

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190291

压力超负荷致小鼠心肌肥厚中 miR-378 对热休克转录因子-1 的调节作用

苑 洁*, 邹云增

复旦大学附属中山医院心内科,上海市心血管病研究所,上海 200032

[摘要] **目的:**探讨 miR-378 在压力超负荷致小鼠心肌肥厚中对热休克转录因子 1(HSF1)的调节作用及机制。**方法:**采用 C57B/L6 雄性小鼠经主动脉缩窄构建心肌的压力超负荷(TAC)模型,2 周后对小鼠进行心脏超声和血流动力学测定,并观察 miR-378 和 HSF1 的表达变化。体外培养心肌细胞,机械牵张刺激 24 h 后观察 miR-378 和 HSF1 的表达变化;对心肌细胞分别转染 miR-378 模拟物和抑制物,48 h 后观察心肌细胞内源性 HSF1 的表达变化;通过荧光素酶基因报告系统,检测 miR-378 是否靶向结合其预测靶点 HSF1 的 3'UTR 区域。**结果:**建模 TAC 小鼠 2 周后,心脏表现为代偿性心肌肥厚,HSF1 表达升高而 miR-378 表达下降。心肌细胞机械牵张后 HSF1 表达升高而 miR-378 表达下降;心肌细胞过表达 miR-378 后,HSF1 表达显著下降,而当抑制内源 miR-378 时,HSF1 表达显著升高;荧光素酶报告系统证实 miR-378 能够靶向结合 HSF1 的 3'UTR 序列。**结论:**在心肌肥厚代偿期,miR-378 可能通过靶向结合 HSF1 的 3'UTR 序列调节心肌内源性 HSF1 的表达。

[关键词] 热休克转录因子-1;压力超负荷;心肌肥厚;微小 RNA-378

[中图分类号] R 336.7 **[文献标志码]** A

Regulation of miR-378 on heat shock factor-1 in cardiac hypertrophy induced by pressure overload

YUAN Jie*, ZOU Yun-zeng

Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role and mechanism of miR-378 on heat shock factor1 (HSF1) in cardiac hypertrophy induced by pressure overload. **Methods:** C57B/L6 mice were subjected to pressure overload by thoracic aortic banding (TAC). Two-dimensional echocardiographic and hemodynamic examinations were performed at two weeks after TAC. *In vitro*, cardiomyocytes were mechanically stretched for 24 h. Pre-miR-378 or Anti-miR-378 was transfected into cardiomyocytes for 48 h. The expression of HSF1 protein and miR-378 were detected by Western blotting and qRT-PCR. Luciferase reporter assay was used to explore the relationship between miR-378 and potential target protein HSF1. **Results:** At two weeks after TAC constructed, the mice showed compensatory cardiac hypertrophy. Western blotting and qRT-PCR showed increase of HSF1 and decrease of miR-378 in the heart. Overexpression of miR-378 significantly suppressed the expression of HSF1 in cardiomyocytes, while inhibition of endogenous miR-378 promoted the up-regulation of HSF1 greatly. Luciferase reporter assay showed that miR-378 can target HSF1 by binding to the 3'-UTR sequence of HSF1. **Conclusions:** In the compensatory phase of cardiac hypertrophy, miR-378 could regulate the expression of endogenous HSF1 in myocardium by targeting the 3'-UTR of HSF1.

[Key Words] heat shock factor-1; pressure overload; cardiac hypertrophy; microRNA-378

心血管疾病是全球范围内危害人类健康的“头号杀手”。心肌肥厚是许多心脏疾病如高血压、心瓣膜病、充血性心力衰竭及先天性心脏病的代偿反应,会导致心力衰竭。而血流动力学压力超负荷是引起心肌肥厚进而发生心力衰竭的主要因素。心脏在压力负荷初期通常表现为代偿性心肌肥厚,以

满足机体的各种生命活动的需要。然而当心脏在持续压力超负荷情况下,代偿性心肌肥厚会发展为失代偿性心肌肥厚,从而诱发心功能不全和心力衰竭,增加猝死发生风险^[1-2]。

