

·基础研究·

环状RNA circ_0036176结合miR-218-5p 发挥抑制心肌纤维化的作用

黄智琪¹, 严钰敏², 郭晶³, 郭继深⁴, 朱杰宁⁵, 方咸宏⁵, 徐金东⁵, 单志新^{1,5}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006; 2. 南方医科大学药学院, 广东广州 510515; 3. 华南理工大学医学院, 广东广州 510006; 4. 南方医科大学第二临床医学院, 广东广州 510280; 5. 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)

摘要:【目的】探究环状RNA circ_0036176对心肌纤维化表型的调控作用。【方法】通过RT-qPCR检测人心肌组织(包括18例器官捐赠健康志愿者和28例心力衰竭患者)中circ_0036176及其宿主基因MYO9A的表达水平。利用血管紧张素II(Ang-II)处理人心房肌成纤维细胞(HAFs), RT-qPCR检测circ_0036176和MYO9A的表达水平。放线菌素D和RNase R处理, 鉴定circ_0036176的典型环状结构。使用circ_0036176腺病毒在HAFs中实现充分过表达, mRNA及蛋白水平检测纤维化相关基因的表达差异。利用双荧光素酶报告基因实验和RNA反义纯化技术(RAP)筛选可与circ_0036176有效结合的miRNA。利用C57BL/6乳小鼠心肌成纤维细胞(mCFs)研究miR-218-5p是否介导circ_0036176对心肌纤维化表型的调节作用。【结果】Circ_0036176在心衰心肌中表达增加($P < 0.001$), 但在Ang-II诱导的HAFs纤维化细胞模型中, 宿主基因及该circRNA的表达一致下调($P < 0.01$)。放线菌素D和RNase R实验证实circ_0036176具有典型的环状RNA稳定性。在HAFs中充分过表达circ_0036176后, 纤维化相关基因表达均有所下降($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验与RAP实验证实miR-218-5p与circ_0036176间存在结合作用。mCFs中转染miR-218-5p促进了纤维化相关基因的表达, 并可有效抵抗circ_0036176的纤维化抑制作用。【结论】Circ_0036176在心衰病人的心肌组织中表达上调, 并可通过吸附miR-218-5p的方式来抑制心肌纤维化。

关键词:环状RNA; 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞; 微小RNA

中图分类号: R363.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2022)01-0061-09

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0108

Circular RNA circ_0036176 Inhibiting Myocardial Fibrosis Via Sponging miRNA-218-5p

HUANG Zhi-qi¹, YAN Yu-min², GUO Jing³, GUO Ji-shen⁴, ZHU Jie-ning⁵,FANG Xian-hong⁵, XU Jin-dong⁵, SHAN Zhi-xin^{1,5}

(1. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 4. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 5. Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China.)

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

Abstract:【Objective】To investigate the biological effect of circ_0036176 on myocardial fibrosis.【Methods】Levels of

收稿日期: 2021-08-24

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(2021A151011554); 广东省人民医院心血管专项(2020XXG003)

作者简介: 黄智琪, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 心肌纤维化的分子机制, E-mail: 1440727494@qq.com; 单志新, 通信作者, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向: 非编码RNA与心肌重构, E-mail: shanzhixin@gdph.org.cn

circ_0036176 and its host gene Myo9a were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay in human myocardial tissue, including 22 healthy organ donors and 26 patients with heart failure (HF). A cell model of angiotensin II (Ang-II)-induced fibrosis in human atrial fibroblasts (HAFs) was achieved. To test the typical ring structure of circ_0036176, actinomycin D treatment and RNase R exonuclease digestion were performed. The expression of fibrosis-related gene in HAFs with overexpression of circ_0036176 was detected at mRNA and protein level. To select miRNAs that can effectively bind to circ_0036176, dual luciferase reporter gene assay and RNA antisense purification assay (RAP) were conducted, respectively. The neonatal mouse cardiac fibroblasts (mCFs) were used to study whether miR-218-5p mediates the effect of circ_0036176 on myocardial fibrosis phenotype.【Results】The expression of circ_0036176 was up-regulated in the myocardium of HF patients ($P<0.001$), and the expression of circ_0036176 and the host gene Myo9a was down-regulated in Ang-II-induced HAFs ($P<0.01$). In response to actinomycin D treatment and RNase R exonuclease digestion, circ_0036176 was more stable than Myo9a mRNA. The expression of COL1A1, COL3A1, TGF- β 1 and ACTA2 was down-regulated in HAFs with overexpression of circ_0036176 ($P<0.05$). Results of dual luciferase reporter gene assay and RAP assay confirmed the interaction between miR-218-5p and circ_0036176. Overexpression of miR-218-5p could promote the expression of fibrosis-related genes, and attenuate the inhibitory effect of circ_0036176 on cardiac fibrosis.【Conclusions】Circ_0036176 is up-regulated in the myocardium of HF patients, and circ_0036176 inhibits the expression of fibrosis-related gene through sponging miR-218-5p in CFs.

