

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.06.04

❖ 论著 ❖

circ_SEC23A 通过 miR-30a/Beclin-1 通路促进 Ang II 诱导的心肌细胞损伤

别自东¹, 郭富英¹, 穆彬², 李溪²

(1. 山东医学高等专科学校附属费县人民医院心内科, 山东 临沂 273400; 2. 宁夏医科大学总医院心脑血管病医院心内科, 宁夏 银川 750000)

【摘要】目的: 探讨 circ_SEC23A 通过 miR-30a/Beclin-1 在心肌细胞损伤中的作用及机制。**方法:** 通过双荧光素酶报告基因实验验证 circ_SEC23A 和 miR-30a 的结合情况, 分别将 circ_SEC23A siRNA、miR-30a mimics、circ_SEC23A siRNA 和 miR-30a inhibitors、circ_SEC23A siRNA 和 Beclin-1 过表达载体转染心肌细胞后, 使用血管紧张素 II (Ang II) 诱导心肌细胞损伤, 用荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 检测 circ_SEC23A、miR-30a 和 Beclin-1 的表达, 用 Western blot 检测 Beclin-1 和 LC3-I/II 的表达; 使用 CCK-8 法检测细胞增殖活性; 使用生化分析仪检测细胞培养上清液中乳酸脱氢酶的浓度以验证细胞损伤程度。**结果:** circ_SEC23A 能靶向结合于 miR-30a。Ang II 诱导心肌细胞损伤后, circ_SEC23A 和 Beclin-1 的表达上调, miR-30a 表达下调; 下调 circ_SEC23A 表达后, miR-30a 表达增加而 Beclin-1 表达抑制; LC3-II/LC3-I 的比值显著增加, 细胞增殖活力下降, 同时乳酸脱氢酶浓度增加。**结论:** circ_SEC23A 通过 miR-30a/Beclin-1 影响自噬, 并促使心肌细胞发生损伤。

【关键词】 心肌梗死; 心肌细胞损伤; 环状 RNA; miR-30a; Beclin-1; 自噬

【中图分类号】 R541.4 **【文献标志码】** A

circ_SEC23A promoted the injury of Ang II-induced cardiomyocytes through miR-30a/Beclin-1

BIE Zi-dong¹, GUO Fu-ying¹, MU Bin², LI Xi²

(Department of Cardiology, 1. Fei County People's Hospital, Shandong Medical College, Linyi 273400, Shandong; 2. Cardiocerebral Vascular Disease Hospital, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, Ningxia, China)

【Abstract】 Objective: To explore the mechanisms of circ_SEC23A in damaging cardiomyocytes through miR-30a/Beclin-1. **Methods:** The dual luciferase reporter gene method was used to verify the binding of circ_SEC23A and miR-30a. Firstly, the cardiomyocytes were respectively transfected with circ_SEC23A siRNA, miR-30a mimics, circ_SEC23A siRNA and miR-30a inhibitors, circ_SEC23A siRNA and Beclin-1 overexpression vector. Then, the angiotensin II (Ang II) was used to induce the damage of cardiomyocytes. Lastly, the expression of circ_SEC23A, miR-30a and Beclin-1 was detected by fluorescent quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) and the expression of Beclin-1 and LC3-I/II was assessed through western blot. Also, the cell proliferation activity was tested by CCK-8 method and the concentration of lactate dehydrogenase (LDH) in cell culture supernatant was evaluated using a biochemical analyzer to verify the degree of cell damage. **Results:** The circ_SEC23A could bind to miR-30a through a specific target site. Besides, Ang II significantly promoted the expression of circ_SEC23A and Beclin-1, while it also inhibited that of miR-30a. But after down-regulating the expression of circ_SEC23A, the expression of miR-30a increased and that of Beclin-1 decreased. Meanwhile, the ratio of LC3-II/LC3-I increased significantly, cell proliferation decreased, and the concentration of LDH increased. **Conclusion:** The circ_SEC23A affected autophagy and promoted the damage of cardiomyocytes through miR-30a/Beclin-1.

