

miR-30a 抑制 Ang2 诱导的大鼠心肌细胞系 H9c2 自噬

于甜乐¹, 马 晗², 吴新华^{3,4,5}, 陈章荣^{3,4,5}, 孙 彪¹, 彭 媛¹, 刘 宏^{3,4,5*}

(1. 大理大学 临床医学院, 云南 大理 671000; 2. 云南省滇东北区域医疗中心 呼吸内科, 云南 昭通 657000;
3. 大理大学第一附属医院 心血管内科, 云南 大理 671000; 4. 云南省跨高原心血管疾病防治工程研究中心,
云南 大理 671000; 5. 大理大学 跨高原心血管疾病防治研究所, 云南 大理 671000)

摘要:目的 探索 miR-30a 对血管紧张素 2(Ang2) 诱导的大鼠心肌细胞自噬的影响。方法 1) 将 H9c2 细胞分为对照组(control)、Ang2 处理组(Ang2 2×10^{-6} mol/L)、去甲肾上腺素阳性对照组(NE 5×10^{-6} mol/L)。处理细胞 48 h, RT-qPCR 检测 miR-30a 表达; Western blot 检测 LC3、Beclin-1 自噬蛋白表达。2) 将 miR-30a mimics、miR-30a inhibitor、miR-30a NC 通过 Lipofectamine 2000 转染至 H9c2 细胞中培养 24 h, 荧光显微镜检测转染率; 转染成功后在 Ang2 刺激基础上设立 Ang2+miR-30a mimics 组、Ang2+miR-30a inhibitor 组、Ang2+miR-NC 组。检测 miR-30a 干预对 Ang2 诱导 H9c2 心肌细胞自噬的影响。结果 1) 与对照组相比, Ang2 处理组、NE 阳性对照组 miR-30a mRNA 表达显著下调($P < 0.05$); 而 LC3、Beclin-1 蛋白表达显著升高($P < 0.001$); 2) 与 Ang2 处理组相比, Ang2+miR-30a mimics 组 LC3、Beclin1 蛋白表达显著降低($P < 0.001$)。结论 Ang2 能下调 miR-30a 表达, 诱导 H9c2 心肌细胞自噬; miR-30a mimics 能够抑制 Ang2 诱导的 H9c2 心肌细胞自噬。

关键词: 自噬; 血管紧张素 2(Ang2); miR-30a

中图分类号: R54 文献标志码: A

miR-30a inhibits autophagy of rat cardiomyocyte line H9c2 induced by angiotensin 2

YU Tian-le¹, MA Han², WU Xin-hua^{3,4,5}, CHEN Zhang-rong^{3,4,5}, SUN Biao¹, PENG Yuan¹, LIU Hong^{3,4,5*}

(1. Clinical Medical College, Dali University, Dali 671000; 2. Department of Respiratory Medicine, Northeast Yunnan Regional Medical Center, Zhaotong 657000; 3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Dali University, Dali 671000;
4. Yunnan Research Center for Prevention and Treatment of Trans-plateau Cardiovascular Disease, Dali 671000;
5. Institute of Trans-plateau Cardiovascular Disease Prevention and Treatment, Dali University, Dali 671000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of miR-30a on autophagy of rat cardiomyocytes induced by angiotensin 2 (Ang2). **Methods** 1) H9c2 cells were treated with Ang2 2×10^{-6} mol/L and NE 5×10^{-6} mol/L respectively for 48 h, miR-30a expression was measured by RT-qPCR, LC3 and Beclin-1 protein expression were detected by Western blot. 2) miR-30a mimics, miR-30a inhibitor and miR-30a NC were transfected into H9c2 cells by Lipofectamine2000 and incubated for 24 h, the transfection efficiency was detected by fluorescence microscope. RT-qPCR and Western blot were applied to detect the effect of miR-30a on autophagy of H9c2 induced by angiotensin 2.

