

miR-29c 过表达对 P19 细胞增殖、凋亡和分化的影响

陈 焘, 陈 斌, 刘 鸿, 黄 琼, 王晓伟*, 顾海涛*

南京医科大学第一附属医院心胸外科, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**探讨 microRNA-29c(miR-29c)过表达对 P19 细胞增殖、凋亡和分化的影响及机制。**方法:**体外传代培养 P19 细胞,利用细胞转染技术构建 miR-29c 过表达细胞(mimic 组)。CCK-8 试剂盒检测细胞增殖,流式细胞技术检测细胞周期;Hoechst 染色结合流式细胞技术检测细胞凋亡情况,定量 PCR 和蛋白质免疫印迹(Western blot)检测凋亡相关因子 Bax/Bcl-2 表达情况;二甲亚砜(DMSO)诱导 P19 细胞分化,定量 PCR 检测心肌特异性标志基因肌球蛋白重链(α -myosin heavy chain, α MHC),转录因子 GATA4 和心肌增强因子 2c(myocyte enhancer factor 2c, Mef2c)表达情况,明确 miR-29c 过表达对 P19 细胞分化的影响;生物信息学分析结合荧光素酶报告实验和 Western blot 明确 miR-29c 的靶基因。**结果:**与对照组相比,miR-29c 过表达组细胞增殖速率较慢,细胞周期 S 期比例降低;miR-29c 过表达组细胞凋亡率增高,Bax 表达水平增高,而 Bcl-2 表达无明显差异;P19 细胞分化第 6 天和第 8 天 miR-29c 过表达组 α MHC、GATA4 和 Mef2c 的表达水平显著高于对照组;Akt3 被证实为 miR-29c 的靶基因。**结论:**miR-29c 过表达可能是通过调控 Akt3 来抑制 P19 细胞增殖、促进 P19 细胞的凋亡和分化。

[关键词] miR-29c;P19 细胞;增殖;凋亡;分化

[中图分类号] Q522

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)04-446-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20180405

Effect of miR-29c overexpression on the proliferation, apoptosis and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells

Chen Tao, Chen Bin, Liu Hong, Huang Qiong, Wang Xiaowei*, Gu Haitao*

Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of miR-29c overexpression on P19 cell proliferation, apoptosis and differentiation. **Methods:** P19 cells were cultured and transfected with miR-29c mimics. Proliferation was examined with CCK-8 kit and cell cycle was examined with flow cytometry. Apoptosis rate was checked with Hoechst staining and flow cytometry. The mRNA and protein expression of Bax/Bcl-2 was tested with qPCR and Western blot. P19 cells were induced to differentiate with DMSO and the mRNA expression level of α MHC, GATA4, Mef2c was checked with methods of qPCR. We used bioinformatic analysis, luciferase assays and Western blot to find target gene of miR-29c. **Results:** Compared with the control group, cells in the miR-29c overexpression group showed a lower proliferation rate and lower S cycle percentage. Apoptosis rate of the miR-29c overexpression group was higher than that of the control group. Expression of Bax of the miR-29c overexpression group was significantly higher than that of the control group, while there was no difference seen in Bcl-2 expression. About The mRNA expression level of α MHC, GATA4, Mef2c, the miR-29c overexpression group was significantly higher than those of the control group at day 6 and day 8. Akt3 was proved to be a target gene of miR-29c. **Conclusion:** Overexpression of miR-29c can inhibits proliferation and promotes apoptosis and differentiation in P19 embryonal carcinoma cells with Akt3.

[Key words] miR-29c;P19 embryonal carcinoma cell;proliferation;apoptosis;differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(04):446-452]

[基金项目] 国家自然科学基金(81573234);江苏省妇幼健康科研项目(F201509)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangxiaowei@njmu.edu.cn; guhaitao65@163.com

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)是最常见的先天性缺陷,在新生儿中发病率约为 0.8%~1.0%^[1],如不经治疗,30%在新生儿期死亡^[2],其防治工作对于实现优生优育至关重要。心脏是胚胎

发育期最早形成并发挥功能的器官,其发育过程在众多基因信号的精确调控下,任何一个微小的调控失误,都会导致CHD的发生。本研究从胚胎基因水平对CHD的可能相关因素进行探索,有助于进一步阐明CHD的发生机制,为临床预防和治疗CHD提供思路和策略。

microRNA(miRNA)是一类长度约22个核苷酸的非编码单链RNA,在细胞内具有重要的调节作用^[3]。近年来,miRNA在心脏发育调节中的作用越来越受到重视^[4-6]。miRNA-29c(miR-29c)是本课题组前期从CHD胎儿母血中筛选得到的,其血清表达水平明显高于正常胎儿的母血^[7],提示miR-29c可能与CHD的发生发展密切相关。然而,目前对于miR-29c的研究主要在肿瘤领域,心脏发育方面尚罕见报道。