【Key words】 Myocardial infarction; Cardiomyocyte injury; circRNA; miR-30a; Beclin-1; Autophagy

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是一种缺血性心脏病, 具有高发病率与高死亡率。MI 能引起心肌损伤甚至心室重构, 严重时进展为心力衰竭,

给人类的生命健康带来极大的威胁^[1]。MI 的发生过程中涉及多种因子的参与, 其中 microRNAs (miRNAs) 是最重要的一类调控因子^[2]。本课题组前

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (2020AAC03364, 2018AAC03261); 山东省临沂市科技创新发展计划项目 (2019088); 宁夏医科大学科学研究基金资助项目 (XY2017113)

作者简介: 别自东 (1980 -), 男, 博士, 副主任医师。E-mail: 191247387@qq.com

通讯作者: 李溪。E-mail: Lilyspring80@126.com

期研究^[3]表明,在心肌细胞缺氧/复氧的过程中,miR-30a 表达显著下调,自噬关键基因 Beclin-1 和 LC3-II 的表达增加;miR-30a 的过表达抑制了 Beclin-1 和 LC3-II 的表达,从而增强心肌细胞在缺氧/复氧状态下的增殖活力,并减少凋亡。因此,miR-30a 是调控心肌细胞功能的一个重要 miRNA。另外,越来越多的研究^[4]表明,环状 RNAs (circular RNAs, circRNAs) 在 MI 等多种心血管疾病中同样发挥重要的调控功能,有可能成为临床检测的特异标志物。同时,研究^[5]发现,多数 circRNAs 能通过竞争性结合 miRNAs 而调控下游靶基因表达,进而影响机体的生物学功能。但到目前为止,关于与 miR-30a 相关的 circRNAs 的研究还未有报道。因此,本研究拟探讨与 miR-30a 相关的 circRNAs 在心肌细胞中的作用机制,为 MI 等心血管疾病的预防治疗提供靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

购自 ScienCell 研究实验室的人心肌细胞,用专用心肌细胞培养基进行培养,需加入 1% 心肌细胞生长添加物、5% 胎牛血清和 1% 双抗(青链霉素混合液)。细胞置于 37℃、含 5% CO₂ 培养箱中培养,隔天换液。用 0.1 μM 血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 诱导细胞产生损伤模型。

1.2 双荧光素酶报告基因实验

将 circ_SEC23A 的序列克隆到双荧光素酶报告载体中得到野生型载体,继续将 circ_SEC23A 序列中的 miR-30a 结合位点进行突变得到突变型载体。分别将上述载体与 miR-30a 模拟物共转染细胞,然后检测荧光素酶活性的变化。实验步骤根据 Dual Glo Luciferase Assay System 的说明书进行。

1.3 细胞转染和荧光定量 PCR 检测

将心肌细胞在 6 孔培养板中培养,当细胞生长至汇合度达 70% 时,用 Lipofectamine 2000 分别将 circ_SEC23A siRNA、miR-30a 模拟物、circ_SEC23A siRNA 和 miR-30a 抑制物、circ_SEC23A siRNA 和 Beclin-1 过表达载体转染至细胞中(转染效率均达 50% 以上),再加入 Ang II 继续培养 48 h 后,收集细胞提取总 RNA,反转录成 cDNA。利用 SYBRTM Green PCR Master Mix 进行实时定量 PCR (qRT-PCR) 检测 circ_SEC23A、miR-30a 和 Beclin-1 的表达,并用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因的相对表达水平。

1.4 细胞活力检测

将心肌细胞接种于 96 孔板中,分别转染后用 Ang II 诱导培养 48 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶

液,轻摇培养板进行混匀,放置培养箱中孵育 2 h。使用酶标仪测定 450 nm 的光吸收值,以计算细胞的增殖活力。

1.5 心肌细胞损伤检测

收集心肌细胞的培养上清液,用全自动生化分析仪检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的浓度,评估细胞的损伤程度。检测试剂购自南京建成生物工程研究所,操作步骤按相应的说明书进行。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,所有数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组差异用 *t* 检验比较。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 circ_SEC23A 靶向结合于 miR-30a

对与 miR-30a 结合的 circRNAs 进行分析筛选发现,circRNA circ_SEC23A 具有 miR-30a 的结合位点(图 1A)。进一步将 circ_SEC23A 的序列克隆进双荧光素酶报告载体,同时将潜在的 miR-30a 结合位点进行突变。将上述载体分别与 miR-30a 模拟物转染细胞,检测荧光素酶表达水平表明,circ_SEC23A 序列中的 miR-30a 结合位点未进行突变时,荧光素酶的活性显著下调;当将 miR-30a 结合位点进行突变时,荧光素酶的活性明显恢复(图 1B)。这说明,circ_SEC23A 能与 miR-30a 结合而影响荧光素酶的活性变化。