热休克蛋白转录因子 1(HSF1)在许多病理条件的(缺血损伤、氧化应激、压力超负荷等)刺激下均可

[收稿日期] 2019-03-06

[接受日期] 2019-04-10

[基金项目] 上海市自然科学基金(18ZR1406900)。Supported by Shanghai Natural Science Foundation (18ZR1406900)。

[作者简介] 苑 洁,博士。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: yuan.jie@zs-hospital.sh.cn

以对心脏起保护作用,并在适应性的生理性心肌肥厚中发挥重要作用^[1-5]。压力超负荷下,HSF1能促进心脏血管新生、抑制心肌纤维化、维持心肌重构的早期代偿^[6-7],然而有关其调控机制的研究报道甚少。因此,研究 HSF1 在心肌肥厚中的调节机制,对于临床治疗中心功能的改善具有重要意义。

MicroRNA(简称 miRNA)是广泛存在于真核生物中长度约为 21 nt 的内源性非编码 RNA,参与基因的转录后调节,在生物体内的生理及病理过程中都扮演着重要角色^[8-10]。已有研究证实,很多 miRNAs 参与心肌肥厚发生发展过程中重要基因的调控^[9,11-12]。MiRNA 是否也参与心脏保护因子 HSF1 的调控,值得进一步研究。

1 材料与方法

1.1 小鼠压力超负荷模型(TAC)的建立 C57B/L6 雄性小鼠,周龄为 10~12 周,体质量 18~22 g,购于上海中科院斯莱克实验动物有限责任公司。小鼠麻醉后卧于鼠板固定,气管插管后连接呼吸机,沿胸骨左侧的第二肋骨剪断肋骨,在主动脉凸侧分支的第一和第二分支之间将丝线穿过主动脉弓,用 31G 针头造成升主动脉环行缩窄,之后逐层缝合。假手术组只穿线不结扎。

1.2 小鼠心脏超声和血流动力学测定 对小鼠假手术组和 TAC 模型术后 2 周进行心功能和动脉收缩压(ASP)测定。使用加拿大 VisualSonics 公司 Vevo 770 超声诊断仪和 30 MHz 高频探头进行小鼠的心脏超声检测心脏功能,记录 B-Mode 图像,测量左室舒张期前壁厚度(LVAWd)、左室射血分数(LVEF)等指标。使用 Millar 导管对小鼠 ASP 进行测定。

1.3 心肌细胞培养 取 1~3 d SD 大鼠乳鼠 15 只,购于上海中科院斯莱克实验动物有限责任公司。用 75%乙醇消毒,取心尖大部用 PBS 洗 2 次,将组织剪碎。用 0.1%胰酶溶液 37℃消化 5~6 次,每次 8 min,收集上清到 DMEM 标准培养基中终止消化,1 200 r/min 离心 5 min,将细胞沉淀收集到 1 个装有 DMEM 低糖标准培养基中的收集管中,将收集得到的细胞悬液加入 2 个 10 mm 培养皿中,置于 CO₂ 培养箱进行差速贴壁法分离。2 h 后,吸取上清,按照 1×10⁶/mL 将细胞接种,次日换液,加入新鲜的 DMEM 低糖培养基。

1.4 MiR-378 模拟物或抑制物细胞转染 心肌细胞贴壁 24 h 后,换成无血清无抗生素低糖培养基预处理过夜,使用转染试剂 siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent (Fisher, AM4510)转染 miR-378 模拟物 (35 nmol/L) (Applied Biosystems, AM17100)或

抑制物(50 nmol/L) (Applied Biosystems, AM17000)分子以及 FAM 标记模拟物和抑制物的阴性对照。48 h 后收集细胞或对细胞进行机械牵张刺激。

1.5 荧光素酶报告基因检测 将扩增得到的 HSF1 野生型基因 3'UTR 或突变型片段各自插入到 pMIR-REPORT™ luciferase miRNA expression (Applied Biosystems, AM4510) 报告载体中得到 Luc-HSF1 及种子序列突变载体 Luc-HSF1-MU,使用 FuGENE HD(Roche, E2311)根据分组将荧光素酶报告载体和 miR-378 模拟物或抑制物共转染 Cos7 细胞,48 h 后使用 Dual-Light® System(Applied Biosystems, T1003)检测化学发光值。