Key words: circRNA; cardiac fibrosis; cardiac fibroblasts; miRNA

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(1):61-69]

目前,心血管疾病已占有所有疾病死因的31%,是全球患者死亡的主要原因之一。心肌纤维化是导致心力衰竭的主要病理基础,是公认的导致高发病率和高死亡率的病因^[1]。心肌纤维化是病理性细胞外基质(ECM)重塑的过程^[2]。最初的心肌纤维化可促进心肌伤口愈合和组织再生,细胞外基质沉积可起到保护作用,但持续性的细胞外基质沉积,尤其是I型胶原分泌,导致基质组成和质量异常,进而心肌功能受损^[1-2]。已知多种疾病都会促进心肌纤维化的发生,如高血压性心脏病、糖尿病性肥厚型心肌病和特发性扩张型心肌病^[2-3],而心肌梗死后也常会引起心肌纤维化疤痕。环状RNA经反向剪接而成,相对于线性形式,circRNA在细胞中有着丰富且稳定的存在^[4-5]。越来越多的证据表明circRNA参与包括心肌纤维化^[6-7]、心肌缺血/再灌注损伤^[8-9]、心力衰竭^[10-11]及其他多种心血管疾病过程^[12]。因此,深入研究circRNAs调节心肌纤维化的作用机制,可为心力衰竭的治疗研究提供科学资料,具有重要意义。我们已证实小鼠源性的circRNA_005647可吸附miR-27b-3p,并解除miR-27b-3p对靶基因PPAR- γ 的抑制作用,进而发挥抑制心肌纤维化的作用^[13]。有趣的是,我们发现与circRNA_005647同源的人circ_0036176在心衰病人心肌组织中表达亦上调,但circ_0036176对心肌纤维化的调节作用尚未见报道。本研究旨在初步

探讨circ_0036176在心肌纤维化中的生物学功能,并了解其发挥作用的分子机制,或可为心肌病的临床治疗提供潜在干预靶点。

1 材料与方 法

1.1 组织标本

利用心衰患者和健康器官捐献者的心肌组织进行circ_0036176和宿主基因Myo9a表达的RT-qPCR检测。本文所涉及的临床样本实验均经广东省人民医院伦理委员会批准[批准号No. GDREC2019238H(R1)],所有患者均签署知情同意书,相关心肌组织标本均由广东省心血管病研究所进行提供,病例资料信息同以往报道^[14]。

1.2 动 物

SPF级出生日龄1-3 d的C57BL/6乳小鼠,雌雄不限,由广州中医药大学实验动物中心进行繁育与提供,乳小鼠的生产许可证号为SCXK(粤)2013-0034。

1.3 主要试剂

特级澳洲胎牛血清与DMEM/F12细胞培养基(BioInd);miR-218-5p、-100-5p、-27b-3p等mimic(广州锐博);转染试剂Oligofectamine(Invitrogen);逆转录试剂盒(TaKaRa);RNase R(ribonuclease R)(广州吉赛生物);放线菌素D(生工有限公司);

RIPA 裂解液(碧云天);SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天);抗GAPDH抗体、抗TGF- β 1抗体(Protein Technology);抗I型胶原蛋白 α 1链(type I collagen α 1, COL1A1)、抗III型胶原蛋白 α 1链(type III collagen α 1, COL3A1)抗体(Invitrogen);抗 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(Abcam);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo);蛋白Marker(Fermentas);ECL发光液(Millipore);PVDF膜(Whatman);血管紧张素II(Sigma);其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.4 主要方法

1.4.1 Masson三色染色 从浸泡于冰生理盐水中的人心肌组织标本中切取出大小适宜的组织块,放置在多聚甲醛中做固定处理,后将固定好的组织块进行脱水、透明、浸蜡和石蜡包埋操作,静置凝固后进行连续性切片,将切片厚度控制在4 μ m。获得组织切片后,利用Masson染色试剂盒染色,最终将切片标本置于显微镜下,观察健康组与心衰病人组之间胶原纤维的沉积差异,并对其进行拍照。

1.4.2 人心房肌成纤维细胞的原代分离、培养 从手术室中取得的左心耳用冷PBS清洗干净,用灭菌的剪刀和镊子清除脂肪及筋膜后将心耳组织剪碎,参照我们已报道的方法进行HAF的原代分离和培养^[4]。本文实验使用的人心房肌成纤维细胞(human atrial fibroblasts, HAFs)为第3~5代。

1.4.3 小鼠心肌成纤维细胞的原代分离、培养、处理 基于已有报道的方法^[15]并进行适当优化,将小鼠心肌成纤维细胞的进行原代分离、培养。准备适龄的SPF级别的C57BL/6小鼠,利用眼科剪从乳鼠体内取出完整心脏,随后立即对组织进行适当修剪与破碎,添加浓度为 2×10^4 U/L DNA酶和2.5 g/L胰酶的混合液,在37 $^{\circ}$ C的条件下进行反复数次酶消化,随后把分离得到小鼠心肌成纤维细胞(mouse cardiac fibroblasts, mCFs)做离心处理,并利用含有10%血清浓度(100 mL完全培养基中含10 mL胎牛血清)的DMEM培养基对离心获得的细胞沉淀进行轻柔的重悬,而后将其置于洁净无菌的培养瓶中。当小鼠成纤维细胞的接触密度增长到接近90%的时候,即可进行传代处理,细胞实验中所用的mCFs代数均为P2。

1.4.4 Circ_0036176重组腺病毒的构建和包装 根据人circ_0036176模板DNA序列和腺病毒穿梭质粒pAd-Track-cmv多克隆位点序列,设计合成引物,通过PCR扩增得到circ_0036176模板的DNA插

入片段。参照已报道方法^[12],将circ_0036176模板DNA利用定向插入的方式,在pAd-Track-cmv载体上实现重组构建。并进一步将pAd-Track-cmv-circ_0036176与pAd-Easy-1在BJ5183 *E. Coli*中进行重组。而后,利用PacI酶将重组circ_0036176腺病毒载体进行酶切,利用转染试剂将其转染至293T细胞中,给予体积分数5%血清的DMEM培养基并于37 $^{\circ}$ C恒温下培养,待绿色荧光蛋白显著表达则提示该重组腺病毒完成包装,并做进一步的病毒扩增。实验时以rAd-GFP作为对照组腺病毒(circ_0036176和rAd-GFP的MOI均是5)。

