

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-12-1196-05

肥大心肌细胞来源外泌体差异表达 microRNA 及其信号通路调节的初步研究

冯月^{1,2}, 秦磊¹, 田英杰^{1,2}, 王占黎³, 于慧³

(1.包头医学院研究生学院, 内蒙古包头市 014030; 2.包头医学院公共卫生学院, 内蒙古包头市 014030;

3.内蒙古自治区疾病相关生物标志物重点实验室 包头医学院分子医学研究所

包头医学院第二附属医院检验科, 内蒙古包头市 014030)

[关键词] 肥大心肌细胞; 外泌体; 差异表达 microRNA

[摘要] **目的** 获得肥大心肌细胞来源外泌体与正常心肌细胞来源外泌体差异表达 microRNA, 并进行靶基因和信号通路分析, 探讨差异表达 microRNA 调控心肌肥大的分子机制。 **方法** 取 1~3 天龄 Wistar 新生鼠心脏行原代心肌细胞培养, 并分成两组, 模型组用 Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) 诱导心肌细胞肥大, 对照组细胞未给予任何处理或加入培养液, 分离纯化上述两组细胞外泌体, 采用 microRNA 测序技术筛选差异表达 microRNA, 通过 miRanda 算法分析差异表达 microRNA 靶基因, 并行 KEGG pathway 分析。 **结果** 与对照组比较, 肥大心肌细胞来源外泌体有 14 个差异表达 microRNA, 其中 13 个 microRNA 上调 (包括 mmu-miR-2137、mmu-miR-5126、mmu-miR-690 和 10 个新发现的 microRNA), 1 个 microRNA 下调 ($P < 0.05$)。通过 miRanda 算法得到差异表达 microRNA 的靶基因 54 条, 采用排序前 20 的靶标基因及其相关 microRNA 构建局部网络图。经 KEGG 通路分析发现, 差异表达 microRNA 参与了 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Wnt 信号通路等的调节。 **结论** 肥大心肌细胞来源外泌体 microRNA 表达谱发生明显变化, 并经靶基因调节 MAPK 等多种信号通路, 进而影响心肌肥大的病理生理过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Study on the microRNA expression profiles of exosomes derived from hypertrophic cardiomyocytes and its proposed signal pathways

FENG Yue^{1,2}, QIN Lei¹, TIAN Ying-Jie^{1,2}, WANG Zhan-Li³, YU Hui³

(1. Graduate School, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014030, China; 2. School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014030, China; 3. The Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of Disease-Related Biomarkers & Institute of Molecular Medicine of Baotou Medical College & The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014030, China)

[KEY WORDS] Hypertrophic cardiomyocytes; Exosome; Differentially expressed microRNA

[ABSTRACT] **Aim** To obtain the differential microRNA expression profiles of exosomes derived from hypertrophic cardiomyocytes and normal cardiomyocytes. Further, target genes and signaling pathways were analyzed to explore the possible molecular mechanism of the differentially expressed microRNA involved in cardiac hypertrophy. **Methods** Primary culture of cardiac myocytes was prepared from three-day-old Wistar rats. The cells were then divided into two groups: model group and control group. In the model group, cardiomyocyte hypertrophy was induced by AngII (1 $\mu\text{mol/L}$), whereas the cells in the control group were not given any treatment or only added culture medium. Additionally, the exosomes were isolated, and the differentially expressed microRNA of exosomes were obtained by microRNA sequencing technique. Furthermore, target genes of differentially expressed microRNA were identified by miRanda algorithm, and KEGG pathway analysis were carried out to identify significant biological processes and key gene/protein. **Results** Compared with the control group, 14 differentially expressed microRNA of exosomes in the model group were identified. Among 14 differentially

[收稿日期] 2017-09-06

[修回日期] 2017-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81560057, 81460049)

