

·基础研究·

## 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

陈丽文<sup>1</sup>, 郭晶<sup>2</sup>, 陈泽润<sup>3</sup>, 朱杰宁<sup>1</sup>, 徐金东<sup>1</sup>, 郭惠明<sup>1</sup>, 单志新<sup>1,2,3</sup>, 王晟<sup>1</sup>

(1. 广东省心血管病研究所//广东省人民医院//广东省医学科学院, 广东广州 510080; 2. 华南理工大学医学院, 广东广州 510006; 3. 南方医科大学第二临床医学院, 广东广州 510280)

**摘要:**【目的】研究微小RNA microRNA-99b-5p(miR-99b-5p)对心肌细胞肥大表型的调节作用及机制。【方法】实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测人心肌组织(包括健康对照者、心力衰竭患者心肌组织)以及横向主动脉缩窄(TAC)手术小鼠心肌中miR-99b-5p的表达水平。血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)处理原代乳小鼠心肌细胞(NMVCs)后,利用鬼笔环肽染色呈现心肌细胞大小,RT-qPCR检测miR-99b-5p表达水平。利用RT-qPCR及蛋白质免疫印迹法检测转染miR-99b-5p mimic对NMVCs中肥大相关基因及成纤维细胞生长因子21(Fgf21)表达的影响。双萤光素酶报告实验验证miR-99b-5p与Fgf21基因3'端非翻译区(3'UTR)的结合作用。利用腺病毒介导在NMVCs中过表达Fgf21及超氧化物歧化酶2(Sod2),并利用小干扰RNA(siRNA)敲低NMVCs中Fgf21和Sod2表达,研究Fgf21/Sod2轴是否介导miR-99b-5p对心肌细胞肥大表型的调节作用。【结果】MiR-99b-5p在心衰患者心肌组织、TAC术后的鼠心肌组织及在AngⅡ处理的心肌细胞中均表达上调( $P<0.01$ )。MiR-99b-5p可促进NMVCs中与肥大相关基因的表达( $P<0.01$ )。双萤光素酶报告基因实验证实miR-99b-5p与Fgf21基因的3'UTR存在结合作用,并且miR-99b-5p可抑制Fgf21及其下游基因Sod2表达( $P<0.05$ )。在NMVCs中过表达Fgf21或Sod2均可有效逆转miR-99b-5p的促心肌细胞肥大作用( $P<0.05$ )。【结论】MiR-99b-5p在肥厚心肌中表达增加,并通过Fgf21/Sod2轴发挥促进心肌细胞肥大的作用。

**关键词:**心肌细胞肥大;微小RNA-99-5p;成纤维细胞生长因子21

中图分类号:R363.2 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2022)02-0192-11

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0204

## MicroRNA-99b-5p Aggravates Cardiomyocyte Hypertrophy by Down-regulating Fgf21

CHEN Li-wen<sup>1</sup>, GUO Jing<sup>2</sup>, CHEN Ze-run<sup>3</sup>, ZHU Jie-ning<sup>1</sup>, XU Jin-dong<sup>1</sup>,  
GUO Hui-ming<sup>1</sup>, SHAN Zhi-xin<sup>1,2,3</sup>, WANG Sheng<sup>1</sup>

(1. Guangdong Cardiovascular Institute//Guangdong Provincial People's Hospital // Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 3. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China.)

Correspondence to: SHAN Zhi-xin, E-mail: shanzhixin@gdph.org.cn; WANG Sheng, E-mail: shengwang\_gz@163.com

**Abstract:**【Objective】To explore the role of microRNA-99b-5p (miR-99b-5p) in cardiomyocyte hypertrophy and the related mechanism involved.【Methods】The expression of miR-99b-5p in myocardium was detected by real-time quan-

收稿日期:2021-09-24

基金项目:国家自然科学基金(82070254, 81770264);广州市科技计划项目(202002030039, 202102080093);广东省自然科学基金(2021A1515011554);广东省人民医院心血管专项(2020XXG003)

作者简介:陈丽文,硕士生,研究方向:心肌肥厚分子调控机制,E-mail: 15802031643@163.com;单志新,通信作者,研究员,博士生导师,研究方向:心肌重构和心肌保护,E-mail: shanzhixin@gdph.org.cn;王晟,通信作者,主任医师,博士生导师,研究方向:心肌保护,E-mail: shengwang\_gz@163.com

titative PCR (RT-qPCR) in the myocardium of patients with heart failure (HF) and healthy controls, as well as in the myocardium of mouse model of transverse aortic restriction (TAC)-induced cardiac hypertrophy. Phalloidin-iFluor 647 staining was used to show the size of neonatal mouse ventricular cardiomyocytes (NMVCs) after Ang II treatment. MiR-99b-5p expression was determined by RT-qPCR in Ang II-treated NMVCs. After transfection with miR-99b-5p mimic, the expression of cardiac hypertrophy-associated genes and Fgf21 in NMVCs was detected by RT-qPCR and Western blot assay, respectively. We identified the interaction between miR-99b-5p and the 3' UTR of Fgf21 mRNA by dual luciferase reporter assay. The recombinant Fgf21 adenovirus (rAd-Fgf21) and rAd-Sod2 were used to infect NMVCs, and the expression of  $\beta$ -MHC, ANP, FGF21 and SOD2 was detected by Western blot assay. We knocked down Fgf21 and Sod2 in NMVCs to investigate the role of FGF21/Sod2 axis in miR-99b-5p-regulated NMVC hypertrophy. [Results] MiR-99b-5p expression was elevated in the myocardium of HF patients and TAC-operated mice, and in Ang II-treated NMVCs ( $P < 0.01$ , respectively). MiR-99b-5p promoted the expression of hypertrophy-related genes in NMVCs ( $P < 0.01$ ). Results of dual luciferase reporter gene assay revealed the interaction between miR-99b-5p and Fgf21 mRNA. MiR-99b-5p down-regulated the expression of Fgf21 and the down-stream gene of Sod2 ( $P < 0.01$ ). Overexpression of FGF21 or SOD2 could inhibit NMVC hypertrophy and effectively reversed the pro-hypertrophy effect of miR-99b-5p on NMVCs ( $P < 0.05$ , respectively). [Conclusion] MiR-99b-5p is up-regulated in the hypertrophic myocardium and enhances cardiomyocyte hypertrophy via suppressing Fgf21/Sod2 axis.