1.4.5 RT-qPCR 利用Trizol法提取CFs的总RNA,而后取800 ng,将其与5 \times 逆转录试剂进行充分混合,同时使用Oligo(dT)₁₅和random primers进行RNA的逆转录,获得cDNA。选择GAPDH作内参照,用相应的引物检测TGF- β 1以及纤维化相关基因的mRNA表达水平。在ViiA 7 Quantitative PCR System(Applied Biosystems)进行PCR反应后,TGF- β 1和纤维化相关基因的相对表达程度用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。所涉及引物均经Invitrogen进行合成,具体序列见图1。

1.4.6 Western blot 取适量的1 \times PBS对处理后的成纤维细胞进行清洗,将蛋白裂解液分别均匀滴加入每个板孔中,静置于冰上10 min,轻轻刮取、裂解细胞,用移液枪收集裂解液,于10 000 \times g的转速下4 $^{\circ}$ C离心13 min使细胞沉淀聚集,随后分装上层澄清蛋白裂解液,沉淀弃去。蛋白质定量18 μ g,加入等量的4 \times SDS-PAGE缓冲液,99 $^{\circ}$ C金属浴加热10 min,使蛋白质完全变性。取样品在恒压条件下进行SDS-PAGE凝胶电泳,在恒流条件下进行PVDF膜转膜,在室温环境下利用5%脱脂牛奶进行封闭处理。按照蛋白对应的不同位置,裁剪PVDF膜条带,并分别利用相应的特异性抗体[COL1A1(1:2 000)、COL3A1(1:2 000)、TGF- β 1(1:2 000)、 α -SMA(1:2 000)]在4 $^{\circ}$ C环境下缓慢均匀孵育过夜后将其取出,于常温条件下分别与对应的二抗稀释液充分孵育1 h。最后利用ECL发光试剂盒对目的蛋白进行显影处理。本文均使用GAPDH(1:5 000)作为内参,借助ImageJ对其灰度值做分析处理,对各目的蛋白进行表达情况分析。

1.4.7 双荧光素酶报告实验 利用特异的引物扩增出circ_0036176碱基片段,并将扩增得到的片段通过定向克隆的方式,连接至pGL3-promoter载体上,构建双荧光素酶报告质粒pGL3-circ_

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>Col1a1</i>	F, CTGGTCCTGTTGGAAGTCGT R, CAGATGCACCTGTTTCTCCA	201
<i>Col3a1</i>	F, CAATGTAAAGAAGTCTCT- GAAG R, CAAAACAGGGCCAATGTCCAC	240
<i>Acta2</i>	F, CTGTGCTATGTCGCTCTGGA R, ATAGGTGGTTTCGTGGATGC	192
<i>Tgfb1</i>	F, TCACTGGAGTTGTACGGCAG R, CCGGTTTCATGTCATGGATGG	167
<i>COL1A1</i>	F, GTGGTGACAAGGGTGAGACA R, ACCGTTGAGTVVATCTTTGC	194
<i>COL3A1</i>	F, CTGGACCAAAGGTGATGCT R, CTCCTGGTTTCCCACTTTCA	195
<i>ACTA2</i>	F, CTGCTGAGCGTGAGATTGTC R, CGATGAAGGATGGCTGGAAC	195
<i>TGF-β1</i>	F, TGGACATCAACGGGTTCACT R, TGCGGAAGTCAATGTACAGC	210
<i>Circ_0036176</i>	F, AGGAGCAAGTGAAGAT- GAGAGA R, TTCAAAGCGTCGTTCTCCTC	234
<i>MYO9A</i>	F, TGGAGAGGACTACCGCTTC R, CCAGTTGGTGGTTATCATA- CA	329
<i>GAPDH</i>	F, CAAGAAGGTGCTGAAGCAGG R, CCACCCTGTGCTGTAGCC	200

0036176。将 HEK293 细胞均匀接种于 24 孔板中, 稳定培养 24 h 后, 利用 Lipofectamine 2000 对 400 ng 重组萤光素酶报告质粒、0.9 ng pRL-TK (可在细胞中表达出海肾萤光素酶, 作为内参照质粒)、100 nM miRNA 进行包裹, 20 min 后分别共转染至细胞, 恒温培养 24 h。测定萤火虫萤光 (Firefly luciferase, FL) 和海肾萤光 (Renilla luciferase, RL) 强

度, 由 FL/RL 比值推断 circ_0036176 与不同微小 RNA 间的结合能力的强弱。

1.5 统计学处理

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。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 Circ_0036176 在心衰心肌组织中表达增加

