

·基础研究·

## 肌球蛋白重链7基因来源的miR-208b-3p促进心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达

张梦珍<sup>1</sup>, 翟琳<sup>1</sup>, 郭林林<sup>1</sup>, 朱杰宁<sup>1</sup>, 李晖<sup>2</sup>, 徐金东<sup>3</sup>, 方咸宏<sup>1</sup>, 单志新<sup>1</sup>

(1. 南方医科大学附属广东省人民医院//广东省医学科学院医学研究部, 广东广州 510080; 2. 南方医科大学附属广东省人民医院//广东省医学科学院检验科, 广东广州 510080; 3. 南方医科大学附属广东省人民医院//广东省医学科学院麻醉科, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】探究肌球蛋白重链7基因来源的微小RNA-208b-3p(miR-208b-3p)对心肌成纤维细胞纤维化表型的调控作用。【方法】通过miRNA表达谱芯片分析18周龄的糖尿病db/db小鼠和db/m对照小鼠心肌中差异的miRNAs。通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-208b-3p在血管紧张素II(Ang II)和高糖/葡萄糖氧化酶(G/Go)处理的C57BL/6乳小鼠心肌细胞(NMVCs)和心肌成纤维细胞(mCFs)中的表达;利用CCK8细胞增殖实验、流式细胞术和纤维化相关蛋白(包括COL1A1、COL3A1和 $\alpha$ -SMA)表达检测来了解miR-208b-3p对mCFs纤维化表型的影响;双萤光素酶报告基因实验检测miR-208b-3p与潜在靶基因Mtf2和Pgrmc1 3'端非翻译区(3'-UTR)的结合作用;利用RT-qPCR和Western blot法分别检测miR-208b-3p转染的mCFs中Mtf2和Pgrmc1表达;通过小干扰RNA(siRNA)抑制Mtf2和Pgrmc1表达,并检测对mCFs中纤维化相关蛋白表达的作用。【结果】miRNA表达谱和RT-qPCR结果证实miR-208b-3p在糖尿病db/db小鼠心肌中表达显著升高。miR-208b-3p前体与宿主基因Myh7在db/db小鼠心肌中表达显著升高,miR-208b-3p与Myh7 mRNA在乳小鼠来源的mCFs和NMVCs中均有表达,但在NMVCs中水平更高。miR-208b-3p在Ang II和G/Go处理后的mCFs和NMVCs中表达均明显升高。miR-208b-3p可显著增加mCFs中纤维化相关蛋白COL1A1、COL3A1和 $\alpha$ -SMA表达,但不影响mCFs的增殖能力和细胞周期分布特征。双萤光素酶报告基因实验显示miR-208b-3p与Mtf2和Pgrmc1 3'-UTR有结合作用。miR-208b-3p可在转录后水平抑制mCFs中Mtf2和Pgrmc1表达。miR-208b-3p、Mtf2 siRNA和Pgrmc1 siRNA均能一致性地促进mCFs中纤维化相关蛋白表达。【结论】miR-208b-3p通过靶向Mtf2和Pgrmc1基因发挥促进mCFs中纤维化相关基因表达的作用。

**关键词:** 心肌纤维化;微小RNA;miR-208b-3p;心肌成纤维细胞

中图分类号:R363.2 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2023)04-0642-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20230421.002

## Myosin Heavy Chain 7 Gene-derived miRNA-208b-3p Enhances the Fibrosis-related Gene Expression in Cardiac Fibroblasts

ZHANG Meng-zhen<sup>1</sup>, ZHAI Lin<sup>1</sup>, GOU Lin-lin<sup>1</sup>, ZHU Jie-ning<sup>1</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, XU Jin-dong,  
FANG Xian-hong<sup>1</sup>, SHAN Zhi-xin<sup>1</sup>

(1. Medical Research Institute, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Anesthesiology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: SHAN Zhi-xin; E-mail: shanzhixin@gdph.org.cn

收稿日期:2022-12-04

基金项目:国家自然科学基金(82070254, 82200325);广州市科技计划项目(202201011627);广东省自然科学基金(2022A1515012522, 2022A1515012175, 2021A1515220122, 2021A1515111173);广东省卫健委课题(A2021002, A2022334);广东省人民医院心血管专项(2020XXG003)

作者简介:张梦珍,研究方向:心肌纤维化的分子机制,E-mail:ciwei226@126.com;单志新,通信作者,研究员,博士生导师,研究方向:非编码RNA与心肌重构,E-mail:shanzhixin@gdph.org.cn

**Abstract:**【Objective】 To investigate the effect of myosin heavy chain 7 gene-derived miRNA-208b-3p on the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts.【Methods】 miRNA chip array was performed to detect the dysregulated miRNAs in the myocardium of diabetic db/db mice and db/m control mice. Neonatal mouse ventricular cardiomyocytes (NMVCs) and cardiac fibroblasts (CFs) were isolated from C57BL/6 mice and cultured. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was conducted to determine the expression of miR-208b-3p in mouse CFs and NMVCs subjected to angiotensin II (Ang II) and high glucose plus glucose oxidase (G/Go) treatment, respectively. Cell counting kit 8 (CCK8) assay, flow cytometry and determination of fibrosis-related protein, including COL1A1, COL3A1 and  $\alpha$ -SMA, were performed in mCFs transfected with miR-208b-3p. Dual luciferase reporter assay was performed to confirm the interaction between miR-208b-3p and the 3'-UTR of metal response element binding transcription factor 2 (Mtf2) and progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1), respectively. The expressions of Mtf2 and Pgrmc1 at the mRNA and protein levels in mCFs after miR-208b-3p mimic transfection were determined using RT-qPCR and Western blot assay, respectively. The small interfering RNA (siRNA) was used to inhibit Mtf2 and Pgrmc1 expression in mCFs, and the effects of Mtf2 siRNA, Pgrmc1 siRNA and miR-208b-3p on fibrosis-related protein expression in mCFs were investigated.【Results】 Results of miRNA chip array and RT-qPCR assay showed that miR-208b-3p was up-regulated in the myocardium of the diabetic db/db mice. miR-208b precursor and the host gene of Myh7 were consistently increased in db/db mice. miR-208b-3p and Myh7 mRNA were expressed in mCFs and NMVCs, but the levels of miR-208b-3p and Myh7 mRNA in NMVCs were much higher than those in mCFs. miR-208b-3p was up-regulated in mCFs and NMVCs subjected to Ang II and G/Go treatment, respectively. miR-208b-3p could significantly enhance fibrosis-related protein, including COL1A1, COL3A1 and  $\alpha$ -SMA, in mCFs, without affecting the proliferation activity and cell cycle distribution of mCFs. Dual luciferase reporter assay revealed the interactions of miR-208b-3p with the 3'-UTR of Mtf2 and Pgrmc1. The results of RT-qPCR and Western blotting confirmed that miR-208b-3p inhibited Mtf2 and Pgrmc1 expression at the post-transcriptional level. Transfection with miR-208b-3p mimic, Mtf2 siRNA and Pgrmc1 siRNA could consistently enhance the fibrosis-related protein expression in the cardiac fibroblasts.【Conclusions】 miR-208b-3p enhances fibrosis-related gene expression by targeting Mtf2 and Pgrmc1 in mCFs.

