

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.06.01

❖ 论著 ❖

LEF1 介导的 microRNA-26b 抑制 H9C2 心肌细胞肥大机制研究

唐春梅^{1,2}, 赵海霞^{1,2}, 随何欢^{1,2}, 梁婧^{1,2}, 朱丽莎^{1,2}, 苏强^{1,2}

(1. 川北医学院第二临床学院·南充市中心医院药学部; 2. 个体化药物治疗南充市重点实验室, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 探讨 microRNA-26b(miR-26b)调控 H9C2 心肌细胞肥大的作用靶基因及其分子机制。**方法:** 传代培养 H9C2 心肌细胞, 分别转染 miR-26b 模拟物(miR-26b mimic)和淋巴样增强因子 1(LEF1) siRNA (si-LEF1), 以增加 H9C2 心肌细胞中 miR-26b 水平或抑制 LEF1 的表达水平。采用 FITC-鬼笔环肽染色检测 H9C2 心肌细胞表面积, 双荧光素酶报告基因实验鉴定 miR-26b 与潜在靶基因 LEF1 3'端非翻译区(3'UTR)的结合作用。RT-qPCR 和 Western blot 法分别检测 miR-26b、LEF1 及心肌细胞肥大相关基因表达。**结果:** 过表达 miR-26b 可明显增加 H9C2 心肌细胞中肥厚相关基因 ANP, β -MHC 的表达水平, 缩小 H9C2 心肌细胞表面积; 双荧光素酶报告基因实验结果提示 miR-26b 与 LEF1 3'UTR 具有相互结合作用, miR-26b 在转录水平抑制 LEF1 的表达; miR-26b mimic 和 si-LEF1 均能抑制 H9C2 心肌细胞肥大基因的表达。**结论:** LEF1 是 miR-26b 的作用靶基因, LEF1 参与 miR-26b 抑制 H9C2 心肌细胞肥大的作用。

【关键词】 心肌细胞肥大; MicroRNA-26b; 淋巴样增强因子 1; H9C2 心肌细胞

【中图分类号】 R542.2 **【文献标志码】** A

microRNA-26b attenuates cardiomyocyte hypertrophy through targeting LEF1 in H9C2 cell

TANG Chun-mei^{1,2}, ZHAO Hai-xia^{1,2}, SUI He-huan^{1,2}, LIANG Jing^{1,2}, ZHU Li-sha^{1,2}, SU Qiang^{1,2}

(1. Department of Pharmacy, Nanchong Central Hospital, Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College; 2. Nanchong Key Laboratory of Individualized Drug Therapy, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the potential target gene and molecular mechanisms of microRNA-26b (miR-26b) in H9C2 cardiomyocyte hypertrophy. **Methods:** miR-26b mimic and Lymphoid Enhancer Factor 1 (LEF1) siRNA (si-LEF1) were transfected into H9C2 cell to elevate the level of miR-26b and inhibit LEF1 expression, respectively. H9C2 cell were stained with FITC-phalloidin solution to demonstrate the size of cardiomyocytes. The interaction between miR-26b and the 3'UTR of Lymphoid Enhancer Factor 1 (LEF1) was verified by Dual luciferase reporter assay. The expression of miR-26b, LEF1 and hypertrophy-related genes at miRNA and protein levels were determined by RT-qPCR and Western blotting assay, respectively. **Results:** Overexpression of miR-26b could significantly decrease the expression of cardiac hypertrophy-related genes atrial natriuretic peptide (ANP) and β -myosin heavy chain (β -MHC) in H9C2 cell. Overexpression of miR-26b could effectively inhibit the hypertrophic phenotype of H9C2 cardiomyocytes. Dual-luciferase reporter Assay results verified that miR-26b could interact with the 3'UTR of LEF1, miR-26b could inhibit the expression of LEF1 at the transcriptional level. Moreover, both miR-26b mimic and si-LEF1 could reduce the expression of hypertrophic genes in H9C2 cardiomyocytes. **Conclusion:** LEF1 is the target gene of miR-26b and it plays a role on the inhibition of miR-26b to H9C2 cardiomyocyte hypertrophy.

