

LncRNA-MEG3 在心肌纤维化过程中的表达变化研究

蒋书美^{1,2} 施 鹏^{1,2} 王立超^{1,2} 王 璨^{1,2} 徐盛松^{1,2} 石开虎^{1,2}

摘要 目的 研究 LncRNA-MEG3 在大鼠心肌纤维化及心肌成纤维细胞(CFs)活化增殖过程中的表达变化。方法 用异丙肾上腺素(ISO)腹部皮下注射 SD 大鼠构造心肌纤维化动物模型为实验组(ISO 组),对照组注射等量的生理盐水;提取乳鼠 CFs 采用转化生长因子 β 1(TGF- β 1)作用 CFs 构建细胞水平纤维化模型为实验组(TGF- β 1 组),对照组为未经 TGF- β 1 作用正常培养的 CFs;HE、Masson 染色观察心肌组织胶原变化;用 Western blot 法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原分子(Collagen I)蛋白的表达;qRT-PCR 法检测 Collagen I、 α -SMA mRNA 和 MEG3 的表达;CCK-8 法检测经 TGF- β 1 作用 CFs 后的吸光度(OD)值。结果 与对照组比较,ISO 组的心肌细胞体积变大、紊乱,组织胶原面积明显增加;ISO 组和 TGF- β 1 组中 Collagen I、 α -SMA 蛋白和 mRNA 表达都显著增多,LncRNA-MEG3 表达显著减少;CCK-8 实验结果提示使用 TGF- β 1 刺激 CFs 24、48 h 后较对照组的细胞 OD 值明显增加,即细胞增殖活性增强。结论 LncRNA-MEG3 在大鼠心肌纤维化组织及 CFs 细胞活化增殖中的表达显著降低,提示 MEG3 在大鼠心肌纤维化及 CFs 活化增殖中可能发挥了负调控作用,为临床心肌纤维化防治和研究提供新的思路。

关键词 LncRNA-MEG3; α -SMA; Collagen I; 心肌纤维化; 心肌成纤维细胞

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)09-1356-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.003

心肌纤维化是心血管疾病中心脏重塑的主要病理特征,包括心房颤动(atrial fibrillation, AF)、心肌梗死(myocardial infarction, MI)和心脏衰竭等,其特征是心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)增加、心肌间质胶原合成增加、降解减少、排列紊乱^[1],主要机制为 CFs 的激活进而转化为肌成纤维细胞导致 I 型胶原(Collagen type I, Collagen I)和 α -平滑肌肌

动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)等蛋白的合成增加,最后细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积发生心肌纤维化^[2]。研究^[3-4]表明,表观遗传修饰参与调控 CFs 细胞的活化增殖,如非编码 RNA 修饰等,但调节心肌纤维化的具体发生机制仍有待于研究阐明。

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是一类长度超过 200 个核苷酸的 RNA 分子,在多种层面上参与相关目的基因表达的调控^[5]。有文献报道^[6],LncRNA 在心血管疾病发生中起着重要的调节作用。人母系表达基因 3(maternally expressed gene3, MEG3)位于人类染色体 14 q 32.3 区的 DLK1-MEG3 位点,其编码产物是一条长约 1.6 kb 的 LncRNA,功能上 MEG3 具有抑制肿瘤细胞的增殖和转移作用,但其对心肌纤维化调控的研究目前知之甚少^[7]。该研究以异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)构建的大鼠心肌纤维化模型及 TGF- β 1 刺激诱导 CFs 模型为研究对象,分别检测 MEG3 的表达变化情况,以此来探究 MEG3 对大鼠心肌纤维化及 CFs 活化增殖的可能作用,为心肌纤维化的机制研究和预防提供潜在的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 20 只,7~8 周龄,体质量(200 $\pm$ 10)g,乳鼠 40 只,出生 1~3 d,体质量(10 $\pm$ 2)g,均购于安徽医科大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(皖)2017-001。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司);胰蛋白酶(加拿大 WISSENT 公司);蛋白酶抑制剂 PMSF、细胞组织裂解液 RIPA(上海 Beyotime 公司); α -SMA、Collagen I 一抗(武汉博士德生物公司)及相关二抗(北京中杉金桥);TRIzol 试剂(美国 Life Technology 公司);MEG3 及相关胶原分子的引物(上海生工生物工程有限公司);TBGreen 试剂(日本 TaKaRa 公司);CCK-8 试剂(Biosharp 公司)。

