的经典指标。本次实验结果显示,与正常心肌细胞比较,D-半乳糖刺激衰老心肌细胞中,LC3B II/LC3B I 的表达水平显著下降,表明 D-半乳糖刺激诱导的细胞衰老可能同时伴有自噬水平的降低,其可能机制有待进一步研究。

microRNA(miRNA)可通过结合到靶 mRNAs 的 3'非翻译区(UTR)来抑制基因的转录<sup>[17]</sup>,从而影响基因的表达调控,在细胞的生长、发育、衰老等过程中具有重要作用,可以作为细胞活动调控的重要参与者。近来研究表明,miRNA 可以参与到心肌细胞的发育、心力衰竭、心肌肥大等过程中<sup>[18-19]</sup>。相同 miRNA 可以在不同疾病中表达,而不同 miRNA 也可以在同一种疾病中表达。有实验证实,在肾透明细胞癌患者肾组织标本总 miRNA-204 水平显著下降<sup>[20]</sup>,而进一步研究发现 miRNA-204 可能是通过抑制自噬从而影响肿瘤细胞的增殖,即其可能机制为通过抑制肿瘤细胞 LC3B 的表达,从而抑制自噬的发生。Jian 等<sup>[21]</sup>指出,缺氧诱导的心肌细胞自噬实验中,miRNA-204 可以下调 LC3B 抑制自噬过程。miRNA-30a 可以通过抑制 Beclin1 介导的自噬来影响肿瘤细胞对药物的敏感性<sup>[22]</sup>。Zhu 等<sup>[23]</sup>发现,自噬相关蛋白 Beclin1 是 miRNA-30 的直接靶基因,过表达 miRNA-30 可以降低由雷帕霉素所造成的自噬水平。而 miRNA-126 与血管的新生、癌细胞的发生和迁移及一些先天性免疫疾病中有着密切的关系<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,D-半乳糖刺激衰老的心肌细胞模型中,miRNA-30a 和 miRNA-126 的表达水平降低,而 miRNA-204 的表达水平在细胞发生衰老后明显增加,由此提示,miRNA 在衰老心肌细胞的表达调控中具有明显的差异,且这种差异可能与自噬相关。

综上所述,在 D-半乳糖诱导的衰老心肌细胞的自噬水平降低的过程中,miRNA-30a、miRNA-204 及 miRNA-126 具有重要作用,其具体的作用机制需要进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Lapierre LR, Kumsta C, Sandri M, et al. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging[J]. *Autophagy*, 2015, 11(6): 867.
- [2] 谢凤,柳威,陈临溪. 自噬参与心脏疾病调控的研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012(3): 224-233.

- [3] 徐璟, 孙国平. miRNA 对自噬的调控及其在肿瘤中的作用研究进展 [J]. 安徽医药, 2013, 17 (10): 1 645-647.
- [4] Kim Y, Lee J, Ryu H. Modulation of autophagy by miRNAs [J]. *Bmb Rep*, 2015, 48(7): 371-372.
- [5] 童坦君, 张宗玉. 衰老机制及其学说 [J]. 生理科学进展, 2007, 38(1): 14-18.
- [6] 刘玮, 张韶英, 徐慧敏, 等. 老年冠心病患者血浆 Klotho 水平测定的临床意义 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(2): 171-174.
- [7] 董晓华, 张丹参, 武海霞. 衰老动物模型的研究进展及评价 [J]. 神经药理学报, 2004, 21(6): 41-43.
- [8] Chen GH, Wang YJ, Wang XM, et al. Effect of aging on species-typical behaviors in senescence-accelerated mouse [J]. *Physiol Behav*, 2005, 85(5): 536-545.
- [9] Feng R, He W, Ochi H. A new murine oxidative stress model associated with senescence [J]. *Mech Ageing Dev*, 2001, 122(6): 547-559.
- [10] 彭宗根. 胸腺素在神经内分泌系统中的延缓衰老作用 [J]. 国际老年医学杂志, 2003, 24(4): 178-180.
- [11] 赵彩红, 王钦富. 小鼠自然衰老模型的评价 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2003, 12(5): 588-589.
- [12] 陈颖霞, 汤永红. 脑缺血过程中自噬作用的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(6): 644-648.
- [13] He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43 (1): 67-93.
- [14] 许金枝, 洪荣华, 谭玉珍. 自噬在心肌衰老中作用的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2014, 34 (8): 1 121-124.
- [15] Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151 (2): 263-276.
- [16] Kabeya Y, Mizushima NA, Oshitani OS, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 13): 2 805-812.
- [17] Bartel DP. MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [18] Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNA add a new dimension to cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2010, 121(121): 1 022-032.
- [19] Condorelli G, Latronico MVG, Li GWD. microRNA in heart disease: putative novel therapeutic targets [J]? *Eur Heart J*, 2010, 31(6): 649-658.
- [20] Atala A. Re: VHL-Regulated miR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma [J]. *J Urology*, 2012, 188(6): 2 434.
- [21] Jian X, Xiao YZ, Bin H, et al. MiR-204 regulate cardiomyocyte autophagy induced by hypoxia-reoxygenation through LC3-II [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 148 (1): 110-112.
- [22] Zou Z, Wu L, Ding H, et al. MicroRNA-30a sensitizes tumor cells to cis-platinum via suppressing beclin 1-mediated autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2011, 287 (6): 4 148-156.
- [23] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells [J]. *Autophagy*, 2009, 5(6): 816.
- [24] 白玉, 陆雯芸, 韩凝, 等. miR126 功能的多效性与先天性免疫 [J]. 遗传, 2014, 36(7): 631-636.
- (此文编辑 朱雯霞)