**Key words:** cardiomyocyte hypertrophy; miR-99b-5p; fibroblast growth factor 21

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43 (2): 192-202]

近年来,我国心血管疾病引发的死亡率和发病率仍呈增长趋势<sup>[1]</sup>。心肌肥厚是多种心血管疾病发生的病理基础,主要表现为心肌细胞在长度和宽度上的改变,即心肌细胞肥大,而非数量上的增加<sup>[2]</sup>。心肌细胞发生病理性肥大时会出现心脏胎儿基因的重新激活和表达,如心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 以及  $\beta$  肌球蛋白重链 ( $\beta$  myosin heavy chain,  $\beta$ -MHC) 等的编码基因<sup>[3]</sup>。在心肌肥厚的早期阶段,心肌收缩力增加是一种短期的适应机制,而持续的刺激将导致适应性不良的心脏重构,并最终发展为心力衰竭<sup>[4]</sup>。目前,心肌肥厚及后续转变为心力衰竭的确切分子机制尚未明确,有待进一步的研究证实。越来越多的研究表明微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与调节心肌细胞的肥大<sup>[5]</sup>。MicroRNA 通过与靶基因 mRNA 结合,抑制靶基因的翻译,进而发挥调节相关生物学过程的重要作用<sup>[6]</sup>。多种 microRNA 可靶向调节与心脏疾病相关的基因表达<sup>[6-7]</sup>,如心肌特异性敲除 miR-22 可减轻应激诱导的心肌肥厚<sup>[8]</sup>; miR-206 可被 YAP 上调,并介导 YAP 诱导的心肌细胞肥大<sup>[9]</sup>。

我们以往的研究证实 miR-199a-3p 和 miR-199b-5p 可分别通过结合 Rb-1 和 CDK9,发挥促进心肌细胞肥大的作用<sup>[10-11]</sup>。成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, Fgf21) 是一种可在多种的组织器官中表达并发挥多种起生物学功能的分泌蛋白<sup>[12]</sup>。有研究显示在异丙肾上腺素诱导肥厚的小鼠心肌,增加 Fgf21 表达能够减轻小鼠心肌肥厚的发生,其可能机制是 Fgf21 通过增加 SIRT1 表达来减弱血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导的心肌肥厚<sup>[13]</sup>,但 Fgf21 发挥心脏保护作用的分子机制尚不完全清楚。我们的前期工作已证实 circRNA\_005647 可作为分子海绵吸附 miR-99b-5p 来抑制心肌细胞发生肥大<sup>[14]</sup>,但 miR-99b-5p 在心肌肥大中的具体作用机制尚不明确。本文旨在探讨 miR-99b-5p 对小鼠心肌细胞 (neonatal mouse ventricular cardiomyocytes, NMVCs) 肥大相关基因表达的促进作用,并阐明 Fgf21 是否介导 miR-99b-5p 发挥对心肌肥大表型的调节作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 组织标本

利用 RT-qPCR 检测并比较心衰(heart failure, HF)患者、健康器官捐献者心肌组织标本中 miR-99b-5p 的表达水平。临床患者组织样本由广东省心血管病研究所提供,开展的实验均经过广东省人民医院伦理委员会审批[批准号 No. GDREC201923 8H(R1)],心衰及健康对照患者病例资料信息同以往报道<sup>[15]</sup>。

### 1.2 实验动物

C57BL/6 乳小鼠(出生日龄 1~3 d,雌雄不限)和 8 周的性成熟雄性 C57BL/6 小鼠由广州中医药大学实验动物中心提供,属于无特定病原体级别动物。开展的动物实验通过广东省人民医院伦理委员会审批[批准号:粤医科伦理 2017015A 号],实验动物许可证号为 SCXK(粤) 2013-0034。

### 1.3 主要试剂

TRIzol 总 RNA 提取裂解液(Invitrogen);逆转录试剂(TaKaRa);miR-99b-5p、U6、Fgf21 等序列引物(Invitrogen);2× SYBR Green Pro Taq HS Premix(艾科瑞);DMEM/F-12 无血清培养基、0.25% EDTA 胰蛋白酶(Gibco)、特级澳洲胎牛血清;细胞转染试剂 Lipofectamine 2000、Oligofectamine(Invitrogen);miR-99b-5p mimic、Fgf21 siRNA、超氧化物歧化酶 2(Superoxide dismutase, Sod2) siRNA(广州锐博);RIPA 蛋白裂解缓冲液(碧云天);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天);4×loading buffer、蛋白 marker 26616(Thermo Fisher Scientific);BCA 蛋白浓度测定试剂盒;PVDF 膜(Whatman);抗心房钠尿肽抗体(Bioworld);抗 β 肌球蛋白重链抗体(Sigma);抗 FGF21 抗体(SAB 公司);抗 SOD2 抗体(Cell Signaling Technology)、抗 GAPDH 抗体(Protein Technology);荧光素酶活性检测试剂盒(Promega);抗氧化剂 N-Acetyl-L-cysteine(MCE 公司)等。

### 1.4 主要方法

1.4.1 原代乳小鼠心肌细胞的分离与培养 取 SPF 级 C57BL/6 乳小鼠心脏于高压灭菌后的 PBS 溶

液中漂洗去除残血,并修剪去除血管等其他组织,转移至干净的离心管中,加入 0.25% EDTA 胰蛋白酶及 PBS 溶液,于 4 °C 摇床 10 h。次日于装有乳小鼠心脏的离心管加入完全培养基,放入 37 °C 中温浴 10 min 停止消化。巴氏管将心脏吸至新的离心管,加入不含血清的细胞培养基及胶原酶 II,37 °C 中轻摇 10 min。待组织吹散后加入完全培养基进行离心,用干净 PBS 溶液重悬下面一层的细胞后,经滤网(70 μm 孔径)过滤至新的离心管里后进行离心,重旋转至培养瓶。1.5 h 后将瓶中的悬液吸出,分至细胞培养板中培养。

1.4.2 C57BL/6 小鼠横向主动脉弓缩窄模型建立 利用横向主动脉弓缩窄(transverse aortic restriction, TAC)法建立小鼠心肌肥厚模型。将小鼠置于诱导麻醉盒中,2% 异氟烷吸入诱导麻醉,麻醉后仰卧位固定,以第二肋骨为中心剪开表皮,从第二肋骨与胸骨连接处剪开暴露主动脉弓,于无名动脉和左颈总动脉结扎主动脉弓,待小鼠情况稳定后缝合,术后进行连续 3 周的观察和饲养。

1.4.3 原代乳小鼠心肌细胞转染 miR-99b-5p 和 siRNA 将 NMVCs 于 12 孔细胞培养板稳定培养后,在 EP 管中加入 Oligofectamine(1.75 μL/孔)与无血清培养基混合,在另外的 EP 管中加入 mimic 或 siRNA(100 nmol/L)与无血清培养基混合,将 Oligo 与 mimic 或 siRNA 轻轻混匀,静置包裹 15 min。将 NMVCs 用 PBS 缓冲液清洗后更换为含 3% 血清的培养基,再加入包裹好的混合物,置于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱培养 36 h。

1.4.4 Fgf21 和 Sod2 重组腺病毒的构建和包装 参照已报道方法<sup>[16]</sup>,分别将小鼠 Fgf21 和 Sod2 基因编码区序列定向插入 pAd-Track-cmv 载体,并进行后续的相应重组腺病毒质粒载体构建和重组腺病毒的包装及扩增。实验时以 rAd-GFP 作为对照组腺病毒(rAd-Fgf21、rAd-Sod2 和 rAd-GFP 的 MOI 均是 5)。