1.1.3 主要仪器 EPS 电泳仪(上海天能科技有限公司)、显影机等相关 Western blot 设备(上海 Tanon

2021-03-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570295)

作者单位:¹ 安徽医科大学第二附属医院心胸外科,合肥 230601

² 安徽医科大学心血管病研究中心,合肥 230601

作者简介:蒋书美 男 硕士研究生;

石开虎 男 主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: shi-kaihu@gmail.com

公司);生物安全柜、细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);预冷离心机(德国 Eppendorf 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);逆转录仪、PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司);酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 心肌纤维化动物模型的建立及病理学检测

取 SD 大鼠 20 只,随机分为 ISO 组和对照组。ISO 组大鼠腹部皮下注射 ISO 5 mg/kg,2 周,对照组腹部皮下注射等量生理盐水 2 周,取心脏组织标本。一部分用甲醛液固定后石蜡切片,行 HE、Masson 染色,观察胶原表达变化;另一部分用于提取组织蛋白和 RNA,行 Western blot、qRT-PCR 实验。

1.2.2 提取乳鼠原代心肌成纤维细胞 取出生 1~3 d 的乳鼠,将其处死消毒后取出心脏并用 PBS 清洗两遍。然后取心脏组织,将其剪碎放置 50 ml 离心管中并加入胰蛋白酶和 II 型胶原酶(2:1)消化 10 min 后取上清液至 10 ml 离心管中,立即加入培养基中和消化酶,接着离心机中离心 10 min(转速 3 500 r/min、重复 3 次),离心后弃上清液加入培养基吹匀接种至培养瓶中并将其转至培养箱中培养 1.5 h,弃去培养瓶中的培养基,贴壁的即是 CFs,显微镜下观察 CFs 为大的梭型有触角的细胞。待细胞长至 80% 左右时予以传代处理,传至 1~2 代后行相关实验。

1.2.3 CFs 分组与培养 用胰酶将培养瓶中的细胞消化下来后进行细胞计数,吹匀后等量种到 6 孔板中。TGF- β 1 组予以 10 ng/ml TGF- β 1 刺激作用 CFs,对照组为未予以 TGF- β 1 刺激,放入细胞培养箱相同条件下培养 48 h。

1.2.4 Western blot 法检测相关蛋白的表达 用配制好的混合裂解液(PMSF:RIPA=1:100 充分混匀)在冰浴中裂解提取各组的组织和细胞蛋白。按配方配制电泳缓冲液、转膜液、TBST。电泳:按分组加入相应组织及细胞蛋白样品;接电源、80 V、30 min 后改 120 V、1 h 左右。转膜:设定恒流 200 mA 进行转膜 100 min 左右。封闭:将膜放入 TBST 配制的 5% 脱脂牛奶,摇床慢摇封闭 1.5 h 左右。孵育抗体:将膜放入配制好的一抗 4℃ 冰箱过夜;第 2 天用 TBST 液快摇床洗膜 3 次、每次 10 min;然后孵二抗,摇床慢摇孵育 1 h,再用 TBST 液洗 3 次后显影。

1.2.5 qRT-PCR 法检测相关 mRNA 与 MEG3 的表达 用预冷的 TRIzol 提取组织和细胞的总 RNA,然后加入 DEPC 水吹匀测浓度和纯度,确保 260 nm/

280 nm OD 值在 1.8~2.0 之间。将总 RNA 逆转录成 cDNA,然后行目标 cDNA 的扩增(qRT-PCR):用无酶水配制目标基因的引物,取 cDNA 样本 1.6 μ l、被扩增基因的引物 3.2 μ l 加入到相应的八联管中,然后在避光的环境下每孔加入 5.2 μ l 的 TBGreen 至总反应体系总量为 10 μ l。按如下步骤进行目标基因扩增:预变性阶段 50℃ 2 min,95℃ 10 min;扩增阶段 95℃ 20 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共进行 40 个循环;溶解曲线阶段 95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。以 β -actin 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组目标基因的表达量。引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')
MEG3	F: TCCTTACGTTGCAACCCTCC R: TTGGGTCCAGCATGTCTGTC
α -SMA	F: TGGCCCTGCTGCTTCCTCTCTT R: GGGGCCAGCTTCGTCATACCTCT
Collagen I	F: GGAGAGAGCATGACCGATGG R: GGGACTTCTTGAGGTTGCCA
β -actin	F: GCAAGTTCAACGGCACAG R: GCCAGTAGACTCCACGACAT