[作者简介] 冯月, 硕士研究生, E-mail 为 245782007@qq.com。通讯作者于慧, 博士, 主任检验师, 研究方向为感染与免疫, E-mail 为 huiyu2008@hotmail.com。

expressed microRNA, 13 were up-regulated (including mmu-miR-2137, mmu-miR-5126, mmu-miR-690 and 10 were newly discovered microRNAs), and 1 were down-regulated ($P < 0.05$). In addition, 54 target genes of differentially expressed microRNAs were obtained, and then local network diagrams were constructed using the target genes of the first 20 and their related microRNA. KEGG pathway analysis indicated that the differentially expressed microRNAs was involved in the regulation of several signaling pathways, including MAPK, PI3K-Akt, and Wnt pathways. **Conclusion** The microRNA expression profiles of exosomes derived from hypertrophic cardiomyocytes changed significantly. They regulated several signaling pathways through target genes, and further affected the pathophysiological process of cardiac hypertrophy.

目前,心血管疾病严重危害人类健康,已经成为重大公共卫生问题^[1]。心肌肥大与多种心血管疾病密切相关,引起心脏功能紊乱,导致心力衰竭发生^[2]。在心肌肥大的发展进程中,心肌细胞释放的内源性物质扮演重要角色。microRNA (miRNA) 是一种长度约 18~25 个核苷酸的小分子非编码 RNA,可通过特异性地作用于靶基因调控基因表达,参与多种病理生理过程^[3]。miRNA 与多种疾病的发生发展有关。心肌细胞差异表达 miRNA 影响心肌炎症和免疫反应^[4],而且,miRNA 通过调节炎症分泌信号可影响心肌肥厚和心衰的发展进程^[5]。外泌体(exosome)是一种由多种细胞分泌的膜性小囊泡,可通过所携带的 miRNA 等物质在细胞间进行转运,以发挥其生物学功能^[6-7]。研究表明,在心血管疾病中,外泌体通过转运 miRNA 发挥重要作用^[7]。外泌体在心血管疾病领域的研究众多,但是,肥大心肌细胞来源外泌体中 miRNA 的表达特征尚未见报道,深入研究肥大心肌细胞来源外泌体中 miRNA 表达谱特征,分析差异表达 miRNA 的靶基因,探讨其靶基因的生物学功能和参与的信号通路,对于探讨心肌肥大的分子调节机制具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

磷酸盐缓冲液(PBS)、Ⅱ型胶原酶、胎牛血清、DMEM 高糖培养基(含双抗:青链霉素+链霉素)、5-溴-2-脱氧尿苷(5-BrdU)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)、Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen)、二氧化碳培养箱、37℃ 恒温水浴箱、超净工作台、恒温高速离心机等。采用 illumina Hiseq3000 测序平台的单端 50 bp 测序模式对样本进行高通量测序,由上海康显盛信息科技有限公司实验室完成。

1.2 实验动物及模型建立

健康清洁级 Wistar 小鼠,体重 100~120 g 左右,均购自内蒙古大学动物实验中心,分笼饲养,自由

进食进水。适应性饲养一段时间后,雌雄同笼,取 1~3 天龄的新生鼠进行实验。在无菌条件下,开胸取 1~3 天龄的 Wistar 新生鼠心脏,置入 PBS 冲洗残血,剪碎至 1~3 mm³ 大小,以 0.8 g/L 的Ⅱ型胶原酶消化 5 min 左右,100 mL/L 胎牛血清培养液终止消化,反复数次,直至碎片完全消化。将收集的细胞悬液用 200 目筛网过滤后,收集细胞于离心管,1000 r/min 离心 8 min,弃上清液,将细胞沉淀以培养液悬浮,悬液收集于 50 mL 培养瓶中,差速贴壁 60 min 后,吸取未贴壁细胞至新培养瓶(板)中继续培养,即为原代培养心肌细胞。为抑制参与的非心肌细胞的增殖,开始培养的 48 h 培养液中加入 5-BrdU (100 μmol/L)。细胞在 50 mL/L 的 CO₂、37℃ 条件下培养。将上述原代心肌细胞培养 48 h,换成无血清再培养 24 h 后,加入 AngⅡ (1 μmol/L) 作用 48 h 即可诱导心肌细胞肥大。未给予任何处理或加入培养液的细胞为对照组。

