

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.018.html>

MicroRNA-133b-5p 通过靶向调控 Fas 基因影响 H9c2 心肌细胞凋亡

程洁, 何淑芳, 韩正怡, 朱海娟, 张野

摘要 目的 研究 microRNA(miR)-133b-5p 在 H9c2 心肌细胞凋亡中发挥的作用及其靶向调控 Fas 基因的机制。方法 取对数生长期大鼠 H9c2 胚胎心肌细胞, 分为空白对照组、miR-133b-5p 抑制剂组、抑制剂阴性对照组。分别转染 48 h 后收集细胞, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测 miR-133b-5p 表达, 微板法检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性, Annexin V-FITC 联合 PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡。双荧光素酶报告基因系统验证 miR-133b-5p 与 Fas mRNA 的 3'UTR 区的靶向结合。最后运用 qRT-PCR 和 Western

blot 分别检测各组 Fas mRNA 与 Fas 蛋白表达水平。结果 miR-133b-5p 抑制剂组细胞内 miR-133b-5p 表达水平下调至空白对照组的 33% ($P < 0.05$); LDH 活性升高, 细胞凋亡率增加, 均明显高于空白对照组与抑制剂阴性对照组 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因证明 Fas 是 miR-133b-5p 的一个靶基因; miR-133b-5p inhibitor 显著上调 Fas mRNA 和 Fas 蛋白水平 ($P < 0.05$)。结论 利用化学合成 miR-133b-5p inhibitor 抑制大鼠 H9c2 心肌细胞中 miR-133b-5p 表达, 可诱导心肌细胞损伤和凋亡, 其机制可能与调控靶基因 Fas 表达有关。

关键词 心肌细胞; 微小 RNAs; 乳酸脱氢酶; 凋亡; Fas

中图分类号 R 363

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0189-06

2015-11-23 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金研究重大项目(编号: KJ2014ZD16); 安徽省科技厅年度重点项目(编号: 1301043030)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院麻醉科, 合肥 230601

作者简介: 程洁, 女, 硕士研究生;

张野, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者,

E-mail: zhangye_hassan@sina.com

凋亡是心肌细胞的一种程序性死亡, 其在心脏发育、心力衰竭、原发性高血压、动脉粥样硬化、心肌梗死等心脏疾病的疾病生理中发挥着重要的作用^[1]。抑制心肌细胞凋亡可以减轻心肌缺血再灌

Survivin gene silencing inhibits the invasion and migration of esophageal carcinoma Eca-109 cell

Niu Zhaoxia, Zhang Xiuzhi, Chen Jie, et al

(Dept of Pathophysiology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191)

Abstract Objective To investigate the effect of survivin on Eca-109 cell invasion and migration by silencing endogenous survivin expression by RNA interference technology. **Methods** A siRNA expressing vector targeting survivin was constructed and transfected into Eca-109 cells via lipofectamineTM 2000 to establish stable transfection cell line; the expression level of survivin protein was detected by Western blot to observe the interference effect; the expressions of MMP2, MMP9 and VEGF proteins were also observed by Western blot; the changes of cell invasion and migration abilities were respectively detected by Transwell Matrigel invasion assay and cell wound-healing scrape assay. **Results** Compared with the control groups, the expression level of survivin protein was significantly reduced and the inhibition rate was 85%; the expressions of MMP2, MMP9 and VEGF proteins of survivin interference group were also distinctly suppressed ($P < 0.05$); at the same time, the cell invasion and migration abilities of survivin interference group were obviously reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Survivin gene expression is correlated with the invasion and migration potential of esophageal carcinoma cell; specifically silencing survivin can effectively inhibit the cell invasion and migration abilities of Eca-109 cells possibly by down-regulating the expressions of MMP2, MMP9 and VEGF proteins.