1.2.6 CCK-8 法检测 CFs 的 OD 值 用胰酶将培养瓶中的细胞消化下来进行细胞计数,以 3 000 个细胞/孔均匀的接种到 96 孔板中,每孔加培养基至 100 μ l。将 CFs 分为 A、B、C 三组,其中 A 组为未加 TGF- β 1 刺激,B、C 两组分别予以 10 ng/ml TGF- β 1 刺激作用 24、48 h,在相同条件下培养 48 h 后,每孔加入 4℃ 保存的 CCK-8 试剂 10 μ l,再放入细胞培养箱中继续培养 3 h,最后测每孔在波长 450 nm 处的 OD 值。

1.3 统计学处理 采取 SPSS 20.0 软件进行数据分析,结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素变量两组之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心肌组织病理学改变 心肌组织切片 HE 染色中细胞核被染成蓝色,细胞质及细胞外基质被染成红色,与对照组比较,ISO 组的心肌细胞体积明显增大、大小不一且排列紊乱,组织病理改变更为明显,见图 1。Masson 染色中细胞核被染成黑色,细胞外胶原纤维被染成蓝紫色,与对照组比较,ISO 组的大鼠心肌细胞肥大紊乱,心肌胶原纤维化面积明显增多,见图 2。

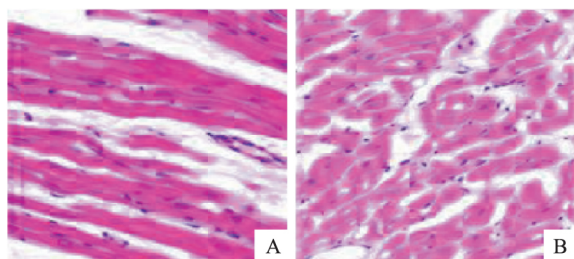


图1 大鼠心肌组织的HE染色图 ×400
A: 对照组; B: ISO组

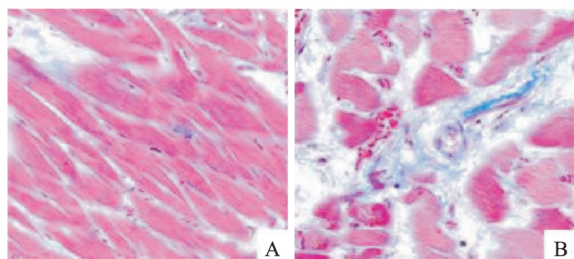


图2 大鼠心肌组织的Masson染色图 ×400
A: 对照组; B: ISO组

2.2 大鼠心肌组织中 Collagen I、 α -SMA 分子蛋白和 mRNA 的表达变化 Western blot 检测大鼠心肌组织蛋白结果提示: 与对照组比较, ISO 组的心肌组织中 Collagen I、 α -SMA 分子蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图3。qRT-PCR 法检测结果提示: 与对照组比较, ISO 组的心肌组织中 Collagen I、 α -SMA 的 mRNA 表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图4。

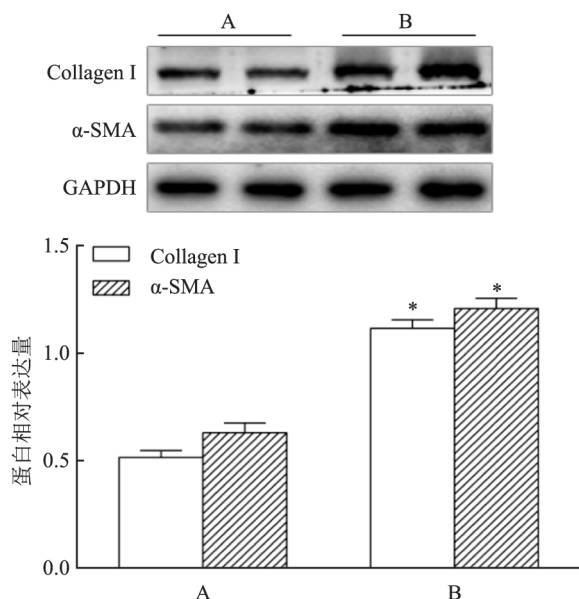


图3 大鼠心肌组织中 Collagen I、 α -SMA 分子的蛋白表达变化
A: 对照组; B: ISO 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

