

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

温艺红¹, 杨真祯¹, 张 铭³, 朱杰宁³, 杨 莹², 符永恒³, 方咸宏³, 单志新^{1, 2, 3, 4}
(1. 华南理工大学医学院, 广东 广州 510006; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006; 3. 广东省临床药理学重点实验室, 广东省人民医院//广东省医学科学院, 广东 广州 510080; 4. 南方医科大学第二临床医学院, 广东 广州 510280)

摘要:【目的】研究环形 RNA circRNA_100395 调节心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达的作用机制。【方法】CircRNAs 表达谱芯片分析结合实时荧光定量 PCR 验证 circRNA_100395 在长期持续性房颤(AF)病人左心耳组织中的表达。检测血管紧张素 II (Ang-II) 诱导人心房肌成纤维细胞(HAFs)中 circRNA_100395 的表达及在细胞核质中分布情况。利用放线菌素 D 实验检测 circRNA_100395 的 RNA 稳定性。制备重组 circRNA_100395 腺病毒(rAd-circRNA_100395)并感染 HAFs, 检测 HAFs 中纤维化相关基因 Col1a1、Col3a1 和 Acta2 的 mRNA 和蛋白表达。通过双荧光素酶报告基因实验和 RNA pull-down 实验分别鉴定 circRNA_100395 与微小 RNA miR-144-3p 的结合作用。【结果】Masson 染色结果显示 AF 病人心耳组织的纤维化明显加重($P < 0.01$)。CircRNA_100395 在 AF 患者心耳组织中表达降低($P < 0.05$), 但在 Ang-II 诱导的 HAFs 中表达明显升高($P < 0.05$), 且主要分布于 HAFs 细胞质内。放线菌素 D 实验证明 circRNA_100395 的 RNA 稳定性明显高于其宿主基因 KLHL20 mRNA。过表达 circRNA_100395 抑制 HAFs 中纤维化相关基因表达。双荧光素酶报告基因实验和 RNA Pull-down 实验均证实 circRNA_100395 与 miR-144-3p 存在特异性的结合作用。CircRNA_100395 可抑制 miR-144-3p 促 HAFs 中纤维化相关基因表达的作用。【结论】CircRNA_100395 通过特异结合 miR-144-3p 来发挥抑制纤维化相关基因表达的作用。

关键词: 心肌纤维化; 人心房肌成纤维细胞; 环状 RNA; 微小 RNA

中图分类号: R363; R5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2020)06-0875-09

CircRNA_100395 Inhibits Expression of Myocardial Fibrosis-related Genes in Human Atrial Myofibroblasts via Sponging miR-144-3p

WEN Yi-hong¹, YANG Zhen-zhen¹, ZHANG Ming³, ZHU Jie-ning³, YANG Ying², FU Yong-heng³,
FANG Xian-hong³, SHAN Zhi-xin^{1, 2, 3, 4}

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

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

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of circRNA_100395 on myocardial fibrosis and explore its mechanism. 【Methods】Circular RNA (circRNA) microarray was performed to show the differential expression of circRNAs in the left atrial appendage between patients with long-standing persistent atrial fibrillation (AF) and the healthy controls, and the expression of circRNA_100395 was detected by RT-qPCR, as well as its distribution in the cytoplasm and nucleus

收稿日期: 2020-06-17

基金项目: 国家自然科学基金(81770264); 广东省医学科研基金(B2020215); 广州市科技计划项目(202002030013)

作者简介: 温艺红, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 心肌纤维化分子调控机制, E-mail: winyiwinyi@163.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

of human atrial fibroblasts (HAFs). Expression of circRNA_100395 and its host gene KLHL20 was detected in angiotensin II (Ang-II)-induced HAFs by RT-qPCR assay. Actinomycin D treatment was performed to test the RNA stability of circRNA_100395 in HAFs. Over-expression of circRNA_100395 was achieved in HAFs with infection of the recombinant circRNA_100395 adenovirus (rAd-circRNA_100395). The expression of Col1a1, Col3a1 and Acta2 was detected in HAFs by RT-qPCR and Western blot assay, respectively. Dual luciferase reporter assay and RNA pull-down assay were performed to identify the interaction between circRNA_100395 and miR-144-3p. 【Results】 Masson staining revealed that myocardial fibrosis was markedly increased in the left atrial appendage of AF patients ($P < 0.01$). CircRNA_100395 was decreased in the left atrial appendage of AF patients ($P < 0.05$), but was increased in Ang-II-induced HAFs ($P < 0.05$), with high enrichment in the cytoplasm of HAFs. CircRNA_100395 was more stable than mRNA of its host gene of KLHL20 when it was subjected to actinomycin D treatment. Overexpression of circRNA_100395 significantly inhibited the expression of fibrosis-related genes in HAFs. Bioinformatics predicted the potential binding site of miR-144-3p in circRNA_100395, and the specific interaction between circRNA_100395 and miR-144-3p was confirmed by the dual luciferase reporter assay and RNA pull-down assay, respectively. Overexpression of miR-144-3p contributed to the expression of fibrosis-related genes in HAFs, while circRNA_100395 could abolish the pro-fibrosis effect of miR-144-3p. 【Conclusion】 CircRNA_100395 exhibits an anti-fibrosis effect in HAFs through sponging miR-144-3p.