**Key words:** cardiac fibrosis; microRNA; miR-208b-3p; cardiac fibroblast

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(4): 642-650]

糖尿病可导致多种心血管并发症,例如冠状动脉粥样硬化等,从而增加了心肌梗死的风险。糖尿病性心肌病首先是由 Rubler 提出<sup>[1]</sup>,是一种独立于冠状动脉疾病和高血压,而是由糖尿病引起的心脏左室功能障碍疾病。相对于高血压和心衰患者来说,糖尿病性心肌病患者常伴有明显的心脏舒张功能障碍,心肌间质和血管周围的纤维化是糖尿病性心肌病的主要病理特征<sup>[2]</sup>。非编码 RNA 参与调控心肌纤维化过程<sup>[3]</sup>,微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约为 19~25 个核苷酸的小的内源性非编码 RNA,可以在转录或转录后水平调控靶基因的表达<sup>[3]</sup>,来参与多种生物学过程和疾病进程<sup>[4]</sup>。本研究组证实了 miR-99b-5p 通过抑制成纤维细胞生长因子 21 表达发挥促进心肌细胞肥大的作用<sup>[5]</sup>,而细胞核内 miR-199b-5p 可特异上调 CDK9 表达并促进心肌细胞肥大的发生<sup>[6]</sup>。已有研究证实,多种 miRNAs 参与调节心肌纤维化的发生和发展进程,可能成为潜在的心肌纤维的诊断标志物或干预靶点<sup>[7-8]</sup>。多个研究表明 miRNAs 在糖尿病性心肌

病的发病中发挥非常重要<sup>[9]</sup>。有一类 miRNAs,包括 miR-208a, miR-208b 和 miR-499 分别来自于 3 个肌球蛋白重链基因 (Myh) Myh6, Myh7 和 Myh7b 的内含子区域,被称为 MyomiRs<sup>[10]</sup>。在成人心脏中,由 Myh6 基因编码的 miR-208a 是 Myh7 和 Myh7b 表达所必需的,后两者分别编码 miR-208b 和 miR-499。miR-208a 对 Myh7b 的激活是组成性的,而 Myh7 的激活也需要应激信号或甲状腺激素的缺少<sup>[10]</sup>。miR-208a<sup>[11-13]</sup> 和 miR-499<sup>[14]</sup> 参与糖尿病性心肌病发生,降低 miR-208a 和 miR-499 水平可改善糖尿病性心肌重构,但目前尚无 miR-208b 参与调控糖尿病性心肌病的报道。既往研究发现 miRNA-208b 初级转录本 (pri-miR-208b) 可与 zeste2 多梳抑制复合物 2 亚基增强子 (EZH2) 形成复合物来促进心肌肥厚相关基因的转录激活<sup>[15]</sup>。但尚无 miRNA-208b 对心肌纤维化调控作用的有关报道。本文将探讨肌球蛋白重链 7 (Myh7) 基因来源的 miR-208b-3p 在糖尿病性小鼠心肌纤维化中的表达和对心肌成纤维细胞表型的调控作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物和细胞株

18周龄的雄性 C57BLKS/J db/m 和 C57BLKS/J db/db 小鼠购自南京青紫兰生物科技公司,出生 1~3 天的 SPF 级乳小鼠(雌雄不限)均由广东中医药大学动物实验中心提供。本文的动物实验已通过广东省人民医院伦理委员会批准(批准号: KY2020-112-01)。实验用细胞株均购自美国标准菌种收藏所美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。

### 1.2 主要试剂

胰蛋白酶(0.25 % Trypsin-EDTA)(Gibco); 细胞培养基 DMEM/F12 和澳洲胎牛血清(Bio Ind); CCK8 细胞增殖检测试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、RIPA 裂解液和 NP40 裂解液(碧云天); 质粒提取试剂盒(Omega); BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo); ECL 化学发光检测试剂盒(Millipore); 逆转录试剂盒(Takara); Trizol 裂解液和转染试剂 Oligofectamine(Invitrogen); 兔抗  $\alpha$ 1- I 型胶原蛋白(Collagen Type I Alpha 1, COL1A1)抗体、兔抗金属响应元件结合转录因子 2(metal response element binding transcription factor 2, MTF2)、兔抗孕酮受体膜成分 1(progesterone receptor membrane component 1, PGRMC1)抗体和兔抗  $\beta$ -肌球蛋白重链( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\beta$ -MHC)抗体(Protein Technology); 兔抗  $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体和骨骼肌肌动蛋白  $\alpha$ 1(actin alpha 1, skeletal muscle, ACTA1)抗体(Abcam); 兔抗  $\alpha$ 1- III 型胶原蛋白(Collagen Type III Alpha 1, COL3A1)抗体(Invitrogen); si-Mtf2 和 si-Pgrmc1(广州锐博)。

### 1.3 主要方法

1.3.1 小鼠心脏 B 超检测 通过经胸超声心动图评估小鼠左心室功能变量。在用异氟烷进行短时的气体麻醉后,用 13MHz 换能器(Acuson, Mountain View, CA)对小鼠进行经胸二维(2D)引导的 M 型超超声心动图。从心脏短轴(乳头水平)测量左心室射血分数(EF)和短轴缩短率(FS),完成至少三个独立的心动周期的检测。