本研究通过P19细胞这一研究胚胎心脏发育的经典细胞模型,利用细胞转染技术,研究miR-29c过表达对P19细胞功能的影响及其可能机制,从而探索其对心脏发育的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用P19细胞株、293T细胞株(ATCC,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国); α MEM(Hyclone公司,美国);TRIzol(Invitrogen公司,美国);SYBR Green聚合酶链反应试剂盒、逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本);氯仿HPLC级、异丙醇HPLC级、无水乙醇AR级(上海国药集团化学试剂有限公司);miR-29c mimic及阴性对照(广州锐博公司);Lipofectamine 3000(Invitrogen公司,美国);DEPC水、BCA蛋白测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、胰酶(杭州碧云天);全蛋白提取试剂盒(南京凯基);Cell Counting Kit-8(Dojindo公司,日本);荧光素酶活性检测试剂盒(Premega公司,美国);荧光素酶质粒设计(广州锐博公司);引物(南京锐真);一抗(Abcam公司,英国);二抗(安徽Biosharp公司)。

1.2 方法

1.2.1 miR-29c过表达细胞株的建立

P19细胞 2×10^5 个/孔铺于6孔板内,在含有100 g/L胎牛血清的 α MEM完全培养基中于37℃、5% CO₂培养箱孵育24 h,待其贴壁生长。将125 μ L opti-MEM与5 μ L Lipofectamine 3000轻轻混匀,125 μ L opti-MEM与10 μ L miR-29c mimic混匀,再将两者混合后室温静置30 min,加入6孔板使细胞过表达miR-29c。

1.2.2 miR-29c过表达对P19细胞增殖的影响

将P19细胞以1 000个/孔接种于96孔板,每孔添加完全培养基至100 μ L,于37℃、5% CO₂培养箱孵育24 h,待其贴壁生长。设置miR-29c过表达组和对照组,每组3个复孔。过表达组转染miR-29c mimic,对照组转染negative control(miR-NC)。确定检测时间点(转染后24、48、72、96 h),严格按照设定时间进行细胞活性检测。检测时,每孔加入10 μ L CCK-8溶液充分混匀。继续孵育2 h,用酶标仪检测细胞在450 nm处的吸光度,绘制P19细胞增殖曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期

P19细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板,24 h后转染,孵育48 h并观察细胞生长状态。将细胞用胰酶消化,PBS清洗2遍,最后1遍不全倒完,余量PBS混匀,加入1 mL 75%的酒精,放入-20℃冰箱过夜。第2天重悬,PBS清洗2遍,加入染色剂300 μ L,避光孵育20 min后,用流式细胞仪检测各分裂时相细胞所占百分比。

1.2.4 miR-29c过表达对P19细胞凋亡的影响

Hoechst染色:P19细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板,24 h后转染,待其汇合度达50%~60%时,用不含血清的培养基饥饿诱导细胞凋亡。48 h后,吸净培养液,每孔加入0.5 mL多聚甲醛固定10 min。去掉多聚甲醛,PBS洗2遍,加入0.5 mL Hoechst染色液,室温孵育5 min。PBS洗涤后,荧光显微镜下观察蓝色的细胞核。

流式细胞术测定凋亡率:P19细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板,24 h后转染,再孵育48 h。收集细胞,4℃ 1 500 r/min,离心5 min。用预冷的PBS洗涤2遍,将细胞重悬于200 μ L 1 \times Buffer中,加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI,另设空白样品,不加染色剂。室温避光孵育10 min后,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

定量PCR检测Bax/Bcl-2基因表达情况:采用TRIzol抽提细胞RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度和纯度,抽提合格的mRNA反转录成cDNA。以cDNA为模板,应用ABI 7500型定量PCR仪,通过SYBR Green I嵌合法进行定量检测。以GAPDH作为内参照,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行计算,每个样本设3个复孔,重复3次。GAPDH引物:上游5'-AACTT-TGGCATTGTGGAAGG-3',下游5'-CACATTGGGGG-TAGGAACAC-3';Bax引物:上游5'-AGACAGGGG-CCTTTTGTCTAC-3',下游5'-AATTCGCCGAGACACTCG-3';Bcl-2引物:上游5'-ATGCCTTTGTG-