Key words: myocardial fibrosis; human atrial myofibroblast; circular RNA; microRNA

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2020, 41(6): 875-883]

当心肌发生纤维化时,心肌组织会出现大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积,引起心肌僵硬增加、舒张和收缩力减弱以及心律失常等问题,导致心力衰竭和心源性猝死。已有研究表明,促纤溶和促炎症信号通路的激活可以引发或加剧心肌纤维化^[1-2]。目前,心肌纤维化的具体分子机制尚未阐明,临床上缺乏有效的心肌纤维化诊疗手段。早在1970年,环形RNA(circular RNA, circRNA)就被发现,但是当时被认为是一些错误剪接,不具备功能的RNA,随着高通量技术的发展, circRNA的多种功能才不断被认识^[3]。CircRNA不具备5'末端帽子和3'多聚polyA尾,并以共价键形成闭合环状结构的分子,在个体不同的发育阶段和组织中体现出表达特异性^[4]。环状的circRNA相比于线形RNA,具有明显的RNA稳定性,可以有效地抵抗RNA酶的消化作用^[5]。CircRNA可通过多种方式行使生物学功能,比如“海绵吸附”微小RNA(microRNA, miRNA)或者蛋白,调节宿主基因转录和翻译多肽等^[6-8]。由于circRNA由宿主基因的mRNA前体剪切产生,因此circRNA在产生的过程中,可能竞争性地抑制宿主基因mRNA的产生,从而起到影响宿主基因表达的作用^[9]。研究证实, circRNA参与心肌损伤与修复、动脉粥样硬化、心肌缺血梗死、内皮细胞功能障碍等过程^[10-11]。如有研究发现 circFndc3b

在心肌梗死后表达显著下调,它通过与融合肉瘤(fused in sarcoma, FUS)RNA结合蛋白相互作用来增强血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)的表达和信号传导,进而减少心肌细胞凋亡,增强新生血管形成,起到心肌保护作用^[12]。我们的工作证实, circRNA_000203在纤维化的小鼠心肌中表达明显上调,它可以通过特异结合miR-26b-5p来促进Col1a2和Ctgf基因表达,进而发挥促进心肌纤维化作用^[13]。利用临床的长期持续性房颤(AF)病人和窦性心律(SR)病人左心耳组织进行circRNAs表达谱分析,我们发现来源于宿主基因KLHL20(Kelch-like protein 20, KLHL20)的ciRNA_100395表达显著降低。目前对于circRNA_100395调控心肌纤维化的作用尚不清楚。本文研究circRNA_100395对人心房肌成纤维细胞(human atrial myofibroblasts, HAFs)中纤维化相关基因表达的调控作用机制,可为以circRNA为靶点的心肌纤维化治疗研究提供科学资料。

1 材料与方法

1.1 实验对象

AF患者(持续出现房颤的时间不低于1年),男性,年龄介于45~65岁,左心耳切除术后废弃

的新鲜心耳组织。窦性心律(SR)病人的左心耳由无心脏疾病的器官捐献者提供,性别、年龄与AF患者配对。本研究经广东省人民医院伦理委员会批准(批准号 No.GDREC2019238H(R1)),手术标本来源:广东省心血管病研究所。

1.2 主要试剂

从 Gibco 购买的有 DMEM/F-12 (1:1) basic, 特级澳洲胎牛 (Fetal Bovine Serum, Qualified) 及 0.25% EDTA-胰蛋白酶 (Trypsin-EDTA); 血管紧张素 II (Ang II) 购自 Sigma; 限制性内切酶 *Xho* I、*Pst* I、*EcoR* I、*Kpn* I、*Pac* I 和 *Pme* I 购自 NEB 公司; Masson 三色染色试剂盒购自中国北京索莱宝科技有限公司; 空载体 pAd-Track-cmv、BJ5183 E.coli 菌株和 pAd-Easy- I 质粒购自 Coloncancer; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Fermentas), 去内毒素质粒提取试剂盒 (Omega); 细胞转染试剂 Lipofectamine 2000 及 Oligo 和 TRIzol 试剂均购于 Invitrogen; 2× pro Taq HS PCR 预混液, 逆转录试剂盒和 2× SYBR Green Pro Taq HS Premix 购自湖南艾科瑞公司; 4× SDS loading buffer 购自 TaKaRa; miR-144-3p mimic 和对照组 mimic NC 购自广州锐博公司; 鼠抗 GAP-

DH 抗体、兔抗 COL1A1 抗体、兔抗 COL3A1 抗体 (Protein Technology); 兔抗 ACTA2 抗体 (Abcam); TBS 缓冲液粉剂和 PBS 缓冲液粉剂 (BOSTER); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo); SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 (碧云天); 蛋白上样 Marker (Fermentas); Western-blot 显影 ECL 发光液 (Millipore); PVDF 膜 (Whatman); 双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega; RIP 试剂盒 (广州伯信); 链霉亲和素磁珠 (NEB); 其他涉及的生化试剂均为进口分装或国产分析纯。本课题所用引物由 Invitrogen 公司合成, 具体序列见表 1。

1.3 主要方法

1.3.1 CircRNAs 表达谱芯片分析 取 AF 和 SR 病人的左心耳进行 circRNAs 表达谱分析, 由上海康成公司协助完成芯片的杂交和结果分析。主要实验步骤: 用 RNase R 消化人心耳组织 RNA 从而获得总 RNA, 去除线性 RNA 后纯化的 circRNAs 用随机引物进行转录, 扩增后与 circRNAs 表达谱芯片 (Arraystar human circRNA Array) 上的寡核苷酸 cRNA 探针 (Arraystar Super RNA labeling kit) 进行杂交反应。杂交后经 Agilent Scanner G2505 扫描

表1 PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

Genes	Sequence (5'-3')
COL1A1	F, gtggtgacaagggtgagaca
	R, accgttgagtcctctttgc
COL3A1	F, ctggacaaaagggtgatgct
	R, ctctggtttcccactttca
ACTA2	F, ctgctgagcgtgagattgic
	R, cgatgaaggatggctggaac
GAPDH	F, caagaagggtggaagcagg
	R, ccacctgttctgttagcc
circRNA_100395	F, gagtagagatgacactacag
	R, gcctctactgcatataacag
KLHL20	F, acgtctcaattaccccagg
	R, taggtttcctggtctctgic
miR-144-3p	RT, tattaatagccaagalltggagcaaccttaagtgccataaccacttactcactacggagtacatca
	F, gtccgctacagtatagatgatgact
	R, gtgcgtgctgtggagtc
U6	RT, gtcgtatccagtcgctgctggagtcggcaattgcactggatacagac
	F, gtccgctgctgcttggcagc
	R, gtgcgtgctgtggagtc

