

·临床研究·

## 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

丰嘉欣<sup>1,4</sup>, 郭继深<sup>2</sup>, 梁 保<sup>3</sup>, 姜佳雪<sup>1</sup>, 李 晖<sup>5</sup>, 徐金东<sup>6</sup>, 方咸宏<sup>4</sup>, 单志新<sup>1,4</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006; 2. 南方医科大学第二临床医学院, 广东 广州 510280; 3. 广东省心血管病研究所心内科, 广东 广州 510080; 4. 广东省人民医院广东省临床药理学重点实验室, 广东 广州 510080; 5. 广东省人民医院检验科, 广东 广州 510080; 6. 广东省人民医院麻醉科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探究环状RNA circ\_0018478调控心肌成纤维细胞纤维化表型的作用和可能机制。【方法】RT-qPCR检测健康器官捐献者( $n=18$ )和心衰( $n=28$ )患者心肌中circ\_0018478及其宿主基因含E3泛素蛋白连接酶4的HECT和RLD结构域(HERC4)的表达水平。荧光原位杂交(FISH)实验和核质RNA定量检测circ\_0018478的细胞分布情况,放线菌素D干预实验和核糖核酸外切酶(RNase R)消化实验检测circ\_0018478的RNA稳定性。过表达腺病毒介导的circ\_0018478时,分别在RNA和蛋白水平检测乳小鼠心肌成纤维细胞(mCFs)中如I型和III型胶原等纤维化相关基因表达的影响。利用EdU染色和Trans-well细胞迁移实验鉴定circ\_0018478对mCFs增殖和迁移能力的影响。质谱shot-gun分析circ\_0018478可能翻译蛋白的肽段序列。利用小干扰RNA(siRNA)抑制HERC4-193表达,检测对circ\_0018478调控mCFs纤维化表型的影响。【结果】在心衰病人心肌中,相较于无显著表达差异的宿主基因HERC4,环形RNA circ\_0018478表达显著增加。FISH和核质分离实验结果证实circ\_0018478主要定位于心肌细胞胞质中。放线菌素D和RNase R消化实验证实circ\_0018478具有典型的RNA稳定性。过表达circ\_0018478可抑制mCFs的增殖、迁移和纤维化相关基因的表达。质谱shot-gun和Western blot检测结果提示circ\_0018478可翻译预期的HERC4-193蛋白。过表达circ\_0018478和HERC4-193可一致地抑制mCFs的纤维化表型,而抑制HERC4-193表达可有效减弱circ\_0018478抑制mCFs中纤维化相关基因表达的作用( $P<0.05$ )。【结论】Circ\_0018478通过翻译蛋白HERC4-193发挥抑制心肌成纤维细胞纤维化表型的作用。

**关键词:**心肌纤维化; circ\_0018478; 翻译; 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(2022)06-0995-10

**DOI:**10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0615

### Circ\_0018478 Inhibits the Fibrotic Phenotype of Cardiac Fibroblasts via Encoding Protein HERC4-193

FENG Jia-xin<sup>1,4</sup>, GUO Ji-shen<sup>2</sup>, LIANG Yu<sup>3</sup>, JIANG Jia-xue<sup>1</sup>, LI Hui<sup>5</sup>, XU Jin-dong<sup>6</sup>,  
FANG Xian-hong<sup>4</sup>, SHAN Zhi-xin<sup>1,4</sup>

(1. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 3. Department of Cardiology, Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China; 4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Pharmacology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; 5. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; 6. Department of Anesthesiology,

收稿日期:2022-06-30

基金项目:国家自然科学基金(82070254);广州市科技计划项目(202102080093);广东省自然科学基金(2022A1515012522, 2022A1515012175, 2021A1515220122);广东省卫健委课题(A2021002, A2022334);广东省人民医院心血管专项(2020XXG003);广东省人民医院自然培育项目(KY0120220028)

作者简介:丰嘉欣,硕士生,研究方向:心肌纤维化的分子机制,E-mail:13640849602@163.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

Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

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

**Abstract:** [Objective] To investigate the effect of circ\_0018478 on the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts and the potential mechanism involved. [Methods] The expression of circ\_0018478 and its host gene of HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4 (*HERC4*) in the myocardium of patients with heart failure (HF) ( $n=28$ ) and healthy donors ( $n=18$ ) was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay. The distribution of circ\_0018478 was identified by fluorescence in situ hybridization (FISH) assay and RT-qPCR assay based on nucleocytoplasmic RNA in human AC16 cardiomyocytes. Actinomycin D and RNase R exonuclease digestion were used to test the stability of circ\_0018478 in AC16 cells. RNA and protein expression of fibrosis-related genes was detected in mouse cardiac fibroblasts (mCFs) with adenovirus-mediated over-expression of circ\_0018478. EdU staining and transwell migration assay were performed to detect the effects of circ\_0018478 on mCFs proliferation and migration activities. The potential circ\_0018478-translated protein in mCFs was identified by mass spectrometry (MS) shot-gun assay. *HERC4*-193 was inhibited by small interfering RNA (siRNA), and the effect of *HERC4*-193 knock-down on the fibrotic phenotype of mCFs with over-expression of circ\_0018478 was studied. [Results] The expression of circ\_0018478 was up-regulated in the myocardium of HF patients, with no significant difference in its host gene of *HERC4*. The results of FISH and RT-qPCR assay showed that circ\_0018478 was mainly in the cytoplasm of AC16 cardiomyocytes. The characteristic RNA stability of circ\_0018478 was verified by Actinomycin D and RNase R assay, respectively. The enforced expression of circ\_0018478 suppressed proliferation and migration of mCFs, and inhibited the expression of fibrosis-related genes in mCFs. The results of MS shot-gun assay and Western blotting showed that circ\_0018478 could translate protein *HERC4*-193. Overexpression of the circ\_0018478 and protein *HERC4*-193 could consistently inhibit the fibrotic phenotype of mCFs. Knock-down of *HERC4*-193 could attenuate the inhibitory effect of circ\_0018478 on fibrosis-related gene expression in mCFs ( $P<0.05$ ). [Conclusions] Circ\_0018478 inhibits the fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts via translating *HERC4*-193 protein.