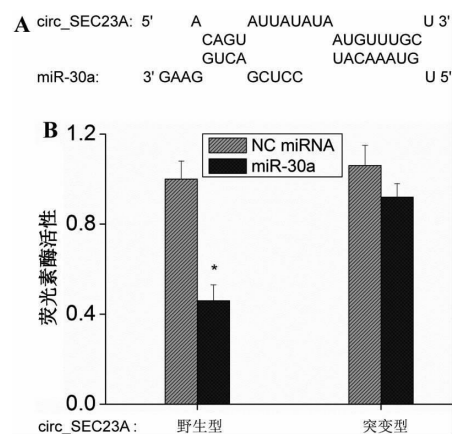


图 1 circ_SEC23A 与 miR-30a 的结合关系检测

A.circ_SEC23A 在 miR-30a 序列中的结合位点;B.克隆有野生型或突变型 circ_SEC23A 序列的载体与 miR-30a 或阴性 (NC)miRNA 共转染细胞,然后检测荧光素酶活性变化。**P* < 0.05,与 NC miRNA 相比。

2.2 circ_SEC23A 影响 miR-30a/Beclin-1 在心肌细胞中的表达

使用 Ang II 诱导心肌细胞损伤后,circ_SEC23A

的表达显著增加(图 2A)。下调 circ_SEC23A 表达后,miR-30a 表达上调(图 2B)。前期研究^[3]发现,miR-30a 的一个重要靶基因是 Beclin-1,进而继续检测 circ_SEC23A 对 Beclin-1 表达的影响。抑制 circ_SEC23A 表达或过表达 miR-30a 均能阻断 Beclin-1 表达作用(图 2C)。共转染 circ_SEC23A siRNA 和 miR-30a 抑制物或 Beclin-1 过表达载体(转染效率均达 50% 以上)后,Beclin-1 表达的作用仍然显著增强(图 2C)。因此,需上调 circ_SEC23A 表达,进而抑制 miR-30a 表达而增强下游靶基因 Beclin-1 的表达。

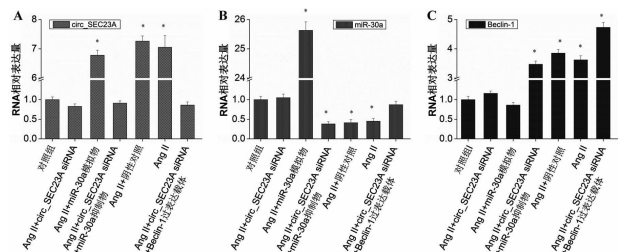


图 2 circ_SEC23A 影响 miR-30a/Beclin-1 通路在心肌细胞中的表达

Ang II 处理心肌细胞,用荧光定量 PCR 检测 circ_SEC23A(A)、miR-30a(B)和 Beclin-1(C)的表达。* $P < 0.05$,与对照组相比。

2.3 circ_SEC23A 通过 miR-30a/ Beclin-1 通路调控心肌细胞的自噬

通过 Western blot 检测 miR-30a/Beclin-1 蛋白水平对心肌细胞的自噬的影响。抑制 circ_SEC23A 表达或过表达 miR-30a 后,Beclin-1 的表达恢复到与控制组一致的水平(图 3)。共转染 circ_SEC23A siRNA 和 miR-30a 抑制物、或 circ_SEC23A siRNA 和 Beclin-1 过表达载体后,Beclin-1 的表达仍然显著升高(图 3)。Beclin-1 是自噬通路的重要调控基因,因此研究进一步检测自噬标志物 LC3-I/II 的表达。Ang II 诱导心肌细胞损伤后,LC3-II/LC3-I 的比值显著增加(图 3),表明 Ang II 能诱导心肌细胞发生自噬。抑制 circ_SEC23A 表达或过表达 miR-30a 后,LC3-II/LC3-I 的比值与对照组相比,差异无统计学意义;但共转染 circ_SEC23A siRNA 和 miR-30a 抑制物或 Beclin-1 过表达载体后,LC3-II/LC3-I 的比值与对照组相比差异仍然显著,与 Ang II 诱导组相比差异不显著(图 3)。因此,circ_SEC23A 通过 miR-30a/Beclin-1 通路诱导心肌细胞发生自噬。

2.4 circ_SEC23A 通过 miR-30a/ Beclin-1 通路调控心肌细胞的损伤

Ang II 处理的心肌细胞,细胞增殖水平下降(图 4A),同时乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的释放增加(图 4B),证实 Ang II 诱导心肌细胞发

生了损伤。抑制 circ_SEC23A 表达或过表达 miR-30a 后,细胞增殖和 LDH 释放水平均与对照组相比差异不显著;但共转染 circ_SEC23A siRNA 和 miR-30a 抑制物或 Beclin-1 过表达载体后,细胞增殖仍然显著下调,而 LDH 释放水平仍然明显增加(图 4)。因此,circ_SEC23A 可以通过 miR-30a/Beclin-1 通路诱导心肌细胞损伤发生。