Key words RNA interference; survivin; invasion and migration; Eca-109

注损伤、延缓心衰等病理过程。通过 microRNA (miRNA) 芯片对比正常与心衰大鼠心肌细胞内 miRNA 表达,发现与正常大鼠相比,心衰大鼠心肌细胞内 miR-133b-5p 明显下调^[2]。该研究拟进一步观察 miR-133b-5p 对心肌细胞凋亡的影响及其可能机制。该实验利用化学合成 miR-133b-5p inhibitor, 将其转染至大鼠 H9c2 心肌细胞内,下调 miR-133b-5p 表达,观察其对心肌细胞损伤和凋亡的影响。通过双荧光素酶报告基因系统验证 miR-133b-5p 与靶基因 Fas 的靶向结合,并观察 miR-133b-5p inhibitor 对 Fas mRNA 与蛋白表达水平的影响,以探讨 miR-133b-5p 影响心肌细胞凋亡的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 F12/DMEM 中糖培养基、TRIzol 总 RNA 提取试剂、Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂、OPTI-MEM 无血清培养基(美国 Life Technologies 有限公司);胎牛血清、0.25% 胰酶消化液(南京 Wisent 生物技术有限公司);AOMD-Q020 miRNA 逆转录与 PCR 试剂盒、U6 与 miR-133b-5p 引物(广州复能基因有限公司);mRNA RR037A 逆转录试剂盒、DRR820A PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公 司); β -actin 与 Fas 引物(上海生工生物工程有限公 司);LDH 测试盒(南京建成生物工程研究所);凋亡 试剂盒(美国 Biouniquer 公司);Dual-Luciferase 报告 基因检测系统试剂盒(美国 Promega 公司);鼠抗 β -actin 单克隆抗体、兔抗 Fas 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 生物技术公司);HRP 标记羊抗兔、羊抗鼠抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司);Tecan M1000 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);Implen P330 超微量分光光度计(德国 Implen 公司);StepOne 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);Cytomics FC 500 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 有限公 司);CXY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂);Tanon Fine Do X6 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有 限公司)。

1.2 细胞的培养 大鼠 H9c2(2-1) 胚胎心肌细胞株、293T 细胞株购自中科院上海细胞库。心肌细胞株采用含有 10% 胎牛血清 F12/DMEM 中糖培养基、293T 细胞株采用 DMEM 高糖培养基,均于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。0.25% 胰酶消化细胞,每 3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。293T 细胞用于双荧光素酶报告基因实验。

1.3 miR-133b-5p mimic、inhibitor 的合成与转染

1.3.1 miR-133b-5p inhibitor 的合成与心肌细胞的转染 miR-133b-5p inhibitor 的序列为 5'-ACUUG-GUUCGGUUUGACCAGC-3',为成熟 miR-133b-5p 的反义序列;miR-133b-5p inhibitor-NC 的序列为 5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3',该序列和所有的哺乳动物都没有同源性,因此没有功能。所有 RNA 片段委托上海吉玛有限公司合成。转染前 1 d 消化制备细胞悬液,以 4×10^4 个/孔接种于 6 孔板中。当细胞长至约 40% ~ 50% 的细胞融合度时进行转染,所有步骤按 Lipofectamine RNAiMAX 操作手册进行,miR-133b-5p inhibitor 转染浓度为 30 nmol/L。实验分成空白对照组(只加 Lipofectamine RNAiMAX)、miR-133b-5p 抑制剂组(转染 miR-133b-5p inhibitor)、抑制剂阴性对照组(转染 miR-133b-5p inhibitor-NC)。

1.3.2 miR-133b-5p mimic 的合成与 293T 细胞的转染 miR-133b-5p mimic 的序列为 5'-GCUGGU-CAAACGGAACCAAGU-3',为成熟 miR-133b-5p 序列;miR-133b-5p mimic-NC 的序列与 miR-133b-5p inhibitor-NC 的序列相同。细胞转染方法同前。