1.3.2 miRNA 的微阵列分析 采用 Trizol 法提取 mCFs 中总的 RNA,并进行 miRNA 表达谱分析。微阵列杂交和数据分析在 Aksonomics 公司进行。首先提取 200 ng 的心肌总 RNA,进行 Cyanine3-pCp 荧光标记。然后将标记的样品浓缩并与杂交室垫片玻片杂交。使用 Agilent 芯片扫描仪(G2565CA)扫

描阵列,使用 Agilent Feature Extraction (v10.7)软件进行图像分析,然后使用 Agilent Gene Spring 软件进行数据归一化。

1.3.3 乳小鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞的原代分离、培养和处理 将刚出生 1~3 d 内的 SPF 级别的 C57BL/6 小鼠参照我们报道的方法<sup>[16]</sup>,用医用酒精进行消毒处理,医用无菌眼科剪小心取出完整心脏,PBS 清洗后,修剪心脏周围的血管组织,转移至 50 mL 离心管,加入 10 mL 胰蛋白酶(0.1% Trypsin-EDTA),4 °C 水平震荡消化过夜。次日,加入终止消化后加入 7 mL 无血清 F12 和 70 mL 胶原酶 II,37 °C 消化 10 min,用巴氏管吹打充分后,用含有 10 % 血清浓度(10 mL 培养基中加入 1 mL 胎牛血清)的 DMEM 培养基终止消化,使用 70  $\mu$ m 滤网过滤,300 $\times$ g 离心 5min,用完全培养液重悬细胞沉淀后转移至 T75 细胞培养瓶中,置于 37°C,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中将培养 1.5~2 h 的差速贴壁。贴壁的乳小鼠心肌成纤维细胞(mCFs)长满后换液,并传代培养。将分离得到的 mCFs 培养到 P2 代后进行铺板处理。未贴壁的即为乳小鼠心肌细胞(NMVCs),将分离的 NMVCs 悬液均匀铺于预先用鼠尾胶原 I 包裹的 12 孔板,待细胞稳定生长 24 h,用 PBS 清洗细胞,更换完全培养液继续培养 24 h 后处理。

将培养的 NMVCs 和 mCFs 去血清进行细胞同步化处理,然后分别给予 10  $\mu$ mol/L 的血管紧张素 II (Ang II) 和高糖/葡萄糖氧化酶(G/Go)(含 33 mmol/L 葡萄糖和 0.8 mU 葡萄糖氧化酶)处理 24 h 来模拟糖尿病条件下 NMVCs 和 mCFs 细胞模型。

1.3.4 RT-qPCR 检测 从心肌组织或 mCFs 中提取总 RNA(Trizol 法),以 2.0  $\mu$ g 总 RNA 为模板,用 Oligo(dT)<sub>15</sub> 和 random primers 逆转录得到 cDNA,用于检测 miR-208b 前体、Myh7、Mtf2、Pgrmc1 基因 mRNA 的表达。以 Gapdh 作为检测 miR-208b 前体及其他编码基因表达的内参对照基因。取 1  $\mu$ g 总 RNA,加入 4  $\mu$ L 5 $\times$  PrimeScript RT Buffer、1  $\mu$ L RT Enzyme Mix 和 0.2  $\mu$ L 特异 miR-208b-3p RT 引物和内参照 U6 RT 引物进行 miRNA 成熟体逆转录得到 cDNA 后,以 U6 为内参照,检测 miR-208b-3p 水平。在 BIO-RAD CFXconnect(美国,realtime system)进行定量 PCR 反应和数据分析。分别以 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> 和 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算 miR-208b-3、miR-208b 前体及其他编码基因的表达水平。本文所用 PCR 引物序列见表 1。

1.3.5 Western blot 检测 细胞实验结束后,用 PBS 轻轻清洗细胞,加入少许 RIPA 裂解液(含有蛋白酶

表1 PCR引物序列  
Table 1 The sequences of the PCR primers.

Gene	The primer sequence (5'-3')	Product / bp
<i>miR-208b precursor</i>	F, TCCACACAGAGGGGACTCTT R, TGAGCATGAAGGCATAGCAC	208
<i>Myh7</i>	F, CAAGGAGCTCACCTACCAGA R, CAGCTTGTTGACCTGGGACT	200
<i>Pgrmc1</i>	F, ACGACCTTTCTGACCTCACC R, AGATATGCTCCACCGAATGC	191
<i>Mtf2</i>	F, CATTTCGGGAGAAGAAGAGG R, CTACCTGCGGCACCAAATA	200
<i>Gapdh</i>	F, CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG R, CCACCTGTTGCTGTAGCC	200
<i>miR-208b-3p</i>	RT, GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGCGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACAAACCTTT F, ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT R, GTGCGTGTCTGCGGAGTC	70
<i>U6</i>	RT, GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGCGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGAC F, GTCCGCGTGTCTGCGTTCGGCAGC R, GTGCGTGTCTGCGGAGTC	160

抑制剂),静置待其裂解充分后刮取细胞,全程保持4 °C。提前预冷离心机,对刮取的细胞裂解液进行沉淀,离心条件:4 °C,11 500 ×g,10~15 min,吸取上清,去除细胞沉淀。蛋白定量15~20 μg(用DEPC水或者RIPA裂解液补齐),加入4×SDS-PAGE loading buffer,金属浴或水浴锅中99 °C蛋白变性10 min。将SDS-PAGE凝胶电泳,转膜。根据检测的目标蛋白大小裁下PVDF膜,利用相应的特异性抗体COL1A1(1:1 500)、COL3A1(1:1 000)、α-SMA(1:1 500)、β-MHC(1:1 500)、PGRMC1(1:1 000)、MTF2(1:2 000)、ACTA1(1:1 000)和GAPDH(1:5 000),4 °C孵育过夜,第二天常温孵育对应二抗1 h,最后发光显影。借助Image J对各目的蛋白进行灰度值分析处理。

1.3.6 双萤光素酶报告基因检测 以pGL3-promoter为载体,分别构建含有Mtf2和Pgrmc1基因潜在miR-208b-3p结合位点序列的重组萤光素酶报告质粒pGL3-Mtf2和pGL3-Pgrmc1。将200 ng重组萤光素酶报告质粒、50 nmol/L miR-208b-3p mimic和20 ng pRL-TK内参质粒共转染进入胚肾(HEK)293细胞中,转染24 h后测定萤火虫萤光素酶(FL)和海肾萤光素酶(RL)活性。用FL/RL的相