1.4.5 麦胚凝集素染色 麦胚凝集素(triticum vulgaris lectin, WGA)染色参照我们已报道的方法<sup>[15]</sup>,并略有改进。

1.4.6 实时荧光定量 PCR TRIzol 法提取 NMVCs

或小鼠心肌组织总RNA, 20  $\mu$ L mRNA 逆转录体系中加入5 $\times$ Prime Script RT Master Mix 4  $\mu$ L以及1.0  $\mu$ g总RNA模板进行逆转录, 获得相应的cDNA, 以GAPDH为内参照检测相关基因mRNA表达水平。MiRNA成熟体逆转录体系中加入5 $\times$ PrimeScript RT Buffer、RT Enzyme Mix、miR-99b-5p RT引物、U6 RT引物, 以1.0  $\mu$ g总RNA为模板进行成熟体逆转录, 获得相应产物用于检测miR-99b-5p表达水平。利用ViiA 7 Quantitative PCR System (Applied Biosystems)进行实时荧光定量PCR并分析得到的实验结果。计算相应的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值, 比较不同实验组间miR-99b-5p、Fgf21以及肥大相关基因的表达水平。相应的引物序列列于表1。

1.4.7 蛋白质免疫印迹法 利用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解细胞培养板中的NMVCs或小鼠心肌组织(组织需进行研磨)后, 高速离心, 测蛋白浓度。等质量分装蛋白后再与4 $\times$ SDS loading buffer震荡混匀, 放入99  $^{\circ}$ C进行变性10 min。按相应的分组, 将样品加入凝胶梳孔中, 电泳分出大小差异的蛋白。取出凝胶后, 在电转缓冲液中将蛋白转印至PVDF膜上。封闭后利用相应的一抗[ $\beta$ -MHC (1: 1 000)、ANP (1: 1 000)、FGF21 (1: 2

000)、SOD2 (1: 1 000)、GAPDH (1: 5 000)] 孵育4  $^{\circ}$ C过夜, TBST液清洗后敷上相应的二抗, 1 h后TBST再次清洗, 即可进行化学发光反应。

1.4.8 双荧光素酶报告基因检测 将Fgf21的3' UTR序列及其与miR-99b-5p潜在的结合位点突变后的3' UTR序列分别构建入pGL3-promoter载体中。在构建好重组质粒后, 将相应质粒pGL3-promoter-Fgf21、pGL3-promoter-Fgf21-mut以及miR-99b-5p mimic与内参照pRL-TK质粒共转染至HEK293细胞中, 24 h后测定萤火虫荧光素酶(FL)和海肾荧光素酶(RL)的活性。通过计算比较FL/RL比值的大小, 判断miR-99b-5p与Fgf21的结合作用。

1.4.9 鬼笔环肽染色 将原代乳小鼠心肌细胞于Confocal皿中培养, 进行实验干预后, 用干净PBS清洗。在皿中加入40 g/L多聚甲醛溶液进行固定。然后更换成PBS溶液, 置于摇床上轻轻漂洗。接下来, 配制0.1% TritonX-100透化液, 加入皿中透化处理细胞, 再次漂洗。加入鬼笔环肽工作液后避光, 细胞染色60 min。染色完成用PBS洗后, 加入含DAPI封片剂, 在4  $^{\circ}$ C冰箱用锡箔纸避光保存, 待激光共聚焦显微镜观察心肌细胞形态。

表1 PCR引物序列

Table 1 The sequences of the primers for PCR

Gene	The primer sequence (5'-3')	Product/bp
<i>Myh7</i>	F, GACCAGATGAATGAGCACCG	203
	R, TCCTCCAGTTGCCTCTTGAG	
<i>Nppa</i>	F, GAGGTGCCTCCCTGGACTG	191
	R, TCTGGGCTCCAATCCTCTGA	
<i>Fgf21</i>	F, TACCAAGCATACCCCATCCC	205
	R, GGATTTGAATGACCCCTGGC	
<i>GAPDH</i>	F, CAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	200
	R, CCACCCTGTTGCTGTAGCC	
<i>miR-99b-5p</i>	RT, GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACCGCAAGGT	70
	F, CACCCGTAGAACCGACCTTGCC	
	R, GTGCGTGTCTGGAGTC	
<i>U6</i>	RT, GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGAC	160
	F, GTCCGCGTCTCGCTTCGGCAGC	
	R, GTGCGTGTCTGGAGTC	

## 1.5 统计学方法

图像处理软件 Image J 分析蛋白条带,利用 GraphPad Prism8、SPSS 21.0 进行统计分析。计量资料结果用均数 $\pm$ 标准差表示。两组间比较采用 *t* 检验;方差不齐的两组数据比较用 Welch's *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析;采用 Bonferroni 校正的 *t* 检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$  时,差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MiR-99b-5p 在发生肥厚的心肌中表达增加

与对健康捐献者心肌相比,WGA 染色显示心衰患者心肌细胞的横截面积明显增大( $P < 0.001$ ;图 1A),同时心衰患者心肌中 miR-99b-5p 表达水平显著升高( $P < 0.05$ ;图 1B)。我们将 C57BL/6 小鼠分为假手术组(Sham)和 TAC 手术组,并进行相应的手术处理。WGA 染色显示 TAC 手术小鼠心肌细胞的横截面积明显增大( $P < 0.01$ ;图 1C),并且 TAC 手术小鼠心肌中 miR-99b-5p 水平显著增加( $P < 0.01$ ;图 1D)。我们用 Ang II 进行处理 NMVCs,建立心肌细胞肥大模型。鬼笔环肽染色显示,Ang II 处理的 NMVCs 细胞明显增大( $P < 0.05$ ;图 1E),RT-qPCR 结果显示发生肥大的 NMVCs 中 miR-99b-5p 水平显著上调( $P < 0.01$ ;图 1F)。

### 2.2 MiR-99b-5p 促进原代乳小鼠心肌细胞中肥大相关基因表达

鬼笔环肽染色结果显示转染 miR-99b-5p mimic 的 NMVCs 细胞面积明显增大( $P < 0.05$ ;图 2A)。RT-qPCR 和 Western blot 检测发现,转染 miR-99b-5p mimic 的 NMVCs 中肥大相关基因 Myh7 和 Anp 表达显著增加( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ;图 2B、2C)。