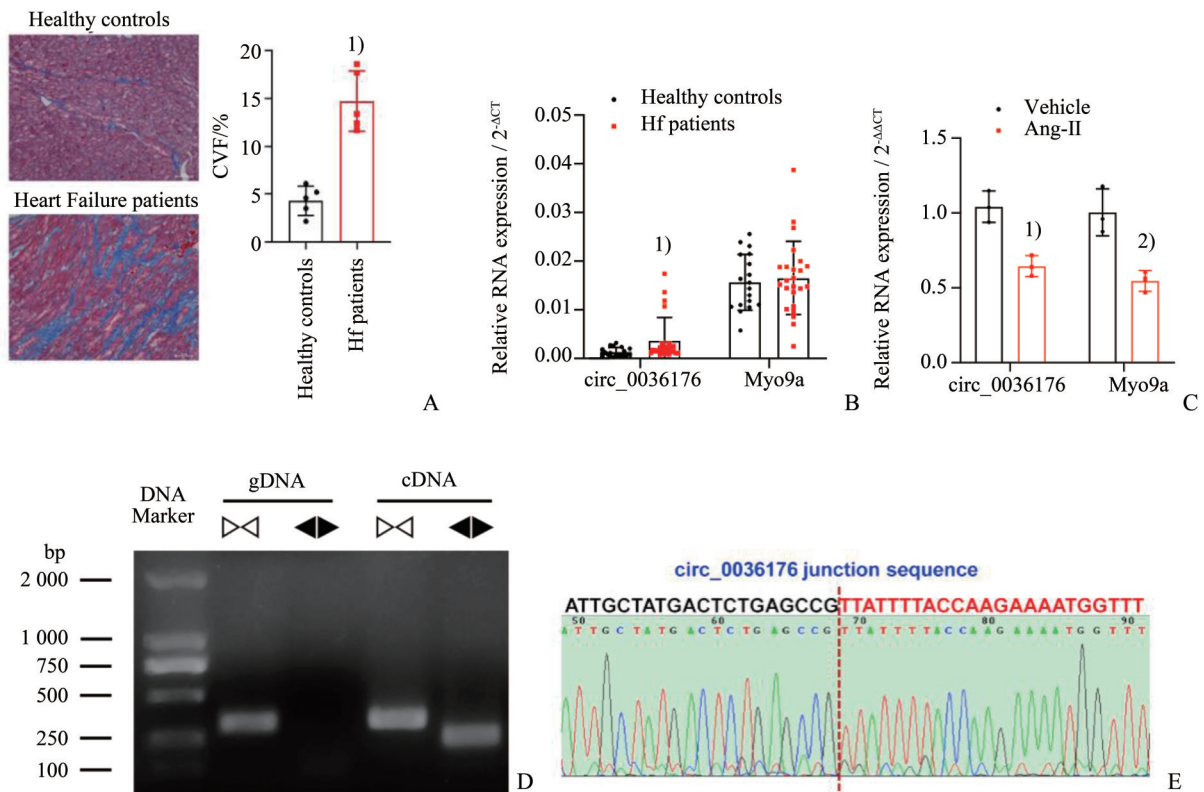
Masson 染色结果显示心衰病人心肌组织中的微血管外周及细胞间质胶原沉积, 较健康人组有增加趋势, 并出现了较高级别的心肌纤维化 ($P < 0.001$; 图 1A)。RT-qPCR 结果显示, circ_0036176 在心衰患者心肌组织中表达上调 ($P < 0.05$), 而其宿主基因 Myo9a 的表达变化不明显 (图 1B)。在 Ang-II 处理的 HAFs 心肌纤维化的细胞模型中, 发现 circ_0036176 和 Myo9a 的表达一致性降低 ($P < 0.01$; 图 1C)。分别以人 cDNA 和基因组 DNA 为模板, PCR 结果显示, 从人 cDNA 和 gDNA 中可 PCR 扩增到 Myo9a 基因产物, 而 circ_0036176 只能从人 cDNA 中扩增到 (图 1D)。通过 DNA 测序的方法, 在 PCR 产物中成功检测出 circ_0036176 的特异接头序 (TATGACTCTGAGCCGTTATTTTACCAAGAA) (图 1E)。

2.2 Circ_0036176 在 AC16 心肌细胞中的分布及稳定性鉴定

定量 PCR 和 FISH 检测结果显示, circ_0036176 除了富集于细胞质中, 在细胞核内也有分布 (图 2A、B)。RT-qPCR 结果显示, 在放线菌素 D 和 RNase R 处理的人心肌细胞 AC16 中后, Myo9a mRNA 水平相对于 circ_0036176, 发生较大程度的下降, 此结果表明 circ_0036176 具有较好的环状 RNA 典型的稳定性 ($P < 0.05$; 图 2C、D)。

2.3 Circ_0036176 抑制心肌成纤维细胞纤维化表型

利用重组 circ_0036176 腺病毒感染 HAFs 24 h 后, 共表达的绿色荧光蛋白 (GFP) 提示 circ_0036176 已在成纤维细胞中成功过表达 (图 3A)。通过 RT-qPCR 对 HAFs 中纤维化相关基因的表达进行检测, 结果显示, 过表达 circ_0036176 后可起



A: Masson trichrome staining. Scale bar is 100 μ m; $t = 6.639$, 1) $P = 0.0002$ vs. Healthy controls. B: Expression of circ_0036176 and its host gene Myo9a in myocardial tissue of healthy controls and heart failure patients by RT-qPCR assay. circ_0036176: $t = 2.096$, 1) $P = 0.0426$ vs. Healthy controls. C: Expression of circ_0036176 and Myo9a mRNA in HAFs exposed to Ang-II treatment. circ_0036176: $t = 5.458$, 1) $P = 0.0055$ vs. Vehicle; Myo9a mRNA: $t = 4.630$, 2) $P = 0.0098$ vs. Vehicle. D: Identification of Myo9a and circ_0036176 by PCR assay; E: Sanger sequencing validated the back-splice junction sequences of circ_0036176. Data are shown as Mean \pm SD. $n = 5$ in A, $n = 18, 28$ in B, $n = 3$ in C.

图1 Circ_0036176在心衰心肌组织中表达增加

Fig. 1 Upregulation of circ_0036176 in the myocardium of patients with heart failure

到明显的抑制作用($P < 0.05$; 图3B)。进一步的,利用 Western-blot,发现过表达 circ_0036176后, COL1A1、COL3A1、TGF- β 1 和 α -SMA 的蛋白表达同样受到了抑制($P < 0.01$; 图3C)。