对比值来判断miR-208b-3p与Mtf2和Pgrmc1基因3'UTR的结合作用。

1.3.7 统计学分析 采用Image J和GraphPad Prism8分析与作图,用SPSS 21.0进行统计分析。实验数据用均数±标准差表示,当两组间作比较时,采用t检验;当多组间作比较时,采用单因素方差分析;在组间两两作比较时,则用Bonferroni校正的t检验。多变量方差分析采用MANOVA检验。当P < 0.05时,则为数据间的差异具有统计学意义。

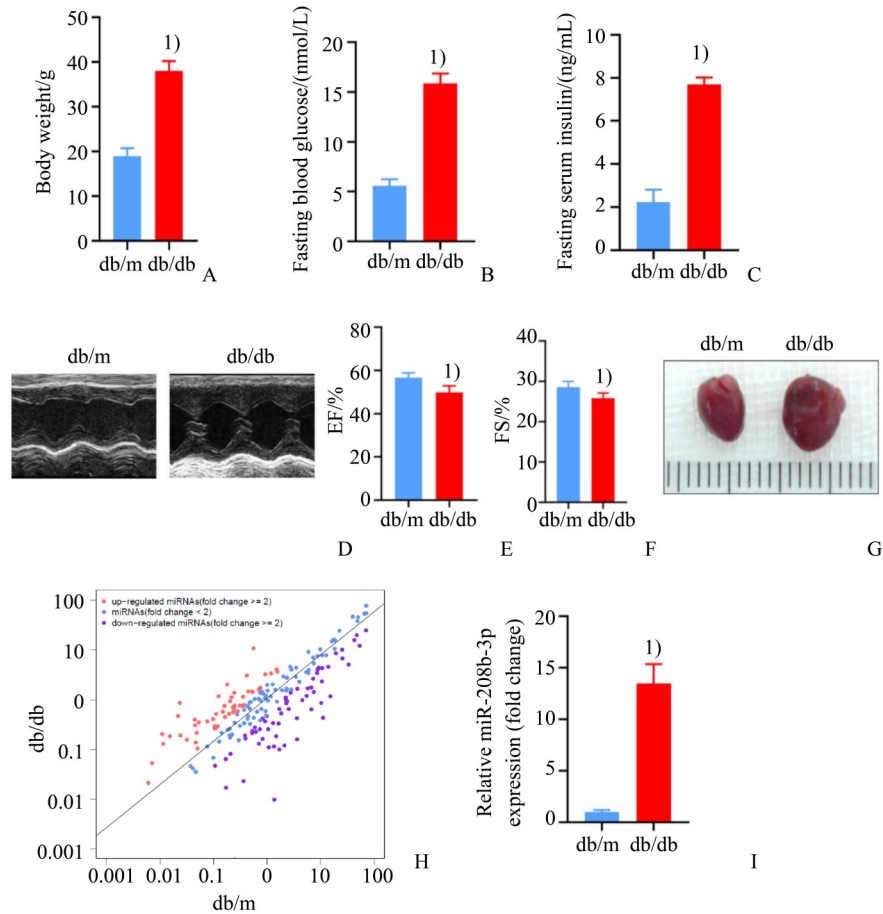
## 2 结果

### 2.1 miR-208b-3p在糖尿病小鼠心肌组织中表达增加

与C57BLKS/J db/m对照小鼠相比,18周龄糖尿病C57BLKS/J db/db小鼠的体质量、空腹血糖和空腹胰岛素水平显著升高(图1A,1B,1C)。小鼠心脏B超检测显示糖尿病db/db小鼠心脏发生肥厚(图1D),并且反映心脏功能的左心室射血分数和短轴缩短率显著降低(图1E,1F)。心脏大体图片显示糖尿病db/db小鼠心脏发生明显的膨大(图1G)。通过对糖尿病db/db小鼠和db/m对照小鼠心肌组织

miRNA 表达谱分析,发现糖尿病 db/db 小鼠心肌中分别有 68 个(包括 miR-208b、miR-29b 和 miR-26b 等)和 62 个(包括 miR-23b、miR-16、let-7g 和 let-7a

等)呈 2 倍以上的升高和降低表达(图 1H)。RT-qPCR 验证结果显示,相较于 db/m 对照小鼠,miR-208b-3p 在 db/db 小鼠心肌中的表达显著升高(图 1I)。



Detection of the body weight, fasting blood glucose and fasting serum insulin in the diabetic db/db mice and db/m mice (A-C).  $F=503.8$ ,  $P<0.0001$ , Body weight:  $t = 14.85$ ,  $^{1)}P<0.0001$  vs. db/m mice; Fasting blood glucose:  $t = 19.27$ ,  $^{1)}P<0.0001$  vs. db/m mice; Fasting serum insulin:  $t = 18.61$ ,  $^{1)}P<0.0001$  vs. db/m mice. D: Representative echocardiographs showing that the left ventricular anterior wall thickness and posterior wall thickness were increased in the diabetic mouse hearts. Cardiac function was decreased in the diabetic mouse hearts (E, F).  $F=261.7$ ,  $P<0.0001$ , EF:  $t = 4.018$ ,  $^{1)}P=0.0039$  vs. db/m mice; FS:  $t = 3.142$ ,  $^{1)}P=0.0138$  vs. db/m mice. G: Representative gross cardiac morphologies of the diabetic db/db mouse and the db/m mouse. H: The scatter plot figure showed the representative dysregulated miRNAs in the myocardium of the diabetic db/db mice and the db/m mice. I: MiR-208b-3p expression in the myocardium of the diabetic db/db mice by RT-qPCR assay.  $t = 14.81$ ,  $^{1)}P<0.0001$  vs. db/m mice. Data are shown as Mean  $\pm$  SD.  $n=5$ .

