

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.12.005
文章编号: 1005-8982 (2024) 12-0024-09

实验研究·论著

MicroRNA-363-5p 靶向血小板反应蛋白-3 调控心肌细胞肥大的作用机制研究*

马玉坤¹, 单正宜², 刘荟婷², 咎树槐³, 赵鹏²

(1. 青岛大学 基础医学院, 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学附属医院 病理科,
山东 青岛 266100; 3. 青岛大学第一临床医学院, 山东 青岛 266071)

摘要: **目的** 探讨 microRNA-363-5p(miR-363-5p) 靶向血小板反应蛋白-3 (THBS3) 对心肌肥大的调节作用。**方法** 体外人心肌细胞(AC16)经血管紧张素 II (Ang II) 处理复制心肌肥大体外模型, 随后鬼笔环肽染色观察细胞骨架, Western blotting 检测心肌肥大体外模型中胚胎期基因的蛋白表达, 以确认模型复制的有效性。实时荧光定量聚合酶链反应检测心肌肥大体外模型中 miR-363-5p 表达。Western blotting 检测肥大心肌细胞中转染 miR-363-5p mimics 和 miR-363-5p inhibitor 后, 肥大相关表型的变化。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-363-5p 与 THBS3 的 3'-UTR 结合作用。设计挽救实验, 同时过表达 THBS3 与 miR-363-5p, 以评估 THBS3 是否介导 miR-363-5p 对心肌肥大的调控。**结果** Ang II 组细胞面积较对照组大 ($P < 0.05$), 心房钠尿肽 (ANP)、B 型钠尿肽 (BNP)、肌球蛋白 β 重链 (β -MHC) 及 miR-363-5p 较对照组高 ($P < 0.05$)。miR-363-5p mimics 组 miR-363-5p 相对表达量较 mimics-NC 组高 ($P < 0.05$), miR-363-5p inhibitor 组相对表达量较 inhibitor-NC 组低 ($P < 0.05$); miR-363-5p mimics 组 ANP、BNP、 β -MHC 相对表达量较 mimics-NC 组低 ($P < 0.05$), miR-363-5p inhibitor 组相对表达量较 inhibitor-NC 组高 ($P < 0.05$)。miR-363-5p mimics 组细胞面积较 mimics-NC 组小 ($P < 0.05$), miR-363-5p inhibitor 组较 inhibitor-NC 组大 ($P < 0.05$)。miR-363-5p mimics + THBS3-WT 组 THBS3-WT 荧光素酶活性较 mimics-NC + THBS3-WT 组低。mimics-NC + THBS3-MUT 组与 miR-363-5p mimics + THBS3-MUT 组 THBS3-MUT 荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR-363-5p mimics 组 THBS3 mRNA 和蛋白相对表达量较 mimics-NC 组低 ($P < 0.05$)。THBS3-OE 组 THBS3 mRNA 和蛋白相对表达量较对照组、OE-NC 组高 ($P < 0.05$)。THBS3-OE + miR-363-5p mimics 组细胞面积较 OE-NC + miR-363-5p mimics 组大 ($P < 0.05$)。THBS3-OE + miR-363-5p mimics 组 ANP、BNP 及 β -MHC 相对表达量较 OE-NC + miR-363-5p mimics 组高 ($P < 0.05$)。**结论** 过表达 miR-363-5p 可抑制 Ang II 对 AC16 细胞的促肥大作用, 其机制与减少 THBS3 表达有关。

关键词: 心肌细胞肥大; microRNA-363-5p; 血小板反应蛋白-3

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

MicroRNA-363-5p targets thrombospondin-3 to regulate myocardial hypertrophy*

Ma Yu-kun¹, Shan Zheng-yi², Liu Hui-ting², Zan Shu-huai³, Zhao Peng²

(1. The School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266100, China; 3. The First School of Clinical Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China)

收稿日期: 2023-06-21

* 基金项目: 山东省自然科学基金(No:ZR2021MH127)