1.4 荧光实时定量 PCR 检测 RNA 表达水平

1.4.1 miR-133b-5p 表达水平检测 各组于转染 48 h 后收集细胞,TRIzol 法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计定量 RNA 样品。以每 10 μ l 逆转录体系加入 1 000 ng 总 RNA,根据复能基因 AOMD-Q020 miRNA 试剂盒说明书,采用 POLY A 加尾法进行逆转录。得到的 cDNA 5 倍稀释后以 U6 为内参进行荧光定量 PCR,反应条件为:95 °C 预变性 10 min;95 °C 10 s 60 °C 20 s 72 °C 10 s(40 个循环);反应结束建立溶解曲线。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 miR-133b-5p 的相对含量。其中 U6(货号:RmiRQP9003)和 miR-133b-5p(货号:RmiRQP3012)引物均委托广州复能基因有限公司设计合成。每组 3 个复孔,实验共重复 3 次。

1.4.2 Fas mRNA 表达水平检测 同样方法收集并定量 RNA 后,以每 10 μ l 逆转录体系加入 500 ng 总 RNA,根据 TaKaRa RR037A 逆转录说明书进行逆转录得到相应的 cDNA。 β -actin 上游引物:5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',下游引物:5'-TT-TAATGTCAACGCACGATTTTC-3';Fas 上游引物:5'-GT-TGAAAGAACCGAAGGACAA-3',下游引物 5'-CC TCAAAGTAGGCACAGGATGT-3'。以 β -actin 为内参进行荧光定量 PCR,反应条件为 95 °C 预变性 30 s;95 °C 5 s 60 °C 30 s(40 个循环);反应结束建立溶解曲线。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 Fas 的相对含量。每组 3 个

复孔,实验共重复3次。

1.5 微板法检测 LDH 活性 转染 48 h 后吸取各孔培养基上清液,100 μ l/孔。根据说明书依次加样后,酶标仪检测 450 nm 处吸光度值。根据公式计算出 LDH 活性。每组至少 3 个复孔,实验共重复 3 次。

1.6 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测心肌凋亡 转染 48 h 后用胰酶消化收集细胞。用 PBS 洗涤细胞两次(800 rpm 离心 5 min),收集约 3×10^5 个细胞。用 500 μ l Annexin V binding buffer 悬浮细胞后,加入 1.2 μ l Annexin V-FITC 和 3 μ l PI,混匀。避光室温反应 10 min。用流式细胞仪检测,Annexin V + /PI - 为凋亡细胞。每组 3 个复孔,实验共重复 3 次。

1.7 双荧光素酶报告基因检测 将含有 miR-133b-5p 预测结合位点的 Fas 基因 3'UTR 全长序列扩增产物转入 PmirGLO 表达载体(Fas-wt),并针对软件预测的 miR-133b-5p 与 Fas 基因的靶结合位点进行定点突变(Fas-mut),然后利用 Lipofectamine 将报告质粒和 miR-133b-5p mimic 或其阴性对照(miR mimic-NC)共转染 293T 细胞。Fas-wt 及 Fas-mut 转染细胞分别分为空白对照组、miR-133b-5p mimic 组及 mimic 阴性对照组,每组 3 个复孔。培养 48 h 后,按照双荧光素酶活性检测试剂盒说明书操作, Tecan M1000 多功能酶标仪检测细胞荧光素酶的活性。相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。实验重复 3 次。

1.8 Western blot 检测 Fas 蛋白水平 转染 48 h 后胰酶消化收集细胞,加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液。BCA 法测定各组蛋白浓度。蛋白样品以 1:1 加入蛋白上样缓冲液,混匀后 100 $^{\circ}$ C 5 min 进行蛋白变性。取 30 μ g 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,电转印至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,加入 β -actin 或 Fas 的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000 稀释),室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次后进行 ECL 化学发光剂显色,Tanon Fine Do X6 全自动化学发光图像分析系统采集图像。实验共重复 3 次。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-133b-5p inhibitor 显著下调 H9c2 心肌细胞内 miR-133b-5p 表达 miR-133b-5p 抑制剂组 miR-133b-5p 相对表达水平为 (0.33 ± 0.17) ,明显低于空白对照组 (1.00 ± 0.17) ($P < 0.05$),提示抑制剂转染成功,可特异性抑制心肌细胞内 miR-133b-5p 表达。相反,抑制剂阴性对照组与空白对照组 miR-133b-5p 表达差异无统计学意义。见图 1。