并提取数据,最后由 Feature Extraction Software 进行数据处理和结果分析。

1.3.2 Masson 三色染色 将从手术室中取得的左心耳组织置于装有 30 mL 冰生理盐水的 50 mL 离心管中,用剪刀剪取适当大小的左心耳组织,行 40 g/L 多聚甲醛固定,然后通过逐步脱水、透明、浸蜡和包埋,再行 4 μm 厚度的连续石蜡切片,选取连续切片进行 Masson 三色染色。在显微镜下观察心耳组织中胶原纤维沉积情况,选择 8 个具有代表性的单独视野($\times 400$)拍照,用于计算统计心肌胶原纤维所占比例(CVF),计算公式为 $\text{CVF} = \frac{\text{胶原区域}}{\text{总面积}}$ 。

1.3.3 人心房肌成纤维细胞(HAF)的原代分离培养 将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,用移液管尖端将组织均匀涂布在细胞培养瓶底部,拧上盖子,倒扣在培养箱中 90 min,加入完全培养基(50 mL 完全培养基中含 5 mL 胎牛血清、45 mL DMEM/F12 培养基,青霉素浓度为 1×10^5 U/L,链霉素则为 1 000 mg/L),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中培养,7~10 d 后 HAFs 从组织中爬出,约 30 d 细胞融合度可达 90%,可进行传代。本实验使用的 HAFs 为第 3~5 代。

1.3.4 重组 circRNA_100395 腺病毒的制备方法 circRNA_100395 的序列来自其宿主基因 KLHL20 的外显子 6~9 序列。按我们报道的方法^[14],在 pAd-Track-cmv 载体中的多克隆位点中定向插入 circRNA_100395 的模板 DNA 后,在 BJ5183 大肠杆菌与腺病毒骨架质粒 pAd-Easy-1 通过重组。重组成功后, circRNA_100395 腺病毒质粒被 *Pac* I 内切酶线性化,并转染到融合度为 75% 的 HEK293T 细胞中包装 circRNA_100395 的重组腺病毒。实验时以 rAd-GFP 作为对照组腺病毒(circRNA_100395 和 rAd-GFP 的 MOI 均是 5)。

1.3.5 荧光实时定量 PCR(RT-qPCR)检测方法 从心耳组织或 HAFs 中提取总 RNA(Trizol 法),以 1.0 μg 总 RNA 为模板,用 Oligo(dT)₁₅ 和 random primers 逆转录得到 cDNA,用于检测 circRNA_100395 及纤维化相关基因 mRNA 的表达。以 Gapdh 作为检测 circRNA_100395 及纤维化相关基因表达的内参对照基因。在 BIO-RAD CFXconnect(美国,real-time system)进行 PCR 反应和数据分析。以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 circRNA_100395 及纤维化相关基因的表达水平。

1.3.6 蛋白印迹法(Western blot) 用 PBS 清洗 HAFs 并加入预冷的 RIPA 蛋白裂解液,冰上轻柔刮取 1 min 后收集细胞裂解液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 转速离心 15 min,小心取上清液进行 BCA 法蛋白定量和分装。加入 4 \times SDS loading buffer,在 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 进行蛋白变性。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后以 200 mA 恒定电流转印 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉(2.5 g 脱脂奶粉溶于 50 mL TBST 中)4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h,分别用相应的抗体 anti-COL1A1(1:1 500)、anti-COL3A1(1:3 000)、anti- α -SMA(1:3 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。取出 PVDF 膜用预冷 TBST 洗 3 次,摇床速度为 100 r/min,每次约 15 min,二抗(1:5 000)室温孵育 1 h, TBST 清洗 2 次,每次 10 min。ECL 发光试剂盒显影(A 液:B 液=1:1), GAPDH(1:5 000)作为内参对照,用 Imagine J 进行相应检测蛋白条带的灰度分析。

1.3.7 双萤光素酶报告实验验证 circRNA_1000395 与 miR-144-3p 的结合作用 按已报道的方法^[15],根据预测的 circRNA_100395 上潜在的 miR-144-3p 结合位点,构建包含该潜在结合序列的双萤光素酶报告质粒 pGL3-circRNA_100395,并制备突变该潜在结合序列的重组质粒 pGL3-circRNA_100395-MUT。将 1 μg 重组萤光素酶报告质粒、1.5 ng pRL-TK(可以表达海肾萤光素酶,作为内参照质粒)、100 nmol/L miR-144b-3p mimic 等转染至融合度为 70% 的 HEK293 细胞中,24~30 h 后,测定萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase, FL)和海肾萤光素酶(Ranilla luciferase, RL)强度,根据 FL/RL 比值来判断 circRNA_100395 与 miR-144-3p 间的结合作用。

1.3.8 RNA pull-down 实验 参照已报道的方法^[16],先用 Trizol 法提取 100 μg 过表达 circRNA_100395 的 HAFs 总 RNA。将 500 μg 链霉亲和素磁珠清洗重悬后与 200 pmol 生物素特异性标记的 miR-144-3p mimic 于室温下静置 5 min,2 min 手动轻柔上下颠倒混匀,使之充分相互结合。再加入提取的 HAFs 总 RNA 中,室温轻柔混合并孵育 30 min 后,加入洗脱缓冲液 wash/Binding buffer,置于磁场中收集拉下的 RNA 复合物,RT-qPCR 对 circRNA_100395 表达水平进行统计分析。