GAACTATATGGC-3', 下游 5'-GGTATGCACCCAG-AGTGA TGC-3'。

Western blot 检测 Bax/Bcl-2 蛋白表达情况: 蛋白定量试剂盒(BCA)法测定各组蛋白水平, 计算上样量。进行 100 g/L 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 100 V 恒压电泳, 随后转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 250 mA, 1 h, 用 50 g/L 脱脂奶粉缓冲封闭液室温封闭 2 h, 分别加入以下一抗 4 °C 孵育过夜: β -actin(1:2 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000), TBST 洗膜 3 次各 10 min, 加二抗(1:2 500)室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次各 10 min, 化学发光显色, 实验重复 3 次。

1.2.5 miR-29c 过表达对 P19 细胞分化的影响

P19 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 24 h 后转染, 孵育 48 h。用胰酶消化细胞, 配制细胞悬液, 按照 1×10^5 个/mL 密度接种于 10 cm 细菌培养皿中, 加入 15 mL 含 1% DMSO 的诱导培养基, 轻轻吹打, 显微镜下观察细胞, 保证细胞分布均匀, 置于培养箱中孵育, 记为诱导分化第 1 天, 每日观察。诱导分化第 3 天半量换液。诱导分化第 4 天, 显微镜下可观察到 P19 细胞大量聚集成团, 形成胚胎样小体。取 6 孔板, 每孔加 2 mL 完全培养基, 用枪头小心吸取 30~40 个胚胎样小体, 移至 6 孔板中, 轻轻晃动使胚胎样小体分散, 放回培养箱继续孵育。每天观察, 每 2 d 换 1 次液。从诱导分化第 8 天开始, 在显微镜下逐渐观察到跳动的心肌细胞团, 每次观察不宜超过 10 min。分别收集诱导分化第 0、4、6、8 天细胞, 以 GAPDH 作为内参照, 用定量 PCR 法检测心肌标志基因 α MHC、Mef2c、GATA4 的表达。 α MHC: 上游 5'-ACCAACCTGTCCAAGTTCCG-3', 下游 5'-GTCTGCATCTTCTTGGCAC-3'; Mef2c: 上游 5'-TGTCAGCCATAACAGTTTGG-3', 下游 5'-CCCTGTGAACATGAAGTCCTCTT-3'; GATA4: 上游 5'-CCA-ACTGCCAGACTACCAC-3', 下游 5'-GGACCAGGCT-GTTCCAAGA-3'。

1.2.6 miR-29c 靶基因预测与生物信息学分析

综合运用 TargetScan Release 6.2 (<http://www.targetscan.org/>)、miRTarBase (<http://www.mirbase.org/>)、miRecords (<http://miRecords.umn.edu/miRecords>) 等常用 miRNA 在线数据库对 miR-29c 进行靶基因预测, 对所得靶基因进行基因功能注释(gene ontology, GO)和信号通路(pathway)分析, 通过明确其靶基因参与的生物学过程和信号通路, 初步推测 miR-29c 及其靶基因与心脏发育的相关性。

1.2.7 荧光素酶报告实验验证 Akt3 是 miR-29c 的靶基因

构建荧光素酶质粒系统: 使用 pGL3-basic 作为载体, 将 Akt3 3' 非编码区(UTR)插入到荧光素酶基因上游非编码区, 构建含 Akt3 基因 3'UTR 的荧光素酶载体 pGL3-Akt3 3'UTR-wt。点突变靶基因 Akt3 3'UTR 核心序列, 构建 pGL3-Akt3 3'UTR-mut。Akt3 wt 的 3'UTR 作用位点 TTCAGATTAACCCTTTGGTGCTA, Akt3 mut 的 3'UTR 突变位点 TTCAGATTAACCCTTACCACGAT(5'→3')。

质粒转染细胞: 293T 细胞按 1.5×10^4 个/孔的密度接种到 96 孔板。12 h 后将细胞分为 4 组, 分别共转染荧光素酶报告基因质粒和 miR-29c mimic 或 miR-NC, 每组设 3 个复孔。Akt3 wt+miR-NC 组: opti-MEM(20 μ L)、Lipofectamine 3000(0.4 μ L)、P3000 Reagent(0.2 μ L)、TK(0.1 μ L)、Akt3 wt DNA(100 ng)、miR-NC(0.5 μ L); Akt3 wt+miR-29c mimic 组: opti-MEM(20 μ L)、Lipofectamine 3000(0.4 μ L)、P3000 Reagent(0.2 μ L)、TK(0.1 μ L)、Akt3 wt DNA(100 ng)、miR-29c mimic(0.5 μ L); Akt3 mut+miR-NC 组: opti-MEM(20 μ L)、Lipofectamine 3000(0.4 μ L)、P3000 Reagent(0.2 μ L)、TK(0.1 μ L)、Akt3 mut DNA(100 ng)、miR-NC(0.5 μ L); Akt3 mut+miR-29c mimic 组: opti-MEM(20 μ L)、Lipofectamine 3000(0.4 μ L)、P3000 Reagent(0.2 μ L)、TK(0.1 μ L)、Akt3 mut DNA(100 ng)、miR-29c mimic(0.5 μ L); 常温孵育 30 min, 将上述混合液分别加入每组细胞样品中。