【Key words】 Cardiomyocyte hypertrophy; MicroRNA-26b; LEF1; H9C2 cell

心肌肥大是一种以心肌细胞增大而不增加心肌细胞数量为特征的心肌重构形式。病理性的心肌肥厚会导致心力衰竭乃至死亡^[1]。microRNAs (miRNAs) 是一类长度为 20 ~ 22 个核苷酸的小非编码 RNA, 通过与靶基因 mRNA 的不完全碱基配对, 调控多达 60% 的蛋白编码基因^[2]。众所周知, miR-

NA 通过靶向肥厚相关基因及信号通路参与心肌肥厚过程, 因此, miRNAs 在心肌肥厚的预测和治疗中具有一定的应用前景^[1]。Kaneto 等^[3]证实了在左心室肥厚的高血压患者血清中 miR-26b-5p 均显著高于正常人, 表明 miR-26b-5p 可能在高血压左心室肥厚的发病机制中发挥作用, 并可能成为这种疾病新

基金项目: 四川省基层卫生事业发展研究课题(SWFZ18-Z-10); 南充市市校科技战略合作项目(18SXHZ0230); 川北医学院科研发展计划项目(CBY17-A-2D12)

作者简介: 唐春梅(1990-), 女, 硕士, 主管药师。E-mail: 2314581163@qq.com

通讯作者: 苏强。E-mail: 187169442@qq.com

的生物标志物。体外细胞实验^[4]表明 miR-26b 可抑制心肌细胞肥大; miR-26b 在小鼠心肌肥厚模型的心肌中明显下调, 过表达 miR-26b 可降低细胞自噬基因 Beclin-1 的表达和自噬标志物 LC3-II/LC3-I 的比值, 抑制心肌细胞自噬反应, 进而抑制心肌细胞肥大效应^[5]。尽管目前已有研究证实 miR-26b 参与心肌肥大的过程, 但其具体分子机制仍待继续研究探索。本文旨在研究 miR-26b 调控 H9C2 心肌细胞肥大的作用靶基因及分子机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

H9C2 心肌细胞 (ATCC, USA); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Gibco, 澳大利亚); NC 基因组、miR-26b mimic、淋巴样增强因子 1 (Lymphoid Enhancer Factor 1, LEF1) siRNA (锐博, 中国广州); microRNA 逆转录试剂盒、编码基因逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex TaqII 染料法荧光定量试剂盒 (TaKaRa, JP); 心钠素 (atrial natriuretic peptide, ANP)、 β 肌凝蛋白重链 (Myosin heavy chain, β -MHC)、LEF1、GAPDH PCR 引物 (Invitrogen, USA); miR-26b、U6 PCR 引物 (锐博, 中国广州); FITC-鬼笔环肽染色试剂盒 (Sigma-Aldrich, USA); Dual-Luciferase Report 检测试剂盒 (Promega, USA); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo, USA); SDS-PAGE 凝胶试剂盒; Anti-LEF1 (碧云天, 中国), Anti-ANP、Anti- β -MHC (Abcam, UK); Anti-GAPDH、Anti-Rabbit、Anti-mouse 抗体 (Protein Technology, UK); PVDF 膜、蛋白 ECL 发光试剂盒 (Millipore, USA); 其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 大鼠心肌细胞 (H9C2 细胞) 处理

大鼠胚胎心肌细胞株 H9C2 细胞购于 ATCC, 传代稳定培养至适宜细胞密度后, 按照脂质体转染说明书分别将 100 nM negative control (NC)、miR-26b mimic 和 LEF1 siRNA (si-LEF1) 转染至 H9C2 细胞中, 以无血清培养基培养 24 h 后结束实验, 留存备用。