1.4 统计学方法

本课题计量资料均采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据分析和做图。数据均采用均数 \pm 标

准误(mean±SEM)表示,两组数据比较采用t检验;采用单因素方差分析(即one way ANOVA)进行多组间比较,且行Bonferroni校正的t检验进行组间两两比较。当P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 环形RNA CircRNA_100395在AF病人心耳组织中表达降低

Masson染色显示,与SR对照组相比,AF病人的左心耳组织的纤维化程度显著增加(P<0.01;图1A)。CircRNAs表达谱芯片结果显示,与SR组相比,AF组中分别有98和110个呈2倍以上的升高或者降低表达的circRNAs(图1B)。CircRNA_100395由其宿主基因KLHL20的外显子6~9通过反向剪接的方式生成(图1C)。RT-qPCR结果显示,与SR组相比,AF组心耳组织中circRNA_100395及其宿主基因KLHL20表达显著降低(P<0.05, P<0.01;图1D)。CircRNA_100395 PCR产物的

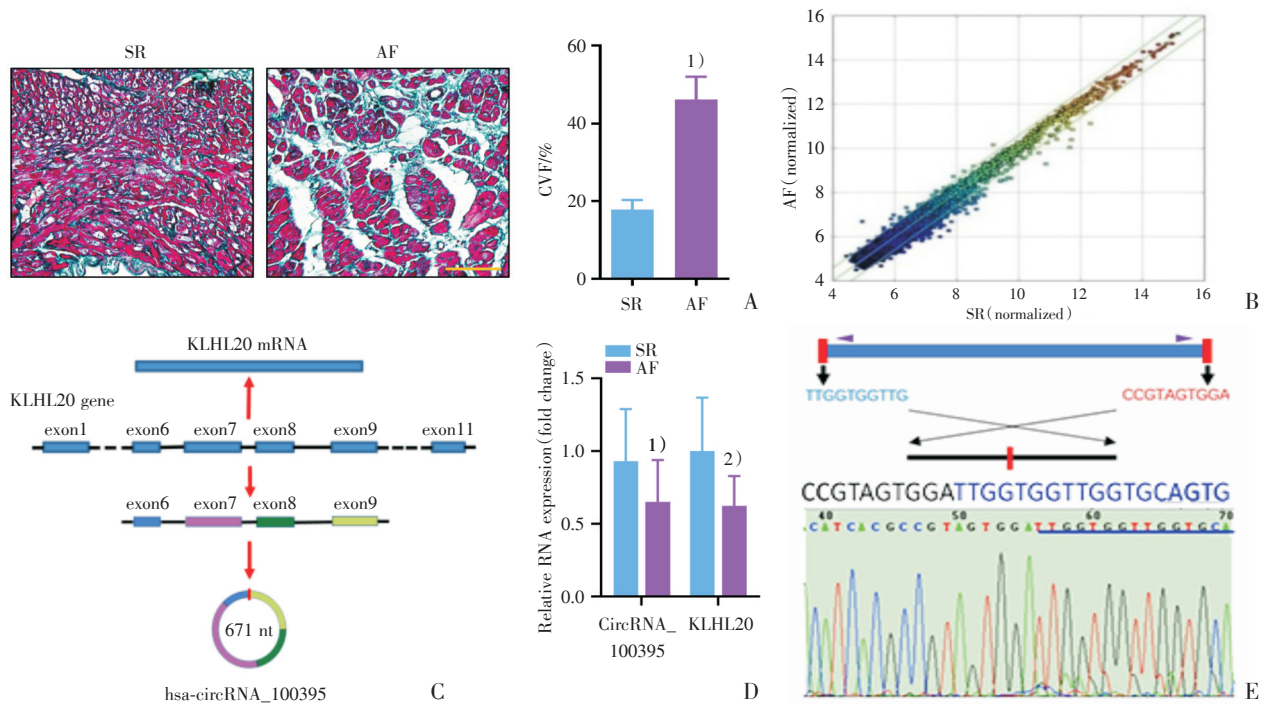
DNA测序结果显示,circRNA_100395特征性的接头序列正确,进一步证实circRNA_100395在人心耳组织中的表达(图1E)。

2.2 CircRNA_100395在Ang II处理的HAFs中的表达

在同步化处理后的HAFs中加入20 μmol/L的Ang II处理24 h,Western-blot显示经Ang II处理的HAFs中,COL1A1、COL3A1和α-SMA表达显著增加(P<0.01,图2A)。RT-qPCR结果显示circRNA_100395及其宿主基因KLHL20表达亦明显上调(P<0.05, P<0.01;图2B)。核质RNA的RT-qPCR检测显示,circRNA_100395主要分布于HAFs细胞质内,见图2C。放线菌素D能抑制HAFs胞内RNA转录,通过放线菌素D处理24 h后,相对于线形的KLHL20 mRNA,circRNA_100395具有更好的RNA稳定性(图2D)。