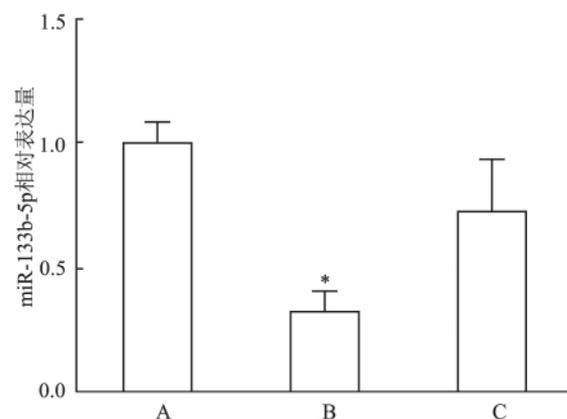


图 1 荧光定量 PCR 比较各组中 miR-133b-5p 水平

A: 空白对照组; B: miR-133b-5p 抑制剂组; C: 抑制剂阴性对照组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 miR-133b-5p inhibitor 对 H9c2 心肌细胞 LDH 活性的影响 与空白对照组相比,转染 miR-133b-5p inhibitor 后,心肌细胞培养液中 LDH 活性明显升高 ($F = 11.000$, $P < 0.05$),提示心肌细胞受损。相反,转染 miR inhibitor-NC 对心肌细胞培养液中 LDH 活性无明显影响。见图 2。

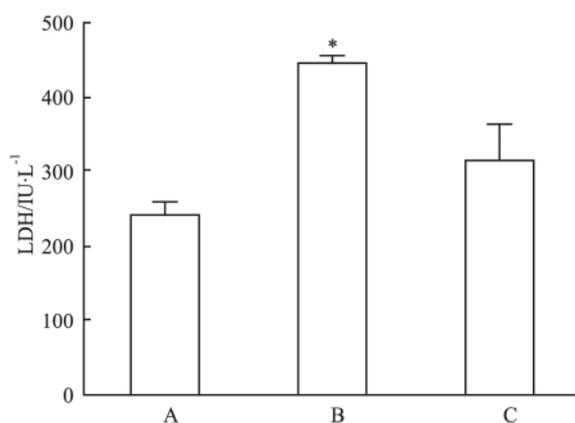


图 2 miR-133b-5p inhibitor 对 H9c2 心肌细胞 LDH 释放水平的影响

A: 空白对照组; B: miR-133b-5p 抑制剂组; C: 抑制剂阴性对照组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 miR-133b-5p inhibitor 对 H9c2 心肌细胞凋亡的影响 Annexin V/PI 双染流式检测心肌细胞凋亡结果显示,与空白对照组相比,miR-133b-5p 抑制剂组细胞 Annexin V + /PI - 区细胞明显增多 ($F = 6.945, P < 0.05$),提示细胞凋亡增加。相反,抑制剂阴性对照组心肌细胞凋亡无明显变化。见图 3。