1.3 外泌体及外泌体中 miRNA 的分离纯化

将培养的原代心肌细胞经胰酶消化悬浮,按照 Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen) 步骤,在 4℃ 下以 2000 g/min 离心 30 min,取上清液,每 1000 μL 上清液加入 500 μL 外泌体提取液,颠倒混匀,4℃ 过夜。在 4℃ 下以 10000 g/min 离心 60 min,弃上清液,加 200 μL Buffer 重悬备用。取上述外泌体原液采用 Total Exosome RNA Isolation Kit (Invitrogen) 按步骤提取外泌体中 miRNA,做好标记,密闭-80℃ 保存。使用干冰运送至上海康显盛公司进行检测。

1.4 外泌体中 miRNA 的表达检测

采用 illumina Hiseq3000 测序平台的单端 50 bp 测序模式进行测序。原始数据需经过引物与 adaptor 序列去除,并经过对测序片段碱基的质量检验和长度筛选,最终选择质量可靠的测序片段。统计小 RNA 的种类及数量,并对小 RNA 做长度分布统计,用于帮助判断小 RNA 的种类,如 miRNA 集中在 21 或 22 nt。针对每个样本预处理后所有序列和去重复后的唯一序列,分别采用 Bowtie 软件与该物种的参考基因组、Rfam 序列数据库、RepBase 序列数据库、编码蛋白质

的 mRNA 或者 EST 序列数据库、miRBase 数据库进行比对,将 miRNA 进行注释。同时,采用 miRDeep 软件结合近缘物种同源的 miRNA 序列,进行新 miRNA 的识别与结构预测分析。

1.5 差异表达 miRNA 分析及靶基因预测和功能分析

将每个样本的 reads 与 miRNA 数据库(miRBase)和新 miRNA 预测的结果进行比对,计算 miRNA 表达量。利用 DESeq 软件将对照组与模型组进行差异表达分析,筛选差异表达 miRNA,计算每个样本的表达量和组内均值,计算组间差异 foldchange,再计算 $\log_2(\text{fold change})$,当满足 $P \text{ 值} \leq 0.05$ 且 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 2$ 时,认为在组间有显著差异。利用 miRanda 算法预测 miRNA 靶基因,将 P 值排序前 20 的 miRNA 和在网络中排序前 20 的靶标基因进行局部网络图构建。针对差异表达 miRNA,进行 KEGG 数据库中 Pathway 的功能注释和归类。利用超几何分布检验计算 P 值, $P < 0.05$ 为显著性阈值,说明得到的结果具有统计学意义。

2 结 果

2.1 肥大心肌细胞来源外泌体中差异表达的 miRNA 与对照组比较,肥大心肌细胞来源外泌体有 14

个差异表达 miRNA,其中 13 个 miRNA 表达上调(包括 mmu-miR-2137、mmu-miR-5126、mmu-miR-690 和 10 个新发现的 miRNA),仅 mmu-miR-574-5p 表达下调($P < 0.05$;表 1 和图 1)。

表 1. 肥大心肌细胞来源外泌体中差异表达的 miRNA
Table 1. Differentially expressed microRNA of exosome derived from hypertrophic cardiomyocytes

miRNA 名称	差异倍数	P 值	调控方向
11_5122	1.930922341	0.045530101	上调
11_5167	2.056453223	0.032980338	上调
13_5929	4.026079574	0.000437631	上调
18_7564	1.768843858	0.000130555	上调
2_1170	4.304380736	1.01E-05	上调
4_1719	3.115346912	0.00196597	上调
6_2583	1.790951803	0.000136021	上调
6_2785	3.963343818	0.000572411	上调
7_3003	4.700309413	0.000114044	上调
7_3339	2.160789883	0.020864322	上调
mmu-miR-2137	3.448770646	0.000314413	上调
mmu-miR-5126	1.963343818	0.046305778	上调
mmu-miR-690	2.641415724	0.033538646	上调
mmu-miR-574-5p	-3.643986495	0.030599508	下调