收稿日期: 2020-09-18 修回日期: 2020-12-31

基金项目: 国家自然科学基金(81760085)

* 通信作者 (corresponding author): dalilihong@163.com

Results 1) Comparing with the control group, the expression of miR-30a mRNA in Ang2 treatment group and NE group was significantly decreased ($P < 0.05$). Protein expression of LC3 and Beclin-1 in Ang2 group and NE group was significantly increased ($P < 0.001$). 2) Comparing with Ang2 treatment group, the expression of LC3 and Beclin-1 protein in Ang2+ miR-30a mimics group significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusions** Ang2 reduces the expression of miR-30a and induces H9c2 cardiomyocyte autophagy, miR-30a mimics can inhibit Ang2 induced H9c2 autophagy.

Key words: autophagy; angiotensin 2 (Ang2); miR-30a

血管紧张素 2 (angiotensin2, Ang2) 是肾素-血管紧张素系统的主要活性肽,在体内过量表达给心血管系统带来了不利影响。多项研究^[1-2]表明,Ang2 诱导的心血管疾病过程中有自噬的参与。细胞自噬本质上是指细胞内异常的细胞器、折叠错误的蛋白质被溶酶体降解为氨基酸等小分子物质并再次利用的过程,是细胞的自我更新和修复的过程。当细胞遭受到饥饿、缺氧、代谢异常等胞内外刺激后,细胞发生自噬,在一定程度上维持细胞内动态平衡,是一种经典的维持细胞生存的机制^[3]。自噬的调节与心脏疾病密切相关,参与了包括心肌病、心脏肥大、缺血性心脏病、心力衰竭以及缺血-再灌注损伤等过程。心肌正常运转依赖于基础水平的细胞自噬,但过度自噬会使心肌细胞死亡,加快心血管疾病的发生发展过程^[4]。miRNA 是内源性 (<22 个核苷酸组成)单链非编码 RNA,与目标 mRNA 碱基互补配对影响 mRNA 的稳定性和翻译,参与心肌细胞中多种病理生理过程,对心血管疾病的启动和进展有重要的影响^[5]。miR-30a 表达与自噬相关,且负向调控自噬^[6]。miR-30 家族可通过自噬参与心血管疾病相关的心室重构,体外研究发现 miR-30a 通过下调 Beclin-1 的表达来抑制细胞自噬^[7]。本研究在细胞水平上探讨 miR-30a 对 Ang2 诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠心肌细胞系 H9c2 (上海中国科学院细胞库);胎牛血清、Opti-MEM 培养基和 DMEM/高糖培养基 (Gibco 公司);反转录试剂盒和 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司);引物、RT 试剂和荧光定量 PCR 试剂 (Western Biotechnology 公司);血管紧张素 2 (Sigma-Aldrich 公司);LC3 (兔来源)一抗、Beclin-1

(兔来源)一抗和 GAPDH (兔来源)一抗 (Abcam 公司);山羊抗兔 IgG 二抗和山羊抗鼠 IgG 二抗 (Sigma-Aldrich 公司);羧基荧光素 (FAM) 标记的 miR-30a mimics 和 miR-30a inhibitor (上海吉玛公司);Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分组及处理:将 H9c2 细胞转移至培养皿中,待细胞汇合度达 80%时,进行实验。将细胞分为对照组、Ang2 (2×10^{-6} mol/L 的 Ang2 配制液)组、NE (5×10^{-6} mol/L 的 NE 配制液)阳性对照组、Ang2+miR-30a mimics 组、Ang2+miR-30a inhibitor 组、Ang2+miR-NC 组。Ang2 和 NE 组均处理 48 h, miR-30a mimic、miR-30a inhibitor 和 miR-NC 先转染到细胞中,将 H9c2 细胞接种至孔板中,把 Lipofectamine 2000 稀释液和 siRNA 稀释液轻柔混匀,室温下孵育 20 min 形成 siRNA-Lipofectamine 2000 混合物,将混合物加入各孔中后放入 37 °C 培养箱中转染 6 h,更换完全培养基,培养 24 h,转染成功后予 2×10^{-6} mol/L 的 Ang2 处理 48 h。拍照并收集样本。

