

miR-522-3p 通过靶向结合 PTEN 促进心肌肥厚*

张 莹^{1**}, 吴 晟¹, 鲍海龙¹, 刘兴德^{1,2***}

(1. 贵州医科大学附院 心内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025)

[摘 要] 目的: 探讨 miR-522-3p 对心肌肥厚的影响及机制。方法: 运用生物信息学分析 GEO 数据库中心心力衰竭病人和正常对照人中 miRNA 的表达差异, 采用实时定量聚合酶链反应 (Real-time PCR) 检测主动脉弓缩窄模型 (TAC) 小鼠和假手术 (sham) 小鼠心肌组织中差异表达 miRNA miR-522-3p 和磷酸酶及张力蛋白同源基因 (PTEN) 的 mRNA 表达; 选取 HEK293T 细胞分别转染 (miR-522-3p) 类似物 (miR-522-3p mimic) 及类似物对照剂 (mimic control) 48 h, 然后进行荧光报告基因实验; 选取 H9C2 细胞分别转染 miR-522-3p 类似物 (miR-522-3p mimic) 及类似物对照剂 (mimic control) 48 h, 利用 Real-time PCR 与 Western blot 法检测 PTEN-AKT-mTOR 通路相关基因的表达; 将 H9C2 细胞分为对照组 (不做处理)、AngII 组 (加用 AngII 干预细胞 24 h)、miR-522-3p mimic + AngII 组 (转染 miR-522-3p mimic 24 h 后, 加用 AngII 干预 24 h) 及 mimic control + AngII 组 (转染 mimic control 24 h 后, 加用 AngII 干预 24 h), 利用 Real-time PCR 与 Western blot 法检测心房利钠肽 (ANP)、脑利钠肽 (BNP)、 β 型肌球蛋白重链 (β MHC) 的表达。结果: 芯片数据显示 (GSE61741), 在缺血性心力衰竭和非缺血性心力衰竭病人中, 血液循环 miR-522-3p 表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.0001$); TAC 小鼠中, miR-522-3p 表达升高, PTEN 表达下降, miR-522-3p 的表达与 PTEN 负相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); miR-522-3p 可调控 PTEN/AKT-mTOR 通路, 过表达 miR-522-3p 明显使 ANP、BNP、 β MHC 表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 上调 miR-522-3p 可通过靶向结合 PTEN 使心肌肥厚加重, 为治疗心力衰竭提供了一个新靶标。

[关键词] miR-522-3p; 心力衰竭; 心肌肥厚; PTEN; Akt

[中图分类号] R541.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)04-0406-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.04.006

miR-522-3p Promotes Cardiac Hypertrophy by Targeting PTEN

ZHANG Ying¹, WU Cheng¹, BAO Hailong¹, LIU Xingde^{1,2}

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-522-3p on cardiac hypertrophy and its action mode. **Methods:** Differential miRNA expression between patients with heart failure and normal controls from GEO database was analyzed using bioinformatics methods. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect expression levels of miR-522-3p and phosphatase and tensin homolog (PTEN). HEK293T cells were transfected with miR-522-3p analog (miR-522-3p mimic) and mimic control for 48 h, followed by fluorescent reporter gene experiments; H9C2 cells were transfected with miR-522-3p analog (miR-522-3p mimic) and analog control (mimic control) for 48 h, and qPCR and Western blot were used to detect the expression of PTEN-AKT-mTOR pathway-related genes. H9C2 cells were divided into control group (no treatment), AngII group (with AngII intervention for 24 h), miR-522-3p mimic + AngII group (after transfection of miR-522-3p mimic for 24 h, plus AngII for 24 h) and mimic control + AngII group (after 24 h transfection with mimic control, add

*[基金项目] 国家自然科学基金地区项目 (31760294); 贵州省科技厅项目 - 黔科合基础 [(2016)1120]; 贵阳市科技局项目 [筑科合同 (2017)5-14]; 贵州省科技厅项目 - 黔科合平台人才 [(2018)5608]

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: zyts2008@126.com; 2360040895@qq.com

网络出版时间: 2019-04-26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190425.2119.006.html>