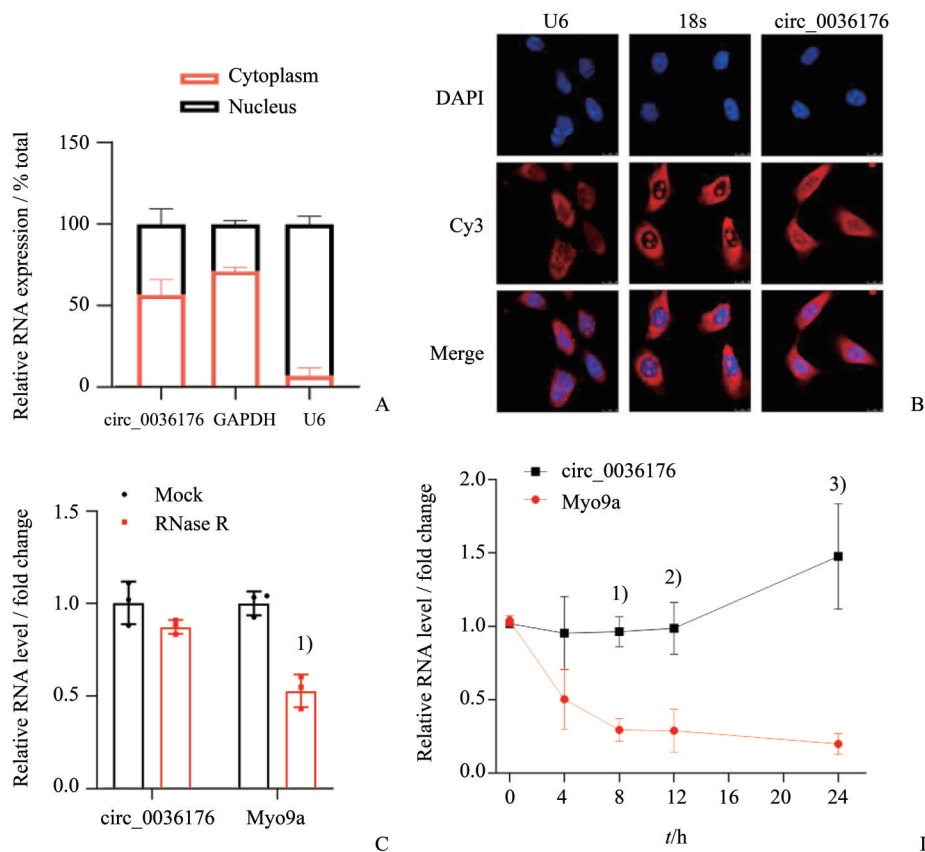
2.4 miR-218-5p介导 circ_0036176 抑制纤维化相关基因的表达

生物信息学预测 (<https://circinteractome.nia.nih.gov/index.html>; <http://starbase.sysu.edu.cn/starbase2/index.php>)结果显示, circ_0036176 序列上有多个潜在的 miRNAs 结合位点,并选择 12 个心肌中高表达 miRNAs,分别为: miR-7-5p、miR-99b-5p、miR-100-5p、miR-154-3p、miR-200b-3p、miR-200c-3p、miR-218-5p、miR-330-3p、miR-429、miR-485-3p、miR-487a-3p 和 miR-665 进行鉴定(图4A)。以 miR-27b-3p 作为无关对照组,将上述 miRNA 的模拟物和 pGL3-circ_0036176 共转染至 HEK293 细胞中进行检测。双萤光素酶报告基因

实验提示, circ_0036176 与 5 个微小 RNA 发生较为明显的结合,其分别为 miR-154-3p、miR-200b-3p、miR-218-5p、miR-487a-3p 和 miR-665 ($P < 0.05$; 图4B)。

进一步通过 RAP 实验检测 circ_0036176 与 miR-154-3p、miR-200b-3p、miR-218-5p、miR-487a-3p 和 miR-665 间结合能力的差异,利用 circ_0036176 特异的生物素标记寡核苷酸探针下拉 AC16 细胞中 circ_0036176,提取 RNA 检测 circ_0036176 结合的相关 miRNA 水平。RAP 实验发现 circ_0036176 可有效地结合 miR-218-5p 和 miR-665,而结合 miR-218-5p 量的相对更多($P < 0.001$; 图4C)。

为了明确 miR-218-5p 是否参与介导 circ_0036176 发挥抑制心肌纤维化表型的作用,将 miR-218-5p 模拟物转染 mCFs。Western blot 结果显示,与 Scramble 组相比,过表达 miR-218-5p 可以促进



Distribution of circ_0036176 in nucleus or cytoplasm of AC16 by RT-qPCR assay (A) and RNA FISH assay (B), respectively. C: Circ_0036176 was detected by RT-qPCR and normalized to the value which was detected in the mock group. Myo9a mRNA; $t = 7.514$, 1) $P = 0.0017$ vs. RNase R. D: Levels of circ_0036176 and Myo9a mRNA in AC16 cells subjected to Actinomycin D at the indicated time points. $t = 8.987$, 1) $P = 0.0008$ vs. Myo9a mRNA; $t = 5.253$, 2) $P = 0.0063$ vs. Myo9a mRNA; $t = 6.036$, 3) $P = 0.0038$ vs. Myo9a mRNA. Data are shown as Mean \pm SD. $n = 3$.

图2 Circ_0036176在AC16心肌细胞中的分布及RNA稳定性鉴定

Fig. 2 Cellular distribution and RNA stability of circ_0036176 in AC16 cardiomyocytes