荧光素酶验证: 细胞培养 24 h 后, 用 PBS 清洗 2 遍, 每孔加入 30 μ L 裂解液(1 \times Passive Lysis Buffer), 室温震荡 30 min。加入 20 μ L Luciferase Assay Substrate 反应液, 测定读取荧光素酶活性。再加入 20 μ L Stop & Glo 反应液, 测定读取荧光素酶活性。

1.2.8 Western blot 在蛋白水平验证 Akt3 是 miR-29c 的靶基因

用 miR-29c mimic 转染 P19 细胞, 构建 miR-29c 过表达细胞株。BCA 法测定各组蛋白水平, 计算上样量。进行 100 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜后, 用 50 g/L 脱脂奶粉缓冲封闭液室温封闭 2 h, 分别加入以下一抗 4 °C 孵育过夜: β -actin(1:2 000)、Akt3(1:1 000), TBST 洗膜 3 次各 10 min, 加二抗(1:2 500)室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次各 10 min, 化学发光显色, 实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计学

分析,计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。成组设计的两样本均数之间的比较,选择独立样本 *t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8检测 miR-29c 过表达对P19细胞增殖的影响

从增殖曲线上可以看出,各时间点所测 OD 值的标准差很小,随着时间延长,miR-29c 过表达组和对照组细胞均呈指数增长,增长速率差异在培养 48 h 开始显现,在 72 h 差异最明显,往后差异逐渐缩小。在 72 h,miR-29c 过表达组的 OD 值显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 1)。

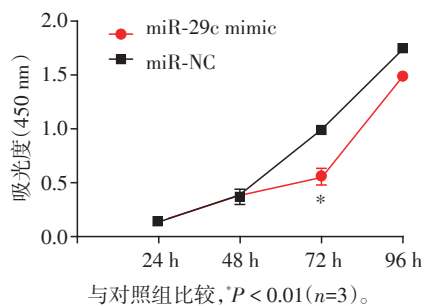


图1 miR-29c 过表达对P19细胞增殖的影响

Figure 1 The effect of overexpression of miR-29c on the proliferation of P19 cells

2.2 流式细胞仪检测细胞周期

初始接种的细胞在细胞周期分布上没有差别,但是经过 48 h,miR-29c 过表达组细胞中,处于 S 期的细胞比率明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

2.3 Hoechst 染色验证 miR-29c 过表达对 P19 细胞凋亡的影响

Hoechst 染色结果显示,miR-29c 过表达组内浓集而呈亮蓝色的细胞核明显多于对照组(图 3)。

2.4 流式细胞仪验证 miR-29c 过表达对 P19 细胞凋亡的影响

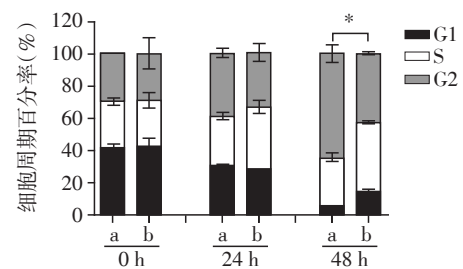
与对照组相比,miR-29c 过表达组发生早期凋亡和晚期凋亡的细胞比率明显高于对照组($P < 0.05$,图 4)。

2.5 定量 PCR 法检测 Bax/Bcl-2 基因表达情况

抑凋亡基因 Bcl-2 在两组间的表达没有明显差异,而促凋亡基因 Bax 在 miR-29c 过表达组中表达水平明显高于对照组($P < 0.05$,图 5)。

2.6 Western blot 检测 Bax/Bcl-2 蛋白表达情况

在蛋白表达水平,Bax 蛋白在 miR-29c 过表达组



a: miR-29c mimic; b: miR-NC; 两组比较, * $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 miR-29c 过表达对P19细胞周期的影响