AngII for 24 h). The expression of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and β -type myosin heavy chain (β MHC) were measured using qPCR and Western blot. **Results:** The analysis of the chip data (GSE61741) showed that the expression of miR-522-3p in blood circulation was significantly increased in patients with ischemic heart failure and non-ischemic heart failure ($P < 0.0001$). In TAC mice, the expression of miR-522-3p was increased, but PTEN expression was decreased. In addition, the expression levels of miR-522-3p were negatively correlated with PTEN expression levels ($P < 0.01$). miR-522-3p could regulate PTEN/AKT-mTOR. Pathway. Overexpression of miR-522-3p significantly increased the expression of ANP, BNP and β MHC ($P < 0.05$). **Conclusion:** Up-regulation of miR-522-3p can increase cardiac hypertrophy by targeting PTEN. Our study provides a new target for the treatment of heart failure.

[**Key words**] miR-522-3p; heart failure; cardiac hypertrophy; PTEN; Akt

心肌肥厚是心肌细胞为了弥补外来或内在的刺激造成的心脏功能障碍而出现的自主代偿过程,包括心肌细胞体积增大、心肌蛋白合成增加以及肌节数目增加^[1-2]。加上炎症反应、心肌纤维化改变继而可出现心脏收缩和舒张功能障碍,导致全世界发病率和死亡率最高的心力衰竭疾病的发生^[3-4]。微小 RNA (miRNA) 是一类长约 18 ~ 22 个碱基的非编码小 RNA,可结合在靶基因 mRNA 的 3'端非编码区(3'UTR)继而调控基因的转录^[5-6]。多种 miRNA 被证实心血管疾病中发挥重要作用,比如 miR-21 被证实可调控心肌纤维化中的 MAPK 通路继而导致心力衰竭加重^[7];miR-24 可抑制小鼠从代偿性心肌肥厚向失代偿性心肌肥厚的转变过程^[8]。本实验旨在证实心力衰竭病理生理过程中 miR-522-3p 表达出现改变,且 miR-522-3p 可以参与心肌肥厚的发展过程中。

1 材料与方法

1.1 主要材料

H9C2 细胞系由华中科技大学附属同济医院高血压研究所馈赠,miR-522-3p 逆转录引物、miR-522-3p mimic 购自广州锐博生物有限公司,Real-time-PCR 相关 SYBR 试剂购自 Takara 公司,引物合成由汉天一辉远公司完成,pMIR 荧光报告基因载体购自武汉天一辉远公司,转染试剂 Lipofectamine2000 购自 invitrogen 公司,双荧光素酶报告检测试剂购自美国 Promega 公司,AngII 购自美国 sigma 公司,BNP 和 ANP 抗体购自美国 Abcam 公司,PTEN、p-AKT、total AKT 购自美国 Proteintech 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

登录 NCBI GEO 数据库

(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) 选用芯片分析数据 (GSE61741)。

1.2.2 动物实验 将 8 周左右的雄性 C57 小鼠分为 sham 组 ($n = 6$) 和 TAC 组 ($n = 6$),两组适应性喂养 2 周后行手术。Sham 组仅行手术切开暴露胸骨,TAC 组暴露胸骨后用 7.0 手术线进行主动脉结扎。手术后 4 周进行小鼠心脏超声检测,然后处死小鼠,取出心肌组织以待后续实验。所有动物操作均经过了伦理委员会审查与批准。

1.2.3 荧光报告基因实验 将 HEK293T 细胞接种在 24 孔板中,待细胞密度至 1×10^6 细胞/孔时,将 400 ng pMIR-PTEN 3'UTR-wild type 与 miR-522-3p mimic (100 nmol/L) 或 mimic control (100 nmol/L) 共转染,另将 400 ng pMIR-PTEN 3'UTR-mutant 载体与 miR-522-3p mimic (100 nmol/L) 或 mimic control (100 nmol/L) 共转染,共计 4 组 (即 pMIR-PTEN 3'UTR-WT + mimic control 组、pMIR-PTEN 3'UTR-WT + miR-522-3p mimic 组、pMIR-PTEN 3'UTR-MU + mimic control 组、pMIR-PTEN 3'UTR-MU + miR-522-3p mimic 组)。细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,24 h 后换液,48 h 后用冷磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗细胞,用被动裂解缓冲液裂解细胞 (Promega, WI, USA),反复冻融 3 遍保证细胞充分裂解。使用荧光素酶活性发光计 (SIRIUS, Pforzheim, Germany) 测量荧光素酶的表达水平。每组选取 4 个副孔,重复 3 次独立实验。

