

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01161

## miR-1 在心肌细胞生长中的调节作用

许旭东, 宋晓伟, 秦永文\*

第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 构建并鉴定 microRNA-1(miR-1) 的腺病毒表达载体, 并探讨其在心肌肥厚中的介导作用。 **方法** PCR 扩增含大鼠 miR-1 前体的 DNA 片段, 并将其克隆到腺病毒穿梭质粒 pAdTrack。pAdTrack 经 *Pme* I 酶切线性化后与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在 BJ5183 菌中进行同源重组。重组质粒 pAd-precursor-miR-1 线性化后, 转染 293A 细胞, 进行病毒包装, 得到重组腺病毒颗粒 Ad-miR-1。Ad-miR-1 与 Ad-GFP 病毒转染培养的乳鼠心肌细胞, 通过实时荧光定量 PCR 方法检测 miR-1 的表达效率, 并分析心肌细胞表面积及肥厚标志物 ANP(Nppa)、 $\beta$ -MHC(myh7) 的基因表达变化。 **结果** 基因测序及酶切鉴定证实重组 Ad-precursor-miR-1 腺病毒载体构建成功, 腺病毒 Ad-miR-1 转染心肌细胞后, 实时荧光定量 PCR 方法证实腺病毒 Ad-miR-1 能够显著提高心肌细胞内 miR-1 的表达水平, 减小心肌细胞表面积及 Nppa、myh7 的表达。 **结论** 利用同源重组方法构建的 miR-1 腺病毒能够提高心肌细胞内 miR-1 的表达, 抑制心肌细胞生长。

**[关键词]** 心肌细胞; 腺病毒; microRNAs; miR-1

**[中图分类号]** R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1161-04

### Role of miR-1 in regulating cardiomyocyte growth

XU Xu-dong, SONG Xiao-wei, QIN Yong-wen\*

Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To construct and identify miR-1 adenovirus vector, and to analyze its effect on cardiac hypertrophy. **Methods** The primers of miR-1 precursor were designed for PCR amplification, and the PCR products were cloned into adenovirus shuttle plasmid pAdTrack and linearized by enzyme *Pme* I; the resultant plasmid was co-transfected into *E. coli* BJ5183 cells with adenovirus backbone plasmid pAdEasy-1 for homologous recombination. Then the recombinant plasmid was identified, linearized and packaged into QBI-293A cells to amplify the recombinant adenovirus Ad-miR-1, which was then used to infect cardiomyocytes. Real-time quantitative PCR was used to observe the expression of miR-1 and two hypertrophic markers, the atrial natriuretic peptide (Nppa) and  $\beta$ -myosin heavy chain (myh7), in cultured primary cardiomyocytes. Cell surface area was analyzed using software AxioVision 4.7.1 (Carl Zeiss). **Results** Sequencing and enzyme digestion showed that the miR-1 recombinant plasmid was successfully constructed. Real-time quantitative PCR confirmed that adenovirus Ad-miR-1 significantly enhanced intracellular miR-1 expression in cardiomyocytes and reduced cell surface area and the expression of Nppa and myh7. **Conclusion** The adenovirus expressing miR-1 has been successfully constructed and it can be transfected into cardiomyocytes to increase the expression of miR-1, thus inhibiting cardiomyocyte growth.

**[Key words]** cardiomyocyte; adenovirus; microRNAs; miR-1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(11):1161-1164]

microRNAs(miRNAs)是一类具有转录后调节活性的小分子 RNA<sup>[1]</sup>, 其与其他分子一起形成 RNA 诱导的沉默复合体(RISC), RISC 通过与靶 mRNA 的 3'端非编码区相互作用, 引起翻译过程的抑制或 mRNA 的降解, 从而在转录后水平负性调节蛋白表达, 调控许多重要的细胞活动和病理生理过程<sup>[2-4]</sup>。

最近研究表明, miRNAs 参与了很多心血管系统疾

病的发生过程<sup>[5-10]</sup>。本研究探讨心肌高丰度的 miRNAs<sup>[11]</sup>——microRNA-1(miR-1)过表达腺病毒的构建方法, 同时对重组腺病毒的表达效率进行检测, 并分析 miR-1 对心肌细胞表面积及肥厚标志物的影响。