**Key words:** cardiac fibrosis; circ\_0018478; translation; cardiac fibroblast

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(6):995-1004]

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是多种心血管疾病晚期的共同病理过程<sup>[1]</sup>,常见于缺血性和非缺血性心肌病<sup>[2]</sup>。它是以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白过度累积、胶原异常分布为特征<sup>[3]</sup>,是对心肌组织损伤的典型病理反应并伴随ECM合成、降解失衡的改变<sup>[4]</sup>。不受控制的MF多发生在心肌长期处于高压负荷<sup>[5]</sup>或者缺血情况下,发生MF的心肌收缩力减弱、硬度增加、顺应性下降、心电传导异常而导致严重的心功能障碍和不良重塑<sup>[6]</sup>,最终引发心力衰竭(heart failure, HF)和心源性猝死<sup>[7]</sup>。越来越多的研究证实非编码RNA参与调控心肌纤维化过程<sup>[8]</sup>。环形RNA(circular RNA, circRNA)是一类不具备5'帽子结构和3' poly(A)尾,通过反向剪切形成的闭合环状的非编码RNA<sup>[9]</sup>,其相对于线性RNA更具稳定性<sup>[10]</sup>。CircRNA主要富集于真核细胞中,其发挥不同生物学功能的分子机制与其亚细胞定位相关<sup>[11]</sup>。大部分

circRNA在细胞核中生成,通过转运到细胞质中发挥生物学功能<sup>[12]</sup>,例如,位于胞质中的circRNA可作为“海绵体”内源性竞争吸附微小RNA(miRNA, miRNA),减弱对下游靶基因表达的抑制作用。CDR1as是第一个被证实可以吸附miRNAs的环状circRNA,其主要通过结合miR-7发挥作用<sup>[11]</sup>,或与相关RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBP)结合来发挥生物学作用<sup>[13]</sup>。还有一些胞质中的circRNA具有翻译微小蛋白或多肽的功能<sup>[14]</sup>,如由6-18号外显子反向剪切形成的circBUB1B通过翻译长度为544氨基酸的蛋白可促进多发性骨髓瘤的进展<sup>[15]</sup>。定位于胞核中的circRNA主要参与基因转录的调节和RNA的可变剪切<sup>[16]</sup>,如近期相关研究证实circNCOR1定位导致的失衡能促使核内的circRNA异常核输出,从而促进相关癌症的进展<sup>[17]</sup>。已有研究表明circRNA参与多种心血管疾病的发病过程,包括弥漫性心肌纤维化<sup>[18-19]</sup>、高血

压<sup>[20]</sup>和缺血性心肌损伤<sup>[21]</sup>等。课题组前期测序结果提示来自于E3泛素蛋白连接酶4的HECT和RLD结构域(HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4, HERC4)基因的环状RNA circ\_0018478在心衰患者心肌中表达上调;通过circBANK(www.circbank.cn/searchCirc.html)和NCBI ORF finder(www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder)等在线数据库网站预测circ\_0018478可能含有一个核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)和开放阅读框(open reading frame, ORF),提示circ\_0018478可能具有翻译蛋白的功能,但目前尚无相应的实验结果来证实,因此,本文将探讨circ\_0018478在心肌纤维化过程中的表达,明确其是否通过翻译蛋白发挥对心肌纤维化表型的调控作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 心肌组织标本

用于检测circ\_0018478和其宿主HERC4 mRNA表达的健康器官捐献者和心衰病人心肌标本均来自于广东省人民医院生物标本库。所有相关样本均经广东省人民医院伦理委员会批准(批准号NO. GDREC2016255H),相关病例资料同以往报道<sup>[22]</sup>。

### 1.2 实验动物和细胞株

出生1~3 d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<sup>[22]</sup>,生产许可证号为SCKK(粤)2013-0034。实验用细胞株均购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。

### 1.3 主要试剂

胰蛋白酶(2.5 g/L, Trypsin-EDTA)(Gibco);细胞培养基DMEM/F12和澳洲胎牛血清(Bio Ind);DNA凝胶回收试剂盒、IP试剂盒BCA蛋白定量试剂盒(Thermo)、RIPA裂解液和NP40裂解液(碧云天);质粒提取试剂盒(Omega);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(Protein Technology);兔抗 $\alpha$ 1-III型胶原蛋白(Collagen Type III Alpha 1, COL3A1)抗体(Invitrogen);兔抗 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth

muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体(Abcam)<sup>[22]</sup>兔抗Flag标签(DYKDDDDK tag)抗体(Protein Technology);放线菌素D(生工有限公司);荧光原位杂交(FISH)试剂盒、si-HERC4-193(广州锐博);核糖核酸外切酶(Ribonuclease R)(广州吉赛生物)。

### 1.4 主要方法

1.4.1 乳小鼠心肌成纤维细胞的原代分离、传代培养、处理 将刚出生(1~3 d内)的SPF级别的C57BL/6小鼠(雌雄不限,体质量相仿)用医用酒精棉团进行消毒处理,提前一天灭菌所需器械耗材,医用无菌眼科剪小心取出完整心脏,灭菌后用预冷的PBS清洗,适当修剪心脏周围的动脉血管组织以及其他多余组织,加入含酚红的胰蛋白酶-EDTA(2.5 g/L)-PBS混合液过夜摇荡促进消化,取含有适量血清浓度的DMEM/F12培养基立即终止消化,置于37 °C摇床上适当温育后巴氏管或移液管吹散离心,弃去上清同时重悬后加入到相应无菌培养瓶中培养,待乳小鼠心肌成纤维细胞长满后换液,并传代培养和后续铺板实验。

1.4.2 实时荧光定量RT-qPCR检测 从人心肌组织或乳小鼠心肌成纤维细胞中提取总RNA(Trizol法),以1.0  $\mu$ g总RNA为模板,逆转录得到cDNA,设计相应引物用于检测circ\_0018478、HERC4及纤维化相关基因mRNA的表达<sup>[19]</sup>。在BIO-RAD CFX-connect(美国,real time system)进行定量PCR反应和数据分析。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算circ\_0018478及其他编码基因的表达水平<sup>[19]</sup>。本文所用PCR引物序列见表1<sup>[22]</sup>。

1.4.3 蛋白免疫印迹 细胞实验处理结束后,倒去培养基,每孔细胞600  $\mu$ L PBS轻轻清洗后置于冰上,加入少许RIPA裂解液(含有蛋白酶抑制剂和PMSF),静置18~28 min待其裂解充分且均匀后刮取细胞,收集细胞悬液至1.5 mL EP管(标记)中,全程保持4 °C(防止细胞中有效蛋白成分降解)。提前预冷离心机,刮取完成后倾斜静置,置于离心机中并配平,离心条件:4 °C,11 600  $\times$  g,12~18 min,吸取上清(尽量不要碰到沉淀)。测定浓度后蛋白定量12~20  $\mu$ g(用DEPC水或者RIPA裂解液补齐体积使上样量体积相等),加入对应的SDS-PAGE Loading Buffer,金属浴或水浴锅中99 °C蛋白变性10 min,SDS-PAGE凝胶电泳,转膜。根据检测的目标蛋白大小裁下PVDF膜,利用对应的特异性抗体COL1A1(1:1 500)、COL3A1(1:1 000)、 $\alpha$ -SMA(1:

