

microRNA-23b 表达异常与心脏发育缺陷相关性分析

陈斌,顾海涛,顾群,刘鸿,张石江*

(南京医科大学第一附属医院胸心外科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨 microRNA-23b(miR-23b)表达异常与心脏发育缺陷的关系。**方法:**收集人胚胎心肌组织和发育中的小鼠胚胎心肌组织,0.9%二甲亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)诱导 P19 细胞定向分化为心肌细胞,定量 PCR 检测人胚胎心肌组织、小鼠胚胎心肌组织和 P19 细胞分化过程中 miR-23b 的表达特点,运用在线数据库对 miR-23b 进行生物信息学分析,分析其可能的靶基因以及涉及的信号通路,综合分析 miR-23b 表达异常与心脏发育缺陷的关系。**结果:**miR-23b 在孕早期人室间隔缺损(ventricular septal defect,VSD)胚胎心肌组织中上调 4.4 倍,在孕中期 VSD 组下调 3.5 倍;小鼠胚胎发育 d12.5、d14.5、d16.5、d18.5 的 4 个时间点 miR-23b 的表达量逐渐增高,d14.5 后各组间差异具有显著性 ($P < 0.05$);P19 细胞定向分化过程中 miR-23b 的表达量逐渐下降,d4 后各组间有显著差异 ($P < 0.05$);生物信息学分析提示 miR-23b 可能涉及转化生长因子 β (TGF- β)、Notch、Wnt 信号通路。**结论:**miR-23b 表达异常可能通过影响心肌细胞的增殖、凋亡、迁移、分化等细胞功能,导致心脏发育缺陷。

[关键词] 心脏发育;室间隔缺损;微小 RNA;生物信息学

[中图分类号] R361

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)01-006-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150102

Correlation analysis of abnormal miR-23b expression and cardiac developmental defects

Chen Bin, Gu Haitao, Gu Qun, Liu Hong, Zhang Shijiang*

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the relationship between miR-23b expression abnormalities and developmental defects of the heart. **Methods:**Human and developing mouse embryo myocardial tissues were collected. P19 cells,induced to differentiating into cardiomyocytes with 0.9% dimethyl sulfoxide (DMSO),were collected at day 0,4,6,10. MiR-23b expression level of the mentioned tissues or cells was then detected. Online databases were used to predict target genes of miR-23b and the signaling pathways that the target genes may be involved in,thus to comprehensively analyze the relationship between miR-23b expression abnormalities and developmental defects of the heart. **Results:**For human embryos of first and second trimester of gestation,miR-23b expression was upregulated 4.4 times and downregulated 3.5 times, respectively,in the VSD (ventricular septal defect) group,compared with the normal control group. For mouse embryos,expression of miR-23b increased gradually at the four time points:d12.5,d14.5,d16.5,d18.5. Differences among the later three time points(after d14.5) were significant($P < 0.05$). During differentiating into cardiomyocytes,P19 cells showed a descending trend in miR-23b expression. Differences between d4 and d6 or d6 and d10 were significant($P < 0.05$). Bioinformatics about miR-23b suggests that it may be involved in TGF- β ,Notch,Wnt signaling pathways. **Conclusion:**MiR-23b expression abnormalities may influence proliferation,apoptosis,migration and differentiation of cardiomyocytes and thus result in developmental defects of the heart.

[Key words] heart development;ventricular septal defect;miRNAs;bioinformatics

[Acta Univ Med Nanjing,2015,35(01):006-010,021]

先天性心脏病 (congenital heart disease,CHD) 是最常见的出生缺陷^[1],心脏发育过程极其复杂,涉

及许多相关基因的时空特异性表达和诸多信号通路(如 Notch、Wnt、BMP 通路)的激活和精确调控,以保证心肌细胞的正确迁移、增殖、分化^[2-4],心脏发育任何一个环节出现异常都将导致 CHD 的发生。

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81270298)

*通信作者(Corresponding author),E-mail: zsjiangnjmu@163.com

微小 RNA(miRNA)作为一种新机制,主要在转

录后水平对靶基因进行负向调节,参与了细胞增殖、凋亡、代谢、免疫、信号转导等诸多生物学过程^[5]。越来越多的研究证实 miRNAs 在心脏发育与疾病发生过程中同样起着重要调控作用^[6-7]。但 miRNAs 致胚胎心脏发育畸形的具体机制尚未阐明,因此继续发掘新的心脏相关性 miRNAs,寻找其下游靶分子,鉴定其在心脏发育中的调控机制依旧极其重要。