### 1 材料和方法

1.1 主要材料 新生 2 d SD 乳鼠购自上海碧凯公

**[收稿日期]** 2010-06-01 **[接受日期]** 2010-09-29

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30828006)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30828006)。

**[作者简介]** 许旭东, 博士生。E-mail: excardio@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81874703, E-mail: QYW2009@163.com

司;Real-time PCR mix 购自 Toyobo 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;pMD18T 载体系统购自 TaKaRa 公司;三氯甲烷、异丙醇、乙醇购自国药集团;5-溴-2-脱氧尿苷购自 Sigma 公司;胰蛋白酶购自 Amresco 公司;高糖型 DMEM 干粉购自 Gibco 公司;限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I 购自 NEB 公司。

1.2 miR-1 过表达腺病毒载体的构建 既往研究表明,miR-1 能够抑制成肌细胞增殖<sup>[2]</sup>,提示 miR-1 可能参与心肌细胞的生长过程。文献<sup>[12]</sup>报道显示质粒重组后,经 *Pac* I 酶切,应出现 30 kb 和 4.5 kb 两条带,未重组质粒不会出现 30 kb 条带。首先将 miR-1 前体所在的基因组序列经 PCR 扩增,然后克隆至穿梭载体 pAdTrack,将其线性化后转化 BJ5183 感受态菌,以获得重组质粒。重组质粒经酶切线性化后转染 293A 细胞,在 293A 细胞中进行病毒包装,获得第一代腺病毒。按 10 MOI 滴度,多次转染 293A 细胞,获得较高滴度的病毒液,经氯化铯(CsCl)密度梯度离心纯化。纯化后的病毒原液以 10 倍梯度稀释后,转染 293T 细胞,荧光显微镜下计数呈绿色荧光的细胞百分数以确定病毒滴度。

1.3 乳鼠心肌细胞培养与转染 取出生 2 d 的 SD 乳鼠,无菌条件下取心脏,D-hanks 液洗涤,去除心房后剪碎心肌,胰蛋白酶消化后收集细胞,以  $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ /ml 接种于 12 孔细胞培养板。含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养 48 h 后,再以无血清培养液培养 24 h,将腺病毒以 50 MOI 滴度转染心肌细胞,荧光显微镜下计数绿色荧光细胞的百分数,以确定转染效率。实验动物处置过程符合第二军医大学动物伦理委员会制定的相关标准。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 常规方法抽提心肌细胞总 RNA,通过颈环结构的特异性引物(5'-GGC TGC CGA CCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGG TCG GCA GCC ATA CAT AC-3')反转录 miR-1, oligo-dT 反转录 mRNA。采用 NanoDrop Spectrophotometer 测定 *D* 值: $D_{260}/D_{280}$  为 1.8~2.0,利用琼脂糖电泳检验提取 RNA 的质量。看家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照,目的基因为 miR-1、ANP(Nppa)、 $\beta$ -MHC(myh7),采用 SYBR Green(Toyobo)进行 qRT-PCR,引物序列,GAPDH F: 5'-AAC GAC CCC TTC ATT GAC CTC-3', R: 5'-CCT TGA CTG TGC CGT TGA ACT-3'; miR-1 F: 5'-CAC TCC AGC TGC TGG AAT GTA AAG AAG TAT G-3', R: 5'-TCT GAC

GAC CGT CTC GTG GAG TCG GCA ATT-3'; Nppa F: 5'-CGG AAG CTG TTG CAG CCT A-3', R: 5'-GCC CTG AGC GAG CAG ACC GA-3'; myh7 F: 5'-GAG CCT CCA GAG TTT GCT GAA GGA-3', R: 5'-TTG GCA CGG ACT GCG TCA TC-3'。反应参数:94℃变性 20 s,60℃退火 20 s,72℃延伸 20 s,3 步组成 40 个循环。目的基因和 GAPDH 产物倍数按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算。

1.5 免疫组化及细胞表面积分析 细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min,0.1% Triton X-100 做可渗透化处理后用 5%的山羊血清室温终止 1 h,与抗辅肌动蛋白抗体共孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,加入结合 Alexa Fluor 555 (分子探针)的二抗,洗涤后用荧光包埋剂包埋玻片。细胞面积用 AxioVision 4.7.1 软件分析。