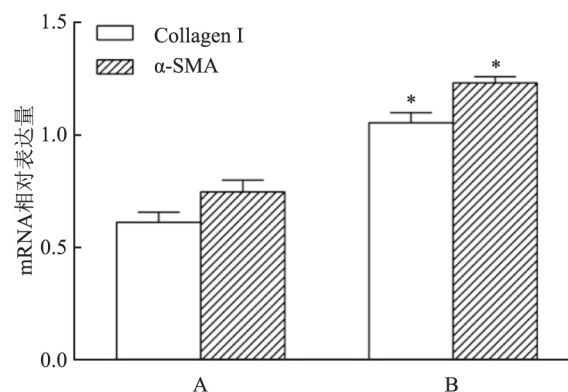


图4 大鼠心肌组织中 Collagen I、 α -SMA 的 mRNA 表达变化
A: 对照组; B: ISO 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 TGF- β 1 刺激诱导 CFs 中 Collagen I、 α -SMA 分子蛋白及 mRNA 的表达变化 用 TGF- β 1 刺激 CFs 48 h 后, Western blot 检测结果提示: 与对照组比较, TGF- β 1 组中 Collagen I、 α -SMA 分子蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图5。qRT-PCR 检测结果提示: 与对照组比较, TGF- β 1 组中 Collagen I、 α -SMA 的 mRNA 表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图6。

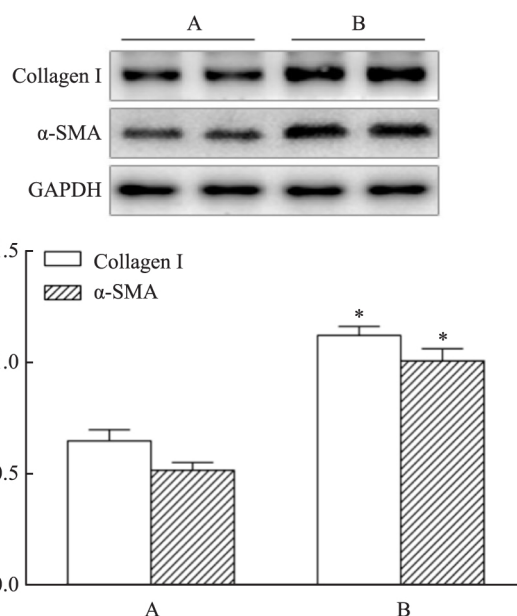


图5 TGF- β 1 刺激 CFs 48 h 后 Collagen I、 α -SMA 的蛋白表达变化

A: 对照组; B: TGF- β 1 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 CCK-8 检测 TGF- β 1 刺激 CFs 后的 OD 值变化 CCK-8 检测结果提示: 与对照组比较, TGF- β 1 刺激 CFs 24 h 和 48 h 后 CFs 的 OD 值均明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图7。说明 TGF-

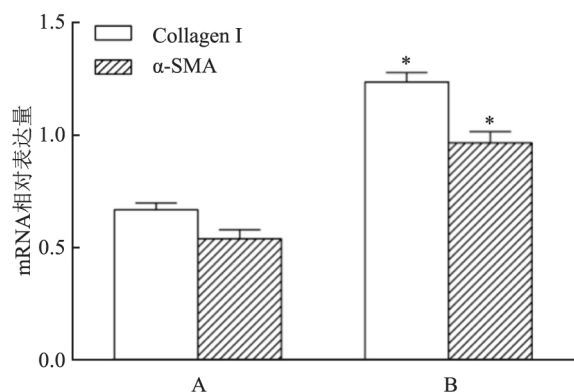


图6 TGF-β1刺激CFs 48 h后 Collagen I、α-SMA的mRNA表达变化

A: 对照组; B: TGF-β1组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

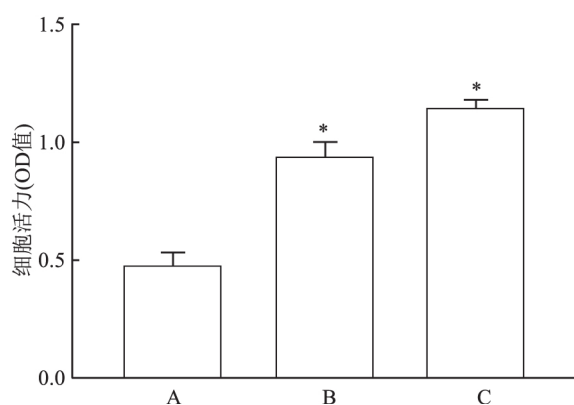


图7 TGF-β1刺激CFs 24、48 h后CFs的OD值变化

A: 对照组; B: TGF-β1刺激CFs 24 h后; C: TGF-β1刺激CFs 48 h后; 与对照组比较: * $P < 0.05$

β1刺激CFs后的细胞增殖活性有所增加。

2.5 大鼠心肌组织和CFs中LncRNA-MEG3的表达变化 qRT-PCR检测结果提示:与对照组比较,在动物实验组(ISO组)的心肌组织中和细胞实验组(TGF-β1组)的CFs中LncRNA-MEG3的表达都明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图8。