miR-23b 是本实验小组前期采用 miRNA 芯片筛选得到的 1 条在人室间隔缺损 (ventricular septal defect, VSD) 胚胎心肌组织内差异表达的 miRNA。与正常对照相比, VSD 组胚胎心肌 miR-23b 在胚胎发育早期上调 8.2 倍,发育中期下调 4.8 倍^[8]。既往关于 miR-23b 与心血管疾病关系的研究仅限于心衰及心肌肥厚方面,例如,后负荷过载的小鼠模型以及心衰患者 miR-23b 表达上调可能涉及心肌肥厚的发生与发展^[9]。但 miR-23b 在心脏发育中的作用,包括心脏细胞系特化以及增殖、凋亡、分化等细胞功能尚未有研究。因此,本研究拟检测小鼠胚胎发育过程以及 P19 细胞定向分化为心肌细胞过程中 miR-23b 的表达规律,初步明确 miR-23b 的表达变化与 VSD 发生的相互关系,通过生物信息学分析,预测其可能的靶基因,推测 miR-23b 表达异常致心脏发育缺陷的关键基因和涉及的信号通路,为进一步研究 miR-23b 的功能、机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠购自南京医科大学实验动物中心,为清洁级 C57BL/6J 小鼠。实验用 P19 细胞株购自美国 ATCC, MEM Alpha basic 培养基、胎牛血清(FBS)以及定量 PCR 试剂盒 TaqMan[®] Universal Master Mix II 购自美国 Life Technologies 公司,胰蛋白酶购自加拿大 Wisent 公司。二甲亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司,总 RNA 提取用 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, cDNA 合成用 TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 人胚胎心脏组织的获取

胚胎心脏的收集方法和纳入、排除标准见本实验小组已发表论著^[8]。其中 VSD 组 6 例,为因病理因素(孕母全身性疾病、生殖系统疾病等)流产的胎儿,经解剖证实为 VSD,且不合并其他畸形。对照组 6 例,为因生理性难免流产(未婚先孕、妊娠期外伤

和习惯性流产等)的胎儿,经解剖证实无心脏和其他器官畸形。VSD 组和对照组各 6 例,再根据胎龄细分为孕早期亚组 (12~14 周) 3 例和孕中期亚组 (25~27 周) 3 例。胎心组织的收集和使用得到了南京医科大学伦理委员会的同意,所有胚胎标本均经家属知情同意用于研究。获取的心肌组织迅速入液氮速冻后保存在 -80℃ 冰箱,用于后续研究。

1.2.2 小鼠胚胎心脏组织的获取

雌鼠 24 只、雄鼠 12 只分开在单独的鼠笼中饲养,给予恒温、12 h 白昼/黑夜环境,6 月龄时按雌雄比例 2:1 合笼,以阴栓脱落的最早时间定为胎龄 d0.5。孕鼠分笼饲养,分别取孕龄 d12.5、d14.5、d16.5、d18.5 的雌鼠,用 CO₂ 处死孕鼠,分离出胚胎,在解剖显微镜下取出心脏后迅速置于液氮中冻存,每个时间点各取 6 个胚胎入组,用于后续实验研究。本研究中实验动物的使用得到了南京医科大学实验动物管理与伦理委员会的同意。

1.2.3 P19 细胞的培养及诱导分化

细胞贴壁培养至汇合度 80% 左右时,进行细胞传代或者进行诱导分化。用含 0.9% DMSO 的完全培养基诱导 P19 细胞分化为心肌细胞,分别收集诱导分化第 0、4、6、10 天细胞,加入 TRIzol 裂解细胞,冻存于 -80℃ 冰箱,用于后续研究。

1.2.4 总 RNA 抽提、cDNA 合成和定量 PCR

冻存的心脏组织加液氮研磨成粉末状后加入 TRIzol 试剂,冻存的 P19 细胞则自 -80℃ 冰箱取出后,室温孵育 5 min,融化样品。进一步参照 TRIzol 试剂说明书,逐步提取各组织或细胞样品总 RNA。根据 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 、 $D(260\text{ nm})/D(230\text{ nm})$ 比值确定样品总 RNA 的纯度和浓度,进一步运用变性琼脂糖凝胶电泳检测样品总 RNA 中 28S 和 18S 的比例,评估 RNA 纯度及完整性。cDNA 合成根据说明书每 15 μl 反应体系加 5 μl RNA 样品,反应条件为:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,4℃ 保持。定量 PCR 反应程序设定为:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火延伸 1 min,共 40 个循环,绘制熔解曲线。反应以 U6 为内参,miRNA 的含量通过 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法定量。

1.2.5 生物信息学分析

利用 miRBase 数据库分析 miR-23b 的序列的保守性,综合运用 TargetScan Release 6.2、PicTar、miRTarBase、miRecords、miRWalk 等^[10] 常用 miRNA 在线数据库对 miR-23b 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-23b 可能的生物学功能以及可能涉及的调节通路。

1.3 统计学方法

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS16.0 进行统计学分析,不同时间点表达情况的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