1.2.2 RT-qPCR 检测 miR-30a mRNA 表达:通过 GeneBank 基因数据库,查询 miR-30a mRNA 基因编号并用 primer 5.0 软件及 Oligo7.0 软件设计相关的引物进行合成,生成引物设计序列;抽提总 RNA;采用 Bio Rad 凝胶成像系统曝光采集图片观察条带;测量总 RNA 浓度及纯度, $A_{260/280}$ 在 1.8~2.0 提示纯度良好,可用于后续实验, $A_{260/230} > 1$ 表明胍类、酚类等残留较少;U6 设置为 microRNA 的内参。qPCR 反应体系配制:预混液 ($2 \times$) 5 μ L、正向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、DNA 模板去核酸酶水 1 μ L、去 RNA 酶水加至 10 μ L,将 qPCR 反应液移入 96 孔 PCR 反应板中,加入获得的 cDNA 模板,进行 qPCR 反应,熔解曲线反应条件:95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。

1.2.3 Western blot 检测自噬相关 LC3、Beclin-1 蛋白表达:加入细胞裂解液收集细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。配制 10% SDS-PAGE 分离胶分离蛋白,电泳 1.5 h 后进行转膜,转膜结束后用 1×TBST 洗膜 1 min,加入 5% 脱脂牛奶封闭液,于摇床上常温平缓摇动 2 h。倒掉封闭液,1×TBST 洗膜 5 min×3 次,分别加入预先稀释好的一抗、二抗(1:1 000 稀释),于摇床上孵育抗体。设置曝光参数,进行图片采集。

1.3 统计学分析

实验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 GraphPad Prism7 软件制图,SPSS 21.0 软件进行统计学分析,两组间比较使用 *t* 检验,多组间比较使用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 各组 H9c2 细胞中 miR-30a mRNA 的表达

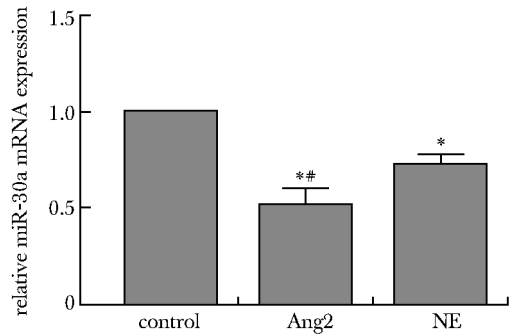
与对照组相比,Ang2 组和 NE 组 miR-30a mRNA 表达明显降低($P<0.05$);与 NE 组相比,Ang2 组 miR-30a mRNA 表达明显降低($P<0.05$) (图 1)。

2.2 各组 H9c2 细胞中自噬蛋白的表达

与对照组相比,NE 组和 Ang2 组 LC3、Beclin-1 自噬蛋白表达显著升高($P<0.001$);与 NE 组相比,Ang2 组 LC3、Beclin-1 自噬蛋白表达显著升高($P<0.001$) (图 2)。

2.3 miR-30a 对 Ang2 引起的心肌细胞自噬的影响

使用末端由 FAM 荧光标记的 miR-30a mimics 和 miR-30a inhibitor 转染 24 h 后用荧光显微镜(激



* $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with NE group

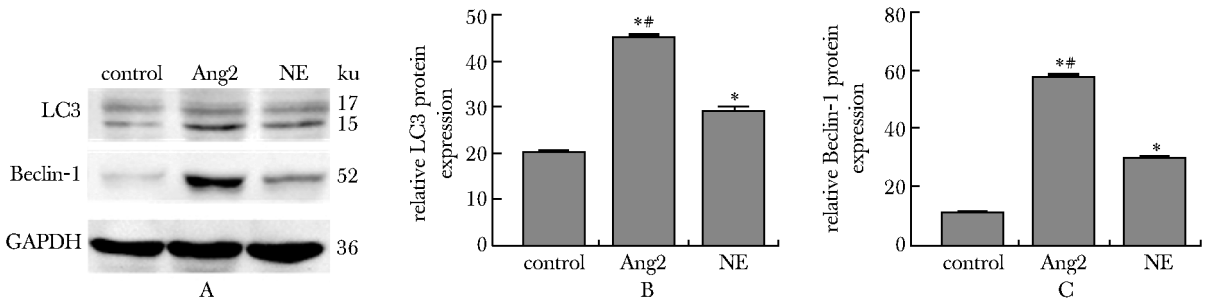
图 1 各组 H9c2 细胞 miR-30a mRNA 的表达水平
Fig 1 Comparison of miR-30a mRNA expression in H9c2 cells of each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