[通信作者] 赵鹏, E-mail: qyzhaopeng@sina.com

Abstract: Objective To investigate the regulatory role of microRNA-363-5p (miR-363-5p) in myocardial hypertrophy by targeting thrombospondin-3 (THBS3). **Methods** An in vitro model of myocardial hypertrophy was replicated by treating human myocardial cells (AC16) with angiotensin II (AngII). The cytoskeleton was observed with the phalloidin staining, and Western blotting was used to evaluate the protein expression levels of embryonic genes in the cell model of myocardial hypertrophy to confirm the successful model establishment. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to detect the expression level of miR-363-5p in the cell model of myocardial hypertrophy. Western blotting was applied to assess the changes in hypertrophy-related phenotypes in hypertrophic myocardial cells after transfection with miR-363-5p mimics and miR-363-5p inhibitor. Dual-luciferase reporter assay was conducted to validate the binding of miR-363-5p to the 3'-UTR of THBS3. Rescue experiments with overexpression of both THBS3 and miR-363-5p were designed to evaluate whether THBS3 mediated the regulatory role of miR-363-5p in myocardial hypertrophy. **Results** The area of cells in the AngII group was larger than that in the control group ($P < 0.05$). The expressions of ANP, BNP, β -MHC and miR-363-5p in the AngII group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The relative expression of miR-363-5p in the miR-363-5p mimics group was higher than that in the mimics-NC group ($P < 0.05$), while that in the miR-363-5p inhibitor was lower compared with the inhibitor-NC ($P < 0.05$). The relative expressions of ANP, BNP and β -MHC in the miR-363-5p mimics group were lower than those in the mimics-NC group ($P < 0.05$), while those in the miR-363-5p inhibitor were higher compared with the inhibitor-NC group ($P < 0.05$). The area of cells in the miR-363-5p mimics group was smaller than that in the mimics-NC ($P < 0.05$), while that in the miR-363-5p inhibitor group was larger compared with the inhibitor-NC group ($P < 0.05$). The luciferase activity of THBS3-WT in the miR-363-5p mimics + THBS3-WT group was lower than in the mimics-NC + THBS3-WT group ($P < 0.05$). There was no difference in the luciferase activity of THBS3-MUT between the mimics-NC+THBS3-MUT group and the miR-363-5p mimics + THBS3-MUT group ($P > 0.05$). The relative mRNA and protein expressions of THBS3 in the miR-363-5p mimics group were lower than those in the mimics-NC group ($P < 0.05$), and they were higher in the THBS3-OE group than those in the control group and the OE-NC group ($P < 0.05$). The area of cells in the THBS3-OE + miR-363-5p mimics group was larger than that in the OE-NC + miR-363-5p mimics ($P < 0.05$). The relative expressions of ANP, BNP and β -MHC in the THBS3-OE + miR-363-5p mimics group were higher than those in the OE-NC + miR-363-5p mimics group ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-363-5p alleviates the pro-hypertrophic effect of AngII on AC16 cells, which is related to the inhibition of THBS3 expression.

Keywords: myocardial hypertrophy; microRNA-363-5p; thrombospondin-3

心肌肥大是指在机械性刺激和/或神经体液因子作用下,心脏为适应心肌损伤或负荷增加,维持心肌细胞稳态^[1],而出现的心肌细胞体积增大、心室质量增加、心室壁增厚及胚胎期基因,如心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、B型钠尿肽(B-type natriuretic peptide, BNP)和肌球蛋白 β 重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)等重新表达的一种代偿适应性反应^[2]。心肌肥大初期具有一定的代偿能力,对机体有益,但其代偿能力有限,在长期、持续的病理因素刺激下,由心肌肥大等多种代偿形式组成的心室重塑走向失代偿,最终导致心力衰竭,心室重塑是心力衰竭发生、发展的重要分子基础^[3-4]。因此,阻断和/或延缓心肌肥大对治疗心力衰竭具有重要意义^[5]。尽管对心肌肥大的研究已经很多,但目前,病理性心肌肥大的发病机制尚未完全阐明,不利于对心肌肥大的临床治疗^[6]。

课题组前期通过蛋白组学技术分析得出携带 MYH7 与 MYBPC3 基因突变的肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)患者心肌组织差异表达蛋白谱后,结合 GO、KEGG 富集等生物信息分析结果,筛选确定了许多关键蛋白^[7],如碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)、血小板反应蛋白-3(Thrombospondin-3, THBS3)、THBS4等。其中,血小板反应蛋白由5个同源基因(THBS1~THBS5)组成,THBS1和THBS2形成三聚体,THBS3、THBS4、THBS5形成五聚体^[8]。尽管所有THBS家族的C末端1/2氨基酸序列高度同源,但每个家族都有不同的功能。最先发现的THBS1、THBS2是许多早期研究的重点,以强大的抗血管生成作用而闻名^[9-10],近期也发现THBS1在甲状腺肿瘤中表现出独特的活性^[11],此外,SINGLA等^[12]证明THBS1可通过激活淋巴内皮细胞中的CD47,缓解动脉粥样硬化病变的形成。THBS3

和 THBS4 在蛋白结构和整体序列上高度相似,这 2 种蛋白都在心脏疾病中表达上调^[13-15],其中 THBS4 在心肌肥厚中的作用已被证明^[16]。而 THBS3 在 HCM 患者中高表达,说明其在 HCM 的发生、发展中具有重要意义,但机制不清楚,是本文的研究重点。

MicroRNA 是一类小的内源性非编码 RNA 分子,通过与靶向 mRNA 的 3'UTR 结合,促进 mRNA 降解或抑制翻译,进而调控各种生物学进程^[17-18]。大量研究表明,miRNA 参与调节心肌肥大,如 miR-208 已被证实参与心肌肥大的信号传导^[19];在体外实验中已被证实抑制 miR-133 会导致心肌肥厚等^[20]。除此之外,也有研究表明,miRNA 同样在其他心血管疾病的发生、发展中扮演重要角色,如扩张性心脏病^[21-22]、心肌梗死^[23]、动脉粥样硬化^[24]、心力衰竭^[25-26]等。生物信息分析筛选出调控 THBS3 转录水平的 miR-363-5p,但其在心肌肥大中的具体作用机制尚不明确。故本文旨在探讨 miR-363-5p 对 Ang II 诱导的人心肌细胞 AC16 肥大相关表型的影响,并阐明 THBS3 是否通过介导 miR-363-5p 发挥对心肌肥大的调节作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和主要试剂