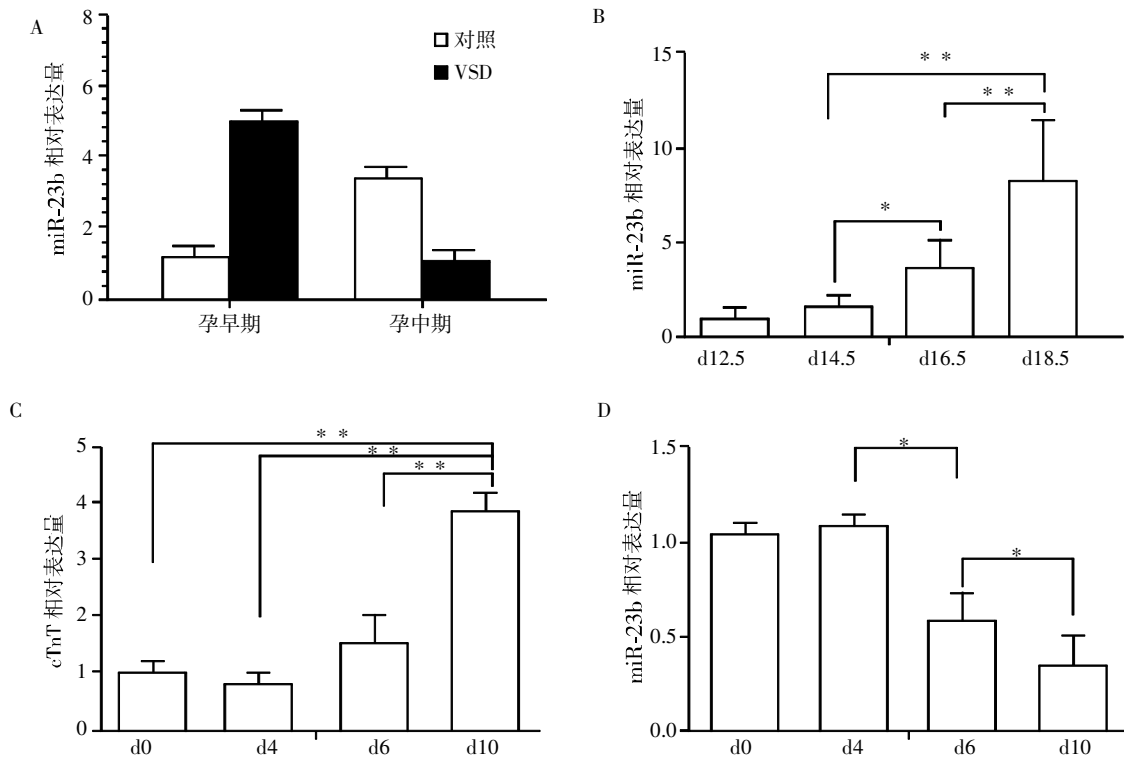
2.1 胚胎心肌发育过程中 miR-23b 表达的变化

采用定量 PCR 对 miR-23b 在人胚胎心肌组织中的表达进行验证,结果显示,与正常对照相比,miR-23b 在孕早期 VSD 亚组表达上调 4.4 倍,在孕中期 VSD 亚组表达下调 3.5 倍(图 1A),与本实验小组前期完成的芯片结果基本相符^[8],提示 miR-23b 在 VSD 胚胎心肌组织中确有差异表达,并且具有一定时间差异性。小鼠胚胎心肌组织定量 PCR 结果显示:miR-23b 在 d12.5、d14.5、d16.5、d18.5 的 4 个时间点表达量逐渐增高,其中 d16.5 的表达量与 d14.5 相

比,差异具有显著性($P < 0.05$),而 d18.5 的表达量与 d14.5、d16.5 相比明显增高 ($P < 0.01$),但 d12.5、d14.5 间的表达量无明显差异(图 1B)。提示小鼠胚胎发育过程中 miR-23b 的调节作用在 d16.5 后可能有明显的增强。P19 细胞诱导分化第 10 天,在相差显微镜下可以观察到自发搏动的细胞团,具有一定的节律和频率,定量 PCR 检测心肌标志物肌钙蛋白 T(cTnT)的表达,d10 显著增高(图 1C),提示诱导分化成功。对分化过程中 d0、d4、d6、d10 的细胞进行定量 PCR 检测 miR-23b 的表达,发现从 d4 开始,miR-23b 的表达开始逐渐下降(图 1D),每两个时间点间均有显著差异($P < 0.05$)。