发波长 480 nm,发射波长 520 nm)检测转染效率,随机选取心肌细胞转染照片,根据细胞计数,其转染率平均值>70%,说明细胞被 miR-30a mimics 和 miR-30a inhibitor 有效转染(图 3,4)。

细胞经转染处理后使用 Ang2 刺激,Western blot 检测 LC3、Beclin-1 蛋白表达。相比 Ang2 组,Ang2+miR-30a mimics 组 LC3、Beclin-1 蛋白表达均显著降低($P<0.05$) (图 5)。

3 讨论

Ang2 与多种心血管疾病密切相关,心脏衰竭过程的 Ang2 过表达是心室重塑的重要影响因素。ACEI、ARB 是以 Ang2 为作用靶点的药物,能够明确改善心室重塑、降低心血管疾病死亡率^[8],因此,深入探讨 Ang2 与心血管疾病的内在机制,对寻求有效



A. the protein expressions of LC3, Beclin-1 was detected by Western blot; B, C. the protein expression of LC3, Beclin-1 was compared in each groups; * $P<0.001$ compared with control group; # $P<0.001$ compared with NE group

图 2 各组 H9c2 细胞中自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 表达水平

Fig 2 Expression of autophagy related proteins LC3 and Beclin-1 in H9c2 cells of each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