1.6 miRNA 表达水平检测 用 TRIzol 试剂 (Invitrogen™, 15596018)从心肌组织和心肌细胞中提取总 RNA,并通过 NanoDrop ND-1000 分光光度计测量浓度。使用 TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, 4427975)在 ABI 7500 系统进行 qRT-PCR 反应,U6 作为内参,实验步骤按照试剂盒操作。

1.7 Western 印迹检测蛋白表达 心肌组织或心肌细胞用 RIPA(碧云天,P0013C)裂解,混匀后 4℃振荡 4 h,以 12 000×g 离心 15 min(4℃),上清为总蛋白质。Western 印迹按常规步骤电泳,每孔加入 20~40 μg 蛋白量,使用 HSF1(CST,4356)、Hsp27 (CST,95357)抗体和 HRP 偶联的兔二抗(CST,7075)检测各组蛋白表达水平,以 GAPDH 为内参计算其相对表达水平。

1.8 统计学处理 所有细胞学实验均重复 3 次以上,采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间计量资料的差异性比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠心肌组织内 HSF1 和 miR-378 的表达变化 小鼠心肌肥厚(图 1A)代偿期时心肌 HSF1 表达显著升高,而 miR-378 的表达显著下降。血流动力学检测结果显示:TAC 术后小鼠的 ASP、收缩压、左室舒张末期压力、收缩末期压力均明显升高($P < 0.05$),心肌肥厚处于代偿期,心功能无显著下降,LVEF 值与假手术组相比无显著差异(图 1B)。小鼠心脏超声数据结果显示:TAC 手术 2 周后心肌肥厚显著,心脏质量/体质量比值 HW/BW、左室壁厚度显著增加($P < 0.05$,图 1C)。TAC 小鼠手术 2 周后心肌内 HSF1 及其下游调控蛋白 Hsp27 的表达均显著升高(图 1D),而心肌内 miR-378 的表达显著降低(图 1E)。