Figure 2 The effect of overexpression of miR-29c on the cell cycle of P19

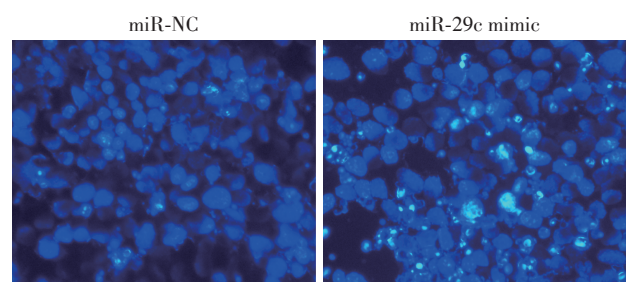


图3 Hoechst 染色评估P19细胞凋亡情况($\times 100$)

Figure 3 Evaluation of the apoptosis of P19 cells by Hoechst staining($\times 100$)

中的表达水平明显高于对照组,而 Bcl-2 蛋白在两组间的表达未见明显差异(图 6)。

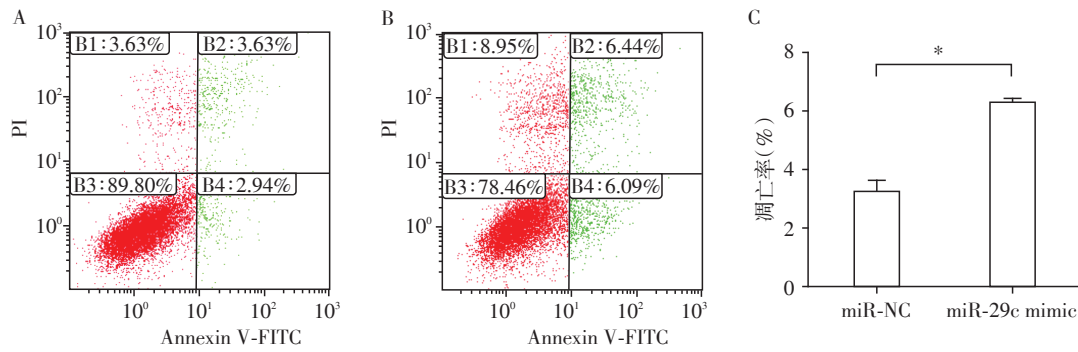
2.7 miR-29c 过表达对 P19 细胞分化的影响

与对照组相比,miR-29c 过表达组形成的胚胎样小体形态更加规则,不易解聚和破裂(图 7A、B)。胚胎样小体贴壁生长后,miR-29c 过表达组以胚胎样小体为中心均匀向四周辐散生长,而对照组细胞向外生长形态略紊乱,细胞厚薄不一(图 7C、D)。

除了形态学观察,本研究还收集了不同分化时间点的细胞进行分化相关标志物检测,主要是分化相关基因的表达水平,包括 α MHC、Mef2c、GATA4。结果显示,在 P19 细胞分化过程中,标志基因的表达水平随分化时间逐渐增高,在分化第 8 天出现高峰。横向比较,不同组间标志基因的表达呈现一定差异,分化第 4 天(GATA4)和第 6 天(α MHC、Mef2c) miR-29c 过表达组相关基因的表达水平显著高于对照组(图 8)。

2.8 荧光素酶报告实验验证 Akt3 是 miR-29c 的靶基因

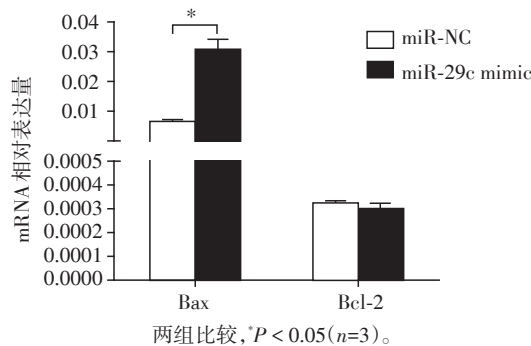
生物信息学分析结果提示 Akt3 可能是 miR-29c 的潜在靶基因。荧光素酶报告实验结果显示,共转染 miR-29c 和携带 Akt3 基因 3' UTR 序列的载体后,荧光素酶活性显著下降,而共转染 miR-29c 和突变