### 2.3 MiR-99b-5p 靶向 Fgf21 发挥促进 NMVCs 中心肌肥大相关基因表达的作用

生物信息学分析(<https://www.mirbase.org/>;<https://starbase.sysu.edu.cn/>)结果提示 Fgf21 基因的 3' UTR 存在与 miR-99b-5p 潜在结合的位点(图 3A)。进一步的双萤光素酶报告基因实验证实

miR-99b-5p 与 Fgf21 3' UTR 间结合作用,经单因素方差分析,四组间差异有统计学意义( $F=4.976, P=0.0117$ ),采用 Bonferroni 法进一步作两两比较,发现 miR-99b-5p 与 Fgf21 3' UTR 间存在特异结合作用( $P < 0.01$ ),而突变 3' UTR 的相应结合序列后,miR-99b-5p 则不能降低萤光素酶的活性(图 3B)。RT-qPCR 结果显示,Fgf21 mRNA 在心衰病人心肌中表达降低,但差异无统计学意义(图 3C),而 Fgf21 mRNA 在 TAC 手术诱导肥厚的小鼠心肌中表达显著降低( $P < 0.05$ ;图 3D)。转染 miR-99b-5p mimic 可在 RNA 和蛋白水平抑制 NMVCs 中 Fgf21 表达( $P < 0.01$ ;图 3E、3F)。

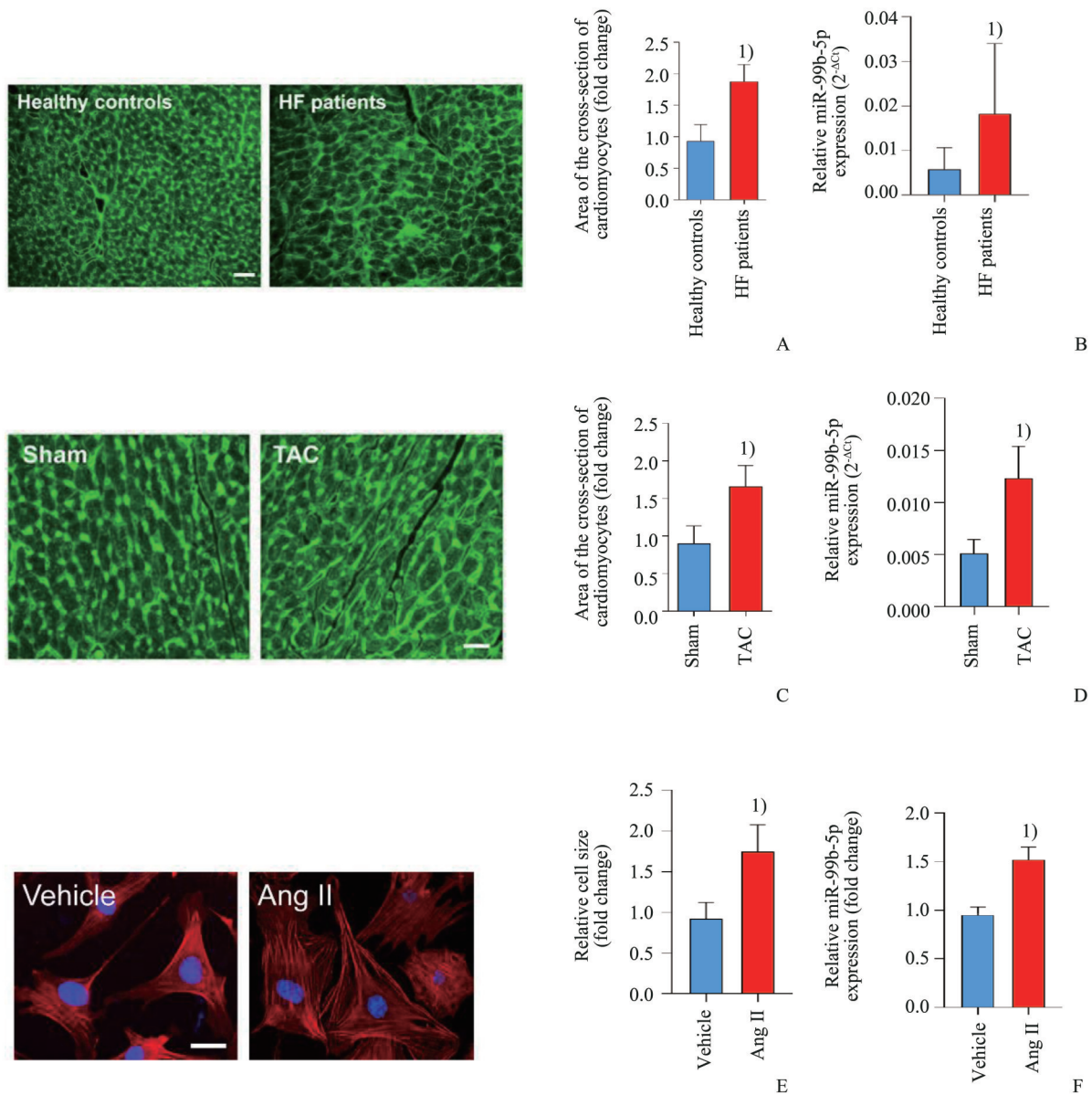
Western blot 结果显示,Fgf21 siRNA 和 miR-99b-5p mimic 可一致性地增强 NMVCs 中  $\beta$ -MHC 和 ANP 蛋白表达( $P < 0.0001$ ;图 3G)。而利用腺病毒介导在 NMVCs 过表达 Fgf21 可显著抑制 NMVCs 中肥大相关基因 Myh7 和 Anp 表达( $P < 0.001$ ),并逆转 miR-99b-5p 对心肌细胞肥大相关基因表达的促进作用( $P < 0.0001$ ;图 3H)。

### 2.4 Fgf21/Sod2 轴介导 miR-99b-5p 促进 NMVCs 中心肌肥大相关基因表达作用

Western blot 结果显示,ROS 抑制剂 NAC 与 Fgf21 能一致地有效逆转 miR-99b-5p 促心肌细胞肥大的作用( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ;图 4A)。利用腺病毒介导过表达 Fgf21 和 Sod2 均能显著抑制 NMVCs 中  $\beta$ -MHC 和 ANP 表达( $P < 0.01$ ),并且 Fgf21 可增加 NMVCs 中 SOD2 表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.0001$ ;图 4B)。用 siRNA 敲减 Fgf21 的 NMVCs 中 SOD2 表达显著降低( $P < 0.0001$ ),而沉默 Fgf21 和 Sod2 表达则可与 miR-99b-5p mimic 一致地促进 NMVCs 中  $\beta$ -MHC 和 ANP 的表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ;图 4C)。

## 3 讨论

在本文中,我们证实 miR-99b-5p 在心力衰竭患者心肌、TAC 诱导的小鼠心肌以及 Ang II 诱导的心肌肥厚细胞模型中均表达增强,提示 miR-99b-5p 可能参与心肌肥厚的过程。功能实验的结果证