2.3 CircRNA_100395能抑制HAFs中纤维化相关基因表达

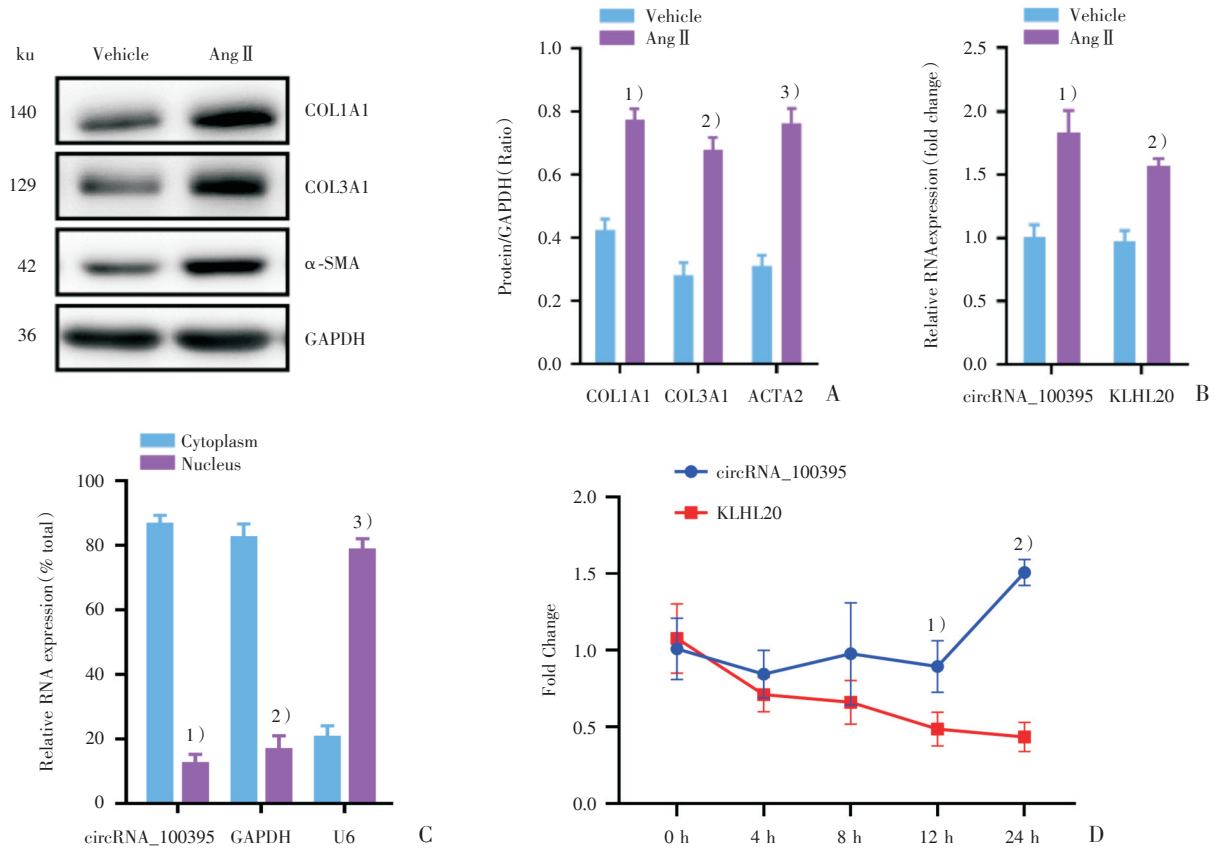
利用重组circRNA_100395腺病毒(rAd-cir-



A: Cardiac fibrosis was increased in auricles of AF patients (scale bar is 100 μm). $t = 4.486, 1) P = 0.002$ vs. SR. Data are shown as mean ± SEM, $n = 5$. B: Scatter-plots showed the dysregulated circRNAs in auricles of AF patients. C: CircRNA_100395 was derived from exon 6 to 9 of the host gene of KLHL20. D: Expression of circRNA_100395 and KLHL20 mRNA was decreased in auricles of AF patients. circRNA_100395: $t = 2.126, 1) P = 0.045$ vs. SR; KLHL20: $t = 3.251, 2) P = 0.0035$ vs. SR. Data are shown as mean ± SEM, $n = 10-14$. E: DNA sequencing results confirmed the correct sequence of the junction site of circRNA_100395.

图1 CircRNA_100395在AF病人心耳中表达降低

Fig.1 Down-regulation of circRNA_100395 in auricles of patients with long-term persistent atrial fibrillation



A: Expression of fibrosis-related genes were increased in Ang-II-induced HAFs. COL1A1: $t = 7.063$, 1) $P = 0.0021$ vs. Vehicle; COL3A1: $t = 6.928$, 2) $P = 0.0023$ vs. Vehicle; ACTA2: $t = 7.839$, 3) $P = 0.0014$ vs. Vehicle. B: Expression of circRNA_100395 and KLHL20 mRNA was increased in Ang-II-induced HAFs. circRNA_100395: $t = 5.848$, 1) $P = 0.0043$ vs. Vehicle; KLHL20: $t = 4.035$, 2) $P = 0.0157$ vs. Vehicle. C: CircRNA_100395 is abundant in the cytoplasm of HAFs. GAPDH mRNA and U6 were applied as positive controls in the cytoplasm and nucleus, respectively. circRNA_100395: $t = 22.53$, 1) $P < 0.0001$ vs. Cytoplasm; GAPDH mRNA: $t = 12.07$, 2) $P = 0.0003$ vs. Cytoplasm; U6: $t = 13.27$, 3) $P = 0.0002$ vs. Cytoplasm. D: Levels of circRNA_100395 and KLHL20 mRNA in HAFs after treatment with 2 mg/mL Actinomycin D at the indicated time points. 12 h: $t = 3.521$, 1) $P = 0.0244$ vs. KLHL20 mRNA; 24 h: $t = 14.62$, 2) $P = 0.0001$ vs. KLHL20 mRNA. Data are shown as mean \pm SEM, $n = 3$.