A:miR-NC组,B:miR-29c mimic组,C:两组凋亡率的比较(两组比较,* $P < 0.05, n=3$)。

图4 流式细胞计数检测P19凋亡情况

Figure 4 The apoptosis of P19 by flow cytometry



两组比较,* $P < 0.05(n=3)$ 。

图5 定量PCR法检测Bax/Bcl-2基因表达

Figure 5 qPCR detection of gene expression of Bax/Bcl-2

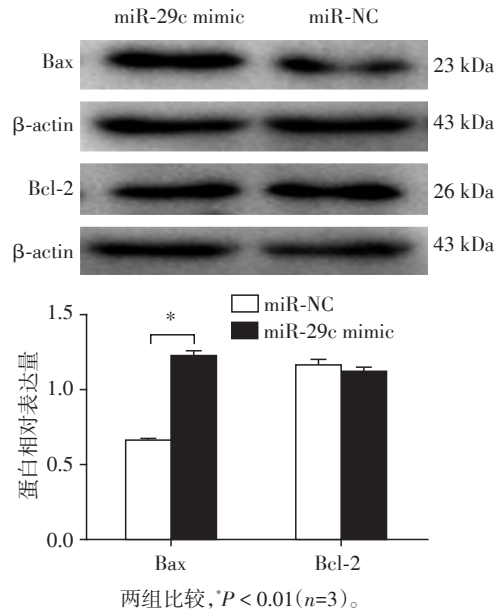
型载体后却未见明显的荧光素酶活性下降($P < 0.01$,图9)。

2.9 Western blot 在蛋白水平验证Akt3是miR-29c的靶基因

与对照组相比,miR-29c过表达组的Akt3蛋白表达水平明显降低(图10)。

3 讨论

CHD是最常见的出生缺陷,不仅出生时给患者和家庭带来负担,众多严重的并发症也给患者长大后的生活带来健康隐患^[8-9]。因此,对于CHD的防治刻不容缓。miRNA一直是近年来的研究热点,主

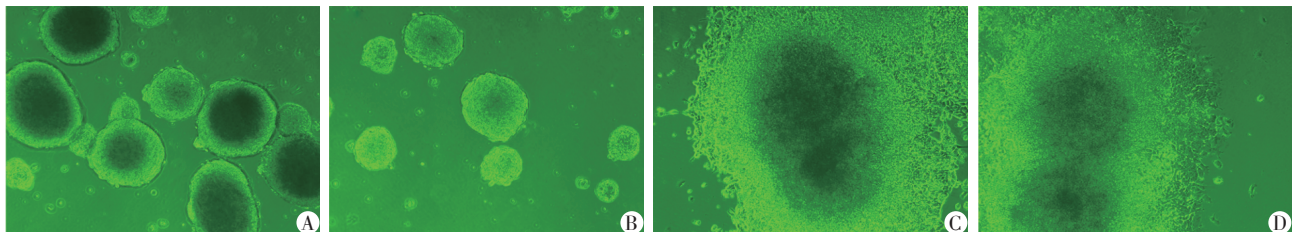


两组比较,* $P < 0.01(n=3)$ 。

图6 Western blot检测Bax/Bcl-2蛋白表达

Figure 6 Detection of Bax/Bcl-2 protein expression by Western blot

要在动植物体内参与转录后基因的表达调控,其在心脏发育过程中的调节作用成为众多学者的研究重点。本研究小组前期在怀有CHD胎儿的孕妇血清中发现miR-29c显著上调,因此利用细胞转染技术模拟体内miR-29c过表达的环境,对miR-29c在细胞



A,C: MIR-29C过表达组;B,D:对照组;A,B:诱导分化第4天形成的胚胎样小体;C,D:诱导分化第6天细胞贴壁生长的情况。

图7 显微镜下观察P19细胞分化过程中典型形态($\times 100$)

Figure 7 Typical morphology of P19 cell differentiation during the differentiation of P19 cells under microscope($\times 100$)