A: WGA staining assay of the myocardium of patients with heart failure (HF). The scale bar is 50  $\mu\text{m}$ ;  $t = 5.802$ ,  $1) P = 0.0004$  vs. Healthy controls. B: Expression of miR-99b-5p in myocardial tissue of HF patients and healthy controls by RT-qPCR assay.  $F$  test  $F = 2.666$ ,  $P = 0.0440$ , Unpaired  $t$  test with Welch's correction,  $1) P = 0.0149$  vs. Healthy controls. C: WGA staining assay of the myocardium of mice subjected to TAC surgery. The scale bar is 50  $\mu\text{m}$ ;  $t = 4.803$ ,  $1) P = 0.0014$  vs. Sham group. D: Expression of miR-99b-5p in the myocardium of mice subjected to TAC surgery by RT-qPCR assay.  $t = 4.946$ ,  $1) P = 0.0011$  vs. Healthy controls. E: Phalloidin-iFluor 647 staining of Ang II-induced hypertrophic NMVCs. The scale bar is 50  $\mu\text{m}$ ;  $t = 3.773$ ,  $1) P = 0.0195$  vs. Sham group. F: Expression of miR-99b-5p in Ang II-induced NMVCs by RT-qPCR assay.  $t = 6.738$ ,  $1) P = 0.0025$  vs. Vehicle control. Data are presented as Mean  $\pm$  SD.  $n = 5$  in A,  $n = 17$  for group of Healthy controls, and  $n = 28$  for group of HF patients in B,  $n = 5$  in C and D,  $n = 3$  in E and F.

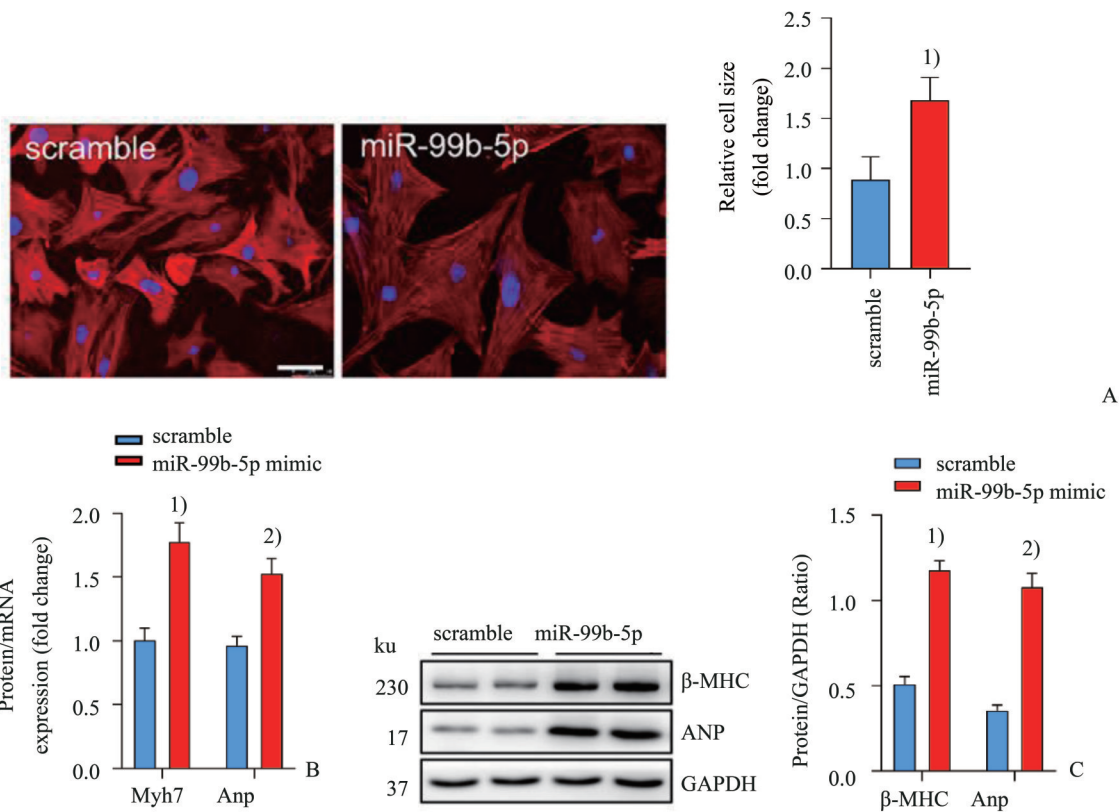
图1 miR-99b-5p在肥厚心肌中表达增加

Fig. 1 Upregulation of miR-99b-5p in the hypertrophic myocardium

实转染 miR-99b-5p 可特异增加小鼠心肌细胞面积和心肌肥大相关基因表达,具有促进心肌细胞肥大的作用。本研究明确了介导 miR-99b-5p 发挥促心肌细胞肥大作用的下游靶基因,为阐明 circRNA\_

005647 通过结合 miR-99b-5p 来抑制心肌细胞肥大的作用机制提供科学依据。

已有研究显示 miR-99b-5p 参与人成骨细胞增殖、骨关节炎以及非小细胞肺癌转移等过程<sup>[17-19]</sup>,



A: Phalloidin-iFluor 647 staining of miR-99b-5p-induced hypertrophic NMVCs. The scale bar is 50  $\mu\text{m}$ ;  $t = 4.372$ , 1)  $P = 0.012$  0 vs. scramble. B: MRNA expression of Myh7 and Anp in miR-99b-5p-modified NMVCs by RT-qPCR assay. Myh7 mRNA:  $t = 4.462$ , 1)  $P = 0.002$  1 vs. scramble; Anp mRNA:  $t = 4.225$ , 2)  $P = 0.002$  9 vs. scramble. C: Protein expression of  $\beta$ -MHC and ANP in miR-99b-5p-modified NMVCs by Western blot assay.  $\beta$ -MHC:  $t = 8.120$ , 1)  $P < 0.000$  1 vs. scramble; ANP:  $t = 4.225$ , 2)  $P = 0.002$  9 vs. scramble. Data are presented as Mean  $\pm$  SD.  $n = 5$ .