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

Gene	The primer sequence (5'-3')	Product/bp
<i>hsa_circ_0018478</i>	F: AGGAGGGGTGCGCAAAGAA R: TTACAGTAAAGGGGCTTTTCC	228
<i>HERC4</i>	F: GCTGGAGGGTATGGTCAGTT R: TGTTGCTTGTGAACCGGTT	202
<i>Col1a1</i>	F, CTGGTCCTGTTGGAAGTCGT R, CAGATGCACCTGTTTCTCCA	201
<i>Col3a1</i>	F, CAATGTAAGAAGTCTCTGAAG R, CAAACAGGGCCAATGTCCAC	240
<i>Acta2</i>	F, CTGTGCTATGTCGCTCTGGA R, ATAGGTGGTTTCGTGGATGC	192
<i>GAPDH</i>	F: CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG R: CCACCCTGTTGCTGTAGCC	200
<i>U6</i>	F: GCTTCGGCAGCACATATACT R: ATCCTTGCGCAGGGGCCA	68

1 500)、HERC4(1:2 000)和GAPDH(1:5 000), 4 °C孵育过夜,第二天常温孵育对应二抗50 min~1.5 h,最后发光显影。借助Image J(National Institutes of Health(NIH)开发)对各目的蛋白进行灰度值分析处理。

1.4.4 环形RNA稳定性实验 提取人心肌细胞AC16的总RNA,分别将1.5 μg RNA加与不加RNase R消化10 min,逆转录后直接进行RT-qPCR反应,分别检测*circ\_0018478*及其宿主基因*HERC4* mRNA的水平。利用2.5 μg/mL放线菌素D处理AC16细胞不同时间,提取总RNA进行RT-qPCR反应,检测*circ\_0018478*和*HERC4* mRNA的水平。

1.4.5 重组腺病毒的制备 *Circ\_0018478*的序列来自其宿主基因*HERC4*的外显子8~19序列。按我们报道的方法<sup>[17]</sup>,在pAd-Track-cmv载体中的多克隆位点中定向插入*circ\_0018478*的模板DNA后,与腺病毒骨架质粒pAd-Easy-1进行重组。重组成功后,*circ\_0018478*腺病毒质粒被*Pac I*内切酶线性化,并转染到融合度(细胞密度)为75%的HEK293T细胞中包装*circ\_0018478*的重组腺病毒。类似地,我们合成了HERC4-193编码读框序列,并用于构建重组HERC4-193腺病毒质粒和腺病毒。实验时以rAd-GFP作为对照组腺病毒(*circ\_0018478*、HERC4-193和rAd-GFP的MOI均是5)<sup>[22]</sup>。

1.4.6 EdU检测细胞增殖能力 将P2代mCFs细胞均匀接种于confocal皿中,生长至适合密度后用相应剂量的重组腺病毒感染mCFs,5~8 h后补适量液体培养基。次日,避光加入EdU试剂盒中相关试剂,按照试剂盒说明书步骤进行后续实验。最后滴加含DAPI的封片剂置于confocal皿上拍照观察。

1.4.7 Transwell检测细胞迁移能力 将P2代mCFs细胞均匀种于Transwell板的小室中,感染mCFs,趋化固定,结晶紫染色至细胞全部染上紫色,分析图像。

1.4.8 免疫沉淀IP实验 准备mCFs铺于10 cm皿中,稳定生长待其丰度为70%~80%后,感染rAd-*circ\_0018478*。24~30 h后,胰酶消化收集细胞悬液,PBS清洗三次,每皿加入800~1 000 mL的NP40裂解液,冰上裂解5~10 min充分吹散细胞,离心后转移上清至1.5 mL EP管,测浓度定量。分别吸取30 mL Flag树脂体抗体,用适量TBS清洗,稍微离心沉降树脂后弃上清,重复清洗步骤。将定量好的蛋白裂解液加入树脂中,4 °C孵育过夜或常温孵育2~4 h,重复TBS清洗步骤3次,离心弃上清。加入50 μL酸性洗脱缓冲液,离心后收集上清加入5 μL碱性缓冲液中和上清。加入适量SDS Loading Buffer混匀,99 °C煮沸10 min变性蛋白,分装样品置于适宜深度低温保存用于后续Western blot检测。

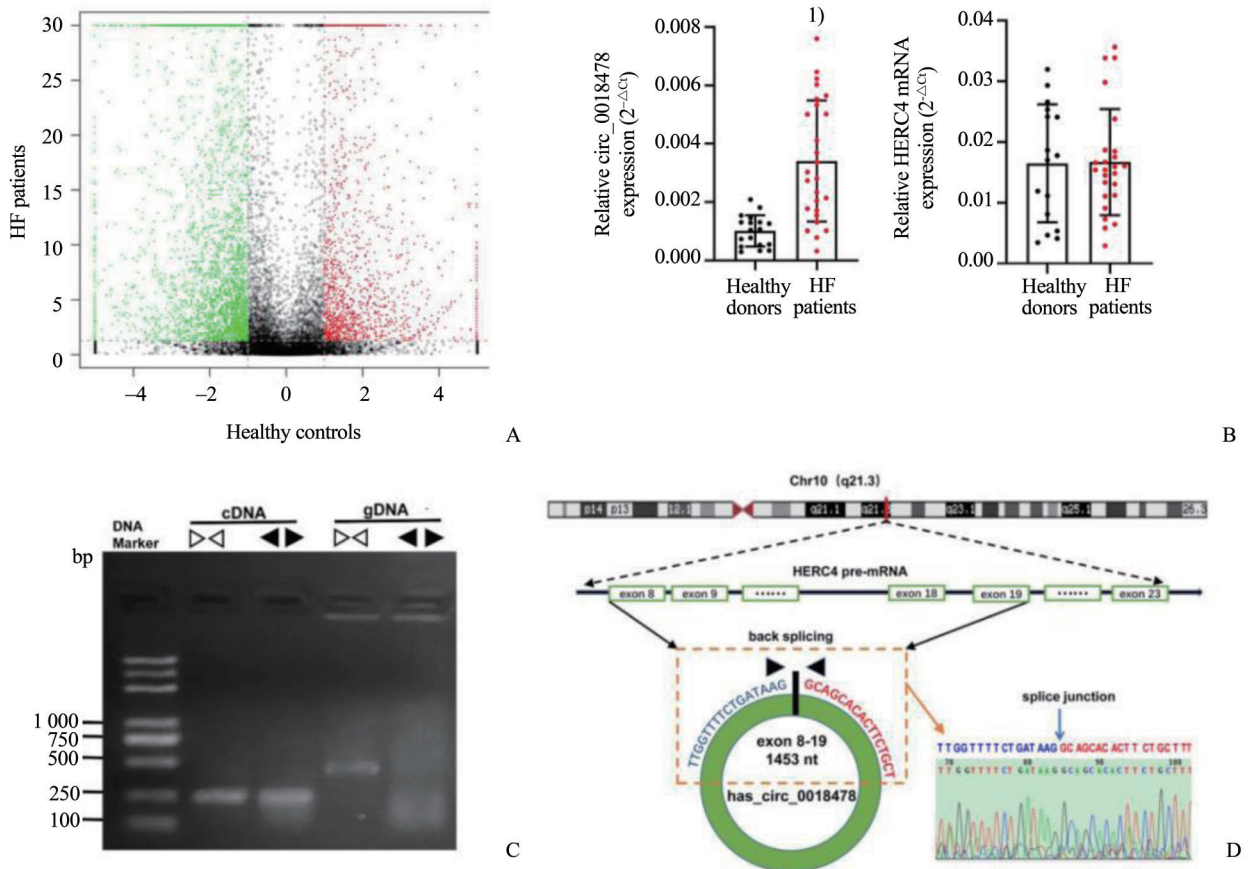
1.4.9 统计学分析 应用 GraphPad Prism9.0.0 进行统计分析。实验数据用均数±标准差表示<sup>[22]</sup>,组间比较-t 检验(组间两两比较-Bonferroni 校正的 t 检验)<sup>[19]</sup>,多组间均数比较先进行正态分布和方差齐性检验,方差齐性检验后采用单因素方差分析。当  $P < 0.05$  时,则为数据间的差异具有统计学意义<sup>[22]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 环形 RNA circ\_0018478 在 HF 心肌组织中表达增加