1.6 生物信息学法预测 miRNAs 的靶基因 miRNAs 主要通过作为 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)的一个组成部分,识别 mRNA 的 3' 端非编码区,引起该 mRNA 降解或者翻译抑制,从而负性调节该蛋白的表达,发挥其生物学功能。

为了探讨其在心肌细胞肥大的机制,我们利用 TargetScan、Bibiserve、Pictar 等 miRNAs 靶基因预测网站和软件,对大鼠 miR-1 的潜在靶基因进行预测分析,寻找序列匹配程度高、结合自由能低、二级结构稳定、靶序列在物种间高度保守的基因进行后续验证。

1.7 统计学处理 实验组和对照组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 11.0 软件包处理,进行两样本 *t* 检验,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 miR-1 过表达腺病毒载体构建 结果如图 1 所示:L1、L2、L4、L6 得到 30 kb 和 4.5 kb 两个片段,重组成功;而 L3 和 L5 未见 30 kb 条带,为未重组质粒。293A 细胞以  $1.5 \times 10^5$ /ml 的密度接种于 60 mm 的细胞培养皿,待细胞长满培养皿的 70% 左右,采用脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导线性化的重组 pAd-miR-1 转染细胞,7~9 d 后出现细胞病变效应(CPE)的细胞达到细胞总量的 80% 以上,并出现片状葡萄串珠样。收集细胞,反复冻融 3 个循环,收取原始病毒液,命名为 Ad-miR-1。将 293A 细胞培养于培养瓶中,至约 90% 细胞融合,进行病毒冻融液转染,反复转染及冻融后,采用 CsCl 梯度离心法,纯化病毒,将病毒液按 10 倍浓度梯度稀释后,转染 293T 细胞,2 d 后观察绿色荧光细胞的百分比,确定重组腺病毒滴度约为  $3 \times 10^{10}$ 。

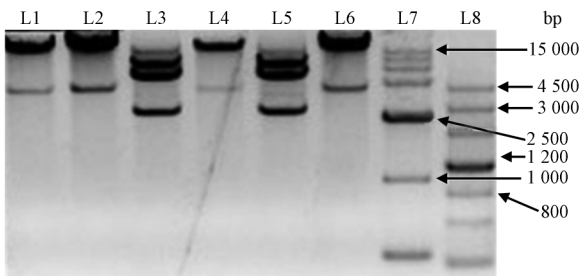


图 1 miR-1 过表达腺病毒载体构建

Fig 1 Construction of miR-1 recombinant adenovirus plasmids

L1, L2, L4, and L6 groups showed two fragments of 30 kb and 4.5 kb, suggesting that the recombinant plasmid was successfully constructed; L3 and L5 groups had no fragment of 30 kb, suggesting there was no recombinant plasmid

2.2 miR-1 过表达腺病毒载体对心肌细胞的转染效率分析 构建的 miR-1 重组腺病毒按 50 MOI 滴度转染培养的心肌细胞 48 h, 荧光显微镜下计数绿色荧光细胞的百分数, 确定转染效率。结果如图 2 所示: 重组腺病毒对培养的原代心肌细胞有较高的转染效率, 绝大多数心肌细胞可见绿色荧光蛋白。通过设计茎环结构引物, 以 GAPDH 为内参照, 采用 SYBR Green 对转染了 miR-1 腺病毒的心肌细胞中 miR-1 表达量行 qRT-PCR 检测, 在 miR-1 线性扩增的前提下, miR-1 的过表达腺病毒能提高心肌细胞中 miR-1 的表达水平 ( $P < 0.05$ )。

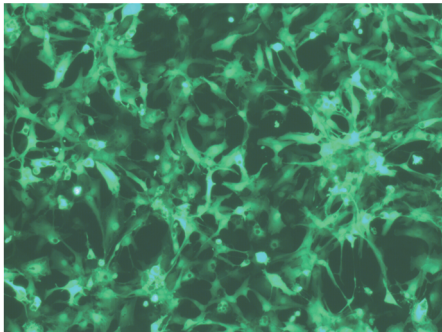


图 2 重组腺病毒在心肌细胞表达的绿色荧光蛋白

Fig 2 GFP expression in cardiomyocytes infected with recombinant adenovirus

Original magnification:  $\times 100$ 

2.3 miR-1 对心肌细胞表面积的影响 构建的 miR-1 重组腺病毒按 50 MOI 滴度转染培养的心肌细胞 48 h, 多聚甲醛固定, 抗体共孵育后用 AxioVision 4.7.1 软件分析细胞表面积的变化。结果如图 3 所示: 过表达 miR-1 后心肌细胞的表面积减少 ( $P < 0.05$ )。