图1 miR-208b-3p在糖尿病 db/db 小鼠心肌中表达增加

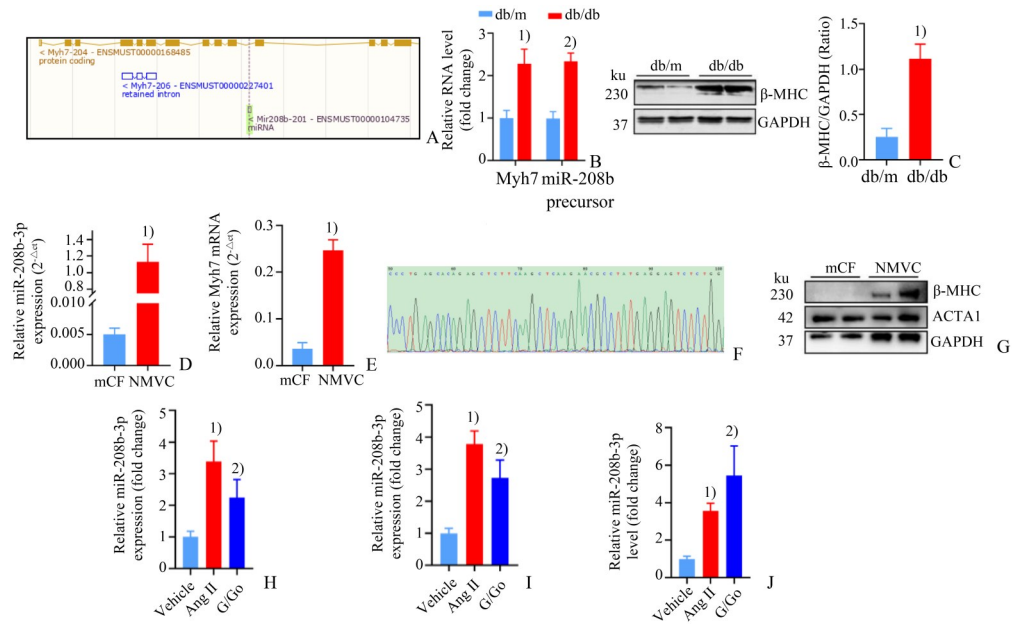
Fig. 1 Upregulation of miR-208b-3p in the myocardium of the diabetic db/db mice

## 2.2 miR-208b-3p在 Ang II 和 G/Go 处理的乳小鼠心肌细胞和心肌纤维细胞中表达增加

序列分析结果显示,小鼠 miR-208b 的模板 DNA 序列位于 Myh7-206(ENSMUST00000168485.8) 的第 10 内含子 ([http://asia.ensembl.org/Mus\\_musculus/Gene](http://asia.ensembl.org/Mus_musculus/Gene)) 中(图 2A)。与 db/m 小鼠相比,糖尿病 db/db 小鼠心肌中 Myh7 和 miR-208b-3p 前体的表达一致地显著升高(图 2B)。Western blot 结果证实,与 db/m 小鼠相比,糖尿病 db/db 小鼠心肌中 Myh7

编码的  $\beta$ -MHC 蛋白表达显著升高(图 2C)。

与 mCF 相比, NMVC 中 miR-208b-3p 和 Myh7 表达水平更高(图 2D, 2E)。PCR 扩增产物的测序结果显示,从 mCF 扩增的 Myh7 mRNA 序列正确(图 2F)。进一步的 Western blot 结果显示 mCF 中检测不到  $\beta$ -MHC 表达,只在 NMVC 中表达(图 2G)。RT-qPCR 检测结果显示,利用 Ang II 和 G/Go 分别处理 mCFs 和 NMVCs 中 miR-208b-3p 表达增加(图 2H, 2I), 同时在 Ang II 和 G/Go 分别处理



A: Location of miR-208b-3p in mouse genome. B: Expression of Myh7 mRNA and miR-208b precursor in the myocardium of db/db mice by RT-qPCR assay.  $F=27.97, P<0.0001$ , Myh7 mRNA:  $^{1)}P=0.0001$  vs. db/m mice; miR-208b precursor:  $^{2)}P<0.0001$  vs. db/m mice. C:  $\beta$ -MHC expression in the myocardium of db/db mice by Western blot assay.  $t=8.187, ^{1)}P<0.0001$  vs. db/m mice. miR-208b-3p and Myh7 mRNA expression in mCF and NMVC by RT-qPCR assay.  $F=74.97, P<0.0001$ , miR-208b-3p:  $^{1)}P<0.0007$  vs. mCF; Myh7 mRNA:  $^{1)}P<0.0002$  vs. mCF (D, E). F: DNA sequencing results of Myh7 mRNA derived from mCF. G: Expression of  $\beta$ -MHC and ACTA1 in mCF and NMVC by Western blot assay. H: Expression of miR-208b-3p in mCFs subjected to Ang II and G/Go treatment, respectively.  $F=16.59, P=0.0036, ^{1)}P=0.0022, ^{2)}P=0.0418$  vs. Vehicle. I: Expression of miR-208b-3p in NMVCs subjected to Ang II and G/Go treatment, respectively.  $F=35.11, P=0.0005, ^{1)}P=0.0003, ^{2)}P=0.0038$  vs. Vehicle. J: Expression of miR-208b-3p in the supernatant of NMVCs subjected to Ang II and G/Go treatment, respectively.  $F=17.01, P=0.0034, ^{1)}P=0.0273, ^{2)}P=0.0021$  vs. Vehicle. Data are shown as Mean  $\pm$  SD.  $n=5$  in B and C,  $n=3$  in D, E, H, I and J.

图2 Ang II和G/Go增加乳小鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞中miR-208b-3p表达  
Fig. 2 Ang II and G/Go enhance miR-208b-3p expression in NMVCs and mCFs

NMVCs上清中miR-208b-3p水平也明显升高(图2J)。

### 2.3 miR-208b-3p增加mCFs中纤维化相关基因表达

分别将25、50和75 nmol/L的miR-208b-3p mimic转染mCFs, Western blot结果显示,只有50和75 nmol/L的miR-208b-3p mimic可显著增加mCFs中纤维化相关的COL1A1、COL3A1和 $\alpha$ -SMA表达(图3A)。通过CKK8和流式细胞术检测转染miR-208b-3p对mCFs增殖能力的影响,结果显示,转染50 nmol/L和75 nmol/L的miR-208b-3p均不能促进mCFs增殖(图3B)和改变mCFs的细胞周期(图3C)。