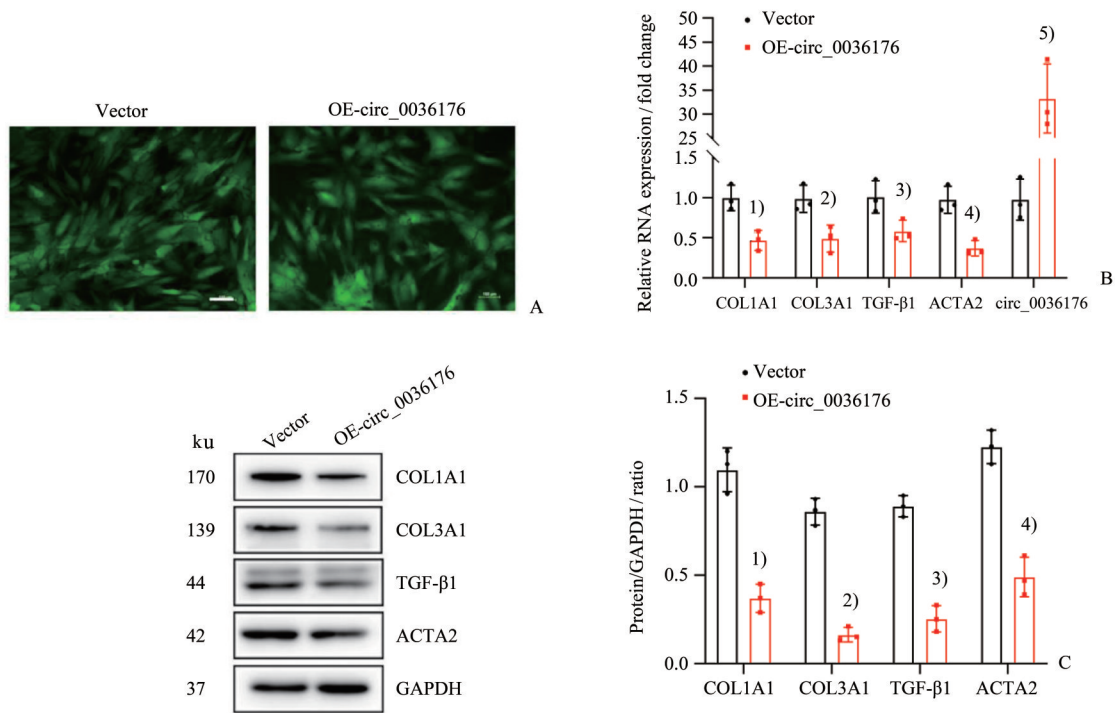
COL3A1、COL1A1、TGF- β 1 和 α -SMA 的表达 ($P < 0.01$; 图 4D)。而在 mCFs 中同时过表达 circ_0036176 和 miR-218-5p, miR-218-5p 可有效逆转 circ_0036176 对心肌纤维化相关基因表达的抑制作用 ($P < 0.05$; 图 4E)。

3 讨论

本文中,我们发现 circ_0036176 在心衰心肌中表达上调,但在经 AngII 处理的 HAFs 中表达下调。与之相似的,课题组前期工作中发现微小 RNA miR-214-3p 在 Ang- II 刺激下的小鼠整体模型与细胞模型中的表达出现相反趋势^[16-17]; KLHL20 是环形 RNA circRNA_100395 的宿主基因,两者在发生纤维化的人心耳组织中表达一致降低,而在经过了 Ang- II 处理的人心耳成纤维细胞中,两者的表

达一致增加^[15]。针对 circ_0036176 在 Ang II 刺激下的 HAFs 中表达下调,而在心衰心肌中表达增加的现象,其可能的原因是,相对于原代分离出来的细胞,整体水平的心肌中存在多种类型的细胞和复杂的病理刺激因素,如氧化应激、急慢性炎症等,在这些因素综合作用,最终引起心衰心肌中 circ_0036176 表达增加,但其中具体的调节机制仍有待深入探讨。

我们以往报道了小鼠源性 circRNA_005647 具有抑制纤维化相关基因表达的作用^[13],而本文证实来自同一宿主基因 Myo9a 的人源性 circ_0036176 同样可以抑制心肌纤维化。我们既往已明确 circRNA_005647 可以特异吸附 miR-27b-3p 的方式发挥其生物学功能,尽管 circRNA_005647 与人 circ_0036176 的碱基序列比较相似(92.75%),但本文未发现 circ_0036176 上具有 miR-27b-3p 潜在的结合



A: Expression of GFP in HAFs after infection by rAd-circ_0036176; B: Expression of COL1A1, COL3A1, TGF- β 1 and ACTA2 mRNA in HAFs with overexpression of circ_0036176. COL1A1: $t = 4.537$, 1) $P = 0.0105$ vs. Vector; COL3A1: $t = 3.574$, 2) $P = 0.0233$ vs. Vector; TGF- β 1: $t = 3.038$, 3) $P = 0.0385$ vs. Vector; ACTA2: $t = 5.385$, 4) $P = 0.0057$ vs. Vector; circ_0036176: $t = 7.800$, 5) $P = 0.0015$ vs. Vector. C: Protein expression of COL1A1, COL3A1, TGF- β 1 and ACTA2 in HAFs with overexpression of circ_0036176. COL1A1: $t = 8.557$, 1) $P = 0.0010$ vs. Vector; COL3A1: $t = 14.00$, 2) $P = 0.0002$ vs. Vector; TGF- β 1: $t = 11.48$, 3) $P = 0.0003$ vs. Vector; ACTA2: $t = 8.715$, 4) $P = 0.0010$ vs. Vector. Data are shown as Mean \pm SD. $n=3$.