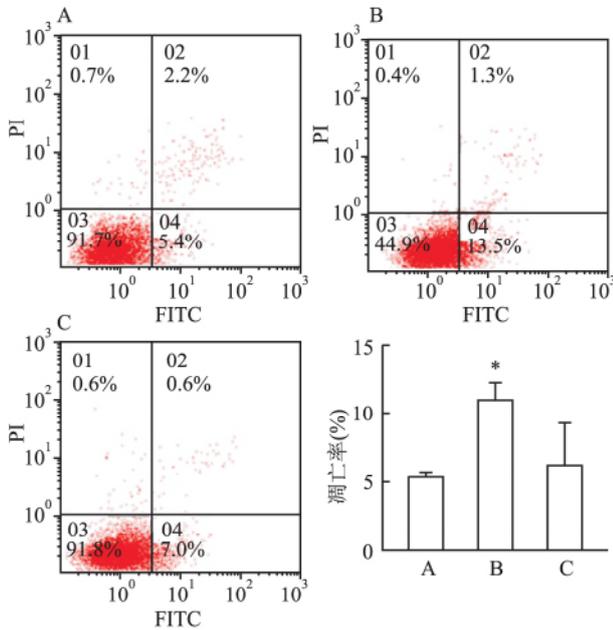


图3 流式细胞术检测 miR-133b-5p inhibitor 对 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

A: 空白对照组; B: miR-133b-5p 抑制剂组; C: 抑制剂阴性对照组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 miR-133b-5p 靶向结合 Fas 基因 3'UTR 包含 miR-133b-5p 结合位点的 Fas mRNA 3'UTR 序列 (Fas-wt) 或其结合位点突变体 (Fas-mut) pmirGLO 报告质粒,被克隆至荧光素酶报告基因载体下游 (图 4A)。在 Fas-wt 细胞株中,共转染 miR-133b-5p mimic 可抑制 Fas 基因荧光素酶活性,与空白对照组及 mimic 阴性对照组相比,差异有统计学意义 ($F = 139.999, P < 0.05$)。而在 Fas-mut 细胞株中,共转染 miR-133b-5p mimic 对 Fas 基因荧光素酶活性无明显影响,与空白对照组及 mimic 阴性对照组相比无明显差异 ($F = 0.599$),见图 4B。说明 miR-133b-5p 是通过靶向结合 Fas 基因的 3'UTR 来调节其表达。

2.5 miR-133b-5p inhibitor 对 H9c2 心肌细胞 Fas mRNA 和 Fas 蛋白水平的影响 qRT-PCR 检测 Fas mRNA 水平显示,与空白对照组相比,转染 miR-133b-5p inhibitor 后,细胞内 Fas mRNA 表达水平升