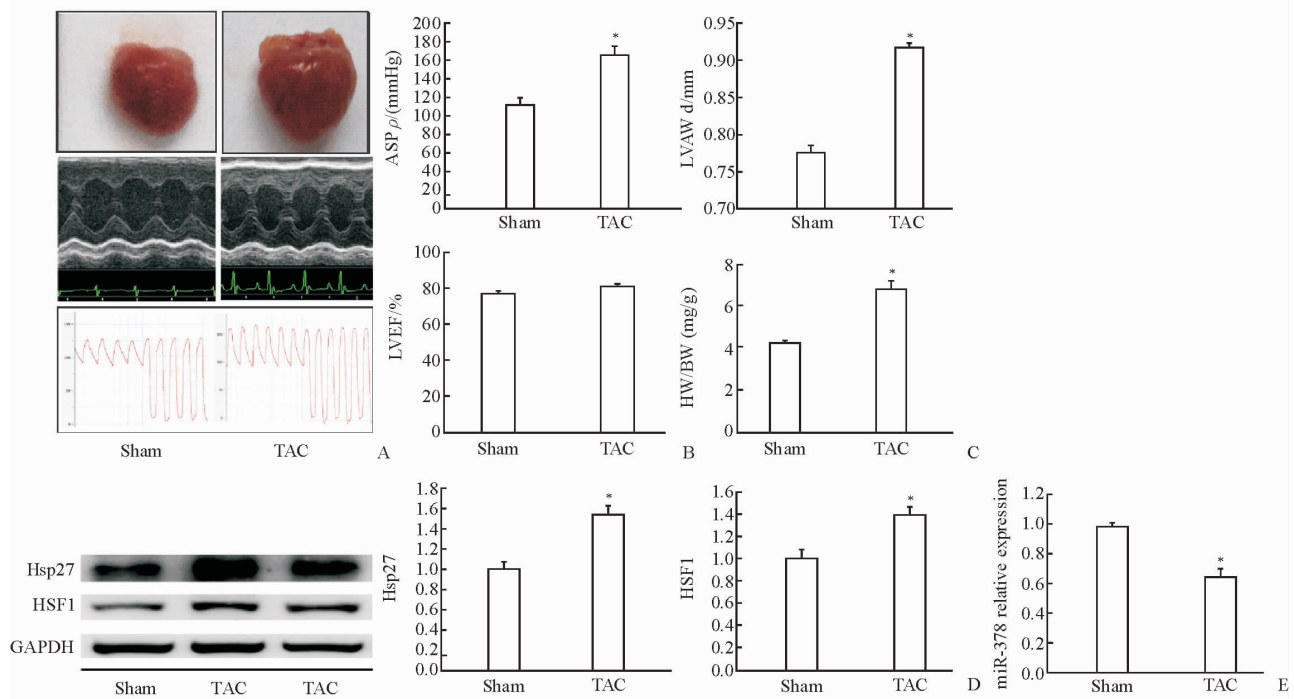


图1 压力超负荷导致小鼠心肌肥厚小鼠心肌内 HSF1 和 miR-378 的表达变化

A: 小鼠 TAC 术后 2 周及假手术组心脏外观、血流动力学变化; B: 小鼠 TAC 术后 ASP 和 LVEF 表达变化; C: 小鼠 TAC 术后 LVAWd 和 HW/BW 表达变化; D: Western 印迹检测 TAC 术后 2 周小鼠心肌内 HSF1 和 Hsp27 蛋白表达变化; E: 实时定量 PCR 检测 TAC 术后 2 周小鼠心肌内 miR-378 的表达变化。* $P < 0.05$ 与假手术组相比; $n = 5$

2.2 心肌细胞体外牵张刺激下 HSF1 和 miR-378 的表达变化 使用 0.01% 鼠尾胶原溶液按照 6~10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的浓度包被硅胶皿, 室温下在无菌操作台内将硅胶皿风干后。心肌细胞接种到硅胶皿培养后, 将硅胶皿放在机械牵张板上拉伸, 使得其长度可以增加 20%。对体外培养的心肌细胞机械牵张刺激 12 h、24 h, 检测心肌细胞内 HSF1 和 miR-378 的表达变化, 发现 HSF1 的蛋白表达水平在牵张 24 h 后显著升高 ($P < 0.05$, 图 2A), miR-378 的表达水平在机械牵张 24 h 后却显著下降 ($P < 0.05$, 图 2B)。