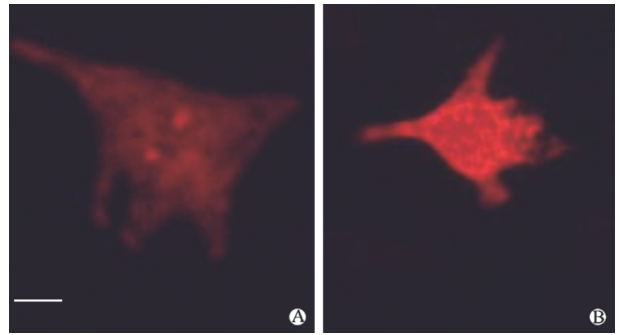


图 3 过表达 miR-1 对心肌细胞表面积的影响

Fig 3 Effects of miR-1 overexpression on surface area of cardiomyocytes

Surface area change of cardiomyocytes infected with recombinant adenovirus miR-1(B) or adenovirus vector(A) for 48 h. Scale: 10  $\mu\text{m}$

2.4 miR-1 对心肌肥厚标志物的影响 构建的 miR-1 重组腺病毒按 50 MOI 滴度转染培养的心肌细胞 48 h, TRIzol 提取总的 RNA, oligo-dT 反转录 mRNA, GAPDH 为内参照, 采用 SYBR Green 对 Nppa 和 myh7 行 qRT-PCR 检测, 结果如图 4 所示: 过表达 miR-1 能明显减少心肌细胞 ANP 及  $\beta\text{MHC}$  的基因表达量 ( $P < 0.05$ )。

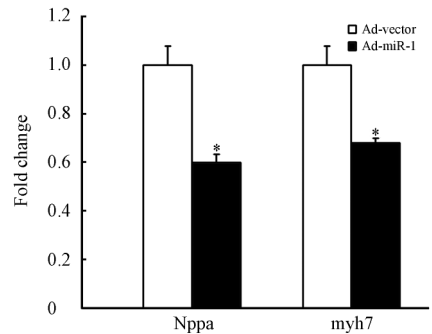


图 4 过表达 miR-1 对心肌肥厚标志物的影响

Fig 4 Effects of miR-1 overexpression on hypertrophic cardiomyocyte marker

\*  $P < 0.05$  vs Ad-vector;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ 

2.5 miR-1 作用靶基因的寻找 结果发现 Twf-1 (twinfilin-1)、RasGAP (Ras GTPase-activating protein)、Cdk9 (cyclin-dependent kinase 9)、Rheb (Ras homolog enriched in brain)、fibronectin、Mef2a、Gata4 均可能是 miR-1 的潜在靶基因。

### 3 讨论

不管在发达国家还是发展中国家, 心血管疾病都是导致人们死亡的主要原因之一。心血管疾病的发生过程涉及了许多重要基因的异常表达和信号通路的异常转导, 其中 miRNAs 是近几年新发现的一类