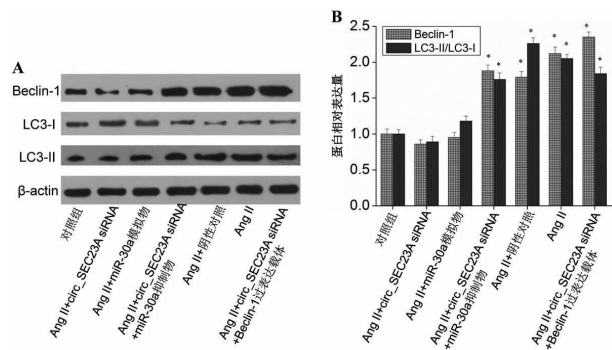


图 3 circ_SEC23A 通过 miR-30a/Beclin-1 通路调控心肌细胞自噬发生

A. 心肌细胞分别转染 circ_SEC23A siRNA,miR-30a 模拟物、circ_SEC23A siRNA+miR-30a 抑制物、阴性对照品、circ_SEC23A siRNA+Beclin-1 过表达载体后,加入 Ang II 处理,最后用 western blot 检测 Beclin-1 和 LC3-I/II 的表达;B. 定量分析蛋白表达水平。* $P < 0.05$,与对照组相比。

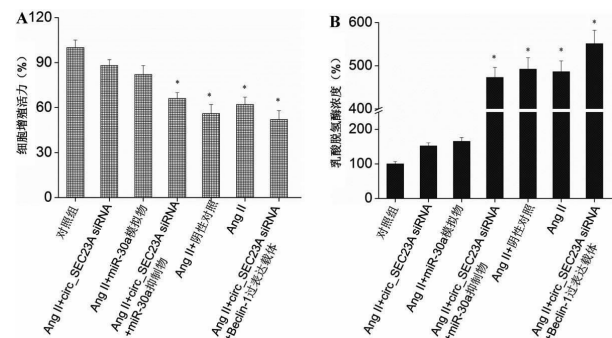


图 4 circ_SEC23A 通过 miR-30a/Beclin-1 通路调控心肌细胞损伤发生

心肌细胞分别转染 circ_SEC23A siRNA,miR-30a 模拟物、circ_SEC23A siRNA+miR-30a 抑制物、阴性对照品、circ_SEC23A siRNA+Beclin-1 过表达载体后,加入 Ang II 处理,然后检测细胞增殖(A)和 LDH 释放水平(B)。* $P < 0.05$,与对照组相比。

3 讨论

心肌损伤是 MI 等多种心血管疾病的重要病理基础,如何减少心肌损伤和心室重构的发生是 MI 治疗的重要手段^[6]。研究探讨心肌损伤发生的分子机制,将会为 MI 等治疗提供有效靶点和理论支持。

近年来,不少的研究^[7-8]发现 circRNAs 积极参与了 MI 等多种心血管疾病的发病起源及进展,关

于 circRNAs 在心血管疾病中的作用已有一定的研究进展,表明 circRNAs 可成为治疗靶点和临床检测的标志物。例如, Schulte 等^[9]对人心脏组织中 158 个 circRNAs 进行筛选表明,其中 12 个 circRNAs 是具有心脏起源的潜在生物标记物。本研究则发现, Ang II 诱导心肌细胞损伤时, circ_SEC23A 的表达显著上调,若下调 circ_SEC23A 表达,则可阻断细胞增殖和减少 LDH 释放。因此, circ_SEC23A 是一个心肌细胞损伤密切相关的 circRNAs。Garikipati 等^[10]对缺血性心脏病患者的心脏组织的检测则表明, circFndc3b 表达显著下调,用腺相关病毒 9 将 circFndc3b 导入 MI 小鼠后, circFndc3b 过表达可减少心肌细胞凋亡,增强血管新生,改善左心室功能,从而认为 circFndc3b 表达的调节可能是促进心肌梗死后心功能和重塑的一种潜在策略。因此,在 MI 过程中, circ_SEC23A 等多种 circRNAs 发挥调控心肌功能的作用。