人心肌细胞 AC16、DMEM/F-12 培养基购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司,血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 购自美国 Abmole 公司,胎牛血清、胰酶购自美国 Gibco 公司,转染试剂 jet PRIME Transfection Reagent 购自法国 Polyplus 公司,TRIzol 试剂、逆转录试剂及实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂等均购自北京擎科生物科技股份有限公司,RIPA 蛋白裂解缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Actin-Tracker Green-488(微丝绿色荧光探针)购自上海碧云天生物技术有限公司,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自武汉赛维尔生物科技有限公司,Double-Luciferase Reporter Assay Kit(双荧光素酶报告基因试剂盒)购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及心肌肥大体外模型复制 AC16

细胞在 DMEM/F-12 培养基中培养,培养基中添加 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素。细胞放置于 37 °C、含 5% 二氧化碳(CO₂)的恒温培养箱中培养,常规传代培养。Ang II 已被证实是诱导 AC16 细胞复制心肌肥大体外模型的常用药物^[27-32]。采用 1×10^{-7} mol/L Ang II 处理 AC16 细胞 24 h 诱发其发生肥大表型,诱导结束后,通过检测胚胎期基因(ANP、BNP 和 β -MHC)的蛋白表达和量化细胞大小来评价模型复制情况。

1.2.2 细胞转染 取对数生长期,生长状态良好的 AC16 细胞按照 3×10^4 个/孔的密度接种到 24 孔板中,培养 24 h。当细胞融合度为 60% ~ 80% 时进行细胞转染。根据转染试剂盒说明书,取 50 μ L jetPRIME 缓冲液放入 EP 管中,加入终浓度为 50 nmoL miR-363-5p mimics、100 nmoL miR-363-5p inhibitor 和 2 μ g THBS3 过表达载体质粒及阴性对照质粒(mimics-NC、inhibitor-NC、OE-NC),混匀;加入 1 μ L jetPRIME 试剂,混匀,室温孵育 10 min;取上述混合物 50 μ L 分别加入细胞培养液中,4 ~ 6 h 后更换新鲜培养基,加入 1×10^{-7} mol/L 的 Ang II,5% CO₂,37 °C 培养;转染 48 h 后进行后续检测。

1.2.3 细胞分组及处理 为检测心肌肥大体外模型复制的有效性、探讨 miR-363-5p 对心肌肥大的影响和 miR-363-5p 与 THBS3 的调控关系,将细胞分为对照组(细胞正常培养)、Ang II 组(细胞接受 Ang II 诱导,即心肌肥大体外模型组)、mimics-NC 组(将模拟物阴性对照转染至细胞中)、miR-363-5p mimics 组(将 miR-363-5p 模拟物转染至细胞中)、inhibitor-NC 组(将抑制剂阴性对照转染至细胞中)、miR-363-5p inhibitor 组(将 miR-363-5p 抑制剂转染至细胞中),除对照组外,其余各组均接受 Ang II 诱导。

为证实 THBS3 可介导 miR-363-5p 对心肌肥大的影响,拟过表达 THBS3 的同时过表达 miR-363-5p 行挽救实验,探讨 miR-363-5p 的作用是否会被部分逆转,将细胞分为对照组(细胞正常培养)、OE-NC 组(将空载体转染至细胞中)、THBS3-OE 组(将 THBS3 过表达载体转染至细胞中)、OE-NC + mimics-NC 组(将空载体和 miR 模拟物阴性对照同时转染至细胞中)、OE-NC + miR-363-5p mimics 组(将空载体和 miR-363-5p 模拟物同时转染至细胞中)、THBS3-OE + miR mimics 组(将 THBS3 过表达载体和

miR-363-5p 模拟物同时转染至细胞中), 除对照组外, 其余各组均接受 Ang II 诱导。

1.2.4 qRT-PCR 检测 THBS3、miR-363-5p mRNA 表达 用 TRIzol 试剂提取 AC16 细胞中总 RNA。取 1.0 μg 总 RNA, 加入逆转录试剂 ($5 \times$) 4 μL (逆转录试剂盒), 随后逆转录为 cDNA 用于检测编码基因 mRNA。取 1.0 μg 总 RNA, 用 miR-363-5p 特异引物逆转录为 cDNA 用于检测 miR-363-5p 水平。分别用 GAPDH 和 U6 作为检测编码基因和 miR-363-5p 表达水平的内参。在 QuantStudio 12K PCR System (Applied Biosystems, 美国 Carlsbad 公司) 进行 PCR 反应和结果分析。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 THBS3 mRNA 和 miR-363-5p 的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
THBS3	正向: 5'-AACTCACCCTCTTCAACCAGAT-3'	184
	反向: 5'-TACTCGTACACTTCCATGCACT-3'	
GAPDH	正向: 5'-TCAAGAAGGTGCTGAAGCAGG-3'	115
	反向: 5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'	
miR-363-5p	茎环: 5'-GTCGTATCCAGTGCATTCCGACTG GATACGACAAATTGCA-3'	80
U6	正向: 5'-CGCTCCGGCAGCACATATAC-3'	85
	反向: 5'-AAATATGGAACGCTTCACGA-3'	