1.2.4 过表达 miR-522-3p 实验 将 H9C2 细胞接种与细胞培养皿中,待密度达 70% 时,分别将 miR-522-3p mimic (100 nmol/L)、mimic control (100 nmol/L) 转染进细胞,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 后换液,48 h 后收取细胞,提取蛋白及 RNA 以待后续实验。部分实验中,转染 24 h 后加用

1 mmol/L AngII 干预,干预 24 h 再收取细胞提取蛋白及 RNA。

1.2.5 实时定量聚合酶连反应(Real-time PCR)

按 Trizol 法提取 sham 组与 TAC 组小鼠的心肌组织,同时提取干预后的 H9C2 细胞总 RNA。测定浓

度,选择同样量的 RNA(500 ng)进行逆转录。将 cDNA 与引物、SYBR 混合,制备 10 μ L 体系样品,按 95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 60 s(40 个循环),95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 15 s、95 $^{\circ}$ C 15 s,完成反应。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 The list of primer sequences

基因名	种属	正向引物	反向引物
PTEN	小鼠	GTCTTAAGTGGCTTGTGTGTGG	AAGGCTTCCTGTGCAATGT
GAPDH	小鼠	GGGTGGTCCAGGGTTTCTTACT	AGGTTGTCTCCTCCGACTTCA
PTEN	大鼠	GAGACATTATGACACCGCCAAG	CATTACACCAGTCCGTCCTTTC
ANP	大鼠	AACCTGCTAGACCACCTGGA	GTCAATCCTACCCCCGAAGC
BNP	大鼠	TCCTTAATCTGTGCGCGCTG	CGCCGATCCGGTCTATCTTC
β MHC	大鼠	ACCTGTCCAAGTTCCGCAAG	TGGAGCTGGGTAGCACAAAG
GAPDH	大鼠	TGTGAACGGATTTGGCCGTA	GATGGTGATGGGTTTCCCGT

1.2.6 蛋白检测(Western Blot) 按标准法提取蛋白。将蛋白样品与加样缓冲液混合,密封放入沸腾的水浴锅中煮沸 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。完成相关准备,制胶、上样、电泳、转膜、封闭 2 h、一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗室温孵育 1 h,曝光。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 对数据进行分析,计量资料采用均数 \pm 标准误表示。同组数据两两比较选用 *t* 检验,组内数据采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果

NCBI 数据库中选取芯片(GSE61741)分析疾病组与对照组外周血中 miRNA 的表达差异,结果显示,与对照组比较,缺血性心力衰竭组和非缺血性心力衰竭组中 miR-522-3p 的表达均显著升高($P < 0.001$),见图 1A。

2.2 小鼠心肌中 miR-522-3p 与 PTEN 表达

对小鼠进行 TAC 建模,4 周后行超声检查,可见 TAC 组小鼠心肌明显肥厚,射血分数下降(图 1B)。实时定量结果显示,TAC 组小鼠心肌组织中 miR-522-3p 表达显著升高[(112.1 \pm 20.9)%, $P < 0.01$],见图 1C;同时发现,TAC 组小鼠心肌组织 PTEN 基因 mRNA 表达明显下降[(-40.0 \pm 0.9)%, $P < 0.01$],miR-522-3p 的表达与 PTEN 表达负相关($r = 0.545$, $P < 0.01$),见图 1。