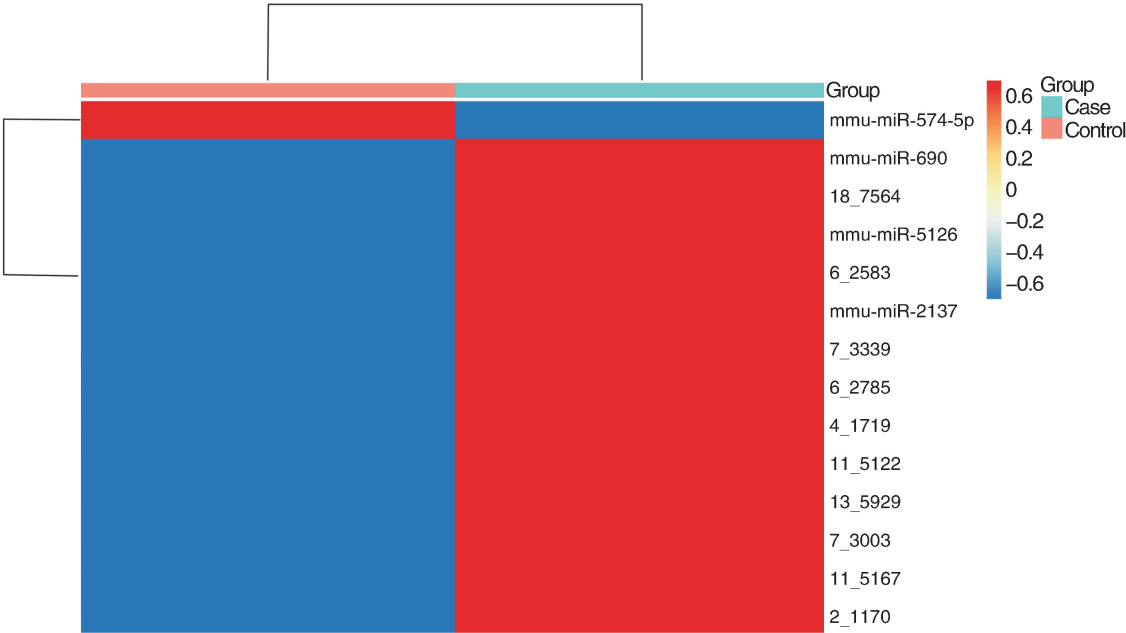


图 1. 肥大心肌细胞来源外泌体中差异表达的 miRNA
Figure 1. Differentially expressed microRNA of exosome derived from hypertrophic cardiomyocytes

2.2 差异表达的 miRNA 靶基因

通过 miRanda 算法得到差异表达 miRNA 靶基因 54 条,例如,表达上调的 mmu-miR-5126 的靶基因有

Dhrs13os [dehydrogenase/reductase (SDR family) member 13, opposite strand]、Coro2b (coronin, actin binding protein, 2B)、Gm7628(predicted gene 7628)和

Slc22a15(solute carrier family 22,member 15)等,mmu-miR-690 的靶基因有 Mkn1 (muskelin 1)、Tenm4 (teneurin transmembrane protein 4)、Mrpl48(mitochondrial ribosomal protein L48)和 Homer2(homer homolog 2)等,而 11_5122 和 11_5167 共同调控 Stx1b[TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA pol-

ymerase I, C]、St6galnac2(RIKEN cDNA 4931428F04 gene)等靶基因;表达下调的 mmu-miR-574-5p 的靶基因有 Zbrb20 (NA)、Vtila (mcf. 2 transforming sequence)、Fycol (insulin-like growth factor binding protein 5)等。进一步将排序前 20 的靶基因及其相关 miRNA 构建局部网络图(图 2)。