1.2.5 Western blotting 检测 THBS3、ANP、BNP 和 β -MHC 蛋白表达 利用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白含量并计算上样量。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将蛋白转至 PVDF 膜, 封闭后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗 ANP (1:1 000)、BNP (1:1 000)、 β -MHC (1:1 000)、THBS-3 (1:1 000)、GADPH (1:50 000) 过夜。TBST 洗涤后用相应二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 经凝胶成像系统显影、曝光、拍照。使用 Image J 对条带进行灰度分析。

1.2.6 鬼笔环肽染色 准备 Confocal 皿, 均匀铺入 AC16, 经实验干预后, 弃原培养液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 漂洗 2 次。吸干 PBS, 加入多聚甲醛固定液, 常温静置 10~20 min。吸干多聚甲醛固定液后, 用 PBS 清洗 2~3 次, 10 min/次,

加入 0.1% Triton-X 透化液处理细胞, 再次漂洗。加入鬼笔环肽工作液, 室温避光孵育 60 min。染色完成用 PBS 洗后, 滴入 DAPI 封片剂, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内避光保存, 用激光共聚焦显微镜观察心肌细胞形态并拍摄, Image J 软件分析细胞面积。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测 根据生物信息学预测的 miR-363-5p 与 THBS3 的结合序列, 用该段序列及其突变序列分别构建 pGL3-promoter 载体, 获得野生型 THBS3 (THBS3-WT) 和突变型 THBS3 (THBS3-MUT) 重组质粒。将 THBS3-WT 或 THBS3-MUT 分别与 mimics-NC 和 miR-363-5p mimics 共转染至 HEK293 细胞中, 24 h 后分别测定萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶的荧光强度。通过计算两者比值, 判断 miR-363-5p 与 THBS3 的结合作用。将细胞分为 mimics-NC+THBS3-WT 组 (将模拟物阴性对照与野生型 THBS3 重组质粒共转染至细胞中)、miR-363-5p mimics + THBS3-WT 组 (将 miR-363-5p 模拟物与野生型 THBS3 重组质粒共转染至细胞中)、mimics-NC + THBS3-WUT 组 (将模拟物阴性对照与突变型 THBS3 重组质粒共转染至细胞中)、miR-363-5p mimics + THBS3-WUT 组 (将 miR-363-5p 模拟物与突变型 THBS3 重组质粒共转染至细胞中)。

1.3 统计学方法

数据分析采用 Image J、GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 27.0 统计学软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析, 两两比较用 Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组细胞面积、ANP、BNP、 β -MHC 及 miR-363-5p 比较

两组细胞面积、ANP、BNP、 β -MHC 及 miR-363-5p 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), Ang II 组细胞面积较对照组大, ANP、BNP、 β -MHC 及 miR-363-5p 较对照组高。提示成功复制心肌肥大体外模型, 且 miR-363-5p 可能参与心肌肥大的发生、发展。见表 2 和图 1、2。

2.2 各组 miR-363-5p、细胞面积、ANP、BNP 及 β -MHC 比较

各组 miR-363-5p、ANP、BNP、 β -MHC 相对表达

表 2 两组细胞面积、ANP、BNP、β-MHC 及 miR-363-5p 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞面积	ANP	BNP	β-MHC	miR-363-5p
对照组	1.09 ± 0.29	0.95 ± 0.05	1.04 ± 0.12	1.01 ± 0.12	0.95 ± 0.47
Ang II 组	2.53 ± 1.57	2.23 ± 0.56	2.62 ± 0.31	2.07 ± 0.40	0.01 ± 0.00
t 值	2.861	3.943	8.187	4.428	35.078
P 值	0.000	0.017	0.001	0.011	0.000

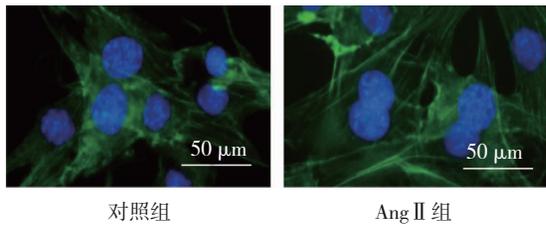


图 1 两组鬼笔环肽染色

量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。miR-363-5p mimics 组 miR-363-5p 相对表达量较 mimics-NC 组高($P < 0.05$), miR-363-5p inhibitor 组相对表达量

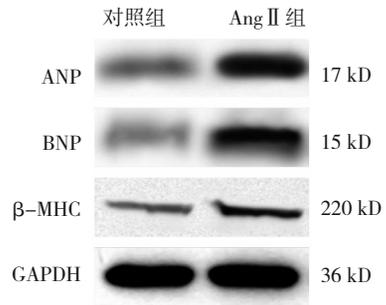


图 2 两组 ANP、BNP 及 β-MHC 蛋白条带图

较 inhibitor-NC 组低($P < 0.05$); miR-363-5p mimics 组 ANP、BNP、β-MHC 相对表达量较 mimics-NC 组低($P < 0.05$), miR-363-5p inhibitor 组相对表达量较 inhibitor-NC 组高($P < 0.05$)。各组细胞面积比较,差异有统计学意义($P < 0.05$), miR-363-5p mimics 组较 mimics-NC 组小($P < 0.05$), miR-363-5p inhibitor 组较 inhibitor-NC 组大($P < 0.05$)。以上结果提示,过表达 miR-363-5p 对 Ang II 诱导的细胞肥大有明显抑制作用,减少 miR-363-5p 表达,促进心肌肥大。见表 3 和图 3、4。