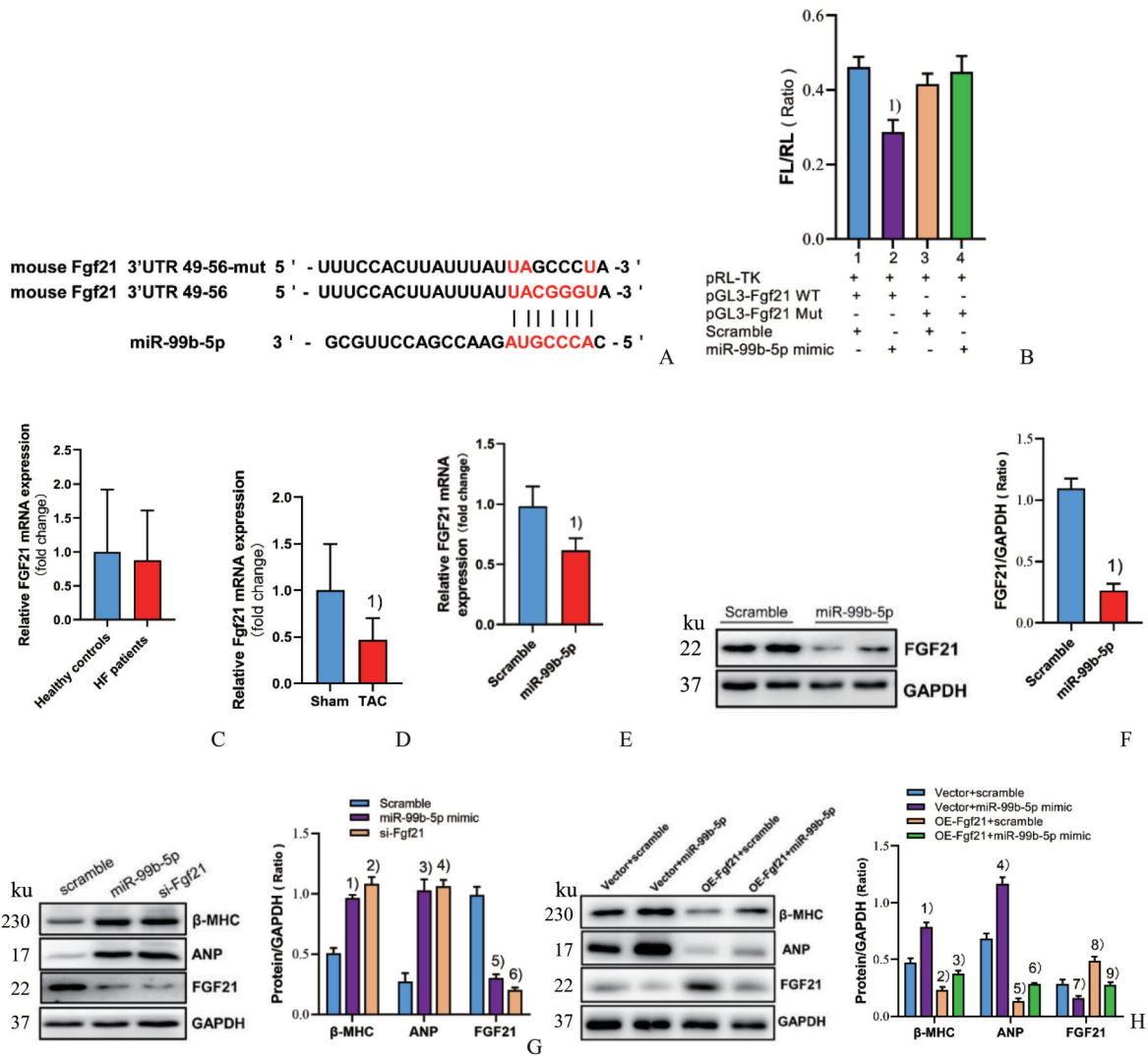
图2 miR-99b-5p促进NMVCs中心肌肥大相关基因表达

Fig. 2 MiR-99b-5p enhances hypertrophy-related gene expression in NMVCs

但尚未见 miR-99b-5p 参与心肌细胞相关表型调控的报道。我们通过 miRNA 数据网站的 TargetScan、miRanda 和 PicTar 等软件共同预测到 Fgf21 是 miR-99b-5p 的潜在靶基因, 鉴于已有报道显示 Fgf21 可以调控 miR-143<sup>[20]</sup> 和 miR-27b<sup>[21]</sup> 发挥调节心血管疾病进程的作用, 但尚未见有关 miRNA 调控 Fgf21 表达的报道, 因而本文拟探讨 miR-99b-5p 是否可通过调节 Fgf21 表达发挥促进心肌细胞肥大作用。本文通过双萤光素酶报告基因实验显示 miR-99b-5p 可与 Fgf21 基因的 3' UTR 特异结合, 并明确 miR-99b-5p 可在转录水平抑制 Fgf21 表达。基于心衰病人心肌和 TAC 小鼠心肌中 miR-99b-5p 和 Fgf21 mRNA 表达的检测结果显示两者在心肌肥厚过程中表达负相关。功能实验验证在细胞水平敲减 Fgf21 可与 miR-99b-5p 一致性地抑制心肌细胞肥大表型, 而过表达 Fgf21 可有效逆转 miR-99b-

5p 的促心肌细胞肥大作用, 因此 Fgf21 介导了 miR-99b-5p 的促进心肌细胞肥大作用。本文上述结果与以往 Fgf21 具有抑制心肌细胞肥大作用的报道相符<sup>[13]</sup>。

长时间的病理性刺激可加重心肌的氧化损伤, 而氧自由基清除剂和抗氧化剂可以减轻氧化应激所致的亚细胞功能缺损和心脏功能的降低<sup>[22]</sup>。已有研究证实 Fgf21 可减轻心肌受到的氧化损伤作用<sup>[23]</sup>, 因此本文试图明确 miR-99b-5p 是否通过靶向 Fgf21 来调节心肌细胞的氧化应激和肥大表型。我们发现抗氧化剂 NAC 和过表达 FGF21 均能一致抑制 miR-99b-5p 的促心肌细胞肥大的作用, 提示 miR-99b-5p 通过增加氧化应激途径来促进心肌细胞肥大。既往研究表明, SOD2 是细胞线粒体内中和超氧阴离子自由基 ( $\cdot\text{O}_2$ ) 的主要抗氧化酶, 在维持正常心脏功能和抑制心肌肥厚表型中发挥重要