在转录后水平调控基因表达的新分子,调节着人类基因组大约30%的基因表达<sup>[13]</sup>。很多研究均表明,miRNAs在细胞的生长、分化及凋亡等过程中发挥着重要作用,提示miRNAs是发育及各种生理过程的重要调节因子,它的功能失调可能会导致各种疾病的发生<sup>[14]</sup>。组织特异性表达是miRNAs的一个重要特征,心脏及动脉中的miRNAs表达谱已经分析清楚<sup>[15-16]</sup>,心脏中表达量最多的是miR-1、let-7、miR-133、miR-126-3p、miR-30c及miR-26a,而动脉中表达最多的是miR-145、miR-125b、let-7、miR-125a、miR-23及miR-143。其他研究也表明miR-1在肌组织(心肌、骨骼肌)特异性表达<sup>[17]</sup>。miRNAs在不同组织的不同表达提示miRNAs在不同组织的生理功能是不一样的。为了探讨心肌高表达的miR-1可能的作用机制并寻找miR-1的生理性靶基因,本研究利用miR-1的基因组片段构建重组腺病毒,将Ad-miR-1转染培养的大鼠心肌细胞,通过荧光观察可见Ad-miR-1在50 MOI感染滴度下,转染心肌细胞24 h,即可见绿色荧光蛋白的表达,并随着时间的延续荧光强度不断增强。通过实时荧光定量PCR检测发现,在Ad-miR-1转染48 h后,miR-1的表达量明显升高,而且还发现心肌细胞表面积明显减小。心肌肥厚时胎儿期蛋白如ANP、 $\beta$ -MHC等的基因会重新表达,是心肌肥厚的标志性分子。本研究结果显示,过表达miR-1能导致ANP、 $\beta$ -MHC的基因Nppa、myh7表达量明显下降,提示miR-1在抑制心肌肥厚中起着重要的调节作用,在后续的工作中可以进一步深入研究。本实验为后续探讨miR-1在心肌肥厚中的作用及机制搭建了一定技术平台。

在miRNAs研究中,其靶基因的确定是研究其生物学功能的关键,miRNAs通过抑制或降解目标mRNA,从而抑制翻译过程来发挥作用。我们通过生物信息学分析,发现Twf-1、RasGAP、Cdk9、Rheb、fibronectin、Mef2a、Gata4均可能是miR-1的潜在靶基因。在后续的研究中,我们将利用Luciferase以及蛋白质印迹法对潜在的靶基因进行验证。

总之,本研究提示miRNAs在心脏疾病的发生发展,特别是在调控心肌细胞生长方面扮演着重要的角色。随着对于miRNAs作用机制及miRNAs和疾病之间关系的进一步深入研究,人们对于高等真核生物基因表达调控网络的理解将会提高到一个新的水平。miRNAs可能成为疾病诊治的新的生物学标志或药物靶点,可能会给人类疾病的治疗提供一种新的手段。

## [参考文献]

[1] Weber M J. New human and mouse microRNA genes found by

homology search[J]. FEBS J, 2005, 272: 59-73.

- [2] Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, Wu Q, Callis T E, Hammond S M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nat Genet, 2006, 8: 228-233.
- [3] Sayed D, Hong C, Chen I Y, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2007, 100: 416-424.
- [4] van Rooij E, Sutherland L B, Liu N, Williams A H, McAnally J, Gerard R D, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 18255-18260.
- [5] Wang K, Long B, Zhou J, Li P F. miR-9 and NFATc3 regulate myocardin in cardiac hypertrophy[J]. J Biol Chem, 2010, 285: 11903-11912.
- [6] Feng B, Chen S, George B, Feng Q, Chakrabarti S. miR133a regulates cardiomyocyte hypertrophy in diabetes [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2010, 26: 40-49.
- [7] Callis T E, Pandya K, Seok H Y, Tang R H, Tatsuguchi M, Huang Z P, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119: 2772-2786.
- [8] Voellenkle C, van Rooij J, Cappuzzello C, Greco S, Arcelli D, Di Vito L, et al. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients[J]. Physiol Genomics, 2010, 42: 420-426.
- [9] Fleissner F, Jazbutyte V, Fiedler J, Gupta S K, Yin X, Xu Q, et al. Short communication: asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism[J]. Circ Res, 2010, 107: 138-143.
- [10] Hoekstra M, van der Lans C A, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394: 792-797.
- [11] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. Nature, 2005, 436: 214-220.
- [12] He T C, Zhou S, da Costa L T, Yu J, Kinzler K W, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2509-2514.
- [13] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120: 15-20.
- [14] Alvarez-Garcia I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. Development, 2005, 132: 4653-4662.
- [15] Wienholds E, Plasterk R H. MicroRNA function in animal development[J]. FEBS Lett, 2005, 579: 5911-5922.
- [16] Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy[J]? Am J Pathol, 2007, 170: 1831-1840.
- [17] Li Q, Song X W, Zou J, Wang G K, Kremneva E, Li X Q, et al. Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy[J]. J Cell Sci, 2010, 123: 2444-2452.

[本文编辑] 贾泽军