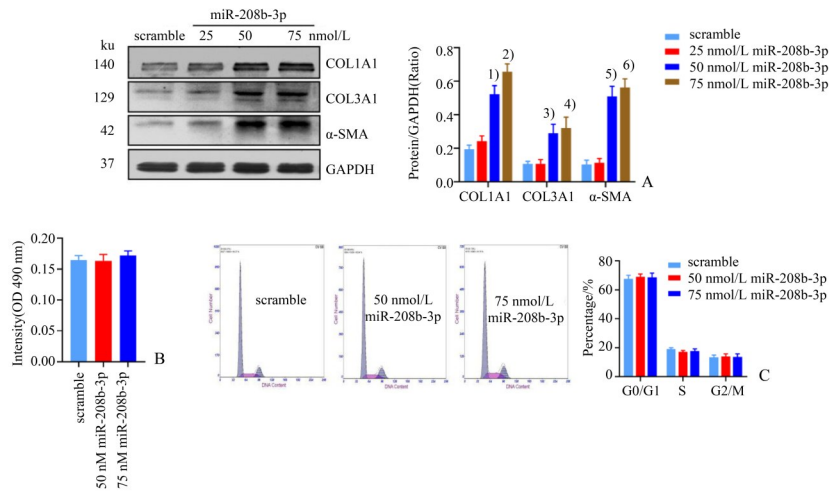
### 2.4 miR-208b-3p靶向Mtf2和Pgrmc1发挥促进心肌纤维化相关基因表达的作用

利用TargetScan-Vert ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org))进行miR-208b-3p靶基因预测分析提示,miR-208b-3p分别与小鼠金属反应元件结合转录因子2(Mtf2)和孕激素受体膜成分1(Pgrmc1)基因的3'非翻译区(3'-UTR)存在结合位点(图4A)。双萤光素酶报告基因实验结果表明,miR-208b-3p与小鼠Mtf2和Pgrmc1基因3'-UTR有特异的结合作用(图4B,

4C)。RT-qPCR和Western blot结果显示,mCFs中转染miR-208b-3p对Mtf2和Pgrmc1 mRNA表达没有影响,但可在蛋白水平抑制MTF2和PGRMC1表达(图4D, 4E)。进一步检测发现,MTF2和PGRMC1蛋白表达在db/db小鼠心肌中表达显著降低(图4D, 4E)。RT-qPCR结果证实,本文所用的Mtf2 siRNA (si-Mtf2)和Pgrmc1 siRNA (si-Pgrmc1)可特异地抑制mCFs中Mtf2和Pgrmc1表达(图4G),75 nmol/L miR-208b-3p与Mtf2 siRNA和Pgrmc1 siRNA可一致性地促进mCFs中纤维化相关的COL1A1、COL3A1和 $\alpha$ -SMA表达(图4H)。

## 3 讨论

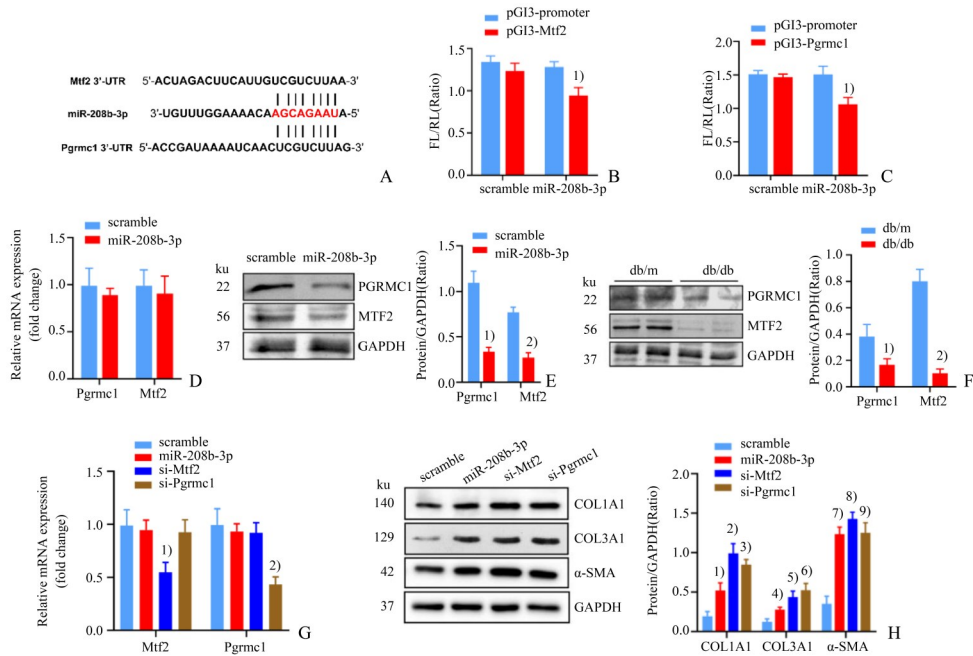
本文证实miR-208b-3p在糖尿病小鼠心肌中水平显著增加,而其前体和宿主基因Myh7同样表达升高,说明在糖尿病小鼠心肌中,miR-208b-3p是伴随宿主基因Myh7一起转录表达的。以往研究证实MyomiR miR-208a在2型糖尿病小鼠和糖尿



Expression of fibrosis-related gene in mCFs transfected with miR-208b-3p by Western blot assay (A).  $F=67.93, P<0.000 1$ , COL1A1:  $F=93.65, P<0.000 1$ , <sup>1)</sup> $P<0.000 1$ , <sup>2)</sup> $P<0.000 1$  vs. scramble; COL3A1:  $F=19.98, P=0.000 5$ , <sup>3)</sup> $P=0.002 6$ , <sup>4)</sup> $P=0.001 0$  vs. scramble; α-SMA:  $F=98.64, P<0.000 1$ , <sup>5)</sup> $P<0.000 1$ , <sup>6)</sup> $P<0.000 1$  vs. scramble. Proliferation activity of mCFs transfected with miR-208b-3p by CCK8 assay (B) and flow cytometry assay (C). Data are shown as Mean ± SD.  $n=3$ .