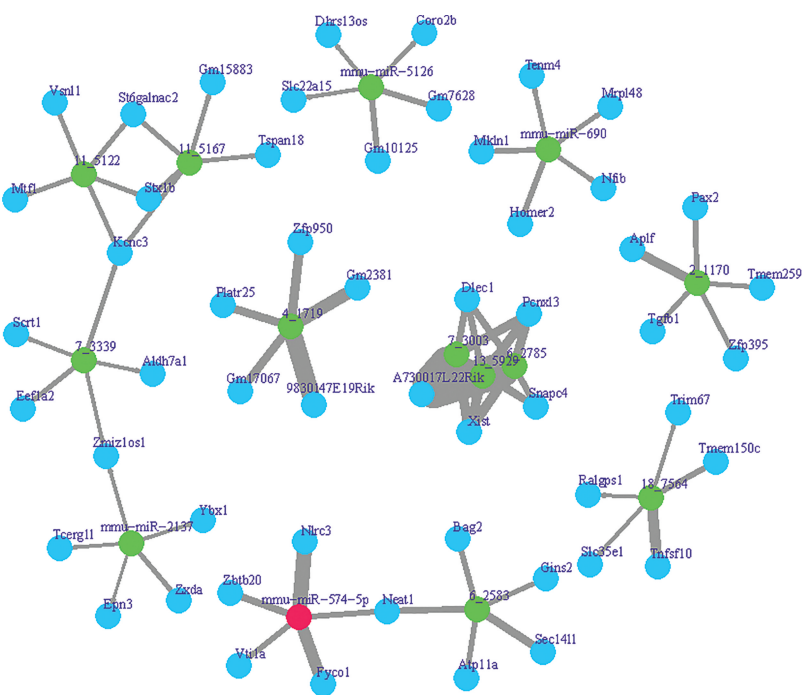


图 2. 差异表达的 miRNA 靶基因局部网络图 红色为下调的 miRNA 基因,绿色为上调的 miRNA 基因,蓝色是被 miRNA 靶向调控的基因。
Figure 2. Differentially expressed microRNA target prediction netgraph

2.3 靶基因 KEGG pathway 分析

KEGG pathway 功能分析是针对全基因/转录本和差异基因/转录本进行 KEGG 数据库中 Pathway 的功能注释和归类。KEGG pathway 功能分析结果显示,肥大心肌细胞来源外泌体中差异表达的 miRNA 靶基因参与调节的信号通路主要有 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Wnt 信号通路、Hippo 信号通路和 ErbB 信号通路等(表 2)。

表 2. microRNA 靶基因参与心肌肥大相关的主要信号通路
Table 2. microRNA target genes are involved in the major signaling pathways of cardiac hypertrophy

序号	名称	富集倍数	P 值
mmu04151	PI3K-Akt 信号通路	1.329464024	1.92E-10
mmu04010	MAPK 信号通路	1.413709574	1.09E-11
mmu04310	Wnt 信号通路	1.486837035	1.28E-09
mmu04390	Hippo 信号通路	1.454309749	1.13E-08
mmu04012	ErbB 信号通路	1.735264665	3.91E-12

3 讨 论

心肌肥大是多种心血管疾病的共同病理过程,严重影响心脏功能,长期的病理性心肌肥大可导致心力衰竭、猝死。近年来,外泌体在疾病方面的研究得到人们越来越多的关注。外泌体由细胞分泌,携带 miRNA 等多种信号物质,介导细胞间通讯,进而参与调节细胞功能。miRNA 是机体重要的内源性物质,与心血管等多种疾病的发生发展密切相关^[8-10]。研究表明,外泌体通过转运 miRNA,在心血管疾病中同样发挥重要调节作用,因此,探讨肥大心肌细胞来源外泌体中 miRNA 表达特征及其介导的信号通路,对于心肌肥大的防治具有一定的意义。

本研究使用 Ang II 建立肥大心肌细胞模型,并对肥大心肌细胞来源外泌体中 miRNA 表达谱进行分析,筛选出差异表达的 miRNA 共 14 个,其中 mmu-miR-2137、mmu-miR-5126、mmu-miR-690 等 13 个 miRNA 表达上调,仅 mmu-miR-574-5p 表达下调,