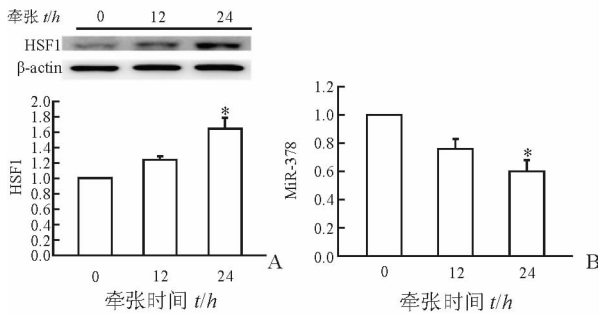
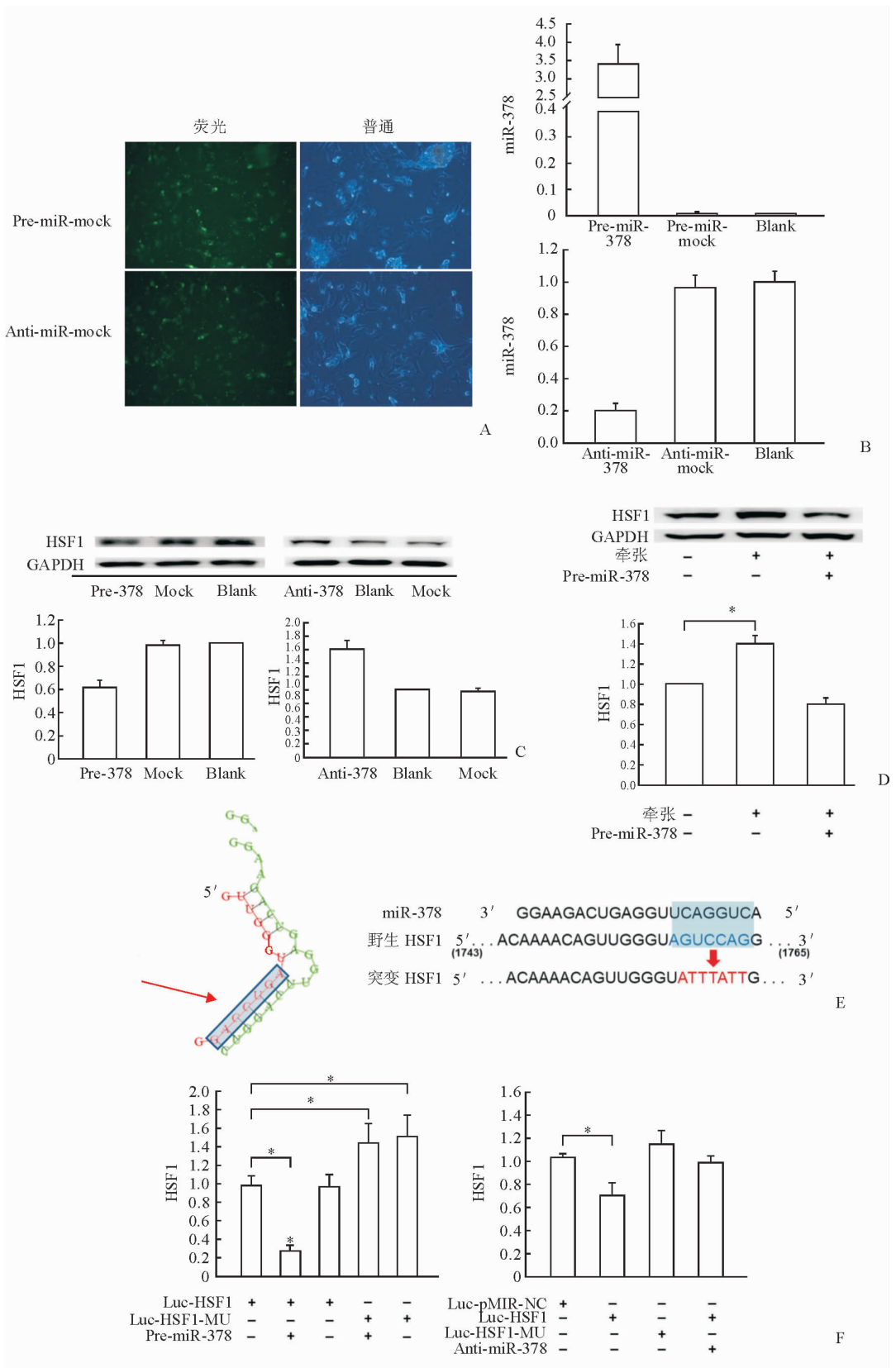


图2 心肌细胞体外牵张刺激下 HSF1 和 miR-378 的表达变化

A: Western 印迹法检测心肌细胞牵张 12 h 和 24 h 后 HSF1 的蛋白表达; B: 实时定量 PCR 检测心肌细胞牵张 12 h 和 24 h 后 miR-378 的表达。* $P < 0.05$ 与未牵张时相比; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 MiR-378 对 HSF1 的转录后调控 心肌细胞分别转染 miR-378 模拟物 (Pre-miR-378)、miR-378 抑制物 (Anti-miR-378) 及 FAM 标记的阴性对照组 (mock), 24 h 后分别在普通光镜下和荧光显微镜下观察细胞, 发现 90% 以上的细胞发出绿色荧光, 转染效率达到 90% (图 3A)。转染 48 h 后, Real-time PCR 结果显示, 转染模拟物组心肌细胞中 miR-378 的表达量显著升高, 转染抑制物组心肌细胞内源 miR-378 的表达被显著抑制 (图 3B)。检测 HSF1 蛋白表达, 转染 miR-378 模拟物组 HSF1 的表达被显著抑制 ($P < 0.05$), 转染 miR-378 抑制物组 HSF1 表达显著升高 ($P < 0.05$, 图 3C)。心肌细胞过表达 miR-378 能够显著抑制机械牵张引起的 HSF1 升高 (图 3D)。