图3 circ_0036176在HAFs中具有下调纤维化相关基因表达的生物学功能

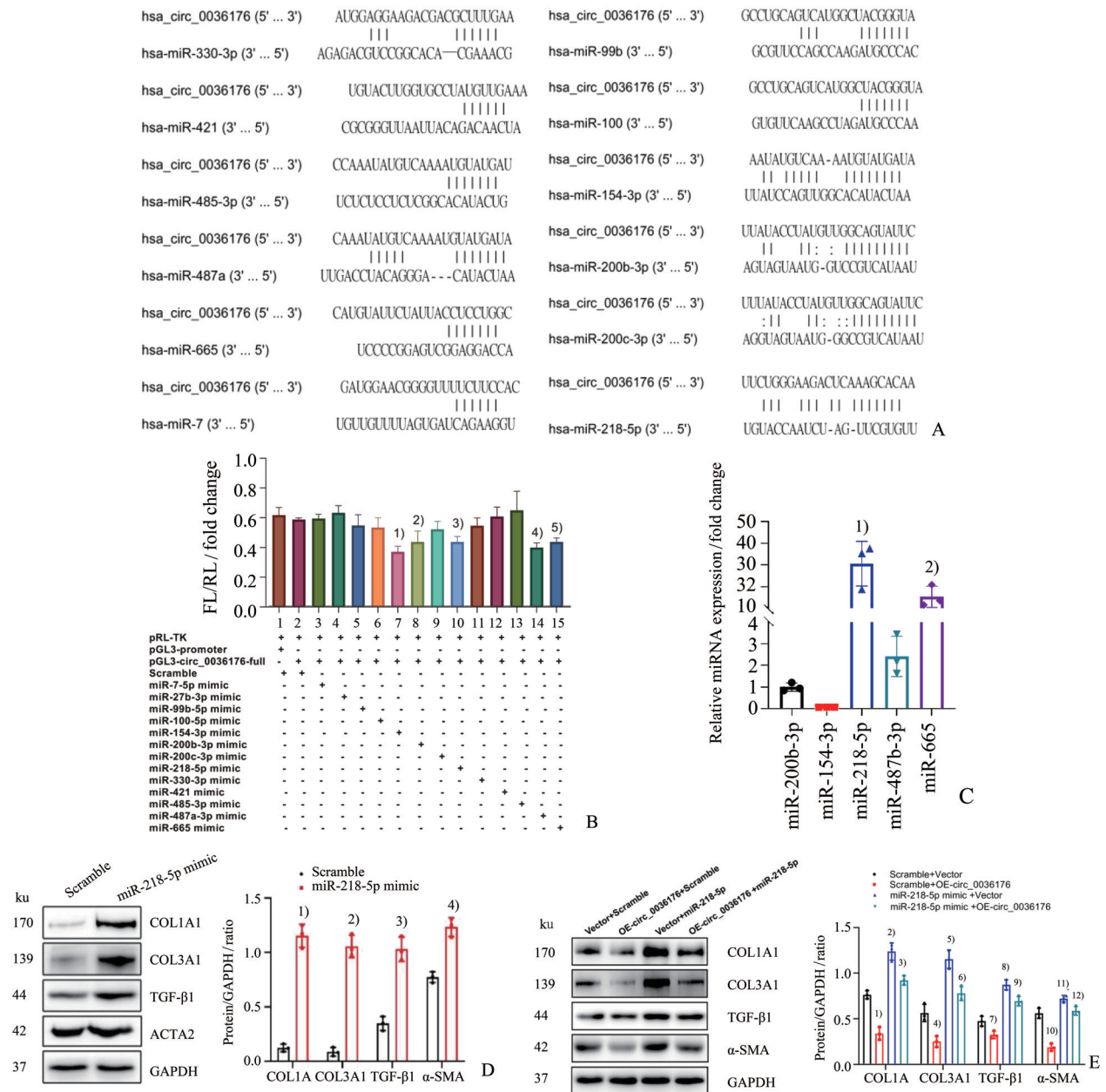
Fig. 3 Circ_0036176 inhibited the expression of fibrosis-related genes in HAFs

序列,提示同源的 circRNA 即使有相同的生物学功能,但介导其生物学功能的分子机制可能不同。

在细胞 RNA 的核质分离实验中,我们证实 circ_0036176 主要存在于 mCFs 细胞质中,这提示了此环形 RNA 可能会通过经典的特异吸附微小 RNA 途径来抑制心肌纤维化^[18-19],因此,我们借助生物信息学对 circ_0036176 上潜在的 miRNA 结合位点进行分析,筛选了 12 个可在心肌中高表达的 miRNAs 进行鉴定。根据双荧光素酶实验的结果,发现 circ_0036176 可与 12 个潜在微小 RNA 中的 5 个发生有效结合,其分别为 miR-154-3p、miR-200b-3p、miR-218-5p、miR-487a-3p 和 miR-665;而 RAP 实验进一步确认 circ_0036176 对 miR-218-5p 的结合作用最显著。功能实验结果表明 miR-218-5p 具有促进心肌纤维化相关基因表达的作用,并能有效逆转 circ_0036176 起到的抑制作用。因此,微小 RNA miR-218-5p 可介导环形 RNA circ_0036176 行使抑制纤维化的功能。既往研究

证实 miR-218-5p 可通过靶向 RE1 沉默转录因子 (RE1-silencing transcription factor, REST) 发挥促进心肌肥厚的作用^[20];降低 miR-218-5p 的表达可以有效减缓大鼠心肌损伤及纤维化的发生进程,同时可促进血管生成^[21]。但对于本文中参与生物学功能调控的 miR-218-5p 下游中起主导作用的目的基因,仍需进一步探究。

综上,本文明确了人源 circ_0036176 可特异吸附 miR-218-5p 来抑制纤维化相关基因的表达,不同于同源的小鼠 circRNA_005647 发挥抑制心肌纤维化作用的分子机制,目前尚未见有关同源 circRNA 通过结合不同 miRNA 发挥一致生物学作用的报道。本文尚存在一定局限性,还需在细胞水平明确 circ_0036176 对 mCFs 增殖和迁移的影响,并且我们拟继续在整体动物水平验证 circ_0036176 对心肌纤维化的抑制作用,并进一步明确其下游作用靶基因和相关信号通路。