2.3 miR-522-3p 靶向调控 PTEN 通路

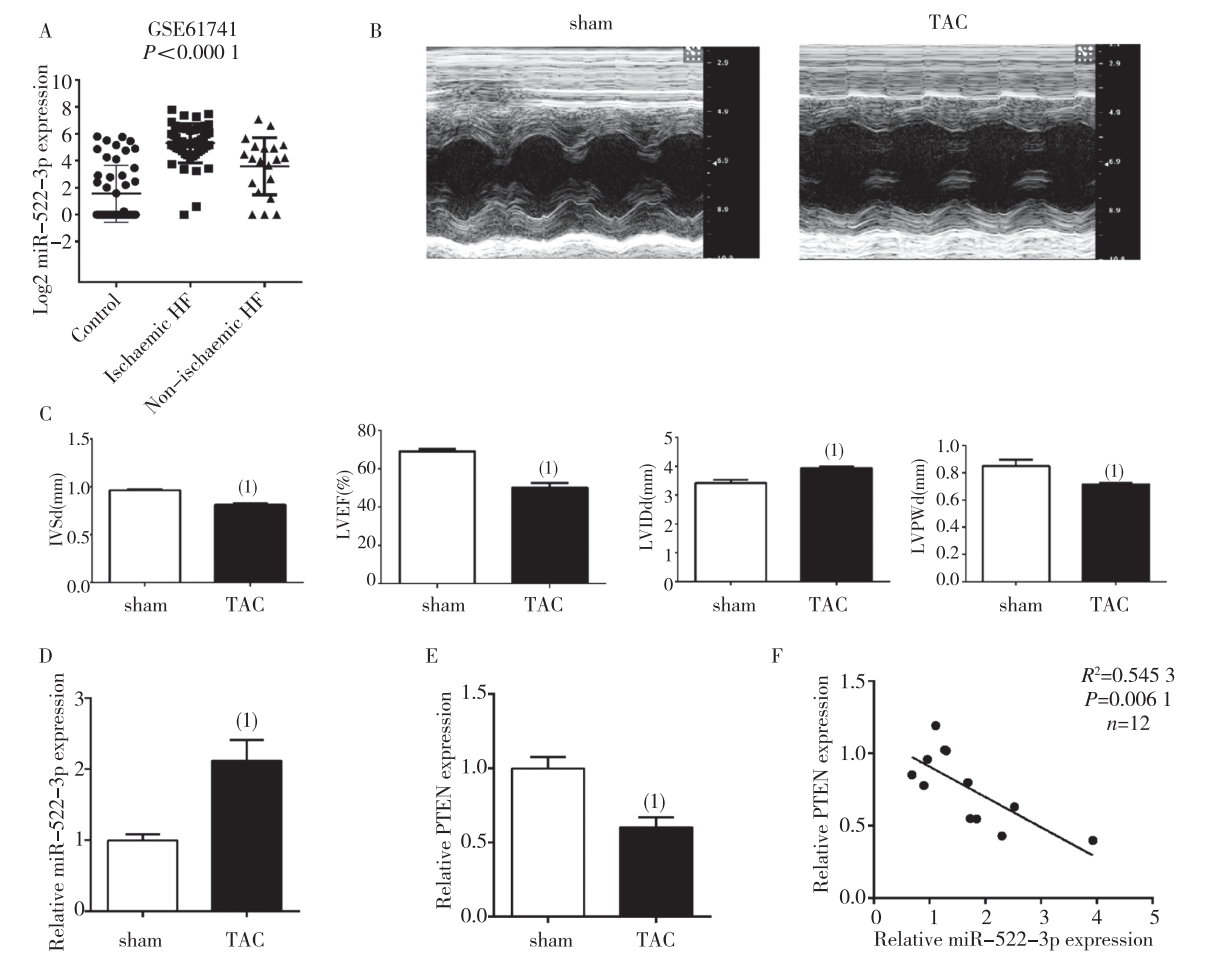
选用 Targetscan7.0 (www.targetscan.org) 对 miR-522-3p 进行靶向结合位点预测,发现 miR-522-3p 可结合在 PTEN 基因 3' UTR 区,如图 2A。荧光报告基因实验结果显示,与 mimic control 组比较,miR-522-3p mimic 明显抑制 PTEN 的转录活性($P < 0.001$),亦抑制了 PTEN 的表达($P < 0.01$)。突变结合位点后,miR-522-3p mimic 并未影响 PTEN 的表达活性(图 2B);同样的 AKT、pAKT、mTOR 的表达也受到影响($P < 0.01$),见图 2C。