通过对健康器官捐献者及心衰病人心肌组织 circRNA 表达谱分析,发现心衰病人心肌中分别有

350 和 290 个呈 2 倍以上的升高和降低表达的 circRNA(图 1A)。RT-qPCR 验证结果显示,相较于健康器官捐献者,circ\_0018478 在心衰心肌中的表达显著升高( $P < 0.0001$ ),而其宿主基因 E3 泛素连接酶 *HERC4* 的 mRNA 表达无明显差异(图 1B)。为确认 circRNA\_0018478 的表达,分别使用 circRNA\_0018478 和 *HERC4* 的检测引物对人心肌 cDNA 和基因组 DNA(gDNA)进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示,从人 cDNA 和 gDNA 中可 PCR 扩增得到 *HERC4* 产物,而 circRNA\_0018478 只能从人 cDNA 中扩增到(图 1C)。DNA 测序结果显示,circRNA\_0018478 的 PCR 检测产物中包含特征接头序列: GTTTTCTGATAAGGCAGCACACTTCT(图 1D)。



A: The volcano map shows the specific expression of circRNAs in patients with heart failure. The green and red dots indicate more than a 2 fold change in circRNAs between the two samples for comparison. B: The expression of circ\_0018478 and *HERC4* in myocardium of healthy donors and patients with heart failure was detected according to RT-qPCR. circ\_0018478:  $t = 5.630$ , <sup>1)</sup>  $P < 0.0001$  vs. healthy donors. C: Identification of *HERC4* and circ\_0018478 by PCR assay; Lane 2, 4: PCR products of *HERC4* amplified from human cDNA and gDNA, respectively; Lane 3: PCR product of circ\_0018478 amplified from human cDNA. D: Circ\_0018478 sequence is derived from exon 8 to exon 19 of *HERC4* gene, and the reverse splice sequence of circ\_0018478 was verified by Sanger sequencing. Data are shown as Mean±SD.  $n = 18, 28$  in B.

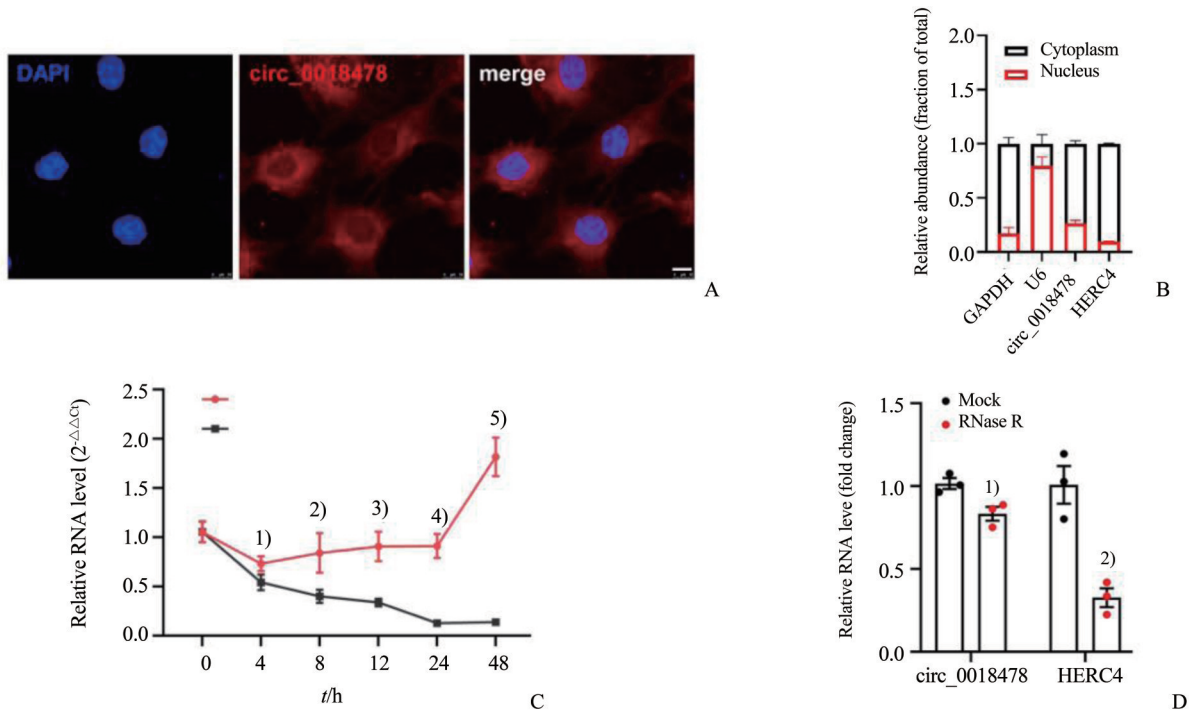
图1 环形 RNA circ\_0018478 在心衰心肌组织中的表达增加

Fig. 1 Upregulation of circ\_0018478 in the myocardium of patients with heart failure