A: Bioinformatics prediction showed the potential binding sites of 12 miRNAs in circ_0036176; **B:** Identification of the interaction between circ_0036176 and miRNAs by dual-luciferase reporter assay. $F=7.164$, $P<0.000$ 1, 1) $P=0.000$ 9 vs. group 2, 2) $P=0.036$ 2 vs. group 2, 3) $P=0.034$ 9 vs. group 2, 4) $P=0.004$ 8 vs. group 2, 5) $P=0.035$ 1 vs. group 2. **C:** MiR-154-3p, miR-200b-3p, miR-218-5p, miR-487a-3p and miR-665 were pulled down from AC16 cell lysate by biotin-labeled circ_0036176 probe, and RT-qPCR was performed to detect the relative level of the concerned miRNAs. $F=19.59$, $P=0.000$ 1, 1) $P=0.000$ 1 vs. miR-200b-3p, 2) $P=0.021$ 7 vs. miR-200b-3p. **D:** Protein expression of COL1A1, COL3A1, TGF- β 1 and α -SMA in mCFs after transfection by miR-218-5p. COL1A1: $t=15.98$, 1) $P<0.000$ 1 vs. Scramble; COL3A1: $t=15.23$, 2) $P=0.000$ 1 vs. Scramble; TGF- β 1: $t=9.177$, 3) $P=0.000$ 8 vs. Scramble; α -SMA: $t=7.981$, 4) $P=0.001$ 3 vs. Scramble. **E:** MiR-218-5p reversed the inhibitory effect of circ_0036176 on myocardial fibrosis-related gene expression. COL1A1: $F=91.37$, $P<0.000$ 1, 1) $P=0.002$ vs. Scramble+Vector, 2) $P<0.001$ vs. Scramble+Vector, 3) $P=0.001$ 2 vs. miR-218-5p mimic+Vector; COL3A1: $F=60.81$, $P<0.000$ 1, 4) $P=0.004$ 8 vs. Scramble+Vector, 5) $P<0.000$ 1 vs. Scramble+Vector, 6) $P=0.001$ 5 vs. miR-218-5p mimic+Vector; TGF- β 1: $F=67.35$, $P<0.000$ 1, 7) $P=0.017$ 6 vs. Scramble+Vector, 8) $P<0.000$ 1 vs. Scramble+Vector, 9) $P=0.006$ 6 vs. miR-218-5p mimic+Vector; α -SMA: $F=75.96$, $P<0.000$ 1, 10) $P<0.000$ 1 vs. Scramble+Vector, 11) $P<0.006$ 6 vs. Scramble+Vector, 12) $P=0.017$ 7 vs. miR-218-5p mimic+Vector; Data are shown as Mean \pm SD. $n=3$ in B, D, E.

图4 circ_0036176以结合miR-218-5p方式抑制mCFs中纤维化相关基因表达

Fig. 4 Circ_0036176 inhibited fibrosis-related gene expression through sponging miR-218-5p in mCFs

参考文献

- [1] Murtha LA, Schuliga MJ, Mabotuwana NS, et al. The processes and mechanisms of cardiac and pulmonary fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2017, 8:777.
- [2] Jellis C, Martin J, Narula J, et al. Assessment of nonischemic myocardial fibrosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(2): 89-97.
- [3] Disertori M, Masè M, Ravelli F. Myocardial fibrosis predicts ventricular tachyarrhythmias [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2017, 27(5):363-372.
- [4] Salzman J, Chen RE, Olsen MN, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003777.
- [5] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141-157.
- [6] 潘蓉, 杨静, 张铭, 等. circRNA_001131 通过结合 miR-25-3p 抑制心肌成纤维细胞中纤维化相关基因的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(1): 1-8.
- Pan R, Yang J, Zhang M, et al. circRNA_001131 inhibits expression of fibrosis-related genes in cardiac fibroblasts via sponging miR-25-3p[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2020, 36(1): 1-8.
- [7] Gu X, Jiang YN, Wang WJ, et al. Comprehensive circRNA expression profile and construction of circRNA-related ceRNA network in cardiac fibrosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125:109944.
- [8] Su Y, Zhu C, Wang B, et al. Circular RNA Foxo3 in cardiac ischemia-reperfusion injury in heart transplantation: a new regulator and target [J]. *Am J Transplant*, 2021, 21(9):2992-3004.
- [9] Jin P, Li LH, Shi Y, et al. Salidroside inhibits apoptosis and autophagy of cardiomyocyte by regulation of circular RNA hsa_circ_0000064 in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Gene*, 2020, 767: 145075.
- [10] Devaux Y, Creemers EE, Boon RA, et al. Circular RNAs in heart failure [J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19(6): 701-709.
- [11] Jiang L, Wang X, Zhan X, et al. Advance in circular RNA modulation effects of heart failure [J]. *Gene X*, 2020, 5:100036.
- [12] Altesha MA, Ni T, Khan A, et al. Circular RNA in cardiovascular disease [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5588-5600.
- [13] 袁淑菁, 梁景南, 张铭, 等. CircRNA_005647 通过结合 miR-27b-3p 抑制小鼠心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(11):1312-1319.
- Yuan SJ, Liang JN, Zhang M, et al. CircRNA_005647 inhibits expressions of fibrosis-related genes in mouse cardiac fibroblasts via sponging miR-27b-3p [J]. *J South Med Univ*, 2019, 39(11):1312-1319.
- [14] 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.
- [15] Communal C, Singh K, Pimentel DR, et al. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway [J]. *Circulation*, 1998, 98(13): 1329-1334.
- [16] Zhu WS, Tang CM, Xiao Z, et al. Targeting EZH1 and EZH2 contributes to the suppression of fibrosis associated genes by miR-214-3p in cardiac myofibroblasts[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 78331-78342.
- [17] 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.
- [18] Tang CM, Zhang M, Huang L, et al. CircRNA_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by derepressing targets of miR-26b-5p, Col1a2 and CTGF, in cardiac fibroblasts[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40342.
- [19] Yu CY, LI TC, Wu YY, et al. The circular RNA circBIRC6 participates in the molecular circuitry controlling human pluripotency [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1149.
- [20] Liu JJ, Zhao CM, Li ZG, et al. miR-218 involvement in cardiomyocyte hypertrophy is likely through targeting REST[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 848.
- [21] Qian L, Pan S, Shi L, et al. Downregulation of microRNA-218 is cardioprotective against cardiac fibrosis and cardiac function impairment in myocardial infarction by binding to MITF[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(15): 5369-5388.

(编辑 孙慧兰)