2.4 miR-522-3p 对 AngII 干预的心肌细胞的影响

AngII 干预 H9C2 细胞后,可见 PTEN 蛋白和 mRNA 表达水平下降,miR-522-3p 使 PTEN 的表达下降得更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$)。心肌肥厚相关分子指标 ANP、BNP、 β MHC 表达上升,而 miR-522-3p mimic 使这种上升更加明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

3 讨论

心力衰竭是最常见的心血管疾病且是大部分心血管疾病的终末阶段^[9],而它的生物学基础——心肌肥厚可以受多种信号通道调控,如 Akt、PI3K、MAPK、AMPK、GPCRs 等信号通路^[1]。研究者认为这些信号通路的调控者可以调控整个心肌肥厚过程达到改善或逆转心肌肥厚的目的,继而治疗心力衰竭,比如 PINK1 基因可以调控 AMPK 的表达影响心肌细胞自噬过程继而影响心力衰竭^[10]。故而 GRCPs 下游 β 受体阻滞剂被应用于



注:A 为 GSE 芯片数据,B 为心脏超声结果,C 为心功能指标,D 为中心肌组织 miR-522-3p 的表达,E 为 PTEN 表达,F 为 miR-522-3p 与 PTEN 表达的关联性分析;(1)与对照组比较, $P < 0.05$

图 1 心力衰竭与对照组中 miR-522-3p 的表达

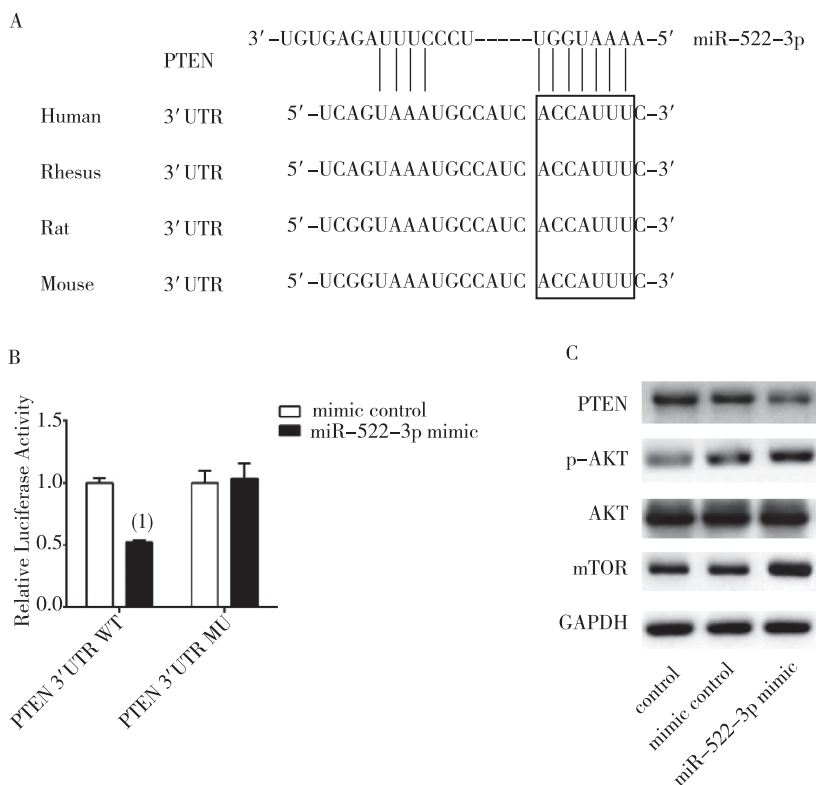
Fig. 1 The expression of miR-522-3p in heart failure group and control group

临床心力衰竭患者, CIBIS-II、MERIT-HF、COPERNICUS 三大临床实验证实 β 受体阻滞剂的应用大大改善了心力衰竭患者的预后^[11-13]。