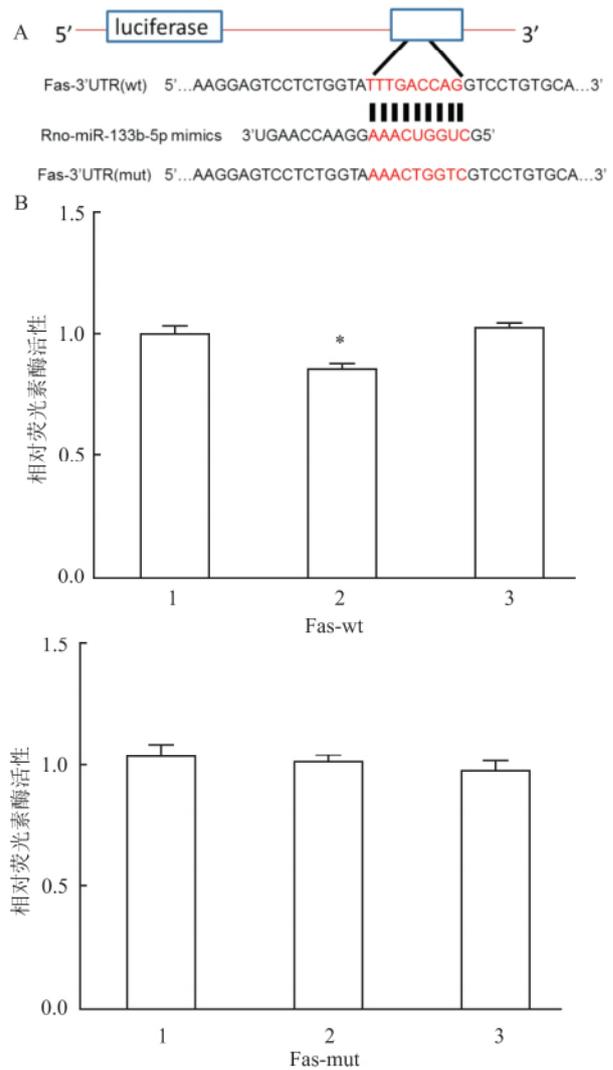


图4 miR-133b-5p 靶向结合 Fas 基因 3'UTR

A: 荧光素酶报告载体中插入野生型 Fas 3'UTR 端 (wt) 或 miR-133b-5p 结合位点突变的 Fas 3'UTR 端 (mut); B: 野生型 (Fas-wt) 与突变型 (Fas-mut) 报告载体分别与空白载体、miR-133b-5p mimic 或 mimic 阴性对照共转染 293T 细胞; 1: 空白对照组; 2: miR-133b-5p mimic 组; 3: mimic 阴性对照组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

高 ($F = 5.091, P < 0.05$),见图 5A。同时,Western blot 结果显示 miR-133b-5p 抑制剂组细胞内 Fas 蛋白表达水平明显高于空白对照组 ($F = 9.019, P < 0.05$),见图 5B; 提示 miR-133b-5p 在 mRNA 和蛋白水平调控 Fas 表达。相反,转染 miR inhibitor-NC 对 Fas mRNA 和蛋白水平均无明显影响。

3 讨论

miRNA 是一类小分子非编码单链 RNA,通常只有 18 ~ 24 个碱基,通过与靶基因 3'UTR 区域的结合,以降解靶基因 mRNA 或者抑制靶基因翻译两种方式达到基因沉默效应^[3-4]。miRNA 几乎参与调控

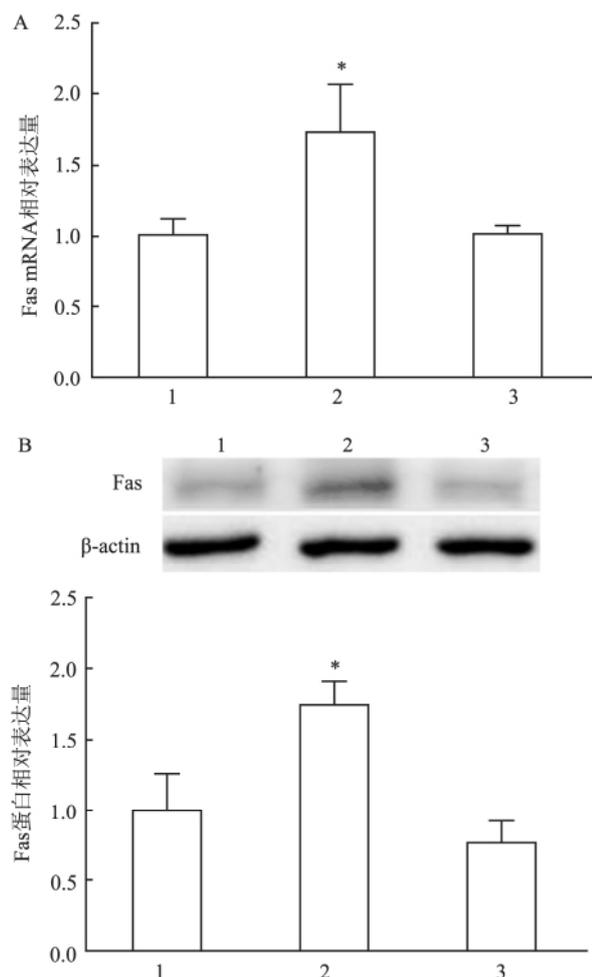


图5 miR-133b-5p inhibitor 对 Fas mRNA 和 Fas 蛋白水平的影响

1: 空白对照组; 2: miR-133b-5p 抑制剂组; 3: 抑制剂阴性对照组;

A: 以 β -actin 为内参, qRT-PCR 分析 Fas mRNA 表达; B: 以 β -actin 为内参, Western blot 分析 Fas 蛋白表达; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