1.3 FITC-鬼笔环肽 (FITC-phalloidin) 染色

H9C2 细胞种在 confocal 皿中, 稳定生长后弃去培养基, 用 PBS 漂洗后加入 500 μ L 的 4% 的多聚甲醛固定 H9C2 心肌细胞 1~2 h, PBS 清洗后加入适量 2 mg/mL 的甘氨酸中和残留的多聚甲醛, 摇床孵育 2 次, 每次 5 min。confocal 皿加入 100 μ L 鬼笔环肽染料, 用 PBS 漂洗 2 次, 随后加入 Hoechst33342 反应液, 37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 40 min。将 confocal 皿倒扣于滴有 30 μ L 防荧光淬灭封片剂的载玻片上, 在倒置荧光显微镜下观察细胞轮廓。

1.4 荧光定量 PCR 检测基因表达

Trizol 试剂提取 H9C2 心肌细胞总 RNA, 进行 RNA 的干燥、溶解及浓度测定。取 1.0 μ g 总 RNA, 加入 5 \times 的逆转录试剂 4 μ L (逆转录试剂盒), 用

oligo (dT) 15 和 random primers 逆转录出 cDNA 用于检测编码基因 mRNA 水平。取 1.0 μ g 总 RNA, 用 miR-26b 特异的 RT 引物逆转录出 cDNA 用于检测 miR-26b 水平。分别用 GAPDH 和 U6 作为检测编码基因和 miR-26b 表达水平的内参照。RT-qPCR 分别检测 miR-26b 及各编码基因的表达并进行结果分析。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算编码基因和 miR-26b 的相对表达水平。本文通过 NCBI 官方网站查询相关基因的 CDS 序列, 并使用 Primer Premier 5.0 工具进行引物设计, miR-26b 及 U6 引物购于广州锐博生物技术有限公司, 所用 PCR 引物序列见图 1。

基因	序列	片段大小
ANP	F, GAGGTGCCTCCCTGGACTG	191
	R, TCTGGGCTCCAATCCTCTGA	
β -MHC	F, GACCAGATGAATGAGCACCG	203
	R, TCCTCCAGTGTGCTCTTGAG	
GAPDH	F, CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	200
	R, CCACCCTGTTGCTGTAGCC	
LEF1	F: ATCACACCCGTCACACATCC	186
	R: GGGTAGGGTGTGCTGAATCC	
miR-26b	RT, GTCGTATCCAGTGCCTGCTGGAGTCGG	76
	CAATTGCACTGGATACGACACCTATCC	
U6	F, TTCAAGTAATTCAGGATAGGT	160
	R, GTGCGTGTGCTGGAGTC	

图 1 相关基因 PCR 引物序列

1.5 Western blot 检测蛋白水平

实验结束收板细胞, 于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存或立刻置于冰上, 将细胞裂解离心获得蛋白溶液, BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白分装变性, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。变性蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 经电转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 脱脂奶粉常温封闭 1~2 h, 根据蛋白分子质量大小位置裁膜, 分别用相应的 I 抗 anti-ANP (1:1 000)、anti- β -MHC (1:1 000)、anti-LEF1 (1:1 000)、anti-GAPDH (1:5 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜后, 以对应的 II 抗 (1:5 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。ECL 发光试剂盒显影, ImageJ 软件进行结果分析。

1.6 双荧光素酶报告实验

参照既有方法^[6]构建重组萤光素酶报告质粒 pGL3-LEF1-1012-1018。将 1 μ g 重组萤光素酶报告质粒与 100 nM miR-26b 或 miR-26b-Mut 或 negative control (NC) 以及 20 ng 内参照质粒 (pRL-TK) 共转染至 HEK293 细胞中, 24 h 后结束实验, 收集处理细胞后采用 Dual-Luciferase[®] Report 检测试剂盒测定萤火虫萤光素酶 (firefly luciferase, FL) 及海肾萤光素酶 (renilla luciferase, RL) 的荧光强度, 计算两种荧光强度比值 (FL/RL) 并分析 miR-26b 与 LEF1 3'

UTR 之间的结合能力^[7]。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件,数据均采用($\bar{x} \pm s$)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(one way ANOVA),并用 Bonferroni 校正的 *t* 检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-26b 抑制 H9C2 心肌细胞肥大