但随着心力衰竭的发病率致死率逐年增高^[14], 人们不满足于仅仅使用 β 受体阻滞剂治疗心力衰竭, 更多心肌肥厚过程中的调控者被人们关注起来。脑啡肽酶抑制剂(ARNI)被证实可以产生良好的心力衰竭治疗作用^[15], 同时 miRNA 也是一大热点。miR-522-3p 最早被报道于肥胖相关疾病中^[16], 结合在肥胖高度相关的基因上, 结合处 SNP 位点突变破坏结合影响基因的表达, 继而随着 SNP 突变出现不同肥胖表型。后续多个研究报道显示 miR-522-3p 可以促进癌细胞的增值、迁移且与肿瘤的预后相关^[17-19]。本研究结合 GSE 数据库, 首次发现在心力衰竭患者组中循环 miR-522-3p 的表

达明显高于对照组, 但血中循环 miRNA 的表达与组织 miRNA 表达是具有差异性的。为了验证心力衰竭患者的心肌组织中 miR-522-3p 也是高表达, 本实验设计了小鼠 TAC 模型验证。造模后 4 周心脏超声显示 TAC 组小鼠心肌明显肥厚且心功能下降, 提示造模成功。对心肌组织进行实时定量 PCR 测定, 发现 miR-522-3p 的表达明显升高。由此看来, miR-522-3p 可能不仅仅参与肿瘤相关疾病。

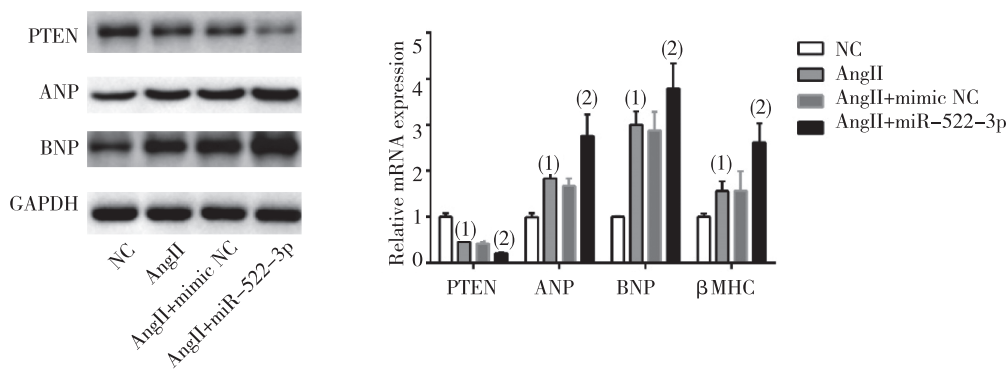
与此同时, 该研究还发现心力衰竭小鼠中 PTEN 的表达下降, 与 miR-522-3p 的表达负相关。通过靶点预测, 发现 miR-522-3p 靶向结合在 PTEN 基因的 3' UTR 区, 这与大多 miRNA-mRNA 结合方式吻合。而 PTEN 被发现在心肌细胞、成纤维细胞和内皮细胞中普遍表达, 且可负性调控 PI3K 信号



注:A 为预测 miR-522-3p 结合在 PTEN 基因 3'UTR 区,B 为在 293T 细胞系中荧光报告基因检测 miR-522-3p 与 PTEN 的相互作用,C 为 miR-522-3p 调控 PTEN/Akt/mTOR 通路;(1)与对照组比较, $P < 0.001$

图 2 miR-522-3p 靶向调控 PTEN 通路情况

Fig. 2 miR-522-3p regulated PTEN/Akt/mTOR pathway through targeting PTEN



(1) 与对照组比较, $P < 0.05$; (2) 与 AngII + mimic NC 组比较, $P < 0.05$

图 3 miR-522-3p 对 AngII 干预的心肌细胞的影响

Fig. 3 The effect of miR-522-3p on Ang II-mediated Cardiomyocytes

通路^[20]。而且 PTEN/Akt 信号通路,近来亦被证实是与心肌肥厚密切相关的^[21]。本研究证实,过表达 miR-522-3p 后 PTEN 的表达活性明显下降,且 PTEN/Akt/mTOR 信号通路的表达受到明显影响。这个发现为 miR-522-3p 调控心肌肥厚提供了理论支持点。为了证实这种可能,本实验使用了体

外心肌肥厚细胞模型。在 AngII 诱导 H92C 细胞中,ANP、BNP、 β MHC 这些心肌肥厚相关分子指标明显上升。过表达 miR-522-3p,这些指标进一步上升,提示心肌肥厚加重。本研究认为,miR-522-3p 通过调控 PTEN/Akt/mTOR 信号通路继而调控心肌肥厚。