图2 CircRNA_100395在Ang II诱导的纤维化细胞模型中表达及核质分布

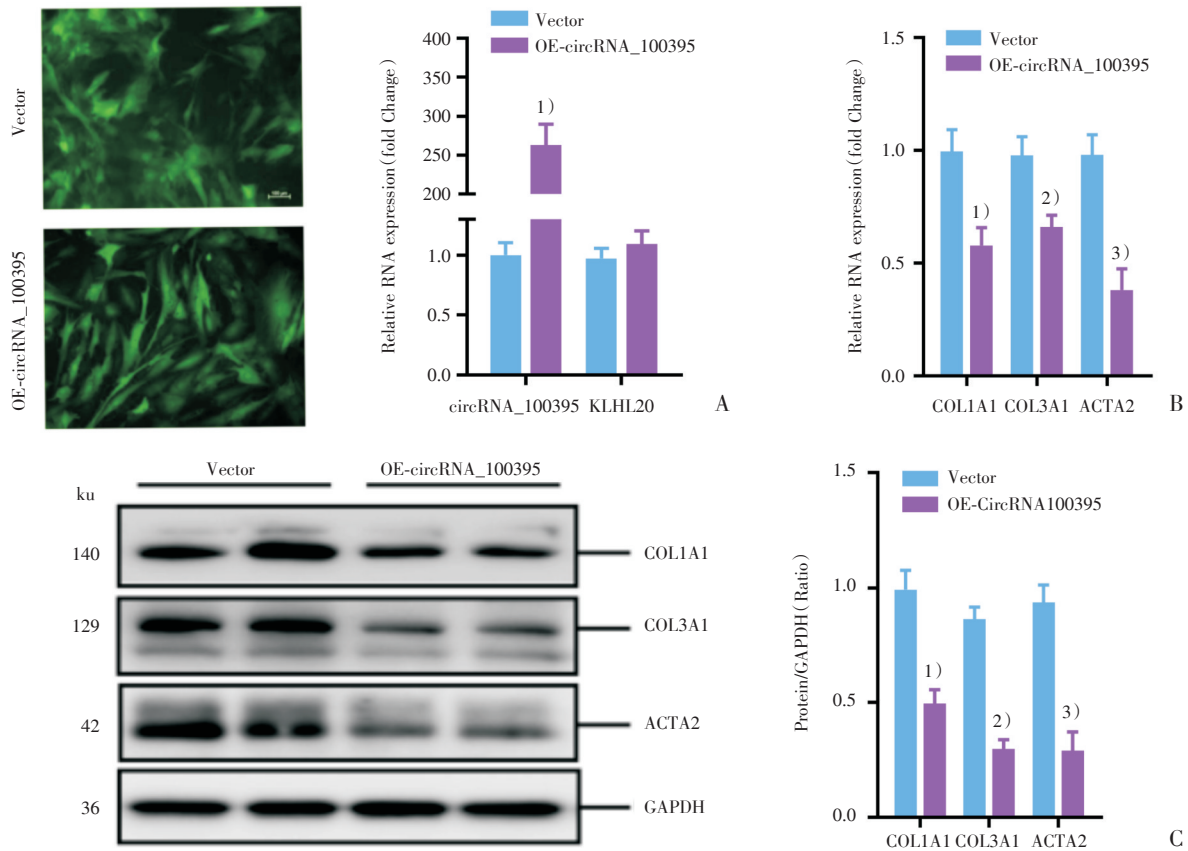
Fig.2 Expression and cellular distribution of circRNA_100395 in Ang II-induced HAF

cRNA_100395)感染HAFs 24 h后,共表达的绿色荧光蛋白(GFP)显示HAFs被充分感染,RT-qPCR结果证实 circRNA_100395在HAFs中显著过表达($P < 0.001$),但KLHL20表达不受影响(图3A)。RT-qPCR和Western-blot结果显示,过表达 circRNA_100395可以抑制Col1a1、Col3a1和Acta2表达,因此, circRNA_100395具有降低HAFs中纤维化相关基因表达的作用(图3B、C)。

2.4 CircRNA_100395通过结合miR-144-3p抑制HAFs中纤维化相关基因表达

生物信息学预测提示,在 circRNA_100395的第550~569碱基对之间,可能是与miR-144-3p结合的序列(图4A)。双荧光素酶报告基因实验

结果提示, circRNA_100395与miR-144-3p有结合作用,突变预测的结合序列后,两者间的结合作用消失(图4B)。RT-qPCR检测结果显示,过表达 circRNA_100395的HAFs中miR-144b-3p表达降低(图4C)。RNA pull-down实验结果显示突变miR-144-3p的种子序列后,miR-144-3p与 circRNA_100395间的结合作用明显降低($P < 0.05$;图4D)。Western-blot检测显示 circRNA_100395能抑制HAFs中COL1A1、COL3A1和 α -SMA的表达,而miR-144-3p增加HAFs中纤维化相关基因表达,并减弱 circRNA_100395抑制纤维化相关基因表达的作用(图4E)。



A: Over-expression of circRNA_100395 mediated by adenoviral vector in HAFs (scale bar is 100 μ m). circRNA_100395: $t = 9.872$, 1) $P = 0.0006$ vs. Vector. B: mRNA expression of fibrosis-related genes in HAFs with enforced expression of circRNA_100395 by RT-qPCR assay. COL1A1: $t = 3.353$, 1) $P = 0.0285$ vs. Vector; COL3A1: $t = 3.273$, 2) $P = 0.0307$ vs. Vector; ACTA2: $t = 4.596$, 3) $P = 0.0101$ vs. Vector. C: Protein expression of fibrosis-related genes in HAFs with enforced expression of circRNA_100395 by Western-blot assay. COL1A1: $t = 4.828$, 1) $P = 0.0085$ vs. Vector; COL3A1: $t = 8.524$, 2) $P = 0.001$ vs. Vector; ACTA2: $t = 5.789$, 3) $P = 0.0044$ vs. Vector. Data are shown as mean \pm SEM, $n = 3$.