## 2.2 Circ\_0018478在人心肌细胞AC16中的定位及其特性

根据 circRNA 特有的反向剪切位点序列,设计 circ\_0018478 的特异荧光探针和 PCR 检测引物,分别用于 circ\_0018478 的 RNA FISH 分析实验和定量检测。FISH 和核质分离 circ\_0018478 表达实验结果均显示,在人心肌细胞 AC16 中, circ\_0018478 大

部分定位于胞质中(图 2A, 2B)。RT-qPCR 结果显示,用放线菌素 D 和 RNase R(核糖核酸外切酶)处理后, *HERC4* mRNA 水平显著降低,而 circ\_0018478 变化水平相对较小,说明在人心肌细胞 AC16 中, circ\_0018478 具有较好的环状 RNA 稳定性(图 2C, 2D)。



Distribution of circ\_0018478 in cytoplasm of human cardiomyocyte AC16 by RNA FISH assay (A) and RT-qPCR assay (B), respectively. Scale bar is 10  $\mu\text{m}$  in A. C: Levels of circ\_0018478 and *HERC4* mRNA in AC16 cells subjected to Actinomycin D at the indicated time points.  $t = 3.897$ ,  $^1P = 0.0046$  vs. *HERC4* mRNA;  $t = 4.660$ ,  $^2P = 0.0016$  vs. *HERC4* mRNA;  $t = 8.227$ ,  $^3P < 0.0001$  vs. *HERC4* mRNA;  $t = 14.31$ ,  $^4P < 0.0001$  vs. *HERC4* mRNA;  $t = 19.08$ ,  $^5P < 0.0001$  vs. *HERC4* mRNA. D: Circ\_0018478 was detected by means of RT-qPCR and normalized to the value which was detected in the mock group. Circ\_0018478:  $t = 3.421$ ,  $^1P = 0.0267$  vs. RNase R; *HERC4* mRNA:  $t = 5.365$ ,  $^2P = 0.0058$  vs. RNase R. Data are shown as Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ .

图2 AC16中环状RNA circ\_0018478的定位及稳定性

Fig. 2 Localization and stability experiment of circular RNA circ\_0018478 in AC16 cardiomyocytes

## 2.3 Circ\_0018478抑制心肌成纤维细胞的纤维化表型

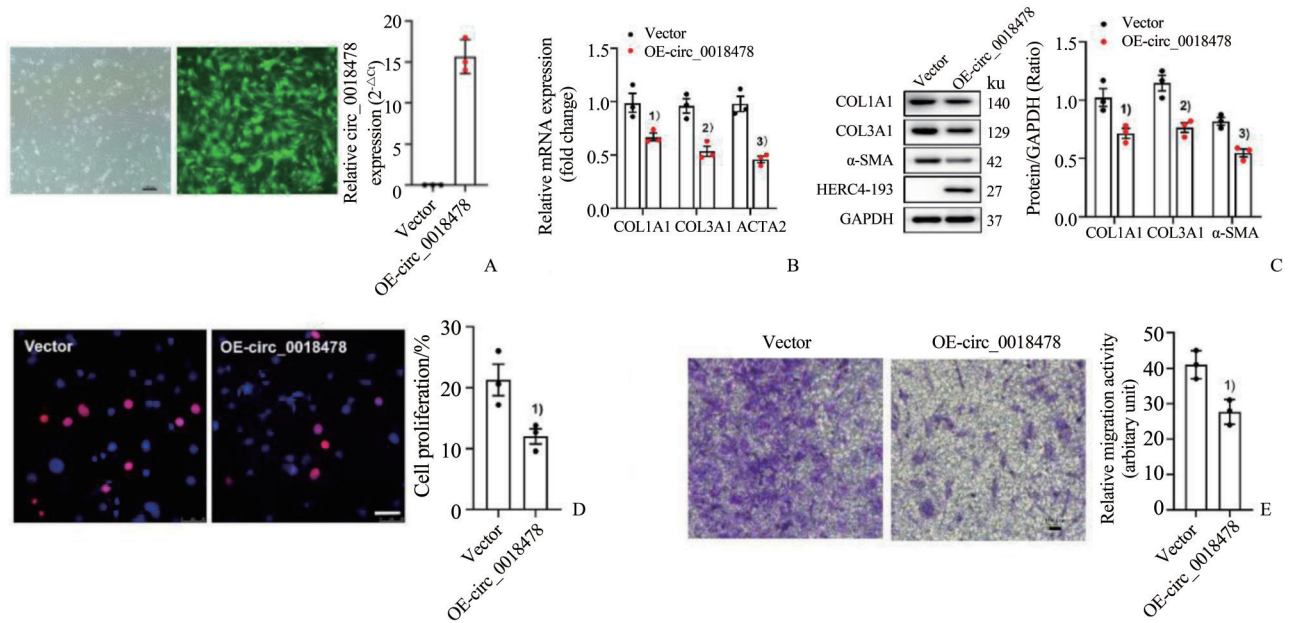
制备并利用重组 circ\_0018478 腺病毒感染小鼠心肌成纤维细胞(mCFs) 24 h后,荧光显微镜下可观察到充分的重组 circ\_0018478 腺病毒携带的绿色荧光蛋白(GFP)表达; RT-qPCR 结果表明 circ\_0018478 在 mCFs 中得到有效的过表达(图 3A)。RT-qPCR 结果显示,过表达 circ\_0018478 24 h 的 mCFs 中纤维化相关基因 Col1a1(I 型胶原蛋白)、Col3a1(III 型胶原蛋白)、Acta2( $\alpha$ 平滑肌肌动

蛋白,  $\alpha$ -SMA) 的表达均被显著抑制(图 3B)。Western blot 结果显示,过表达 circ\_0018478 的 mCFs 中 COL1A1、COL3A1 和  $\alpha$ -SMA 表达降低(图 3C)。EdU 实验结果显示,过表达 circ\_0018478 显著抑制 mCFs 的增殖能力( $P < 0.05$ ; 图 3D)。