表 3 各组 miR-363-5p、细胞面积、ANP、BNP 及 β-MHC 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-363-5p	细胞面积	ANP	BNP	β-MHC
mimics-NC 组	1.07 ± 0.13	1.04 ± 0.03	0.90 ± 0.06	1.01 ± 0.01	0.64 ± 0.05
miR-363-5p mimics 组	304.10 ± 13.25	0.63 ± 0.18	0.59 ± 0.03	0.82 ± 0.03	0.38 ± 0.05
inhibitor-NC 组	0.99 ± 0.03	1.17 ± 0.25	0.75 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.55 ± 0.01
miR-363-5p inhibitor 组	0.27 ± 0.01	2.16 ± 1.10	1.01 ± 0.11	1.15 ± 0.03	0.90 ± 0.07
F 值	1571.000	12.920	22.410	235.400	52.610
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

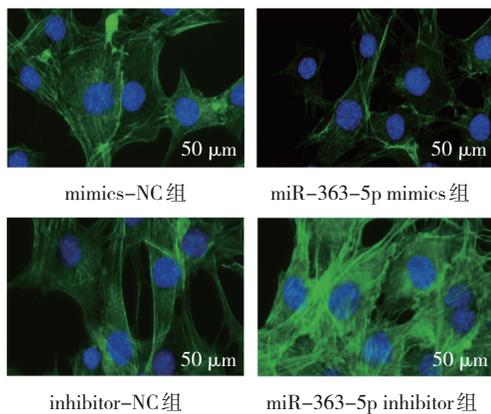
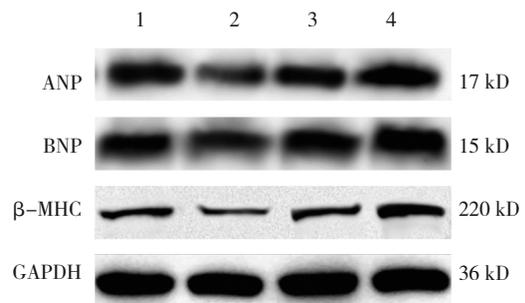


图 3 各组鬼笔环肽染色



1: mimics-NC 组; 2: miR-363-5p mimics 组; 3: inhibitor-NC 组; 4: miR-363-5p inhibitor 组。

图 4 各组 ANP、BNP 及 β-MHC 蛋白条带

2.3 miR-363-5p mimics + THBS3-WT 组与 mimics-NC + THBS3-WT 组荧光素酶活性比较

生物信息学在线分析显示, THBS3 的 3'-UTR 与 miR-363-5p 存在潜在结合位点 (见图 5)。随后进行双荧光素酶报告基因实验, miR-363-5p mimics + THBS3-WT 组与 mimics-NC + THBS3-WT 组 THBS3-WT 荧光素酶活性比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-363-5p mimics + THBS3-WT 组较 mimics-NC + THBS3-WT 组低。mimics-NC + THBS3-MUT 组与 miR-363-5p mimics + THBS3-MUT 组 THBS3-MUT 荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以上结果说明 miR-363-5p 通过靶向结合 THBS3 的 3'-UTR 调控其转录活性。见表 4。

THBS3-WT 5'-TGGCCTTGGGGTCCATCC-3'
 miR-363-5p 5'-AACGUAGCACUAGGUGGG-3'
 THBS3-MUT 5'-AGCGCATCGCGAGGTTGG-3'

图 5 miR-363-5p 与 THBS3 结合位点示意图

表 4 两组荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

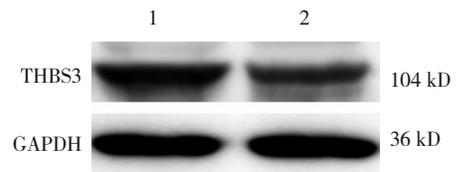
组别	THBS3-WT	THBS3-MUT
mimics-NC + THBS3-WT 组	1.00 ± 0.03	0.98 ± 0.09
miR-363-5p mimics + THBS3-MUT 组	0.50 ± 0.02	0.93 ± 0.05
t 值	23.140	0.9497
P 值	0.000	0.396

2.4 mimics-NC 组与 miR-363-5p mimics 组 THBS3 mRNA 和蛋白相对表达量比较

mimics-NC 组与 miR-363-5p mimics 组 THBS3 mRNA 和蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-363-5p mimics 组较 mimics-NC 组低。提示 miR-363-5p 可靶向结合且负向调控 THBS3 表达。见表 5 和图 6。

表 5 mimics-NC 组与 miR-363-5p mimics 组 THBS3 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	THBS3 mRNA	THBS3 蛋白
mimics-NC 组	3.35 ± 0.06	1.08 ± 0.02
miR-363-5p mimics 组	1.68 ± 0.09	0.76 ± 0.01
t 值	26.700	25.290
P 值	0.000	0.000



1: mimics-NC 组; 2: miR-363-5p mimics 组。

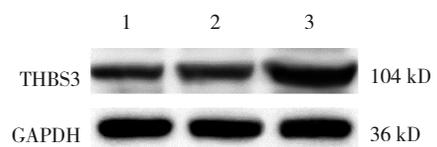
图 6 mimics-NC 组与 miR-363-5p mimics 组 THBS3 蛋白条带