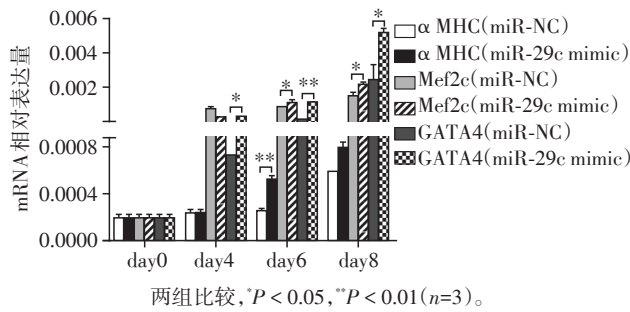


图8 定量PCR检测心肌标志物基因表达水平

Figure 8 qPCR detection of gene expression level of myocardial markers

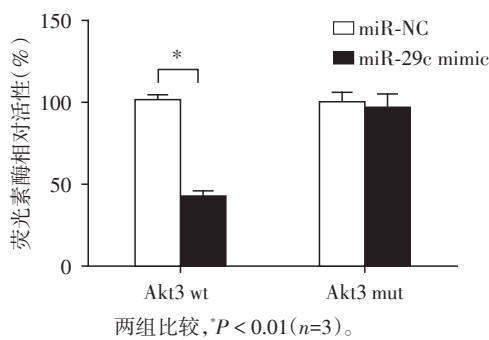


图9 荧光素酶报告实验验证靶基因

Figure 9 Verification of the target gene by Luciferase report test

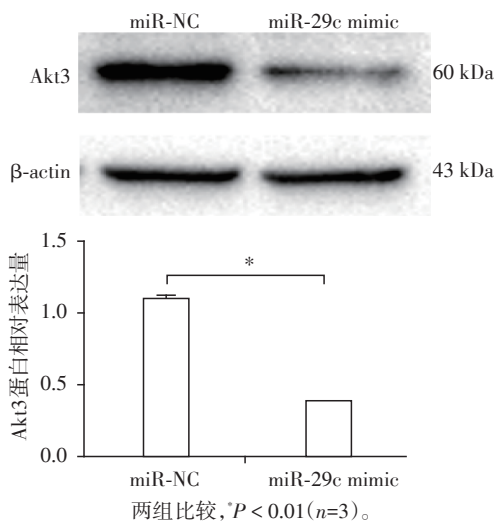


图10 Western blot检验Akt3蛋白表达水平

Figure 10 Akt3 protein expression level by Western blot

发挥功能中的作用展开研究。miRNA mimic是运用化学合成的方法,模拟生物体内源的miRNA,能增强内源性miRNA的功能^[10]。

从本实验所得的增殖曲线上可以看出,细胞生长状态稳定,复孔之间差异小,均一性好。在72 h, miR-29c过表达组的吸光度值显著低于对照组,说明miR-29c过表达能够抑制P19细胞的增殖。而往

后两组间差异逐渐缩小,可能与细胞生长过密产生接触抑制有关。

胚胎样小体的形成是P19细胞分化为心肌细胞过程中的关键步骤。在对P19细胞进行分化处理后发现,相对照组,miR-29c过表达组的胚胎样小体形态更规则,状态更稳定,从分化第4天开始,心肌标志基因的表达水平明显高于对照组。提示miR-29c过表达能够促进P19细胞向心肌细胞的分化。

无限增殖和万能分化性是胚胎癌性细胞的两大特征,增殖是细胞生长和维持一定密度的方式,而分化则是多能干细胞向其他不同组织转化的必要途径^[11]。依赖于稳定的增殖和准确的分化,P19癌胚细胞才能够成功转化为心肌细胞进而向心脏方向发育,两者缺一不可。本研究发现,miR-29c过表达可抑制P19细胞增殖和促进其向心肌细胞分化。这样导致胚胎心脏发育的低效和失衡,miR-29c过表达易诱发CHD的原因可能与此有关。

心脏在从胚胎发育成四心腔结构的过程中,经历了众多特定结构的产生与消失,其中细胞凋亡起到了至关重要的作用^[12]。细胞在饥饿诱导下会发生凋亡,用Hoechst着色后在荧光显微镜下发射出浓密的荧光,正常细胞的核形态呈圆形,淡蓝色,内有较深的蓝色颗粒,而凋亡细胞的核由于浓集而呈亮蓝色,呈分叶或碎片状边集。Hoechst染色结果显示,经饥饿诱导48 h后,miR-29c过表达组的凋亡细胞明显多于对照组。流式细胞技术的结果与此一致,在细胞生长48 h,miR-29c过表达组细胞的凋亡率明显高于对照组。这提示,miR-29c过表达能够促进P19细胞的凋亡。而细胞凋亡是受多种凋亡基因调控的,Bcl基因家族是调控细胞凋亡的众多基因之一^[13]。Bcl-2和Bax都是其中的成员,但作用却截然相反,Bcl-2抑制细胞凋亡而Bax促进细胞凋亡,两者与其他家族成员一起调控细胞凋亡的内在平衡^[14]。本研究发现,miR-29c过表达组细胞促凋亡基因Bax表达水平明显高于对照组,抑凋亡基因Bcl-2的表达则无明显差异,在mRNA和蛋白水平的表达具有较好的一致性。因此我们有理由推测,miR-29c对P19细胞的促凋亡作用可能与其促进Bax基因的表达有关。

心脏的生长发育极其复杂,受到Wnt/ β -catenin^[15-16]、Notch^[17-18]、PI3K/Akt^[19-20]等多个信号通路的共同调控。本研究通过荧光素酶和蛋白的验证,证明Akt3是miR-29c的1个靶基因,miR-29c过表达会下调Akt3的表达水平。关于Akt3对心脏发