图3 miR-208b-3p对乳小鼠心肌成纤维细胞增殖和纤维化相关基因表达的影响

Fig. 3 Effects of miR-208b-3p on mCF proliferation and fibrosis-related gene expression in mCFs



A: Predicted miR-208b-3p seed matches to the sequence in the 3'-UTR of mouse Mtf2 and Pgrmc1 mRNA. The seed sequence of miR-208b-3p is UAAGACGA. B: Verification of Mtf2 as target gene of miR-208b-3p by the dual luciferase reporter assay.  $t = 5.069$ , <sup>1)</sup> $P=0.007 1$  vs. pGL3-promoter. C: Verification of Pgrmc1 as target gene of miR-208b-3p by the dual luciferase reporter assay.  $t = 4.821$ , <sup>1)</sup> $P=0.008 5$  vs. pGL3-promoter. MRNA (D) and protein (E) expression of Mtf2 and Pgrmc1 in mCFs transfected with miR-208b-3p mimic. PGRMC1:  $t = 9.740$ , <sup>1)</sup> $P=0.000 6$  vs. scramble; MTF2:  $t = 11.00$ , <sup>1)</sup> $P=0.000 4$  vs. scramble. F: Expression of Mtf2 and Pgrmc1 in the myocardium of db/db mice and db/m mice by Western blot assay. PGRMC1:  $t = 4.782$ , <sup>1)</sup> $P=0.001 4$  vs. db/m; MTF2:  $t = 13.71$ , <sup>1)</sup> $P<0.000 1$  vs. db/m. G: mRNA expression of Mtf2 and Pgrmc1 in mCFs transfected with si-Mtf2 and si-Pgrmc1, respectively. Mtf2:  $F=9.504, P=0.005 1$ , <sup>1)</sup> $P=0.004 0$  vs. scramble; Pgrmc1:  $F=19.05, P=0.000 5$ , <sup>1)</sup> $P=0.000 4$  vs. scramble. H: Fibrosis-related protein expression in mCFs transfected with miR-208b-3p, si-Mtf2 and si-Pgrmc1, respectively.  $F=81.94, P<0.000 1$ , COL1A1:  $F=46.85, P<0.000 1$ , <sup>1)</sup> $P=0.005 5$ , <sup>2)</sup> $P<0.000 1$ , <sup>3)</sup> $P<0.000 1$  vs. scramble; COL3A1:  $F=24.66, P=0.000 2$ , <sup>4)</sup> $P=0.039 3$ , <sup>5)</sup> $P=0.000 7$ , <sup>6)</sup> $P=0.000 1$  vs. scramble; α-SMA:  $F=67.22, P<0.000 1$ , <sup>7)</sup> $P<0.000 1$ , <sup>8)</sup> $P<0.000 1$ , <sup>9)</sup> $P<0.000 1$  vs. scramble. Data are shown as Mean ± SD.  $n=3$  in B, C, D, E, G and H,  $n=5$  in F.

图4 miR-208b-3p靶向抑制mCFs中Mtf2和Pgrmc1基因表达

Fig. 4 miR-208b-3p inhibits expression of Mtf2 and Pgrmc1 in mCFs

病人心肌中表达增加<sup>[16]</sup>,而本文结果发现 MyomiR miR-208b 也同样在糖尿病心肌中表达上调。

那么,在糖尿病心肌中表达升高的 miR-208b-3p 的细胞来源是什么呢? 本文检测发现 miR-208b-3p 在 NMVCs 和 mCFs 两种心肌细胞中均有表达,而在 NMVCs 中含量更高,这与 miR-208b 的宿主基因 Myh7 在 NMVCs 中高表达是一致的。定量 PCR 和 DNA 测序结果证实,Myh7 mRNA 在 mCFs 中表达,但检测不到 Myh7 编码的  $\beta$ -MHC 蛋白表达,具体机制尚不清楚。氧化应激、晚期糖化终产物 (AGE) 的形成、肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 的激活参与糖尿病心肌病的发病过程<sup>[17-18]</sup>。分别用 Ang II 和 G/Go 处理 NMVCs 和 mCFs 可上调细胞中 miR-208b-3p 表达,该结果提示在糖尿病的病理条件下,小鼠心肌细胞和心肌成纤维细胞中 miR-208b-3p 可被特异地激活表达。

心肌成纤维细胞是参与心肌纤维化过程的关键细胞类型,在心肌纤维化发生中会向肌成纤维细胞分化,并伴随细胞增殖和迁移能力的增加<sup>[19]</sup>。本文利用 25、50 和 75 nmol/L 的 miR-208b-3p mimic 分别处理 mCFs, CCK8 细胞增殖实验和流式细胞术分析结果显示,不同剂量的 miR-208b-3p mimic 处理都不会改变 mCFs 的增殖能力和细胞周期分布特征。进一步检测发现 50 和 75 nmol/L 的 miR-208b-3p 可有效促进 mCFs 中纤维化相关蛋白表达,显示 miR-208b-3p 具有促进心肌纤维化的作用。序列分析显示 miR-208a-3p 与 miR-208b-3p 有共同的种子序列 (seed sequence) UAAGACG (www.mirbase.org), 而 miRNA 主要是通过种子序列与靶基因的 3'-UTR 结合来发挥抑制基因表达的作用<sup>[20]</sup>。已有研究报道 miR-208a-3p 具有促进心肌纤维化的作用<sup>[21]</sup>,而本文结果证实 miR-208b-3p 也具有一致的促进心肌纤维化的作用。本文证实 miR-208b-3p 具有促进心肌纤维化的作用,结合以往 miR-208b-3p 具有促进心肌肥厚作用的报道<sup>[22]</sup>,提示了 miR-

208b-3p 可通过促进心肌纤维化和心肌肥厚两个方面参与心肌重构的过程。

本文结果表明 mCFs 和 NMVCs 中 Myh7 基因来源的 miR-208b-3p 可在 Ang II 和 G/Go 诱导下表达升高,并证实 Ang II 和 G/Go 处理后的 NMVCs 细胞上清中 miR-208b-3p 水平增加,鉴于心肌细胞和心肌成纤维细胞间存在细胞囊泡形式的信息交换<sup>[23]</sup>,因此,提示糖尿病病理条件下心肌细胞表达的 miR-208b-3p 可能借助于细胞囊泡输送并进入到邻近的心肌成纤维细胞,发挥促进心肌纤维化基因表达的作用。

本文证实 miR-208b-3p 可特异靶向 Mtf2 和 Pgrmc1 发挥促进心肌纤维化的作用。首先,利用 Target Scan-Vert 软件预测提示 Mtf2 和 Pgrmc1 是 miR-208b-3p 的潜在靶基因,双荧光素酶检测结果显示 miR-208b-3p 能分别特异性结合于 Mtf2 和 Pgrmc1 mRNA 3'-UTR,并在蛋白水平上抑制 mCFs 中 Mtf2 和 Pgrmc1 表达。功能实验结果显示,利用 siRNA 分别沉默 Mtf2 和 Pgrmc1 表达,可与 miR-208b-3p 一致性地促进 mCFs 中纤维化相关基因表达。