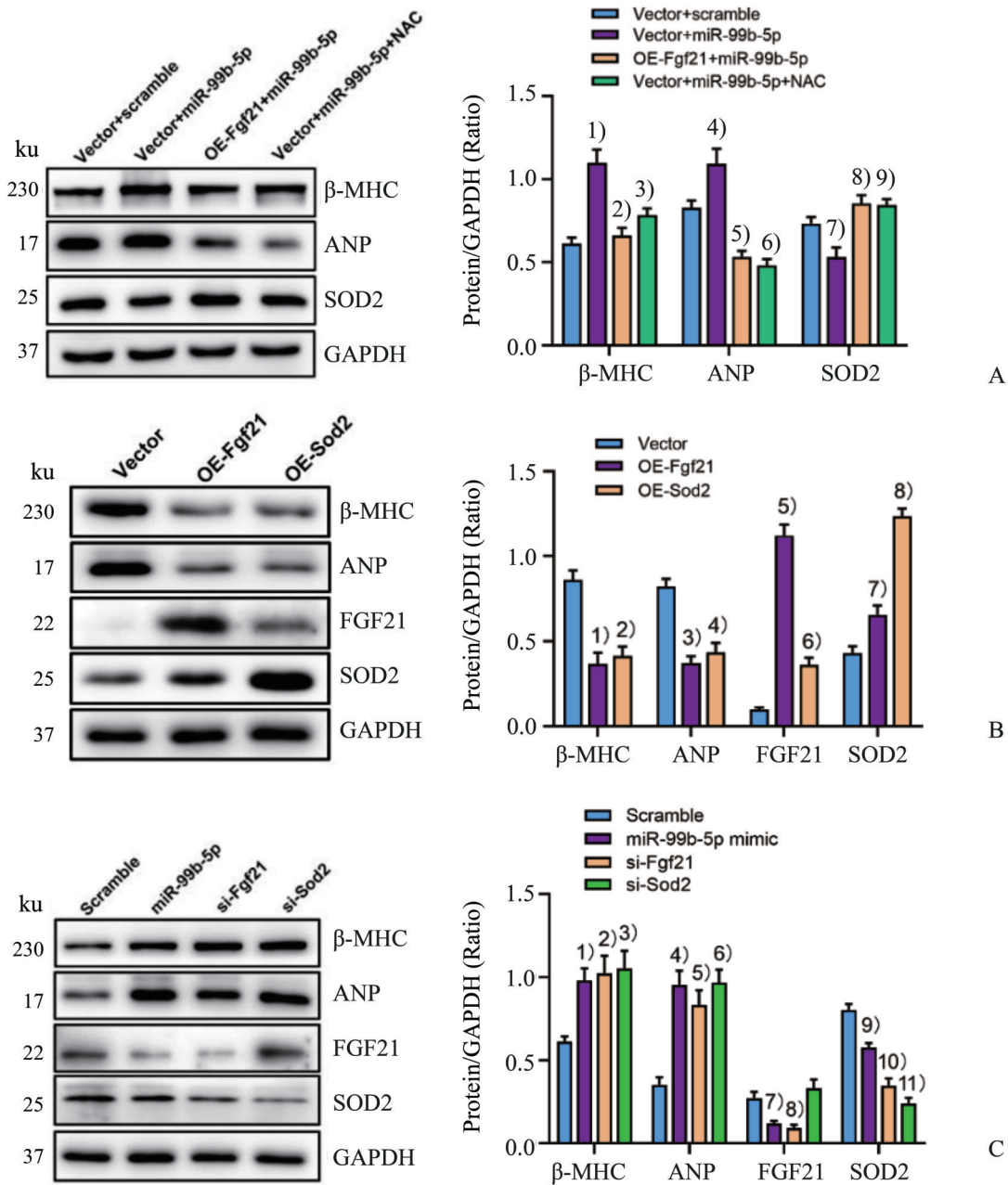
**图3 miR-99b-5p靶向Fgf21发挥促进NMVCs中心肌肥大相关基因表达作用**  
**Fig. 3 Fgf21 mediates the pro-hypertrophic effect of miR-99b-5p on NMVCs**

A: Bioinformatics prediction showed the potential binding site of miR-99b-5p in the 3'-UTR of Fgf21 mRNA. B: Identification of the interaction between miR-99b-5p and Fgf21 mRNA by dual-luciferase reporter assay.  $F=4.976$ ,  $P=0.0117$ , 1)  $P=0.0087$  vs. group 1. C: MRNA expression of FGF21 in the myocardium of HF patients and healthy controls by RT-qPCR assay. D: MRNA expression of Fgf21 in the myocardium of mice subjected to TAC surgery by RT-qPCR assay;  $t=2.507$ , 1)  $P=0.0311$  vs. Sham group. E: MRNA expression of Fgf21 in miR-99b-5p-modified NMVCs by RT-qPCR assay;  $t=6.078$ , 1)  $P=0.0037$  vs. scramble. F: Protein expression of FGF21 in miR-99b-5p-modified NMVCs by Western blot assay;  $t=8.548$ , 1)  $P=0.0010$  vs. scramble. G: miR-99b-5p and Fgf21 siRNA increased hypertrophy-related protein expression in NMVCs.  $\beta$ -MHC:  $F=46.79$ ,  $P<0.0001$ , 1)  $P<0.0001$ , 2)  $P<0.0001$  vs. scramble; ANP:  $F=36.73$ ,  $P<0.0001$ , 3)  $P<0.0001$ , 4)  $P<0.0001$  vs. scramble; FGF21:  $F=91.67$ ,  $P<0.0001$ , 5)  $P<0.0001$ , 6)  $P<0.0001$  vs. scramble. H: Overexpression of FGF21 could reverse the increases of  $\beta$ -MHC and ANP expression in miR-99b-5p-treated NMVCs.  $\beta$ -MHC:  $F=46.15$ ,  $P<0.0001$ , 1)  $P<0.0001$ , 2)  $P=0.0004$  vs. Vector+scramble, 3)  $P<0.0001$  vs. Vector+miR-99b-5p; ANP:  $F=144.9$ ,  $P<0.0001$ , 4)  $P<0.0001$ , 5)  $P=0.0004$  vs. Vector+scramble, 6)  $P<0.0001$  vs. Vector+miR-99b-5p; FGF21:  $F=20.69$ ,  $P<0.0001$ , 7)  $P<0.0255$ , 8)  $P=0.0007$  vs. Vector+scramble, 9)  $P=0.0367$  vs. Vector+miR-99b-5p. Data are presented as Mean  $\pm$  SD.  $n=3$  in B, E and F,  $n=17$  for group of Healthy controls, and  $n=28$  for group of HF patients in C,  $n=5$  for Sham group, and  $n=7$  for TAC group in D,  $n=5$  in G and H.

作用<sup>[24-26]</sup>。已有报道Fgf21可在mRNA水平上促进抗氧化基因Sod2表达<sup>[21]</sup>，而本文进一步在蛋白水平证实Fgf21可调控NMVCs中Sod2表达，并从功能

上明确Fgf21/Sod2轴介导了miR-99b-5p的促心肌细胞肥大作用。

综上，本文证实了miR-99b-5p通过抑制其下



A: Overexpression of FGF21 reversed the decrease of Sod2 in miR-99b-5p-modified NMVCs.  $\beta$ -MHC:  $F=15.86$ ,  $P=0.001$  0, 1)  $P=0.000$  6 vs. Vector+scramble, 2)  $P=0.001$  3, 3)  $P=0.009$  2 vs. Vector+miR-99b-5p; ANP:  $F=25.39$ ,  $P=0.000$  2, 4)  $P=0.025$  4 vs. Vector+scramble, 5)  $P=0.000$  3, 6)  $P=0.000$  2 vs. Vector+miR-99b-5p; SOD2:  $F=10.55$ ,  $P=0.003$  7, 7)  $P=0.036$  3 vs. Vector+scramble, 8)  $P=0.002$  9, 9)  $P=0.003$  6 vs. Vector+miR-99b-5p. B: Overexpression of Sod2 inhibited hypertrophy-related protein expression in NMVCs.  $\beta$ -MHC:  $F=20.75$ ,  $P=0.002$  0, 1)  $P=0.002$  0, 2)  $P=0.003$  3 vs. Vector; ANP:  $F=25.47$ ,  $P=0.001$  2, 3)  $P=0.001$  0, 4)  $P=0.002$  4 vs. Vector; FGF21:  $F=138.6$ ,  $P<0.000$  1, 5)  $P=0.000$  1, 6)  $P=0.011$  2 vs. Vector; SOD2:  $F=79.21$ ,  $P<0.000$  1, 7)  $P=0.024$  7, 8)  $P<0.000$  1 vs. Vector. C: MiR-99b-5p, Fgf21 siRNA and Sod2 siRNA increased hypertrophy-related protein expression in NMVCs.  $\beta$ -MHC:  $F=5.975$ ,  $P=0.019$  4, 1)  $P=0.036$  6, 2)  $P=0.021$  5, 3)  $P=0.015$  0 vs. scramble; ANP:  $F=14.55$ ,  $P=0.001$  3, 4)  $P=0.001$  3, 5)  $P=0.005$  2, 6)  $P=0.001$  1 vs. scramble; FGF21:  $F=12.01$ ,  $P=0.002$  5, 7)  $P=0.030$  3, 8)  $P=0.013$  6 vs. scramble; SOD2:  $F=51.75$ ,  $P<0.000$  1, 9)  $P=0.004$  5, 10)  $P<0.000$  1, 11)  $P<0.000$  1 vs. scramble. Data are presented as Mean  $\pm$  SD.  $n=3$ .