3 讨论

心肌纤维化被认为是众多心脏疾病的终末病理表现,CFs的活化增殖导致α-SMA、Collagen I等胶原分子合成的增加是心肌纤维化的主要发生机制,但具体发生机制尚未完全研究清楚^[8]。研究表明^[9]LncRNAs在细胞增殖、分化和变性中发挥重要作用,包括对心肌纤维化中CFs的活化增殖过程也具有调控作用,例如本课题组前期验证过LncRNA-Gas5可通过调控CFs的凋亡来影响心肌纤维化的发生,起到抑制心肌纤维化的作用^[10]。

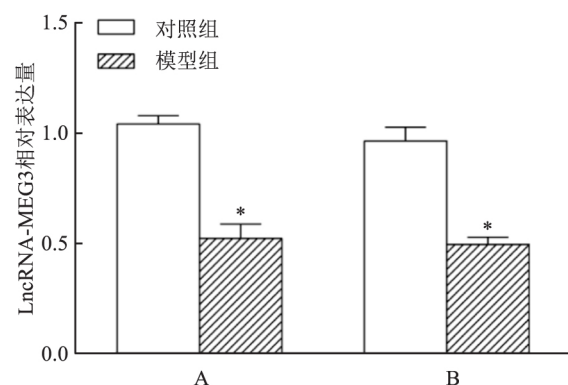


图8 大鼠心肌组织和CFs中MEG3的表达变化

A: 动物实验; B: 细胞实验; 与对照组比较: * $P < 0.05$

LncRNA-MEG3是非编码RNA中的一种,其在肿瘤增殖中研究较多,且已被证明具有抑制肿瘤细胞增殖生长的作用,如在肺癌^[11]、胃癌^[12]等肿瘤中LncRNA-MEG3表达降低。同时也有报道LncRNA-MEG3在糖尿病肾病肾脏纤维化和肺纤维化发生过程中起调控作用^[13-14],但其在心肌纤维化发生过程中的机制研究较少。本研究在大鼠ISO模型的心肌组织中和TGF-β1刺激CFs中检测到α-SMA、Collagen I在蛋白和基因水平都较对照组表达显著增加;同时TGF-β1刺激CFs后较对照组增殖活性明显增加,说明心肌纤维化动物和细胞模型建立成功。我们发现在心肌纤维化动物和细胞模型组中LncRNA-MEG3的表达较对照组都是明显降低的。Piccoli et al^[15]研究在心脏疾病晚期重塑过程中,CFs中的LncRNA-MEG3表达也是下调的,其结果与本研究是一致的。间接说明LncRNA-MEG3可能在心肌纤维化及CFs活化增殖形成过程中发挥了负调控作用。

综上所述,本研究发现了LncRNA-MEG3在心肌纤维化动物和细胞模型组中表达明显降低,其在心肌纤维化过程中可能起到抑制作用,但本研究只是在组织和细胞水平的初步验证,LncRNA-MEG3在心肌纤维化发生中的具体调控通路还有待于继续深入研究。

参考文献

- [1] Park S, Nguyen N B, Pezhouman A, et al. Cardiac fibrosis: potential therapeutic targets[J]. Transl Res 2019; 209: 121-37.
- [2] 宋剑南, 陶辉, 丁季飞, 等. IGFBP-3在大鼠心肌纤维化和心肌成纤维细胞活化增殖中的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2020; 55(2): 263-8.
- [3] Grimaldi V, De Pascale M R, Zullo A, et al. Evidence of epigenetic tags in cardiac fibrosis[J]. Int J Cardiol 2017; 69(2): 401-8.
- [4] 丁季飞, 陶辉, 石开虎, 等. DNMT1在SD大鼠心肌成纤维细