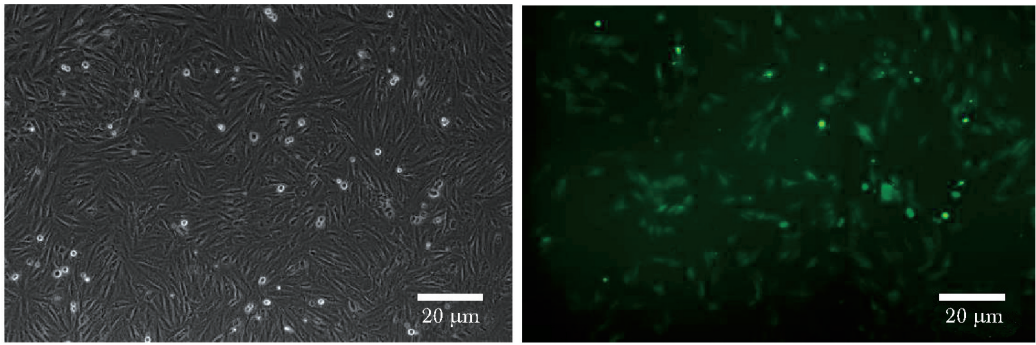


图 3 miR-30a mimics 转染组图片

Fig 3 Images of miR-30a mimics transfection

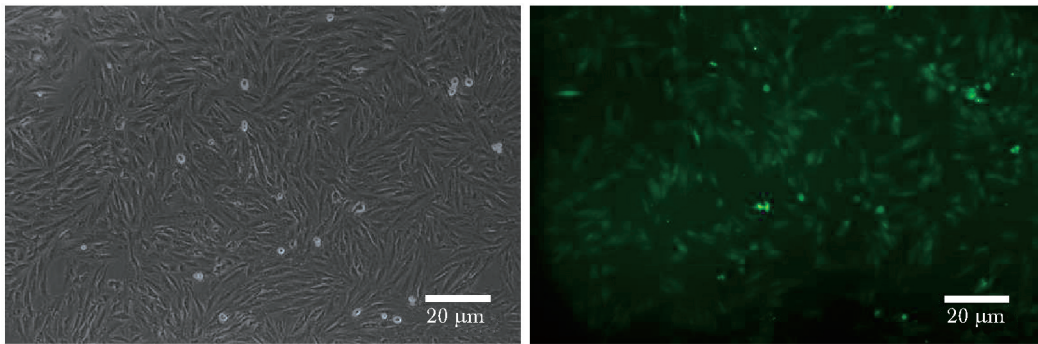
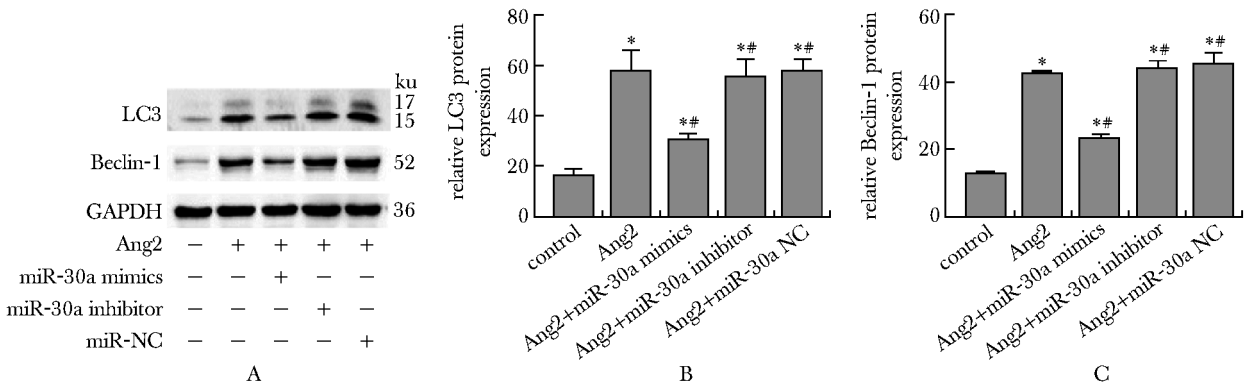


图 4 miR-30a inhibitor 转染组图片

Fig 4 Images of miR-30a inhibitor transfection



A. the protein expressions of LC3, Beclin-1 was detected by Western blot; B, C. the protein expression of LC3, Beclin-1 was compared in each groups; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with Ang2 group

图 5 不同处理组细胞自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 蛋白表达水平

Fig 5 The proteins expression of LC3 and Beclin-1 in different treated group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的药物靶点有重要意义,有研究表明 Ang2 可能通过诱导心肌细胞自噬参与心血管疾病的发生发展^[9]。本研究在体外培养大鼠 H9c2 心肌细胞,采用 2×10^{-6} mol/L 的 Ang2 诱导 H9c2 细胞自噬,设立去肾上腺素阳性对照组,Western blot 检测自噬蛋白 LC3、Beclin-1 表达水平来判断细胞自噬状态,结果显

示特定浓度 Ang2 能够引起心肌细胞自噬,本部分结果与 Ang2 相关的心肌细胞自噬结果一致,既往研究显示心肌细胞过度自噬可能加重细胞肥大、纤维化等,是心脏衰竭发病过程中的重要机制,人参皂苷能够通过 AMPK/mTOR/PI3K 途径抑制 Ang2 引起的心肌细胞自噬^[10],单硝酸异山梨酯、白介素 10 也能够抑

制 Ang2 诱导的慢性心衰中的心肌细胞自噬过程^[11]。

有报道^[12]表明 Ang2 处理新生大鼠心肌细胞 48 h 后细胞中 LC3 自噬蛋白明显增加,且 miR-30a 参与细胞自噬过程^[13]。本研究通过 RT-qPCR 检测发现 Ang2 组 miR-30a 基因表达水平较正常组明显下降,并进一步猜测 miR-30a 可能参与了 Ang2 诱导的细胞自噬。为了证实 miR-30a 能够影响 Ang2 诱导的 H9c2 细胞自噬,使用 miR-30a mimics、miR-30a inhibitor、miR-30a NC 转染心肌细胞,发现过表达 miR-30a 能够抑制 Ang2 诱导的 H9c2 细胞自噬。在此过程中,进一步抑制 miR-30a,未能进一步增加心肌细胞自噬。既往研究^[14-15]已证实 miR-30a 的靶基因是 Beclin-1,可以靶向