对 circ_SEC23A 作用机制的研究发现, circ_SEC23A 能吸附 miR-30a 而抑制 miR-30a 的表达。这表明,在心肌细胞中, circ_SEC23A 与 miR-30a 作用相反, circ_SEC23A 能通过调控 miR-30a 而发挥作用。其他研究也有类似的发现,表明一些关键 circRNAs 能通过相关 miRNAs 而发挥作用。Cai 等^[11]发现缺血心肌和缺氧损伤心肌细胞中 circ-Ttc3 表达明显上调,心肌细胞中 circ-Ttc3 过表达能吸附内源性 miR-15b-5p 而抑制其活性,导致下游靶基因 Arl2 表达增加,从而抵抗缺氧诱导的凋亡死亡,在心肌梗死过程中发挥心脏保护作用。人心肌细胞进行氧糖剥夺 (oxygen-glucose-deprivation, OGD) 时, circ_0010729 表达显著增加,其过表达能负调控 miR-145-5p 的表达,进而抑制细胞的生长和迁移而加重 OGD 诱导的损伤^[12]。 hsa_circ_0007623 能与 miR-297 结合,促进急性心肌缺血后心脏修复,保护心功能^[13]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 处理可降低 H9c2 细胞的活力,增加细胞凋亡和炎症损伤;下调 circANKRD36 表达能通过 p38MAPK/NF-κB 途径和上调 miR-138 表达而在 LPS 作用过程中发挥抗凋亡和抗炎作用^[14]。因此,不少 circRNAs 均通过与相关 miRNAs 相互作用而在心肌细胞中发挥功能。

miR-30a 在多种心血管疾病中发挥重要作用^[15]。例如,有研究^[16]表明, miR-30a 在心力衰竭患者的心肌中表达显著下调,而在正常人心脏的心肌中高表达。心肌细胞缺氧再灌注时, miR-30a 表达明显下调,其表达升高能促进细胞存活而减少缺血再灌注损伤^[17]。因此, miR-30a 是一个具有心肌

保护作用的重要 miRNA。已有研究发现, miR-30a 的一个重要靶基因是 Beclin-1,进而调控细胞自噬而发挥作用^[3]。Yin 等^[18]也发现,抑制 miR-30a 表达能显著诱导心肌肥厚标志物的表达和激活自噬。而本研究进一步证明, circ_SEC23A 通过吸附 miR-30a 而促进 Beclin-1 表达,从而增强细胞自噬和促进损伤;抑制 circ_SEC23A 表达能显著减少 Ang II 诱导的细胞自噬和细胞损伤发生。因此, circ_SEC23A 能通过 miR-30a/Beclin-1 通路诱导心肌细胞发生自噬而促进损伤。Huang 等^[19]研究也表明, Ang II 下调 miR-30a 表达而诱导心肌细胞自噬,进而促进心肌损伤。Zhou 等^[20]发现了一种自噬相关的 circRNA-ACR,其能通过靶向 Pink1 介导的 FAM65B 磷酸化而抑制心肌细胞自噬和细胞死亡,保护心脏免受缺血/再灌注 (I/R) 损伤,并减少心肌梗死面积。长链非编码 RNA AK139128 在心肌缺血再灌注损伤组织和心肌细胞中表达明显上调,其基因敲除显著减轻心肌细胞自噬和凋亡。因此,自噬是心肌细胞的一种重要生理现象,能调控细胞的生物学功能。 circ_SEC23A 调控 miR-30a/Beclin-1/自噬通路的进行,表明其确实具有在心肌细胞中的重要地位。

综合上述, circ_SEC23A 通过 miR-30a/Beclin-1 通路在 Ang II 诱导的心肌细胞损伤中发挥作用,表明此通路是心肌细胞功能发挥的一个重要通路,可为 MI 等心肌疾病的治疗提供靶点。

参考文献

- [1] 肖秋玉. 心肌梗死后心力衰竭的防治进展[J]. 心血管病防治知识, 2020, 10(3): 94-96.
- [2] 曹润峰, 沈立. miRNA 在心肌梗死中的作用及其机制研究进展[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2019, 9(6): 363-368.
- [3] Wang JJ, Bie ZD, Sun CF. Long noncoding RNA AK088388 regulates autophagy through miR-30a to affect cardiomyocyte injury[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 10155-10163.
- [4] Altesha MA, Ni T, Khan A, et al. Circular RNA in cardiovascular disease[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 5588-5600.
- [5] Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circRNAs[J]. EMBO J, 2019, 38(16): e100836.
- [6] Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction[M]. Compr Physiol, 2015, 5(4): 1841-1875.
- [7] 李根, 柴璐, 蒋雅楠. 环状 RNA: 心脏疾病治疗的新靶点[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(11): 891-895.
- [8] 刘人可, 曾研, 彭道泉. 环状 RNA 对心血管疾病的影响[J]. 中国心血管杂志, 2019, 24(1): 94-97.
- [9] Schulte C, Barwari T, Joshi A, et al. Comparative Analysis of Circulating Noncoding RNAs Versus Protein Biomarkers in the Detection of Myocardial Injury[J]. Circ Res, 2019, 125(3): 328-340.

(下转第 976 页)