分析 HSF1 3'UTR 区域, 发现在第 1743~1765 个碱基区域内有 miR-378 的潜在靶向结合种子序列 (图 3E)。构建包含 HSF1 3'UTR 的荧光素酶报告基因载体 Luc-HSF1 及种子序列突变载体 Luc-HSF1-MU, 转染 Cos7 细胞。当细胞过表达 miR-378 时, 转染 Luc-HSF1 组细胞内化学发光被显著抑制, 而 Luc-HSF1-MU 组则升高 ($P < 0.05$); 当 Cos7 单独转染 Luc-HSF1 时, 细胞内化学发光被显著抑制, 而当抑制内源 miR-378 时, 化学发光的抑制作用被逆转 ($P < 0.05$, 图 3F)。因此, 这些结果证实 miR-378 能够通过靶向结合 HSF1 3'UTR 调控 HSF1 的表达。



3 讨论

HSF1 在多种病理条件刺激下,如缺血损伤、氧化应激、压力超负荷等,均对心脏起到一定的保护作用^[3,6,13]。另外有研究证明,当机体内的 HSF1 表达降低时,心脏对外界刺激的适应性会随之降低^[14]。这些均表明在代偿性心肌肥厚反应中,HSF1 可能是一种生理性的保护因子,但是对于其引起这种保护性效应的机制,目前研究还是十分有限。

在心肌损伤中,一些 miRNA 与 HSF1 之间的调节作用被报道。HSF1 能够激活 miR-135b 的表达,促进内皮细胞的增殖^[15];在心肌肥厚中,HSF1 通过调节 HSP70 的表达促进 miR-23 表达的升高^[16];在急性心梗的小鼠中,敲除内源性 HSF1 会促进 miR-208 的表达^[17];房颤发生后,通过调节 HSF1 可引起 miR-432 表达的升高^[18];miR-1 可以上调 HSF1 的表达,当 miR-1 表达下调时会导致心肌肥厚的发生^[19]。本研究通过构建心肌肥厚的代偿模型,从在体和细胞水平同时观察内源性 HSF1 和 miR-378 的表达变化,并对其中的调控机制进行了探讨。

本研究中,TAC 处理 2 周后,小鼠表现为代偿期的病理性心肌肥厚,伴随心肌内源性 HSF1 及其下游调控蛋白 Hsp27 的代偿性升高,而心肌内源性 miR-378 的表达却明显下降。细胞水平发现机械牵张刺激心肌细胞会导致内源性 miR-378 的表达下降,而 HSF1 的表达则会升高。之前的研究^[1-5]认为 HSF1 在适应性心肌肥厚中发挥重要作用,在心肌肥厚的早期代偿阶段表现为代偿性的表达升高。那么在心肌组织中,HSF1 的代偿性升高是否受到 miR-378 的调控? 本研究在心肌细胞中分别过表达和抑制 miR-378,发现细胞过表达 miR-378 时会抑制 HSF1 的表达,而抑制 miR-378 的表达会使内源性 HSF1 的表达升高,并且在机械牵张刺激下,过表达 miR-378 会抑制 HSF1 的升高,证实了 miR-378 参与了 HSF1 的表达调控。利用生物信息学软件 miRanda 和 RNAhybrid 分析 miR-378 的潜在靶点,发现 HSF1 的 3'UTR 上有 miR-378 的靶向结合位点,且最小自由能为 -28.4 kcal/mol,说明其可以为 miR-378 的结合提供很好的空间结构,本研究进一步利用荧光素酶报告基因证实了 miR-378 可以靶向结合 HSF1 3'UTR,进而调控其转录后的翻译。