综上所述,本实验首次发现心力衰竭中 miR-522-3p 表达上升。PTEN 基因表达下降,二者呈负性相关。继而在 H9C2 细胞中过表达 miR-522-3p,发现明显抑制 PTEN/AKT 信号通路。与此同时,在 AngII 干预的 H9C2 细胞模型中,过表达 miR-522-3p,增加心肌肥厚相关的 ANP、BNP、 β MHC 蛋白的表达。但本实验没有在动物层面进行进一步验证 miR-522-3p 是否会对心脏超声影像学、心肌组织形态学等层面造成影响,缺乏更多更严谨的证据证实本研究的设想。不过就目前结果,为后续实验提供了一个新的思路,也为抗心肌肥厚治疗提供了一个新靶标。

4 参考文献

[1] FREY N, OLSON E N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly [J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65:45 – 79.

[2] HEINEKE, KEMPF T, KRAFT T, et al. Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide: impact on cardiac myocyte hypertrophy [J]. *Circulation*, 2003, 107(10): 1424 – 1432.

[3] WILCOX J E, FONAROW G C, ARDEHALI H, et al. “Targeting the heart” in heart failure: myocardial recovery in heart failure with reduced ejection fraction [J]. *JACC Heart Fail*, 2015, 3(9): 661 – 669.

[4] JESSUP M, BROZENA S. Heart failure [J]. *N Engl J Med*, 2003,348(20): 2007 – 2018.

[5] LAI E C. Micro RNAs are complementary to 3’ UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation [J]. *Nat Genet*, 2002, 30(4): 363 – 364.

[6] BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116 (2): 281 – 297.

[7] THUM T, GROSS C, FIEDLER J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts [J]. *Nature*, 2008 456 (7224): 980 – 984.

[8] LI R C, TAO J, GUO Y B, et al. In vivo suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice [J]. *Circ Res*, 2013, 112(4): 601 – 605.

[9] YANCY C W, JESSUP M, BOZKURT B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: Executive summary: A report of the American col-

lege of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines [J]. *Circulation*, 2013, 128(16): 1810 – 1852.

[10] WANG B, NIE J, WU J, et al. AMPK α 2 protects against the development of heart failure by enhancing mitophagy via PINK1 phosphorylation [J]. *Circ Res*, 2018, 122(5): 712 – 729.

[11] DRUMMOND GA, SQUIRE IB. The cardiac insufficiency bisoprolol study II [J]. *Lancet*, 1999, 353(9161):1361.

[12] SHARPE N. Benefit of beta-blockers for heart failure; proven in 1999 [J]. *Lancet*, 1999, 353(9169):1988 – 1989.

[13] PACKER M, COATS A J, FOWLER M B, et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(22):1651 – 1658.

[14] PONIKOWSKI P, ANKER S D, ALHABIB K F, et al. Heart failure: preventing disease and death worldwide [J]. *ESC Heart Failure*, 2014, 1(1): 4 – 25.

[15] MCMURRAY J V, PACKER M, DESAI A S, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(11): 993 – 1004.

[16] RICHARDSON K, LOUIE-GAO Q, ARNETT D K, et al. The PLIN4 variant rs8887 modulates obesity related phenotypes in humans through creation of a novel miR-522 seed site [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e17944.

[17] ZHANG S, ZHANG H, ZHU J, et al. MiR-522 contributes to cell proliferation of human glioblastoma cells by suppressing PHLPP1 expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 70: 164 – 169.

[18] ZHANG T, HU Y, JU J, et al. Downregulation of miR-522 suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells by directly targeting DENN/MADD domain containing 2D [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:19346.

[19] SHI Y H, QI B B, LIU X B, et al. Upregulation of miR-522 is associated with poor outcome of hepatocellular carcinoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20 (15): 3194 – 3198.

[20] OUDIT G Y, PENNINGER J M. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(2): 250 – 260.

[21] MAILLET M, VAN BERLO J H, MOLKENTIN J D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 38 – 48.

(2019-01-14 收稿,2019-03-26 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