图3 过表达 circRNA_100395 可抑制 HAF 中纤维化相关基因的表达

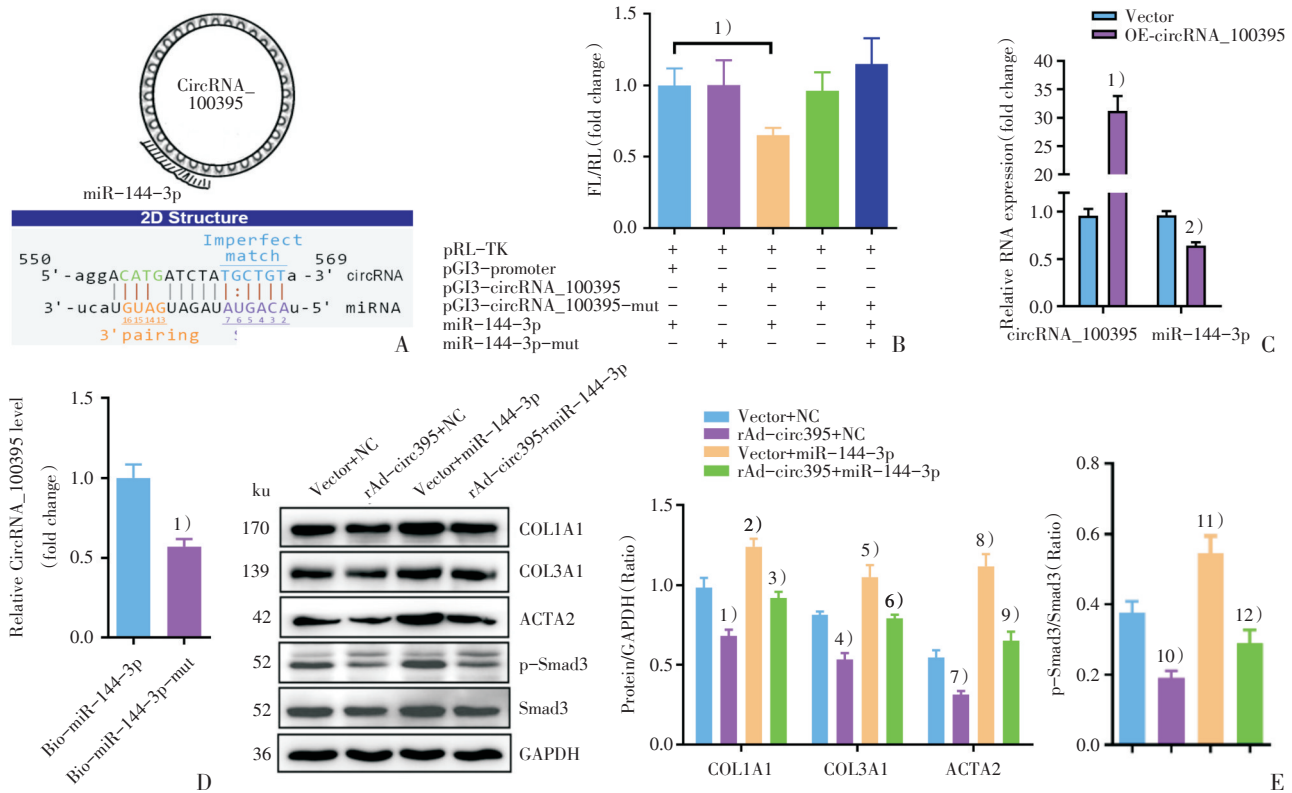
Fig.3 Over-expression of circRNA_100395 inhibits fibrosis-related genes in HAFs

3 讨论

本文发现 AF 病人的心耳组织纤维化程度显著增加,芯片检测结果显示 AF 病人心耳组织中 circRNAs 表达谱发生显著改变。RT-qPCR 实验证实 circRNA_100395 及其宿主基因 KLHL20 在纤维化的心耳组织中表达降低,而在 Ang II 诱导 HAFs 中表达升高。我们既往也有类似的发现,在 Ang- II 灌注诱导重构的小鼠心肌中 miR-214-3p 表达下调,而在 Ang- II 处理的小鼠心肌成纤维细胞和心肌细胞中 miR-214-3p 上调^[17-18]。本文结果显示在发生心肌纤维化的整体和细胞水平上, circRNA_100395 及其宿主基因 KLHL20 的表达特征不同;在 Ang- II 单一因素诱导的 HAFs 中

circRNA_100395 和 KLHL20 mRNA 表达升高,而在 AF 病人心耳组织中 circRNA_100395 和 KLHL20 mRNA 的表达下调,这种在整体水平的表达降低可能是在肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统激活、炎症和氧化应激等多种病理因素综合作用下的结果,但具体的调控机制有待于进一步研究证实。

通过对 HAFs 进行细胞核/质 RNA 分离和 RT-qPCR 检测,我们证实 circRNA_100395 主要存在于 HAFs 的胞质中,并且具有很好的 RNA 稳定性。为研究 circRNA_100395 对心肌纤维化的调控作用,我们利用腺病毒介导在 HAFs 中有效过表达 circRNA_100395,但同时并未影响其宿主基因 KLHL20 的表达。RNA 和蛋白水平的检测结果显示,过表达 circRNA_100395 可显著降低 HAFs 中



A: Potential binding site of miR-144-3p in circRNA_100395. B: Identification of interaction between circRNA_100395 and miR-144-3p by dual luciferase assay, $F = 5.156$, $P = 0.0162$, 1) $P = 0.0388$. C: Detection of miR-144-3p in HAFs with enforced expression of circRNA_100395, circRNA_100395: $t = 11.53$, 1) $P = 0.0003$ vs. Vector; miR-144-3p: $t = 5.358$, 2) $P = 0.0059$ vs. Vector. D: Identification of interaction between circRNA_100395 and miR-144-3p by RNA pull-down assay, $t = 4.419$, 1) $P = 0.0115$ vs. Bio-miR-144-3p. E: Expression of fibrosis-related genes and Smad3 activation in HAFs with overexpression of circRNA_100395 and miR-144-3p, respectively. COL1A1: $F = 22.37$, $P = 0.0003$, 1) $P = 0.0058$ vs. Vector+NC, 2) $P = 0.0146$ vs. Vector+NC, 3) $P = 0.0041$ vs. Vector+miR-144-3p; COL3A1: $F = 21.62$, $P = 0.0003$, 4) $P = 0.0062$ vs. Vector+NC, 5) $P = 0.0156$ vs. Vector+NC, 6) $P = 0.0094$ vs. Vector+miR-144-3p; ACTA2: $F = 38.93$, $P < 0.0001$, 7) $P = 0.0388$ vs. Vector+NC, 8) $P = 0.0002$ vs. Vector+NC, 9) $P = 0.0008$ vs. Vector+miR-144-3p; p-Smad3/Smad3: $F = 17.77$, $P = 0.0007$, 10) $P = 0.0157$ vs. Vector+NC, 11) $P = 0.0251$ vs. Vector+NC, 12) $P = 0.0025$ vs. Vector+miR-144-3p. Data are shown as mean \pm SEM, $n = 3$.