综上所述,HSF1 作为心肌内源重要的保护因子,在心肌缺血缺氧、机械应力及炎症损伤中均发挥了重要的保护作用。在高血压心肌肥厚的早期代偿阶段,心肌 miR-378 表达的下降使得其对内源性 HSF1 转录后抑制作用减弱,进而对 HSF1 的代偿性升高发挥了重要的调控作用。由于 miRNA 表达及调控的时序性的复杂性,有关 miR-378 通过调节 HSF1 在心肌肥厚发生发展阶段所发挥的生物学功能需要进一步深入研究,同时 miR-378 与 miR-1 是否协同调节 HSF1 也需要深入探讨。该研究对于 HSF1 参与调节心肌保护的机制提供了新的理论基础,为心肌重构干预靶点的开发提供了新思路。

参考文献

- [1] KANNEL W B, LEVY D, CUPPLES L A. Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham Study[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1987, 10 Suppl 6:S135-S140.
- [2] KOMURO I, YAZAKI Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress[J]. Annu Rev Physiol, 1993, 55: 55-75.
- [3] ZOU Y, ZHU W, SAKAMOTO M, et al. Heat shock transcription factor 1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury [J]. Circulation, 2003, 108 (24): 3024-3030.
- [4] SAKAMOTO M, MINAMINO T, TOKO H, et al. Upregulation of heat shock transcription factor 1 plays a critical role in adaptive cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2006, 99(12):1411-1418.
- [5] MA H, GONG H, CHEN Z, et al. Association of Stat3 with HSF1 plays a critical role in G-CSF-induced cardio-protection against ischemia/reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(6):1282-1290.
- [6] ZOU Y, LI J, MA H, et al. Heat shock transcription factor 1 protects heart after pressure overload through promoting myocardial angiogenesis in male mice[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(5):821-829.
- [7] ZHOU N, YE Y, WANG X, et al. Heat shock transcription factor 1 protects against pressure overload-induced cardiac fibrosis via Smad3[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(4):445-460.
- [8] ALVAREZ-GARCIA I, MISKA E A. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. Development, 2005, 132(21):4653-4662.
- [9] DIVAKARAN V, MANN D L. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure[J]. Circ Res, 2008, 103(10):1072-1083.
- [10] ABONNENC M, NABEEBACCUS A A, MAYR U, et al. Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of

- microRNA-29b and microRNA-30c[J]. *Circ Res*, 2013, 113(10):1138-1147.
- [11] CARE A, CATALUCCI D, FELICETTI F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5):613-618.
- [12] TATSUGUCHI M, SEOK H Y, CALLIS T E, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(2):1137-1141.
- [13] YU Y, LIU M, ZHANG L, et al. Heat shock transcription factor 1 inhibits H₂O₂-induced cardiomyocyte death through suppression of high-mobility group box 1 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364:263-269.
- [14] WANG S, WU J, YOU J, et al. HSF1 deficiency accelerates the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure through endothelial miR-195a-3p-mediated impairment of cardiac angiogenesis[J]. *J Mol Cell Cardiol NLM*, 2018, 118:193-207.
- [15] XU Z, HAN Y, LIU J, et al. MiR-135b-5p and MiR-499a-3p promote cell proliferation and migration in atherosclerosis by directly targeting MEF2C[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12276.
- [16] HERNANDEZ-TORRES F, ARANEGA A E, FRANCO D. Identification of regulatory elements directing miR-23a-miR-27a-miR-24-2 transcriptional regulation in response to muscle hypertrophic stimuli[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(9): 885-897.
- [17] YOKOYAMA S, OHNO Y, EGAWA, et al. Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading[J]. *Acta Physiol(Oxf)*, 2016, 217(4): 325-337.
- [18] DAS S, BHATTACHARYYA N P. Heat shock factor 1 regulates hsa-miR-432 expression in human cervical cancer cell line[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453(3): 461-466.
- [19] HE M, YANG Z, ABDELLATIF M, et al. GTPase activating protein (Sh3 Domain) binding protein 1 regulates the processing of microRNA-1 during cardiac hypertrophy [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145112.

[本文编辑] 吴秀萍, 贾泽军