Beclin-1 调控 LC3 的表达,影响大鼠心肌细胞缺血再灌注诱导的自噬,从而影响心肌细胞的存活和凋亡。实验中 Ang2 已经明确抑制了 miR-30a 表达,使用 miR-30a inhibitor 未能进一步影响自噬。

综上所述,本研究证实了 Ang2 能成功诱导 H9c2 心肌细胞自噬,在此过程中 miR-30a 表达降低,miR-30a mimics 能够抑制 Ang2 诱导的细胞自噬。当然,Ang2 诱导的细胞自噬涉及多条通路、多个靶点,本研究只探讨了 miR-30a 这一调控因子,因此完整的 Ang2 相关的自噬通路机制仍需进一步探讨;且 miR-30a 在 Ang2 诱导的心血管疾病中可能发挥重要作用,能够成为新的潜在治疗靶点。

参考文献:

- [1] Agbo E, Li MX, Wang YQ, *et al.* Hexarelin protects cardiac H9C2 cells from angiotensin II-induced hypertrophy via the regulation of autophagy[J]. *Pharmacazie*, 2019, 74: 485-491.
- [2] Dai DF, Johnson SC, Villarin JJ, *et al.* Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure[J]. *Circ Res*, 2011, 108: 837-846.
- [3] Ren J, Sowers JR, Zhang Y. Metabolic stress, autophagy, and cardiovascular aging: from pathophysiology to Therapeutics[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29: 699-711.
- [4] Gatica D, Chiong M, Lavandero S, *et al.* Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system[J]. *Circ Res*, 2015, 116: 456-467.
- [5] Lock MC, Tellam RL, Botting KJ, *et al.* The role of miRNA regulation in fetal cardiomyocytes, cardiac maturation and the risk of heart disease in adults[J]. *Physiol*, 2018, 596: 5625-5640.
- [6] Li C, Yang L, Wu H, *et al.* Paeonol inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced vascular endothelial cells autophagy by upregulating the expression of miRNA-30a[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 95. doi: 10.3389/fphar.2018.00095.
- [7] Zhang X, Dong S, Jia Q, *et al.* The microRNA in ventricular remodeling: the miR-30 family[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39. doi: 10.1042/BSR20190788.
- [8] Li XC, Zhang J, Zhuo JL. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 125: 21-38.
- [9] Wang L, Ye N, Lian X, *et al.* miR-208a-3p aggravates autophagy through the PDCD4-ATG5 pathway in Ang II-induced H9c2 cardiomyoblasts[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 1-8.
- [10] Mao N, Tan RZ, Wang SQ, *et al.* Ginsenoside Rg1 inhibits angiotensin II-induced podocyte autophagy via AMPK/mTOR/PI3K pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40: 917-925.
- [11] Kishore R, Krishnamurthy P, Garikipati VN, *et al.* Interleukin-10 inhibits chronic angiotensin II-induced pathological autophagy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89: 203-213.
- [12] Li J, Li Y, Zhang Y, *et al.* The inhibitory effect of wexinKeli on H9C2 cardiomyocytes hypertrophy induced by angiotensin II through regulating autophagy activity[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 7042872. doi: 10.1155/2017/7042872.
- [13] Zhu H, Wu H, Liu X, *et al.* Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells[J]. *Autophagy*, 2009, 5: 816-823.
- [14] Wang P, Liang J, Li Y, *et al.* Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39: 1279-1291.
- [15] Guo D, Ma J, Yan L, *et al.* Down-regulation of lncrna MALAT1 attenuates neuronal cell death through suppressing beclin1-dependent autophagy by regulating mir-30a in cerebral ischemic stroke[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43: 182-194.