传代稳定培养 H9C2 细胞,分别转染 100 nM negative control (NC)、miR-26b mimic,24 h 后结束实验收集细胞。FITC-鬼笔环肽染色结果显示,与 NC

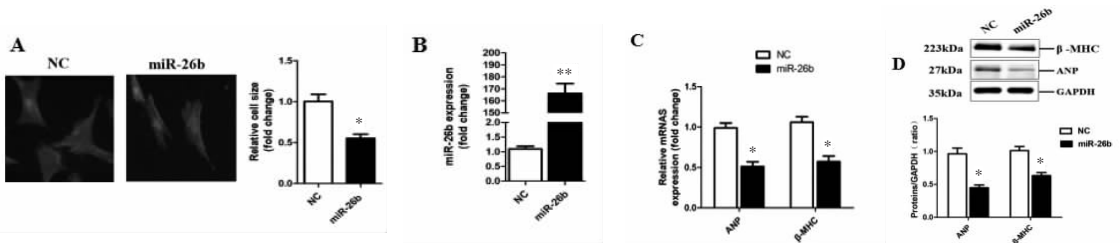


图 2 miR-26b 抑制 H9C2 心肌细胞肥大

A.FITC-鬼笔环肽染色实验检测细胞面积;B.RT-qPCR 检测 miR-26b 表达;C.RT-qPCR 检测肥大相关基因 ANP 及 β -MHC 的 mRNA 表达;D.Western blot 实验检测肥大相关基因 ANP 及 β -MHC 的蛋白表达。 $n=3$,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$,与 NC 组比较。

2.2 双荧光素酶报告基因系统鉴定 miR-26b 靶基因 LEF1

基于 TargetScan-Vert(www.targetscan.org) 基因序列分析提示,miR-26b 与 LEF1 3'UTR 的 1012-1018 碱基序列可能存在结合位点,双荧光素酶报告基因实验结果显示 miR-26b 与 LEF1 3'UTR 的 1012-1018 位点存在特异性结合,与 pGL3-promoter + NC 组相比,其荧光强度比值(FL/RL)下降 49.2%,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而 miR-26b-Mut 无法与 LEF1 3'UTR 的 10121018 碱基序列结合,荧光强度比值(FL/RL)变化无明显差异($P > 0.05$)。见图 3A。RTqPCR 实验及 Western blot 实验检测的结果显示,与 NC 对照组相比,转染 miR26b mimic 后,H9C2 细胞中 LEF1 的 mRNA 水平及蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$),见图 3B 和图 3C,以上结果证实 LEF1 是 miR-26b 的作用靶基因,miR-26b 可在转录水平抑制 LEF1 的表达。

2.3 miR-26b 及 si-LEF1 可抑制 H9C2 细胞肥大基因的表达

H9C2 细胞分别转染 miR-26b mimic 或 si-LEF1,24 h 结束实验。RT-qPCR 结果显示,与 NC 组相比,H9C2 细胞过表达 miR-26b 或抑制 LEF1 表达,LEF1 及心肌肥大相关基因 ANP、 β -MHC 的 mRNA 表达水平均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 4A;Western bolt 检测结果也显示,转染 miR-26b

对照组相比,H9C2 心肌细胞过表达 miR-26b 后,心肌细胞表面积明显减小($P < 0.05$),见图 2A。RT-qPCR 结果显示,与 NC 对照组相比,转染 miR-26b mimic 后,H9C2 心肌细胞中 miR-26b 水平显著升高($P < 0.001$),见图 2B;且过表达 miR-26b 后,H9C2 细胞中 ANP 及 β -MHC 的 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.05$),见图 2C。Western blot 检测结果显示,H9C2 细胞转染过表达 miR-26b 后,ANP 及 β -MHC 的蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),见图 2D,以上结果提示 miR-26b 可有效抑制 H9C2 心肌细胞的肥大表型及心肌细胞肥大相关基因的表达。

mimic 或 si-LEF1 后,H9C2 细胞中 LEF1 及心肌肥大相关基因 ANP、 β -MHC 的蛋白水平均显著降低($P < 0.05$),见图 4B。以上结果分别证实 miR-26b mimic 及 si-LEF1 都能降低 H9C2 心肌细胞中肥大