育的影响,之前已有相关报道。Taniyama等^[21]研究发现,Akt3转基因小鼠表现出明显的心脏肥大,这表明Akt3在体内的功能之一就是促进心脏细胞生长。同时,在第4周时,其心脏生长的状态与代偿性肥大类似,而到第20周即表现出明显的病理性肥大。这提示,在心脏发育的不同阶段,Akt3信号所起的作用也不相同。在胚胎早期,Akt3信号有利于心脏的生长发育,而往后持续激活的Akt3信号则会对心脏产生不利影响。结合本研究结果,我们发现调控靶基因Akt3的表达水平,可能是miR-29c影响心脏发育的途径之一。

综上所述,本研究揭示了miR-29c过表达能够抑制P19细胞增殖、促进其凋亡及向心肌细胞分化的作用,其机制可能涉及miR-29c对靶基因Akt3的调控。这为CHD的预防提供了新思路 and 实验依据,但由于心脏发育是多基因多通路共同调控作用的结果,miR-29c与Akt3发挥作用的具体机制以及参与其中相互作用的其他信号仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Suradi HS. Adult congenital interventions in heart failure [J]. *Interv Cardiol Clin*, 2017, 6(3): 427-443
- [2] 艾陈晨,贾兵. 新生儿危重先天性心脏病的早期干预 [J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2016, 32(2): 76-79
- [3] Chien PS, Chiang CB, Wang ZR, et al. MicroRNA-mediated signaling and regulation of nutrient transport and utilization [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2017, 39: 73-79
- [4] De Lucia C, Komici K, Borghetti G, et al. microRNA in cardiovascular aging and age-related cardiovascular diseases [J]. *Front Med*, 2017, 4: 74
- [5] Stanley-Hasnain S, Hauck L, Grothe D, et al. Control of cardiomyocyte proliferation through p53/Mdm2-regulated microRNAs [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2016, 35(4S): S183-S184
- [6] Zhou Y, Jia WK, Jian Z, et al. Downregulation of microRNA199a5p protects cardiomyocytes in cyanotic congenital heart disease by attenuating endoplasmic reticulum stress [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2992-3000
- [7] Zhu S, Cao L, Zhu J, et al. Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2013, 424: 66-72
- [8] Silvey M, Hall M, Bilynsky E. Increasing rates of thrombosis in children with congenital heart disease undergoing cardiac surgery [J]. *Thromb Res*, 2017, 162: 15-21
- [9] Poryo M, Paes LA, Pickardt T. Somatic development in children with congenital heart defects [J]. *J Pediatr*, 2018, 192: 136-143
- [10] Chu D, Zhao Z, Li Y, et al. Increased microRNA-630 expression in gastric cancer is associated with poor overall survival [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90526
- [11] Rijlaarsdam MA, Looijenga LH. An oncofetal and developmental perspective on testicular germ cell cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 29: 59-74
- [12] Paraskevas G, Koutsouflianiotis K, Iliou K. The first descriptions of various anatomical structures and embryological remnants of the heart: A systematic overview [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 227: 674-690
- [13] Vitagliano O, Addeo R, D'angelo V, et al. The Bcl-2/Bax and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways: implications in pediatric leukemia pathogenesis and new prospects for therapeutic approaches [J]. *Expert Rev Hematol*, 2013, 6(5): 587-597
- [14] Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1378-1386
- [15] Jeong MH, Kim HJ, Pyun JH, et al. Cdon deficiency causes cardiac remodeling through hyperactivation of WNT/beta-catenin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(8): E1345-E1354
- [16] Ren MM, Wang T, Huang L, et al. Role of VR1 in the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes associated with Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Cardiovasc Ther*, 2016, 34(6): 482-488
- [17] Wu KH, Xiao QR, Yang Y, et al. MicroRNA-34a modulates the Notch signaling pathway in mice with congenital heart disease and its role in heart development [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 114: 300-308
- [18] Wu F, Yu B, Zhang X, et al. Cardioprotective effect of Notch signaling on the development of myocardial infarction complicated by diabetes mellitus [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4): 3447-3454
- [19] Ling L, Gu S, Cheng Y, et al. bFGF promotes Sca1⁺ cardiac stem cell migration through activation of the PI3K/Akt pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2349-2356
- [20] Huang PC, Wang GJ, Fan MJ, et al. Cellular apoptosis and cardiac dysfunction in STZ-induced diabetic rats attenuated by anthocyanins via activation of IGFI-R/PI3K/Akt survival signaling [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(12): 2471-2480
- [21] Taniyama Y, Ito M, Sato K, et al. Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38(2): 375-385

[收稿日期] 2017-07-12