图4 CircRNA_100395通过结合miR-144-3p发挥抑制心肌纤维化作用

Fig.4 CircRNA-100395 inhibits myocardial fibrosis in HAFs via sponging miR-144-3p

纤维化相关基因表达,证实 circRNA_100395 具有抑制心肌纤维化的作用,并且 circRNA_100395 发挥生物学作用不是通过调控宿主基因 KLHL20 表达的方式来实现的。

以往研究表明,胞质中富集存在的 circRNA 可以通过结合特异的 miRNA 来发挥生物学作用^[13,19]。鉴于 circRNA_100395 是在 HAFs 胞质中富集存在,我们推测 circRNA_100395 可能通过特异结合与纤维化调控相关 miRNAs 的途径来发挥生物学作用。Chen 等人发现 circRNA_100395 可以通过结合 miR-1228 调控 miR-1228/TCF21 信号轴,负性调控肺癌细胞的增殖,从而起到抑制癌细胞增殖的作用^[20]。本文中,我们预测 circRNA_100395 上

存在可与 miR-144-3p 结合的潜在位点,并通过双荧光酶报告基因实验和 RNA pull-down 实验证实了两者间的结合作用。有文献报道,miR-144-3p 可靶向结合宿主基因第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN),抑制 PTEN 的转录和翻译,上调纤维化相关基因 α -SMA, COL1A1 和 COL3A1 的表达,发挥促进心肌纤维化的作用^[21]。本文结果显示,miR-144-3p 可促进 HAF 中纤维化相关基因表达,而 circRNA_100395 可通过特异吸附 miR-144-3p 来发挥抑制 HAF 中纤维化相关基因表达的作用,但 PTEN 是否参与介导 circRNA_100395 抑制纤维化相关基因表达的作用,仍需进一步的实验证实。

综上,本文发现在AF病人的心耳组织中 circRNA_100395 表达明显下调,circRNA_100395 主要存在于 HAFs 胞质中;circRNA_100395 可通过特异结合 miR-144-3p 来发挥抑制心肌纤维化的作用。接下来,我们将继续研究介导 circRNA_100395 发

挥抑制心肌纤维化作用的 miR-144-3p 下游靶基因,在细胞和整体动物水平明确 miR-144-3p 介导 circRNA_100395 发挥抑制心肌纤维化作用的分子机制,为以 circRNA_100395 为靶点的心肌纤维化治疗研究提供科学依据。

参考文献

- [1] Tsai CT, Tseng CD, Hwang JJ, et al. Tachycardia of atrial myocytes induces collagen expression in atrial fibroblasts through transforming growth factor β 1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(4): 805-815.
- [2] He X, Gao X, Peng L, et al. Atrial fibrillation induces myocardial fibrosis through angiotensin II type 1 receptor-specific Arkadia-mediated downregulation of Smad7 [J]. *Circ Res*, 2011, 108(2): 164-175.
- [3] Liu J, Liu T, Wang X, et al. Circles reshaping the RNA world: from waste to treasure [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 58.
- [4] Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(3): 428-442.
- [5] Suzuki H, Tsukahara T. A view of pre-mRNA splicing from RNase R resistant RNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(6): 9331-9342.
- [6] Legnini I, Timoteo GD, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22-37.
- [7] Sun YM, Wang WT, Zeng ZC, et al. circMYBL2, a circRNA from MYBL2, regulates FLT3 translation by recruiting PTBP1 to promote FLT3-ITD AML progression [J]. *Blood*, 2019, 134(18): 1533-1546.
- [8] Li LJ, Leng RX, Fan YG, et al. Translation of non-coding RNAs: Focus on lncRNAs, pri-miRNAs, and circRNAs [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 361(1): 1-8.
- [9] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. CircRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing [J]. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55-66.
- [10] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [11] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- [12] Garikipati VNS, Verma SK, Cheng Z, et al. Circular RNA CircFndc3b modulates cardiac repair after myocardial infarction via FUS/VEGF-A axis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4317.
- [13] 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.
- [14] Liang Y, Lin Q, Zhu J, et al. The caspase-8 shRNA-modified mesenchymal stem cells improve the function of infarcted heart [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 397(1-2): 7-16.
- [15] Yuan W, Tang C, Zhu W, et al. CDK6 mediates the effect of attenuation of miR-1 on provoking cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 412(1-2): 289-296.
- [16] Li H, Xu JD, Fang XH, et al. Circular RNA circRNA_000203 aggravates cardiac hypertrophy via suppressing miR-26b-5p and miR-140-3p binding to Gata4 [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(7): 1323-1334.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [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] Chen D, Ma W, Ke Z, et al. CircRNA hsa_circ_100395 regulates miR-1228/TCF21 pathway to inhibit lung cancer progression [J]. *Cell cycle*, 2018, 17(16): 2080-2090.
- [21] Yuan X, Pan J, Wen L, et al. MiR-144-3p enhances cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting PTEN [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, (7): 249.

(编辑 孙慧兰)