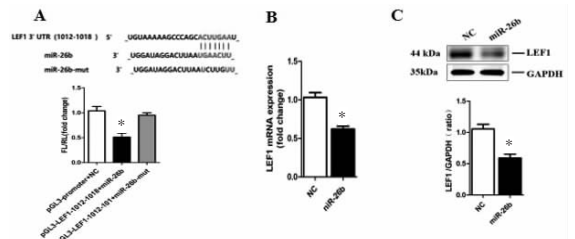


图 3 miR-26b 在转录水平调控 LEF1 表达

A.双荧光素酶报告实验验证 LEF1 是 miR-26b 的靶基因;B.RT-qPCR 检测 LEF1 的 mRNA 表达;C.Western blot 实验检测 LEF1 的蛋白表达。 $n=3$,* $P < 0.05$,与 pGL3-promoter+NC 组或 NC 组比较。

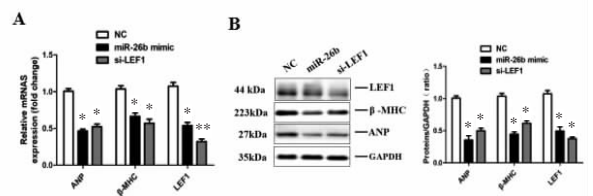


图 4 miR-26b 和 LEF1 siRNA 均能抑制 H9C2 心肌细胞中肥大相关基因表达

A.RT-qPCR 检测 ANP 及 β -MHC 的 mRNA 表达;B.Western blot 实验检测 ANP、 β -MHC 及 LEF1 的蛋白表达。 $n=3$,* $P < 0.05$,** $P < 0.001$,与 NC 组比较。

相关基因的表达,进而有效抑制 H9C2 心肌细胞肥大。

3 讨论

H9C2 心肌细胞来源于胚胎 BDIX 大鼠心脏组织,广泛用于心肌重构的体外实验研究^[8]。研究^[9]表明,miR-26b 广泛参与心血管疾病的进程。在本课题以往研究中,证实 miR-26b-5p 通过靶向 Col1a2 和 CTGF,抑制纤维化相关基因的表达,进而抑制小鼠心肌纤维化。近期研究^[10]发现,在心肌梗死(MI)小鼠研究中,miR-26b 通过靶向 PTGS2 进而抑制 MAPK 通路,减轻 MI 小鼠的心肌重构。在小鼠心肌细胞实验^[11]中证实,GATA4 是 miR-26b-5p 的作用靶基因,miR-26b 能抑制小鼠心肌细胞中 GATA4 基因的表达,进而抑制心肌细胞肥大。本研究发现,在大鼠 H9C2 心肌细胞中过表达 miR-26b 可以减小心肌细胞的表面积,下调 H9C2 心肌细胞中肥大相关基因 ANP、 β -MHC 的 mRNA 及蛋白表达。因此,本实验结果提示 miR-26b 可抑制 H9C2 心肌细胞的肥大,具有心肌保护作用,与以往报道相符。