人类生长发育的各个阶段, 据预测, 人类可能有超过 90% 基因受到 miRNA 的调控^[4]。miRNA 可通过其下游的靶基因和信号通路, 调控心肌细胞的凋亡过程^[5], 从而使 miRNA 成为临床治疗和预防心肌细胞凋亡相关疾病的靶标之一。

在细胞内有效地抑制目的 miRNA 表达, 利用脂质体转染寡核苷酸是一种简便有效的方法。miRNA inhibitor 通过特异性地与成熟 miRNA 分子结合而抑制其作用, 削弱细胞中 miRNA 导致的基因沉默效应^[5]。本实验采用的 miR-133b-5p inhibitor 为 2'-甲氧修饰的 RNA 寡核苷酸设计, 可以有效抑制内源性成熟 miRNA 的功能。利用 RNA 特异性转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX, 进一步提高了细胞转染效率。转染 48 h 后利用 qRT-PCR 检测心肌细胞内 miR-133b-5p 表达, 验证了抑制剂转染成功。

miR-133 家族主要包括 miR-133a 和 miR-133b, 其中 miR-133a 已被证实是一种重要的抗心肌细胞凋亡 miRNA, 其可能通过靶向抑制 caspase-9 抑制心肌细胞凋亡^[6-7]。研究表明, miR-133a 可以靶向调控 cyclinD2, 调节心肌细胞增殖^[8]; 在主动脉结扎和异丙肾上腺素诱导的心肌肥大模型中, miR-133a 可以发挥抑制心肌纤维化、改善电生理作用^[9]; miR-133a 的敲除会导致鼠发生室间隔缺损、扩张性心脏病^[8]。miR-133b 与 miR-133a 具有高度同源性, 可能有类似生物学功能, 两者在心肌梗死后心肌组织中表达均显著降低^[10]。然而 miR-133b 在心肌细胞凋亡中发挥何种作用仍不明确, 其作用机制尚待阐明。miR-133b-5p 是 miR-133b 前体自 5' 端臂加工得到的成熟体。本研究中, 利用 miR-inhibitor 下调 H9c2 心肌细胞内 miR-133b-5p 表达, 导致 LDH 活性升高, 细胞凋亡率增加, 提示 miR-133b-5p 表达下调可诱导心肌细胞损伤和凋亡。因而, miR-133b-5p 在心肌细胞中可能有抗损伤和凋亡的作用, 维持或上调 miR-133b-5p 表达可能有利于心肌细胞生存。

本实验运用生物信息学分析与双荧光素酶实验证实 Fas 是 miR-133b-5p 的直接靶基因之一, 而且 miR-133b-5p inhibitor 可显著上调 Fas mRNA 和 Fas 蛋白表达。miRNA 作用于靶基因的方式主要有两种: 一种是使靶基因 mRNA 降解, 另一种是抑制靶基因 mRNA 翻译^[3]。基于本实验结果, 推测 miR-133b-5p 可能是通过前一种方式作用于其靶基因 Fas 发挥作用。Fas 是一种分子量为 48 ku 的跨膜糖蛋白, 其与 FasL 结合后介导的凋亡通路是经典的凋亡途径之一^[11]。Fas/FasL 激活后, 级联激活 caspase-8、caspase-3、6、7、9 等, 作用于线粒体或者转录因子, 最终导致凋亡发生^[12]。在心肌细胞中下调 Fas 可以有效减轻心肌细胞凋亡^[13]。因此, 推测 miR-133b-5p inhibitor 下调心肌细胞内 miR-133b-5p 表达, 并且可能通过上调 Fas mRNA 和 Fas 蛋白表达, 诱导活化 Fas/FasL 信号通路, 致使心肌细胞发生损伤和凋亡。

综上所述, 利用 miR-133b-5p inhibitor 抑制大鼠 H9c2 心肌细胞中 miR-133b-5p 表达水平, 可诱导心肌细胞损伤和凋亡, 其机制可能是通过在 mRNA 和蛋白水平调控 Fas 表达, 诱导活化 Fas 介导的细胞凋亡信号。为进一步探讨 miR-133b-5p 在心肌细胞凋亡中发挥的作用及其机制提供了基础。