Transwell 迁移实验结果显示,过表达 circ\_0018478 可明显抑制 mCFs 的迁移能力( $P < 0.05$ ; 图 3E)。

## 2.4 Circ\_0018478 编码小蛋白 HERC4-193aa

序列分析结果提示 circ\_0018478 包含一个内



A: Expression of GFP in mCFs after infection by rAd-circ\_0018478. Scale bar is 100  $\mu$ m. B: Expression of Col1a1, Col3a1, and Acta2 mRNA in mCFs with overexpression of circ\_0018478. Col1a1:  $t = 3.336$ , <sup>1)</sup> $P = 0.0289$  vs. Vector; Col3a1:  $t = 5.193$ , <sup>2)</sup> $P = 0.0065$  vs. Vector; Acta2:  $t = 6.753$ , <sup>3)</sup> $P = 0.0025$  vs. Vector. C: Protein expression of COL1A1, COL3A1, and  $\alpha$ -SMA in mCFs with overexpression of circ\_0018478. COL1A1:  $t = 3.522$ , <sup>1)</sup> $P = 0.0244$  vs. Vector; COL3A1:  $t = 4.823$ , <sup>2)</sup> $P = 0.0085$  vs. Vector;  $\alpha$ -SMA:  $t = 5.730$ , <sup>3)</sup> $P = 0.0046$  vs. Vector. D: Proliferation of mouse mCFs by Edu assay.  $t = 3.235$ , <sup>1)</sup> $P = 0.0318$  vs. Vector. Scale bar is 50  $\mu$ m. E: Migration of mouse mCFs by trans-well assay.  $t = 3.472$ , <sup>1)</sup> $P = 0.0255$  vs. Vector. Data are shown as Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . Scale bar is 100  $\mu$ m.

图3 Circ\_0018478抑制mCFs的增殖、迁移和纤维化相关基因表达

Fig. 3 Circ\_0018478 inhibited the proliferation and migration of mCFs, and the expression of fibrosis-related genes expression

部核糖体进入位点(IRES)序列和开放阅读框(ORF),预测 circ\_0018478可编码193个氨基酸(Aa)(命名为HERC4-193)(图4A)。在mCFs中过表达 circ\_0018478,用Flag树脂体抗体进行IP实验,PAGE电泳胶银染胶显示在预期翻译蛋白位置(27 ku)有特异条带,蛋白质谱Shot-gun分析可检测出

HERC4-193的肽段序列(图4B)。Western blot结果显示,利用HERC4多抗可在过表达 circ\_0018478的mCFs中检测出HERC4-193的特异表达(图4C)。

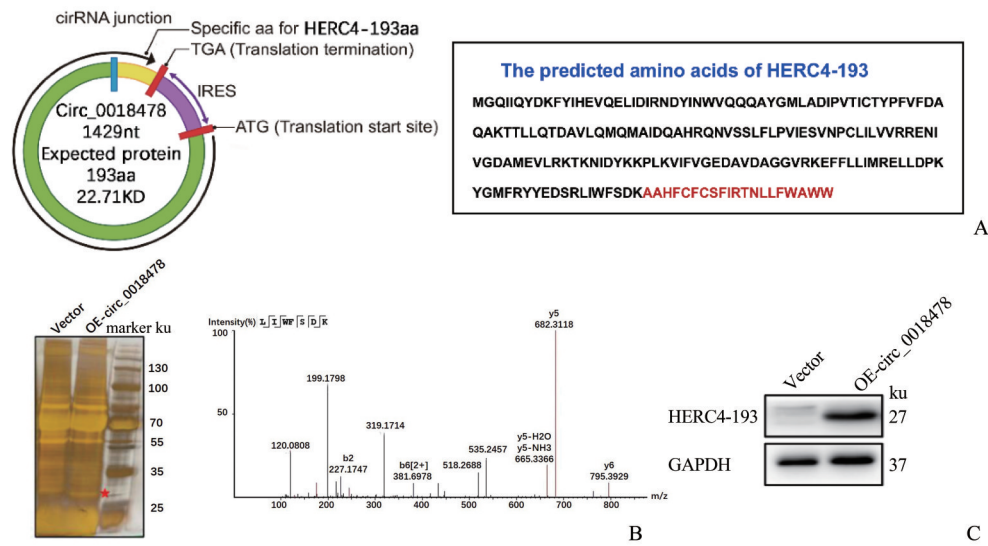
### 2.5 HERC4-193抑制心肌纤维细胞的纤维化表型

构建可表达HERC4-193的重组腺病毒并感染mCFs,Western blot结果显示,过表达 circ\_0018478和HERC4-193可一致地抑制纤维化相关蛋白的COL1A1、COL3A1和 $\alpha$ -SMA表达(图5A)。Edu染色和Transwell细胞迁移实验结果显示,过表达 circ\_0018478和HERC4-193均可有效抑制mCFs增殖和迁移能力(图5B,5C)。利用小干扰RNA(siR-

NA)降低 circ\_0018478的转录本水平,证实抑制HERC4-193表达可有效减弱 circ\_0018478对mCFs中纤维化相关蛋白COL1A1、COL3A1和 $\alpha$ -SMA表达的抑制作用(图5D)。

## 3 讨论

心肌纤维化是一种心肌纤维细胞向肌成纤维细胞表型转化的缓慢且渐进性的过程,在病理形态上主要表现为胶原沉积比例失衡,尤其是I型和III型胶原合成增加,这种病理性反应几乎会发生在所有的心衰患者的心肌中;心肌成纤维细胞激活在短期内有助于缓解心肌损伤的进展,但长时间的持续性激活会影响组织器官的结构功能。在本文中,我们发现在心衰心肌中 circ\_0018478上调,而其宿主基因HERC4的mRNA表达无明显差异,提示 circ\_0018478表达增加不是源于HERC4的表达上调,而是参与 circ\_0018478生成的相关RNA结合蛋白的表达/活性提高的结果。利用腺病毒介导过



A: Circ\_0018478 sequence, the potential IRES, ORF, and the predicted amino acid sequence of HERC4-193. The potential IRES and ORF is shown in purple and green. B: Identification of HERC4-193 expression in mCFs with over-expression of circ\_0018478 by silver staining and mass spectrometry shot-gun assay, respectively. C: Expression of HERC4-193 in mCFs with over-expression of circ\_0018478 by Western blot assay.