LEF1 是淋巴样增强因子(LEF)基因家族成员,LEF1 主要表达于瓣膜区的间充质细胞,TCF/LEF 家族成员通过不同的时间和空间控制直接使心脏成熟^[12]。研究^[13]表明,LEF1 参与心肌细胞肥大过程,在 Ang-II 诱导的肥大 H9c2 心肌细胞中 LEF1 表达增加,给予 si-LEF1 处理可通过抑制 IGF-IIR/ $G\alpha q$ /PKC α 通路减轻 Ang-II 诱导的心肌细胞肥大。ANF 是 B-catenin/TCF/LEF1 通路的靶基因,B-catenin/TCF/LEF1 通路可直接调节苯肾上腺素诱导的大鼠心肌细胞肥大与 ANF 转录^[14]。本研究利用 HEK293 细胞双荧光素酶报告基因实验证实 miR-26b 可与 LEF1 3'UTR 区域特异性结合,RT-qPCR 及 Western blot 实验结果证实 miR-26b 在转录水平抑制 LEF1 的 mRNA 及蛋白表达。实验发现在 miR-26b 及 siLEF1 处理 H9C2 细胞后,心肌肥大相关基因 ANP、 β -MHC 的表达显著降低,证实 miR-26b 及 si-LEF1 都能有效抑制 H9C2 心肌细胞的肥大。因此,本研究实验结果证实 LEF1 是 miR-26b 的靶基因,LEF1 参与了 miR-26b 抑制 H9C2 心肌细胞肥大的作用。

综上所述,本文通过双荧光素酶报告基因实验、靶基因表达等实验证实 LEF1 是 miR-26b 的作用靶基因;LEF1 介导了 miR-26b 发挥抑制心肌细胞肥大的作用。在后续研究中,将在动物整体水平进一步

明确 miR-26b 对 LEF1 基因的表达和心肌肥厚的调控作用,为基于 miRNAs 的心肌肥厚治疗研究提供科学依据和资料。

参考文献

- [1] Wehbe N, Nasser SA, Pintus G, et al. MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19):4714.
- [2] Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression; An overview of nuclear functions [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10):1712.
- [3] Kaneto CM, Nascimento JS, Moreira MCR, et al. MicroRNA profiling identifies miR-7-5p and miR-26b-5p as differentially expressed in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy [J]. Braz J Med Biol Res, 2017, 50(12):e6211.
- [4] Sowa N, Horie T, Kuwabara Y, et al. MicroRNA 26b encoded by the intron of small CTD phosphatase (SCP) 1 has an antagonistic effect on its host gene [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(11):3455-3465.
- [5] Yu R, Xiang Z, Zhou Y, et al. Overexpression of microRNA-26b attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through inhibition of autophagic responses [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(9):9409-9417.
- [6] Shan ZX, Lin QX, Deng CY, et al. miR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes [J]. FEBS Lett, 2010, 584(16):3592-3600.
- [7] 唐春梅, 朱杰宁, 朱文思, 等. MEF2C 介导 microRNA-214 发挥抑制心肌细胞肥大的作用 [J]. 中国病理生理杂志. 2016, 32(8):1345-1350.
- [8] Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart [J]. Experimental Cell Research, 1976, 98(2):367-381.
- [9] Tang CM, Zhang M, Huang L, et al. CircRNA_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by derepressing targets of miR-26b-5p, Col1a2 and CTGF, in cardiac fibroblasts [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):40342.
- [10] Ge ZW, Zhu XL, Wang BC, et al. MicroRNA-26b relieves inflammatory response and myocardial remodeling of mice with myocardial infarction by suppression of MAPK pathway through binding to PTGS2 [J]. Int J Cardiol, 2019, 280(1):152-159.
- [11] Li H, Xu JD, Fang XH, et al. Circular RNA circRNA_000203 aggravates cardiac hypertrophy via suppressing miR26b-5p and miR-140-3p binding to Gata4 [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(7):1323-1334.
- [12] Ye B, Li L, Xu H, et al. Opposing roles of TCF7/LEF1 and TCF7L2 in cyclin D2 and Bmp4 expression and cardiomyocyte cell cycle control during late heart development [J]. Lab Invest, 2019, 99(6):807-818.
- [13] Chin-Hu Lai, Sudhir Pandey, Cecilia Hsuan Day, et al. β -catenin/LEF1/IGF-IIR Signaling Axis Galvanizes the Angiotensin-II-induced Cardiac Hypertrophy [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17):4288.
- [14] Zhang CG, Jia ZQ, Li BH, et al. beta-Catenin/TCF/LEF1 can directly regulate phenylephrine-induced cell hypertrophy and ANF transcription in cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 90(2):258-262.

(收稿日期:2019-10-30)

学术编辑:周春阳)