图4 Fgf21/Sod2轴介导miR-99b-5p促进NMVCs中心肌肥大相关基因表达作用  
 Fig. 4 Fgf21/Sod2 axis mediates the pro-hypertrophic effect of miR-99b-5p on NMVCs

游靶基因 Fgf21, 进而抑制其下游 Sod2 基因表达来促进心肌细胞肥大。在后续的研究中, 我们将继续探讨 Fgf21/Sod2 轴介导 miR-99b-5p 促心肌

细胞肥大的分子机制, 并在整体水平上明确 Fgf21 介导 miR-99b-5p 发挥促进心肌肥厚的作用机制。

### 参考文献

- [1] 编写组中国心血管健康与疾病报告.《中国心血管健康与疾病报告 2020》概述[J]. 中国心血管病研究, 2021, 19(7):582-590.  
Key points of report on cardiovascular health and diseases in China 2020[J]. Chin J Cardio Res, 2021, 19(7):582-590.
- [2] Ahmad F, Seidman JG, Seidman CE. The genetic basis for cardiac remodeling [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2005, 6:185-216.
- [3] Papait R, Serio S, Condorelli G. Role of the epigenome in heart failure[J]. Physiol Rev, 2020, 100(4):1753-1777.
- [4] Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(7):387-407.
- [5] 马建君, 黄萍. 循环非编码 RNA 作为生物标志物在心血管疾病中作用的研究进展[J]. 新医学, 2019, 50(10): 729-734.  
Ma JJ, Huang P. Research progress on the role of circulating non-coding RNA as a biomarker of cardiovascular disease[J]. J New Med, 2019, 50(10): 729-734.
- [6] Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, et al. MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy[J]. Eur J Heart Fail, 2016, 18(5):457-468.
- [7] Colpaert R, Calore M. MicroRNAs in cardiac diseases [J]. Cells, 2019, 8(7):737.
- [8] Huang Z, Chen J, Seok HY, et al. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress[J]. Circ Res, 2013, 112(9): 1234-1243.
- [9] Yang Y, Del Re DP, Nakano N, et al. MiR-206 mediates YAP-induced cardiac hypertrophy and survival [J]. Circ Res, 2015, 117(10):891-904.
- [10] 杨静, 胡志琴, 朱杰宁, 等. MiR-199a-3p 靶向视网膜母细胞瘤转录辅阻遏子 1 促进心肌细胞肥大[J]. 中山大学学报(医学版), 2019, 40(1): 23-30.  
Yang J, Hu ZQ, Zhu JN, et al. MicroRNA-199a-3p enhances cardiomyocyte hypertrophy through targeting retinoblastoma transcriptional co-repressor 1 [J]. J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(1): 23-30.
- [11] 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.
- [12] Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21 [J]. Annu Rev Physiol, 2016, 78(1): 223-241.
- [13] Planavila A, Redondo I, Hondares E, et al. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice[J]. Nat Commun, 2013, 4:2019.
- [14] 严钰敏, 袁淑菁, 张铭, 等. 环状 RNA\_005647 通过结合 miR-99b-5p 抑制心肌细胞中肥厚相关基因的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(1):10-16.  
Yan YM, Yuan SJ, Zhang M, et al. CircRNA\_005647 inhibits the expression of hypertrophy-related genes in cardiomyocytes by sponging miR-99b-5p [J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(1):10-16.
- [15] Tang CM, Liu FZ, Zhu JN, et al. Myocyte-specific enhancer factor 2C: a novel target gene of miR-214-3p in suppressing angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. Sci Rep, 2016, 6:36146.
- [16] 杨莹, 郭晶, 温艺红, 等. PTBP1 介导长链非编码 RNA RP11-879F14.2 发挥抑制心肌纤维化的作用[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2021, 42(1): 33-41.  
Yang Y, Guo J, Wen YH, et al. PTBP1 mediates the

- effect of lncRNA RP11-879F14.2 on suppression of fibrosis-related genes in cardiac fibroblasts [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2021, 42(1):33-41.
- [17] Ding M, Liu B, Chen X, et al. MiR-99b-5p suppressed proliferation of human osteoblasts by targeting FGFR3 in osteoporosis [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(5):1398-1409.
- [18] Lu Y, Liu L, Pan J, et al. MFG-E8 regulated by miR-99b-5p protects against osteoarthritis by targeting chondrocyte senescence and macrophage reprogramming via the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6):533.
- [19] Liu R, Chen Y, Shou T, et al. MiRNA-99b-5p targets FZD8 to inhibit non-small cell lung cancer proliferation, migration and invasion [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:2615-2621.
- [20] Li J, Xu C, Liu Y, et al. Fibroblast growth factor 21 inhibited ischemic arrhythmias via targeting miR-143/EGR1 axis [J]. *Basic Res Cardiol*, 2020, 115(2):9.
- [21] Yao D, He Q, Sun J, et al. FGF21 attenuates hypoxia-induced dysfunction and inflammation in HPAECs via the microRNA-27b-mediated PPAR $\gamma$  pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(6):116.
- [22] Shah AK, Bhullar SK, Elimban V, et al. Oxidative stress as a mechanism for functional alterations in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6):931.
- [23] Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106(1):19-31.
- [24] Xie Y, Gao Y, Gao R, et al. The proteasome activator REG $\gamma$  accelerates cardiac hypertrophy by declining PP2Ac $\alpha$ -SOD2 pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(10):2952-2972.
- [25] Kang PT, Chen CL, Ohanyan V, et al. Overexpressing superoxide dismutase 2 induces a supernormal cardiac function by enhancing redox-dependent mitochondrial function and metabolic dilation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 88:14-28.
- [26] Sharma S, Bhattarai S, Ara H, et al. SOD2 deficiency in cardiomyocytes defines defective mitochondrial bioenergetics as a cause of lethal dilated cardiomyopathy [J]. *Redox Biol*, 2020, 37:101740.

(编辑 孙慧兰)