提示这些差异表达 miRNA 可能参与了心肌肥大的病理生理过程。

为了进一步探讨差异表达 miRNA 调节心肌肥大的分子机制,采用 miRanda 算法得到差异表达 miRNA 的靶基因,将排序前 20 的靶基因及其相关 miRNA 构建局部网络图。靶基因的功能分析结果提示,差异表达 miRNA 的靶基因主要参与心肌肥大发生发展相关的信号通路。例如,MAPK 信号通路可调节心肌细胞增殖分化、炎症反应等病理生理过程,在心肌肥大的发生以及转化为心功能衰竭的过程中作用关键^[11];ErbB 信号通路参与心肌细胞增殖,对维持心肌细胞结构和功能具有重要作用^[12];PI3K/Akt 信号通路与冠状动脉内皮细胞的生物学活性有关,抑制该信号通路可影响内皮细胞损伤和炎症反应^[13-14];Wnt 信号通路在心肌肥大发生时被激活,抑制该信号通路可防止病理性心肌肥大^[15-16];同样,Hippo 信号通路影响细胞增殖、凋亡和器官生长,也在心肌细胞肥大调节方面发挥作用^[17]。

综上所述,本文采用 miRNA 测序技术和生物信息学分析发现,肥大心肌细胞来源外泌体 miRNA 表达谱发生明显改变,这些差异表达的 miRNA 经靶基因调节 MAPK、ErbB、PI3K-Akt、Wnt、Hippo 等信号通路,进而影响心肌肥大的病理生理过程。上述研究结果为探讨肥大心肌细胞来源外泌体调节心肌肥大的分子机制提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Yan RH, Li W, Yin L, et al. Cardiovascular diseases and risk-factor burden in urban and rural communities in high-, middle-, and low-income regions of China: a large community-based epidemiological study[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(2): e004 445.
- [2] Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(1): 38-48.
- [3] Nouraei N, Mowla SJ. miRNA therapeutics in cardiovascular diseases: promises and problems[J]. Front Genet, 2015, 30(6): 232.
- [4] Schroein B, Heymans S. Small but smart-microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(4): 605-613.
- [5] Heymans S, Corsten MF, Verheesen W, et al. Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure[J]. Circulation, 2013, 128(13): 1 420-143.
- [6] Keller S, Ridinger J, Pupp AK, et al. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics [J]. J Transl Med, 2011, 8(9): 86-90.
- [7] Fleury A, Martinez MC, Le Lay S. Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases [J]. Front Immunol, 2014, 4(5): 370-378.
- [8] Olivier H, Jacob AH, Laetitia P, et al. Identification and characterization of microRNA differentially expressed in macrophages exposed to porphyromonas gingivalis infection[J]. Infect Immun, 2017, 85(3). pii: e00771-16.
- [9] Zhou JQ, Shao GF, Chen XL, et al. miRNA 206 and miRNA 574-5p are highly expression in coronary artery disease[J]. Biosci Rep, 2016, 36(1): e00295.
- [10] Zhou LY, Zang GY, Zhang GF, et al. MicroRNA and mRNA signatures in ischemia reperfusion injury in heart transplantation[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79 805.
- [11] 方 健, 刘培庆. MAPK 信号通路在心肌肥大中的作用[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2006, (S1): 238-240.
- [12] Gui C, Zhu LG, Hu M, et al. Neuregulin-1/Erb B signaling is impaired in the rat model of diabetic cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Pathol, 2012, 21(5): 414-420.
- [13] Xia T, Guan W, Fu J, et al. Tirofiban induces vasorelaxation of the coronary artery via an endothelium-dependent NO-cGMP signaling by activating the PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 474(3): 599-605.
- [14] Li JB, Wang HY, Yao Y, et al. Overexpression of microRNA-138 alleviates human coronary artery endothelial cell injury and inflammatory response by inhibiting the PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(8): 1 482-491.
- [15] Kristin D, Mona A, Stanley N. Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential[J]. J Physiol, 2013, 591(Pt 6): 1 409-432.
- [16] Feng J, Chen HW, Pi LJ, et al. Protective effect of tanshinone IIA against cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats through inhibiting the Cys-C/Wnt signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 10 161-170.
- [17] Lin ZQ, Pu WT. Harnessing Hippo in the heart: Hippo/YAP1 signaling and applications to heart regeneration and rejuvenation[J]. Stem Cell Res, 2014, 13(3): 571-581.

(此文编辑 许雪梅)