- 胞增殖中的作用[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(8): 1129 – 33.
- [5] Begolli R, Sideris N, Giakountis A. LncRNAs as chromatin regulators in cancer: from molecular function to clinical potential [J]. *Cancers* 2019, 11(10): 1524.
- [6] Xu D, Liu T, He L, et al. LncRNA MEG3 inhibits HMEC-1 cells growth, migration and tube formation *via* sponging miR-147 [J]. *Biological Chemistry* 2020, 401(5): 601 – 15.
- [7] Zhou C, Huang C, Wang J, et al. LncRNA MEG3 downregulation mediated by DNMT3b contributes to nickel malignant transformation of human bronchial epithelial cells *via* modulating PHLPP1 transcription and HIF-1 α translation [J]. *Oncogene*, 2017, 36(27): 3878 – 89.
- [8] Frangogiannis N G. Cardiac fibrosis: cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities [J]. *Mol Aspects Med* 2019, 65: 70 – 99.
- [9] Chen C, Tang Y, Sun H, et al. The roles of long noncoding RNAs in myocardial pathophysiology [J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(11): BSR20190966.
- [10] She Q, Shi P, Xu S, et al. DNMT1 methylation of LncRNA GAS5 leads to cardiac fibroblast pyroptosis *via* affecting NLRP3 axis [J]. *Inflammation* 2020, 43(3): 1065 – 76.
- [11] Yang Z, Wang Z, Duan Y. LncRNA MEG3 inhibits non-small cell lung cancer *via* interaction with DKC1 protein [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(3): 2183 – 90.
- [12] Xu G, Meng L, Yuan D, et al. MEG3/miR21 axis affects cell mobility by suppressing epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. *Oncol Rep* 2018, 40(1): 39 – 48.
- [13] Gokey J J, Snowball J, Sridharan A, et al. MEG3 is increased in idiopathic pulmonary fibrosis and regulates epithelial cell differentiation [J]. *JCI Insight* 2018, 3(17): e122490.
- [14] Zha F, Qu X, Tang B, et al. Long non-coding RNA MEG3 promotes fibrosis and inflammatory response in diabetic nephropathy *via* miR-481a/Egr-1/TLR4 axis [J]. *Aging*, 2019, 11(11): 3716 – 30.
- [15] Piccoli M, Gupta S K, Viereck J, et al. Inhibition of the cardiac fibroblast – enriched lncRNA MEG3 prevents cardiac fibrosis and diastolic dysfunction [J]. *Circulation Research* 2017, 121(5): 575 – 83.

Study on the expression changes of LncRNA-MEG3 in the process of myocardial fibrosis

Jiang Shumei^{1,2}, Shi Peng^{1,2}, Wang Lichao^{1,2}, et al

(¹Dept of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Cardiovascular Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To study the expression changes of LncRNA-MEG3 in the process of rat cardiac fibrosis and cardiac fibroblasts (CFs) activation and proliferation. **Methods** SD rats were subcutaneously injected with isoproterenol (ISO) into the abdomen to construct a myocardial fibrosis animal model as the experimental group (ISO group), and the control group was injected with the same amount of normal saline; the CFs of suckling rats were extracted, and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) was used to construct a cell-level fibrosis model as the experimental group (TGF- β 1 group), and the control group was CFs cultured normally without TGF- β 1; HE and Masson staining were used to observe the changes of myocardial tissue collagen; Western blot method was used to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen type I (Collagen I) protein; qRT-PCR method was used to detect the expression of Collagen I, α -SMA mRNA and MEG3; The CCK-8 method was used to detect the absorbance (OD value) of CFs after TGF- β 1 was used. **Results** The results of HE and Masson staining indicated that compared with the control group, the volume of cardiomyocytes in the ISO group became larger and disordered, and the area of tissue collagen increased significantly. Compared with the control group, Collagen I, α -SMA protein and mRNA expression in ISO group and TGF- β 1 group increased significantly, and the expression of LncRNA-MEG3 decreased significantly; The results of CCK-8 experiments suggested that CFs stimulated by TGF- β 1 for 24 h and 48 h significantly increased the OD value of cells compared with the control group, that is, the cell proliferation activity enhanced. **Conclusion** The expression of LncRNA-MEG3 in rat myocardial fibrosis tissue and the activation and proliferation of CFs cells significantly reduced, suggesting that MEG3 may play a negative regulatory role in rat myocardial fibrosis and activation and proliferation of CFs, providing new ideas for clinical myocardial fibrosis prevention and research.

Key words LncRNA-MEG3; α -SMA; Collagen I; myocardial fibrosis; myocardial fibroblasts