2.5 对照组、OE-NC 组、THBS3-OE 组 THBS3 mRNA 和蛋白相对表达量比较

对照组、OE-NC 组、THBS3-OE 组 THBS3 mRNA 和蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。THBS3-OE 组较对照组、OE-NC 组高 ($P < 0.05$)。提示 THBS3 过表达载体构建成功。见表 6 和图 7。

表 6 对照组、OE-NC 组、THBS3-OE 组 THBS3 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	THBS3 mRNA	THBS3 蛋白
对照组	0.97 ± 0.06	0.61 ± 0.08
OE-NC 组	0.96 ± 0.01	0.71 ± 0.08
THBS3-OE 组	306.10 ± 42.36	1.21 ± 0.10
F 值	155.700	155.700
P 值	0.000	0.000



1: 对照组; 2: OE-NC 组; 3: THBS3-OE 组。

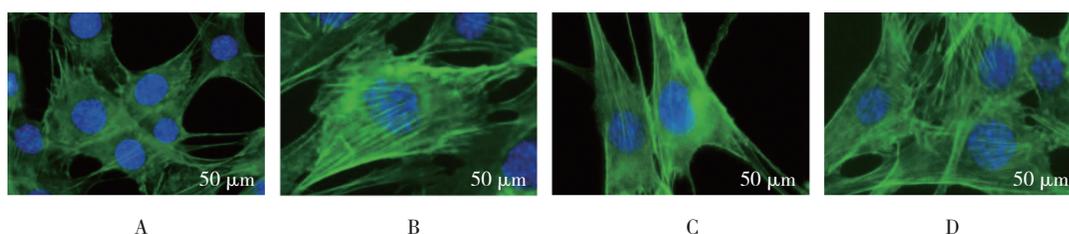
图 7 对照组、OE-NC 组、THBS3-OE 组 THBS3 蛋白条带

2.6 各组细胞面积、ANP、BNP 及 β-MHC 比较

各组细胞面积比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), THBS3-OE + miR-363-5p mimics 组较 OE-NC + miR-363-5p mimics 组大 ($P < 0.05$)。各组 ANP、BNP 及 β-MHC 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), THBS3-OE + miR-363-5p mimics 组较 OE-NC + miR-363-5p mimics 组高 ($P < 0.05$)。说明过表达 THBS3 可部分减弱过表达 miR-363-5p 对心肌肥大的抑制作用。见表 7 和图 8、9。

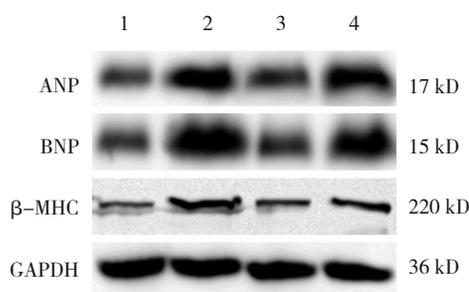
表 7 各组细胞面积、ANP、BNP 及 β -MHC 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞面积	ANP	BNP	β -MHC
对照组	1.02 \pm 0.26	0.39 \pm 0.03	0.37 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03
OE-NC + mimics-NC 组	2.07 \pm 0.73	0.93 \pm 0.20	1.13 \pm 0.22	1.06 \pm 0.15
OE-NC + miR-363-5p mimics 组	1.03 \pm 0.27	0.69 \pm 0.08	0.48 \pm 0.03	0.49 \pm 0.04
THBS3-OE + miR-363-5p mimics 组	1.44 \pm 0.36	1.08 \pm 0.07	0.90 \pm 0.07	0.64 \pm 0.06
F 值	12.290	20.760	27.460	38.280
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000



A: 对照组; B: OE-NC + mimics-NC 组; C: OE-NC + miR-363-5p mimics 组; D: THBS3-OE + miR-363-5p mimics 组。

图 8 各组鬼笔环肽染色图



1: 对照组; 2: OE-NC + mimics-NC 组; 3: OE-NC + miR-363-5p mimics 组; 4: THBS3-OE + miR-363-5p mimics 组。

图 9 各组 ANP、BNP 及 β -MHC 蛋白条带图

3 讨论

不论是原发性,还是继发性的心脏疾病,如果不对其干预,最终都会走向心室重塑,导致心力衰竭。心肌肥大是心室重塑的表现形式之一,且进展先于心力衰竭,故逆转和/或延缓心肌肥大对治疗心力衰竭具有重要意义。随着对 microRNA 的认知逐渐清晰,发现其参与许多病理生理过程,包括心肌肥大^[33],但其具体机制尚未完全明了。本研究前期利用蛋白组学技术分析得出 HCM 与正常人心肌组织中的差异表达蛋白谱,最终筛选得到 THBS3^[7]。已有研究表明^[34], miR-363-5p 可在转录后水平调节 THBS3 表达影响血管内皮细胞的特性。但是,尚不清楚两者在心肌肥大中是否发挥作用。本研究试图探讨 miR-363-5p 靶向 THBS3 调控 Ang II 对心肌肥