图4 Circ\_0018478可翻译出HERC4-193蛋白

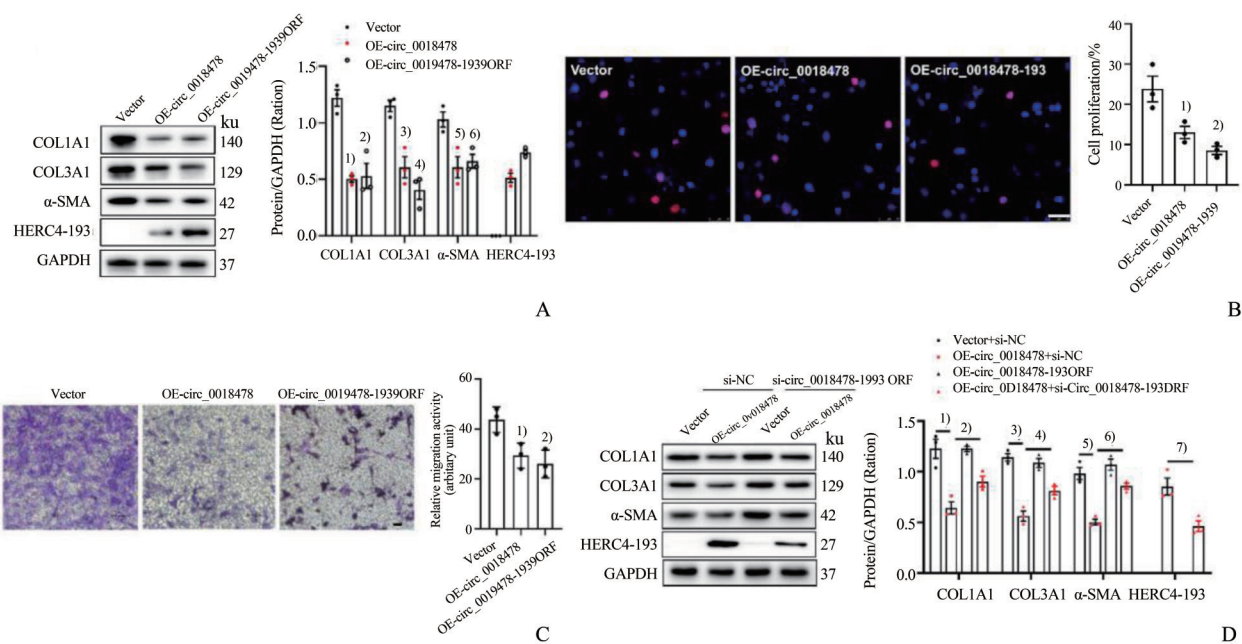
Fig. 4 Circ\_0018478 could translate protein HERC4-193

表达 circ\_0018478 具有抑制 mCFs 中纤维化相关基因表达的作用, 鉴于心肌成纤维细胞的增殖和迁移参与心肌纤维化的发生过程<sup>[23]</sup>, 本文的 EdU 和 Trans-well 细胞迁移实验结果显示过表达 circ\_0018478 可抑制 mCFs 的增殖和迁移, 因此, 我们证实 circ\_0018478 可抑制 mCFs 的纤维化表型, 提示 circ\_0018478 具有抑制心肌纤维化的作用。

CircRNA 在真核细胞中的定位与其发挥生物学作用的机制密切相关<sup>[24]</sup>, 定位于细胞核中的 circRNA 可能协同 RNA 聚合酶 II 参与调控基因的转录过程<sup>[25]</sup>, 而细胞质中的 circRNA 则可以充当 miRNA 的“海绵吸附体”阻抑 miRNA 与靶 mRNA 的结合作用<sup>[11]</sup>, 也可与 RNA 结合蛋白相互作用来调节相关生物学过程<sup>[13]</sup>, 甚至可以翻译相关功能蛋白参与相关信号转导和生物学过程的调节<sup>[15]</sup>。研究发现, 在心脏、肾和肝脏中存在几百种以往未曾检测到的由长链非编码 RNA (lncRNA) 和 circRNAs 翻译的微蛋白<sup>[26-27]</sup>。目前, 有翻译功能的 circRNA 在心肌重构调节方面的报道不多, 有研究表明环形 RNA circNlgn 在心肌重构中表达上调, 而且能通过翻译蛋白 Nlgn173 与 Lamin B 结合入核, 进一步激活 SGK3 和 ING4 启动子参与调控心肌重构过程<sup>[28]</sup>。我们课题组发现 circ\_0036176 可通过编码蛋白 Myo9a-208aa 发挥抑制心肌成纤维细胞增殖的作用<sup>[29]</sup>。

通过序列分析, 提示 circ\_0018478 具有的潜在 ORF 及 IRES 序列, 利用 Flag 标签抗体富集及 MS shot-gun 技术鉴定了翻译蛋白 HERC4-193 的存在, 而用 HERC4 抗体(多抗)可检测到 circ\_0018478 在 mCFs 中表达的 HERC4-193。在功能上, HERC4-193 可与 circ\_0018478 一致性地抑制 mCFs 的增殖、迁移和纤维化相关基因的表达。利用 siRNA 靶向沉默 circ\_0018478 上 HERC4-193 ORF 序列, 能有效减弱 circ\_0018478 抑制 mCFs 的增殖、迁移和纤维化相关基因表达的作用, 表明 circ\_0018478 可能通过翻译 HERC4-193 蛋白发挥抑制 mCFs 纤维化表型的作用。HERC4-193 是在心衰时表达增加的蛋白, 并具有抑制心肌纤维化相关基因表达的作用, 提示 circ\_0018478 翻译的 HERC4-193 是一种内源性的心肌保护性蛋白, 具有减缓心肌纤维化进程的生理意义。

综上, 本文明确了在心衰心肌中的上调表达的 circ\_0018478 可以通过编码蛋白 HERC4-193 发挥抑制 mCFs 心肌纤维化表型的作用, 但针对 HERC4-193 是通过何种分子机制发挥抑制心肌纤维化作用, 尚不明确。我们将后续在细胞和整体水平实验进一步明确 circ\_0018478 调控的下游相关信号通路和靶基因, 为基于 circRNA 为干预靶点的心肌纤维化治疗研究提供科学资料。