Mtf2 是多梳压制复合物 2 (PRC2) 的重要组成部分,可激发 PRC2 的组蛋白 H3K27 甲基转移酶活性,在干细胞干性维持和体细胞重编程中的基因表达方面发挥重要作用<sup>[24-25]</sup>。Mtf2 表达能否增强 CFs 中 H3K27 甲基修饰并特异增加纤维化相关基因表达,尚不明确。已有研究证实 Pgrmc1 可提高线粒体呼吸和脂肪酸氧化的速率,高脂喂养 Pgrmc1 基因敲除小鼠容易发生心脏脂肪毒性,促发心肌纤维化和心力衰竭<sup>[26]</sup>。Pgrmc1 表达能否增加 CFs 中脂肪酸氧化并介导纤维化相关基因表达,亦需实验证实。我们后续将在细胞和整体水平进一步阐明 miR-208b-3p 通过靶向 Mtf2 和 Pgrmc1 促进心肌纤维化的分子机制,为基于 miR-208b-3p 为潜在干预靶点的心肌纤维化治疗研究提供科学资料。

#### 参考文献

- [1] Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis[J]. Am J Cardiol, 1972, 30:595-602.
- [2] Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, et al. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus[J]. J Clin Invest, 1977, 60(4):884-899.
- [3] Park S, Nguyen NB, Pezhouman A, et al. Cardiac fibrosis: potential therapeutic targets[J]. Transl Res, 2019, 209:121-137.
- [4] Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5):5451-5465.
- [5] 陈丽文, 郭晶, 陈泽润, 等. MicroRNA-99b-5p 通过抑制成纤维细胞生长因子 21 表达促进心肌细胞肥大[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2022, 43(2):

- 192-202.  
Chen LW, Guo J, Chen ZR, et al. MicroRNA-99b-5p aggravates cardiomyocyte hypertrophy by down-regulating fgf21 [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(2):192-202.
- [6] 易芷瑶, 赵安职, 张铭, 等. 核内 miR-199b-5p 通过上调 CDK9 表达促进心肌细胞肥大[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(2):193-201.  
Yi ZY, Zhao AZ, Zhang M, et al. Nuclear miR-199b-5p promotes cardiomyocyte hypertrophy by up-regulating CDK9 expression [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2021, 37(2):193-201.
- [7] 赵安职, 郭晶, 陈丽文, 等. miR-25-3p 通过 BTG2/SOD2 轴促进心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(4): 328-334; +351.  
Zhao AZ, Guo J, Chen LW, et al. MiR-25-3p promotes the expression of fibrosis-related genes in cardiac fibroblasts through BTG2/ SOD2 axis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(4): 328-334; +351.
- [8] Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar-Kamińska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(5):865-874.
- [9] Ahmed U, Khaliq S, Ahmad HU, et al. Pathogenesis of diabetic cardiomyopathy and role of miRNA [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2021, 31(1):79-92.
- [10] van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(5):662-673.
- [11] Mekala N, Kurdys J, Vicenzi AP, et al. MiR 208a regulates mitochondrial biogenesis in metabolically challenged cardiomyocytes[J]. *Cells*, 2021,10(11):3152.
- [12] Blumensatt M, Fahlbusch P, Hilgers R, et al. Secretory products from epicardial adipose tissue from patients with type 2 diabetes impair mitochondrial  $\beta$ -oxidation in cardiomyocytes via activation of the cardiac renin-angiotensin system and induction of miR-208a [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112(1):2.
- [13] Rawal S, Nagesh PT, Coffey S, et al. Early dysregulation of cardiac-specific microRNA-208a is linked to maladaptive cardiac remodelling in diabetic myocardium[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1):13.
- [14] Zhao L, Li W, Zhao H. Inhibition of long non-coding RNA TUG1 protects against diabetic cardiomyopathy induced diastolic dysfunction by regulating miR-499-5p[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(3):718-730.
- [15] Mathiyalagan P, Okabe J, Chang L, et al. The primary microRNA-208b interacts with Polycomb-group protein, Ezh2, to regulate gene expression in the heart [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(2):790-803.
- [16] 丰嘉欣, 郭继深, 梁俣, 等. Circ\_0018478 通过编码 HERC4-193 发挥抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(6):995-1004.  
Feng JX, Guo JS, Liang Y, et al. Circ\_0018478 inhibits the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts via encoding protein HERC4-193[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(6):995-1004.
- [17] Rawal S, Nagesh PT, Coffey S, et al. Early dysregulation of cardiac-specific microRNA-208a is linked to maladaptive cardiac remodelling in diabetic myocardium[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1):13.
- [18] Stanton AM, Vaduganathan M, Chang LS, et al. Asymptomatic diabetic cardiomyopathy: an underrecognized entity in type 2 diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2021, 21(10):41.
- [19] Tian J, Zhao Y, Liu Y, et al. Roles and mechanisms of herbal medicine for diabetic cardiomyopathy: current status and perspective [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:8214541.
- [20] Turner NA. Therapeutic regulation of cardiac fibroblast function: targeting stress-activated protein kinase pathways [J]. *Future Cardiol*, 2011, 7(5):673-691.
- [21] Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions[J]. *Brief Bioinform*, 2014, 5(1):1-19.
- [22] Wang BW, Wu GJ, Cheng WP, et al. MicroRNA-208a increases myocardial fibrosis via endoglin in volume overloading heart [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e84188.
- [23] Coulis G, Londhe AD, Sagabala RS, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B regulates miR-208b-argonaute 2 association and thyroid hormone responsiveness in cardiac hypertrophy [J]. *Sci Signal*, 2022, 15(730):eabn6875.
- [24] Yang J, Yu X, Xue F, et al. Exosomes derived from cardiomyocytes promote cardiac fibrosis via myocyte-fibroblast cross-talk [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12):4350-4366.
- [25] Dong C, Nakagawa R, Oyama K, et al. Structural basis for histone variant H3tK27me3 recognition by PHF1 and PHF19[J]. *Elife*, 2020, 9:e58675.
- [26] Zhang Z, Jones A, Sun CW, et al. PRC2 complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES cells to modulate ES cell pluripotency and somatic cell reprogramming[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(2):229-240.
- [27] Lee SR, Heo JH, Jo SL, et al. Progesterone receptor membrane component 1 reduces cardiac steatosis and lipotoxicity via activation of fatty acid oxidation and mitochondrial respiration[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):8781.