大的影响。

在 Ang II 成功诱导复制的心肌肥大体外模型组中,检测 miR-363-5p 表达,发现其明显低于对照组,说明 miR-363-5p 可能参与心肌肥大的调控。随后,在肥大心肌细胞中特异性转染 miR-363-5p mimics 和 miR-363-5p inhibitor 后,观察肥大相关表型的变化,结果显示,过表达 miRNA 可显著降低心肌细胞面积及胚胎期基因的蛋白表达,而抑制 miRNA 的表达则呈相反趋势,以上结果分别从形态学和分子生物学角度提示 miR-363-5p 具有抑制、延缓心肌肥大的作用。

THBS 蛋白在胚胎发育过程中选择性表达,成年后表达基本缺失,直到损伤事件发生,5 个家族成员都可能被诱导^[35]。除 THBS3 在骨发育中的作用外,其余在组织稳态和疾病中的作用还知之甚少^[36]。LYNCH 等^[37]发现在心肌细胞中特异性过表达 THBS3 的转基因小鼠,于应激刺激下表现出加重的心脏病理特征,而缺乏 THBS3 的小鼠则受到保护;SCHIPS 等^[14]证明在 TAC 手术诱导的心肌肥厚动物模型、活化的钙调磷酸酶 A 诱导的肥大细胞模型和 Csrp^{3-/-}模拟的扩张性心肌病的动物模型中,THBS3 的表达均升高且激活了内质网应激相关分子,如 ATF6、BiP 等。而在 miRNA 数据库中,笔者预测 THBS3 是 miR-363-5p 的潜在靶基因,本文通过双荧光素酶报告基因实验得出, miR-363-5p 成功与

THBS3-WT 序列结合, 并抑制下游基因转录, 荧光素酶基因表达受限, 分解底物产生荧光强度低; 而 miR-363-5p 无法与 THBS3 突变型序列结合, 所以不会对荧光素酶的基因转录产生较大影响, 荧光素酶分解底物产生荧光强度与对照组相近, 两者无统计学差异, 故提示 miR-363-5p 与 THBS3 具有潜在结合位点。随后, 在 AC16 细胞中过表达 miR-363-5p, 结果显示, 与 mimics-NC 组相比, THBS3 mRNA 与蛋白表达均显著下降。以上结果表明 miR-363-5p 能够靶向结合 THBS3, 且负向调控其表达。

为验证 THBS3 是否介导 miR-363-5p 调控心肌肥大, 设计挽救实验, 在肥大心肌细胞中同时过表达 THBS3 及 miR-363-5p, 结果显示, THBS3-OE+miR-363-5p mimics 组心肌细胞面积较 OE-NC+miR-363-5p mimics 组大, 胚胎期基因的蛋白表达水平较 OE-NC+miR-363-5p mimics 组高, 提示 THBS3 部分减弱了 miR-363-5p 对心肌肥大的抑制作用, 说明 THBS3 可逆转 miR-363-5p 对心肌肥大的延缓作用, 作为其下游因子促进心肌肥大。

综上所述, 本研究证实 miR-363-5p 在心肌肥大中低表达, 且可抑制心肌肥大的相关表型, 而相关作用可被与其靶向结合 THBS3 有效逆转。考虑到机体错综复杂的信号网络, 本研究缺乏体内实验依据, 后期将建立动物模型进一步深入研究, 继续探索与心肌肥大有关的 miRNA 及相关蛋白, 为临床诊断和治疗提供有力的生物标志物。

参 考 文 献 :