参考文献

[1] 段纬喆, 赵延恕. 肿瘤坏死因子 α 与心力衰竭及心肌细胞凋

- 亡的研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(9): 1284-6.
- [2] 朱海娟, 何淑芳, 吴昊, 等. 吗啡预处理对心力衰竭大鼠离体心肌细胞缺氧复氧时 miRNA 表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(12): 1471-3.
- [3] 王艳, 吴强, 胡向阳, 等. 不同侵袭力乳腺癌细胞 miRNAs 表达谱检测 [J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(3): 302-5.
- [4] Ye Y, Perez-Polo J R, Qian J, et al. The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Physiol Genomics* 2011, 43(10): 534-42.
- [5] Skommer J, Rana I, Marques F Z, et al. Small molecules, big effects: the role of microRNAs in regulation of cardiomyocyte death [J]. *Cell Death Dis* 2014, 5: e1325.
- [6] Castaldi A, Zaglia T, Di Mauro V, et al. MicroRNA-133 modulates the β 1-adrenergic receptor transduction cascade [J]. *Circ Res* 2014, 115(2): 273-83.
- [7] He B, Xiao J, Ren A J, et al. Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 22.
- [8] Liu N, Bezprozvannaya S, Williams A H, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart [J]. *Genes Dev* 2008, 22(23): 3242-54.
- [9] Matkovich S J, Wang W, Tu Y, et al. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts [J]. *Circ Res* 2010, 106(1): 166-75.
- [10] Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction [J]. *Cardiology* 2010, 115(3): 163-9.
- [11] Cherng S H, Huang C Y, Kuo W W, et al. GABA tea prevents cardiac fibrosis by attenuating TNF- α and Fas/FasL-mediated apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Food Chem Toxicol* 2014, 65: 90-6.
- [12] McIlwain D R, Berger T, Mak T W. Caspase functions in cell death and disease [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(4): a008656.
- [13] Su B C, Mo F E. CCN1 enables Fas ligand-induced apoptosis in cardiomyoblast H9c2 cells by disrupting caspase inhibitor XIAP [J]. *Cell Signal* 2014, 26(6): 1326-34.

Effects of microRNA-133b-5p on cell apoptosis by targeting Fas gene in myocardial H9c2 cells

Cheng Jie, He Shufang, Han Zhengyi, et al

(Dept of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effects of miR-133b-5p on cell apoptosis in H9c2 cells and the mechanisms of which targeting Fas gene. **Methods** H9c2 cells in logarithmic phase were divided into the CON group, the miR-133b-5p inhibitor group, and the miR inhibitor-NC group. The cells in different groups were collected after 48 h transfection to examine miR-133b-5p level by qRT-PCR. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium was measured by colorimetric kit. Cell apoptosis was determined by flow cytometry after Annexin V/PI double staining. Dual luciferase reporter assay was performed to confirm the direct regulation of miR-133b-5p on the 3'UTR of target gene Fas. Finally, the levels of Fas mRNA and protein were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. **Results** The level of miR-133b-5p in miR-133b-5p inhibitor group was reduced to 33% as compared with the CON group ($P < 0.05$). Inhibition of miR-133b-5p led to elevated LDH activity and increased apoptosis rate as compared with the CON group or miR inhibitor-NC group ($P < 0.05$). Dual luciferase reporter assay results confirmed that Fas was a target gene of miR-133b-5p. In addition, miR-133b-5p inhibitor obviously up-regulated the levels of Fas mRNA and Fas protein ($P < 0.05$). **Conclusion** The chemically synthesized miR-133b-5p inhibitor could effectively inhibit miR-133b-5p expression in H9c2 cells, leading to cell injury and apoptosis, and its mechanism might involve the regulation on Fas expression.

Key words myocytes, cardiac; microRNAs; lactate dehydrogenase; apoptosis; Fas