A: Expression of fibrosis-related genes in mCFs with over-expression of circ\_0018478 and circ\_0018478-193 ORF, respectively. COL1A1:  $F=26.90$ ,  $P=0.001$  0, <sup>1)</sup> $P=0.001$  2, <sup>2)</sup> $P=0.001$  4 vs. Vector; COL3A1:  $F=24.36$ ,  $P=0.001$  3, <sup>3)</sup> $P=0.004$  7, <sup>4)</sup> $P=0.000$  9 vs. Vector;  $\alpha$ -SMA:  $F=9.505$ ,  $P=0.013$  8, <sup>5)</sup> $P=0.012$  6, <sup>6)</sup> $P=0.022$  7 vs. Vector. B: Proliferation of mouse CFs by EdU assay.  $F=13.88$ ,  $P=0.005$  6, <sup>1)</sup> $P=0.019$  1, <sup>2)</sup> $P=0.003$  9 vs. Vector. Scale bar is 50  $\mu$ m. C: Migration of mouse CFs by transwell assay.  $F=9.593$ ,  $P=0.0135$ , <sup>1)</sup> $P=0.027$  4, <sup>2)</sup> $P=0.011$  1 vs. Vector. Scale bar is 100  $\mu$ m. D: Protein expression of COL1A1, COL3A1, and  $\alpha$ -SMA in mCFs with overexpression of circ\_0018478 and knock-down of HERC4-193ORF. COL1A1:  $F=19.85$ ,  $P=0.000$  5, <sup>1)</sup> $P=0.000$  5, <sup>2)</sup> $P=0.048$  6 vs. Vector+si-NC; COL3A1:  $F=38.66$ ,  $P<0.000$  1, <sup>3)</sup> $P<0.000$  1, <sup>4)</sup> $P=0.008$  7 vs. Vector+si-NC;  $\alpha$ -SMA:  $F=29.81$ ,  $P=0.000$  1, <sup>5)</sup> $P=0.000$  2, <sup>6)</sup> $P=0.001$  5 vs. Vector+si-NC. HERC4-193:  $t=3.928$ ,  $P=0.017$  1 vs. OE-circ\_0018478+si-NC. Data are shown as Mean  $\pm$  SD.  $n=3$ .

图5 Circ\_0018478 翻译的 HERC4-193 抑制 mCFs 的增殖、迁移和纤维化相关基因表达

Fig. 5 Circ\_0018478-translated HERC4-193 inhibited proliferation and migration of mCFs, and the expression of fibrosis-related genes in mCFs

#### 参考文献

- [1] Li L, Zhao Q, Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis[J]. Matrix Biol, 2018, 68-69: 490-506.
- [2] Gupta S, Ge Y, Singh A, et al. Multimodality imaging assessment of myocardial fibrosis[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2021, 14(12):2457-2469.
- [3] Umbarkar P, Ejantkar S, Tousif S, et al. Mechanisms of fibroblast activation and myocardial fibrosis: Lessons learned from FB-specific conditional mouse models[J]. Cells, 2021, 10(9):2412.
- [4] Maruyama K, Imanaka-Yoshida K. The pathogenesis of cardiac fibrosis: a review of recent progress[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(5):2617-2632.
- [5] Achkar A, Saliba Y, Fares N. Differential gender-dependent patterns of cardiac fibrosis and fibroblast phenotypes in aging mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020:8282157.
- [6] Tallquist MD. Cardiac fibroblast diversity [J]. Annu Rev Physiol, 2020, 10(82):63-78.
- [7] Liu M, López de Juan Abad B, Cheng K. Cardiac fibrosis: myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 173:504-519.
- [8] Bao Q, Zhang B, Suo Y, Liu C, et al. Intermittent hypoxia mediated by TSP1 dependent on STAT3 induces cardiac fibroblast activation and cardiac fibrosis [J]. Elife, 2020, 9:e49923.
- [9] Stratton MS, McKinsey TA. Epigenetic regulation of

- cardiac fibrosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 92: 206–213.
- [10] Wilusz JE. Circular RNAs: Unexpected outputs of many protein-coding genes [J]. *RNA Biol*, 2017, 14 (8):1007–1017.
- [11] Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(18): 5609–5612.
- [12] Wen SY, Qadir J, Yang BB. Circular RNA translation: novel protein isoforms and clinical significance [J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28(5):405–420.
- [13] Huang A, Zheng H, Wu Z, Chen M, Huang Y. Circular RNA-protein interactions: functions, mechanisms, and identification [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (8):3503–3517.
- [14] Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circRNAs [J]. *The EMBO Journal*, 2019, 38 (16):e100836.
- [15] Tang X, Guo M, Ding P, et al. BUB1B and circBUB1B\_544aa aggravate multiple myeloma malignancy through evoking chromosomal instability [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):361.
- [16] Meng L, Zhang Y, Wu P, et al. CircSTX6 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression by sponging miR-449b-5p and interacting with CUL2 [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):121–134.
- [17] An M, Zheng H, Huang J, et al. Aberrant nuclear export of circNCOR1 underlies SMAD7-mediated lymph node metastasis of bladder cancer [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(12):2239–2253.
- [18] Yousefi F, Soltani BM. Circular RNAs as potential theranostics in the cardiac fibrosis [J]. *Heart Fail Rev*, 2021, 26(1):195–203.
- [19] 温艺红, 杨真祯, 张铭, 等. CircRNA\_100395 通过结合 miR-144-3p 抑制心肌成纤维细胞中纤维化相关基因的表达 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2020, 41(6):875–883.
- Wen YH, Yang ZZ, Zhang M, et al. CircRNA\_100395 inhibits expression of myocardial fibrosis-related genes in human atrial myofibroblasts via sponging miR-144-3p [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41(6):875–883.
- [20] Zaiou M. Circular RNAs in hypertension: challenges and clinical promise [J]. *Hypertens Res*, 2019, 42 (11):1653–1663.
- [21] Li M, Ding W, Liu G, et al. Extracellular circular RNAs act as novel first messengers mediating cell cross-talk in ischemic cardiac injury and myocardial remodeling [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2022, 15 (3):444–455.
- [22] 黄智琪, 严钰敏, 郭晶, 等. 环状RNA circ\_0036176 结合 miR-218-5p 发挥抑制心肌纤维化的作用 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(1):61–69.
- Huang ZQ, Yan YM, Guo J, et al. Circular RNA circ\_0036176 inhibiting myocardial fibrosis via sponging miRNA-218-5p [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(1):61–69.
- [23] Tao H, Shi KH, Yang JJ, et al. Epigenetic regulation of cardiac fibrosis [J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (9): 1932–1938.
- [24] Li X, Liu CX, Xue W, et al. Coordinated circRNA biogenesis and function with NF90/NF110 in viral infection [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(2):214–227.
- [25] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3):256–264.
- [26] van Heesch S, Witte F, Schneider-Lunitz V, et al. The translational landscape of the human heart [J]. *Cell*, 2019, 178(1):242–260.
- [27] 孙帅锋, 刘巍. circRNA 在心肌纤维化中的研究进展 [J]. *新医学*, 2020, 51(7):493–496.
- Sun SF, Liu W. Research progress on circRNA in myocardial fibrosis [J]. *New Med*, 2020, 51(7): 493–496.
- [28] Du WW, Xu J, Yang W, et al. A neuroligin isoform translated by circNlgn contributes to cardiac remodeling [J]. *Circ Res*, 2021, 129(5):568–582.
- [29] Guo J, Chen LW, Huang ZQ, et al. Suppression of the inhibitory effect of circ\_0036176-translated Myo9a-208 on cardiac fibroblast proliferation by miR-218-5p [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2022, 15(3): 548–559.

(编辑 孙慧兰)