- [1] HUANG R J, LIU J Y, CHEN X, et al. A long non-coding RNA LncSync regulates mouse cardiomyocyte homeostasis and cardiac hypertrophy through coordination of miRNA actions[J]. *Protein Cell*, 2023, 14(2): 153-157.
- [2] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(7): 387-407.
- [3] PAPAIT R, SERIO S, CONDORELLI G. Role of the epigenome in heart failure[J]. *Physiol Rev*, 2020, 100(4): 1753-1777.
- [4] YANG M Y, WANG W C, WANG L L, et al. Circ_0001052 promotes cardiac hypertrophy via elevating Hipk3[J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15(4): 1025-1038.
- [5] PEI G Q, CHEN L, WANG Y, et al. Role of miR-182 in cardiovascular and cerebrovascular diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1181515.
- [6] PFEFFER M A, SHAH A M, BORLAUG B A. Heart failure with preserved ejection fraction in perspective[J]. *Circ Res*, 2019, 124(11): 1598-1617.
- [7] 王庆尧. 肥厚型心肌病定量蛋白质组学及赖氨酸乙酰化、巴豆酰化、琥珀酰化修饰组学研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2021: 1-74.
- [8] ADAMS J C, LAWLER J. The thrombospondins[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(10): a009712.
- [9] LAWLER P R, LAWLER J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(5): a006627.
- [10] URAO N, MIRZA R E, CORBIERE T F, et al. Thrombospondin-1 and disease progression in dysferlinopathy[J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(24): 4951-4960.
- [11] HONG Y, KIM I, MOON H, et al. Novel thrombospondin-1 transcript exhibits distinctive expression and activity in thyroid tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2023, 42(22): 1832-1842.
- [12] SINGLA B, AITHBATHULA R V, PERVAIZ N, et al. CD47 activation by thrombospondin-1 in lymphatic endothelial cells suppresses lymphangiogenesis and promotes atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43(7): 1234-1250.
- [13] MUSTONEN E, RUSKOAHO H, RYSÄ J. Thrombospondins, potential drug targets for cardiovascular diseases[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 112(1): 4-12.
- [14] SCHIPS T G, VANHOUTTE D, VO A, et al. Thrombospondin-3 augments injury-induced cardiomyopathy by intracellular integrin inhibition and sarcolemmal instability[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 76.
- [15] ADOLPH K W, LONG G L, WINFIELD S, et al. Structure and organization of the human thrombospondin 3 gene (THBS3)[J]. *Genomics*, 1995, 27(2): 329-336.
- [16] PALAO T, RIPPE C, van VEEN H, et al. Thrombospondin-4 knockout in hypertension protects small-artery endothelial function but induces aortic aneurysms[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(11): H1486-H1493.
- [17] THUM T, GALUPPO P, WOLF C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure[J]. *Circulation*, 2007, 116(3): 258-267.
- [18] SAENZ-PIPAON G, DICHEK D A. Targeting and delivery of microRNA-targeting antisense oligonucleotides in cardiovascular diseases[J]. *Atherosclerosis*, 2023, 374: 44-54.
- [19] van ROOIJ E, SUTHERLAND L B, QI X X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA[J]. *Science*, 2007, 316(5824): 575-579.
- [20] CARÈ A, CATALUCCI D, FELICETTI F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5): 613-618.
- [21] SOUIDI A, NAKAMORI M, ZMOJZIAN M, et al. Deregulations of miR-1 and its target Multiplexin promote dilated cardiomyopathy associated with myotonic dystrophy type 1[J]. *EMBO Rep*, 2023, 24(4): e56616.
- [22] CHENG X L, JIAN D D, XING J Y, et al. Circulating cardiac MicroRNAs safeguard against dilated cardiomyopathy[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(5): e1258.

- [23] BOON R A, DIMMELER S. MicroRNAs in myocardial infarction[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(3): 135-142.
- [24] SOLLY E L, DIMASI C G, BURSILL C A, et al. MicroRNAs as therapeutic targets and clinical biomarkers in atherosclerosis[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(12): 2199.
- [25] LI G Q, SHAO Y H, GUO H C, et al. MicroRNA-27b-3p down-regulates FGF1 and aggravates pathological cardiac remodeling[J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(9): 2139-2151.
- [26] HSU C H, LIU I F, KUO H F, et al. miR-29a-3p/THBS2 axis regulates PAH-induced cardiac fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10574.
- [27] GADDAM R R, KIM Y R, JACOBS J S, et al. The microRNA-204-5p inhibits APJ signalling and confers resistance to cardiac hypertrophy and dysfunction[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(1): e693.
- [28] JIA G Z, LIANG C G, LI W H, et al. MiR-410-3p facilitates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy by targeting SMAD7[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 119-127.
- [29] LI D Y, SHEN M Z, DENG X X, et al. MicroRNA miR-27a-3p accelerates cardiac hypertrophy by targeting neuro-oncological ventral antigen 1[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 8982-8993.
- [30] LI J, SHA Z, ZHU X L, et al. Targeting miR-30d reverses pathological cardiac hypertrophy[J]. *EBioMedicine*, 2022, 81: 104108.
- [31] LIN X F, ZHANG L Q, ZHANG W, et al. Circular RNA circ_0001006 aggravates cardiac hypertrophy via miR-214-3p/PAK6 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(5): 2210-2220.
- [32] TU S, WANG X Y, ZENG L X, et al. LncRNA TINCR improves cardiac hypertrophy by regulating the miR-211-3p-VEGFB-SDF-1 α -CXCR4 pathway[J]. *Lab Invest*, 2022, 102(3): 253-262.
- [33] GONG K, YANG K, XIE T, et al. Identification of circRNA-miRNA-mRNA regulatory network and its role in cardiac hypertrophy[J]. *PLoS One*, 2023, 18(3): e0279638.
- [34] COSTA A, AFONSO J, OSÓRIO C, et al. miR-363-5p regulates endothelial cell properties and their communication with hematopoietic precursor cells[J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6(1): 87.
- [35] CARMINATI L, CARLESSI E, LONGHI E, et al. Controlled extracellular proteolysis of thrombospondins[J]. *Matrix Biol*, 2023, 119: 82-100.
- [36] HANKENSON K D, HORMUZDI S G, MEGANCK J A, et al. Mice with a disruption of the thrombospondin 3 gene differ in geometric and biomechanical properties of bone and have accelerated development of the femoral head[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(13): 5599-5606.
- [37] LYNCH J M, MAILLET M, VANHOUTTE D, et al. A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response[J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1257-1268.

(李科 编辑)

本文引用格式: 马玉坤, 单正宜, 刘荟婷, 等. MicroRNA-363-5p 靶向血小板反应蛋白-3 调控心肌细胞肥大的作用机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(12): 24-32.

Cite this article as: MA Y K, SHAN Z Y, LIU H T, et al. MicroRNA-363-5p targets thrombospondin-3 to regulate myocardial hypertrophy[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(12): 24-32.