2.2 miR-23b 的生物信息学分析

通过 miRBase 对人(hsa)、小鼠(mmu)、大鼠(rno)、斑马鱼(dre)等 10 个物种 miR-23b 的序列分析,发现 hsa-miR-23b 的“aucacauugccaggauuacc”21 个碱基在各个物种间高度保守,尤其与小鼠 mmu-miR-23b 序列完全一致(表 1)。运用 TargetScan Release 6.2、PicTar 和 miRWalk 对 miR-23b 进行靶基因预测分别获得 840、305 和 133 个靶基因,取交



A: 定量 PCR 验证 miR-23b 在胚胎心肌组织中的表达; B: 小鼠胚胎发育过程中 miR-23b 的表达逐渐升高, d14.5 后各组间有显著差异; C: 心肌标志物 cTnT 的表达从 d4 开始增高, d6 后显著增高; D: P19 细胞分化过程中第 0、4、6、10 天 miR-23b 的表达呈下降趋势, d4 和 d6、d6 和 d10 间有显著差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图 1 miR-23b 及心肌标志物 cTnT 的定量 PCR 结果

Figure 1 Expression of miR-23b and cTnT detected by qRT-PCR

集得到 4 个靶基因 (EPS15、MAPRE1、POU4F2、PTP4A2), 而 miRecords 和 miRTarBase 数据库中为已注册靶基因, 共 9 个, 因此, 取两者并集共获得 miR-23b 靶基因 13 个 (图 2A)。针对靶基因的 GO 分析提示 miR-23b 涉及多种生物学过程, 包括与心脏间隔发育密切相关的生物学过程 (图 2B)。利用 KEGG 经典生物通路数据库对 miRNA-23b 的靶基因进行信号通路富集分析, 结果提示其中 6 个靶基因涉及 30 个不同的信号通路 (图 2C)。其中涉及靶基因最多的是转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路, 包含了 3 个预测靶基因 (smad3、smad4、smad5), 此外, 与心脏发育以及心血管疾病密切相关的 Wnt 信号通路和 Notch 信号通路分别涉及 2 个 (smad3、smad4) 和 1 个 (Hes1) 预测靶基因。

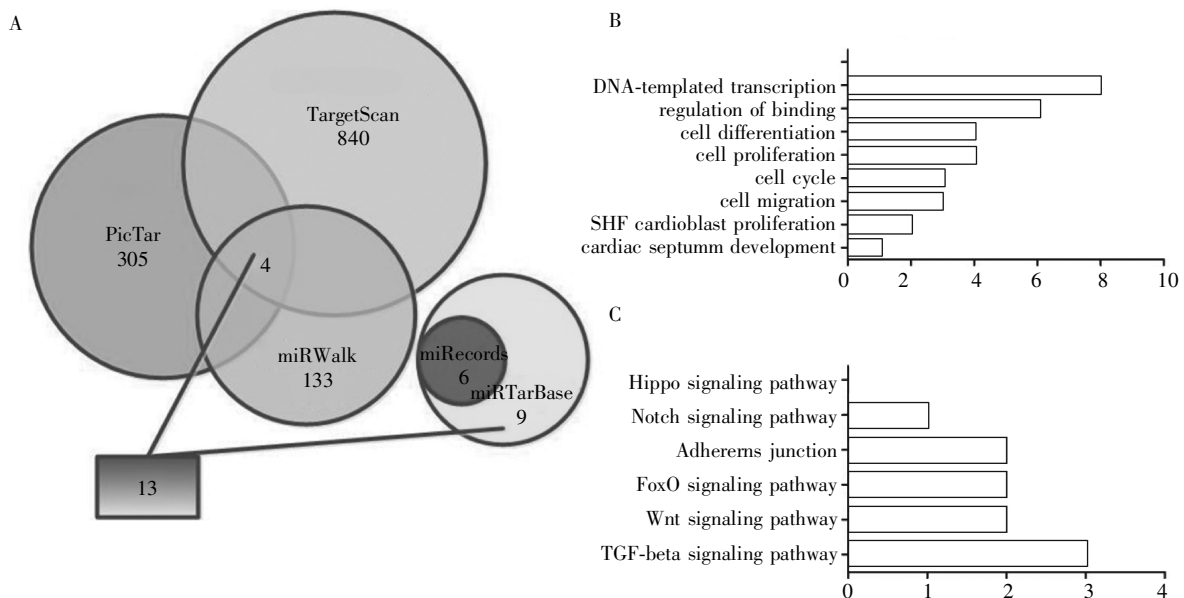
3 讨论

得益于 miRNA 表达谱芯片技术, 现在能够快速获得在室间隔缺损心肌组织中差异表达的 miRNAs, 但由于数量众多, 研究者不可能逐一深入研究, 因此如何筛选出具有高度研究价值的目标 miRNA 就成为获得芯片结果后的首要问题。miR-23b 是在 VSD 胚胎心肌组织中差异表达的 miRNA, 本研究定量 PCR 验证结果与前期芯片结果基本一致, 提高了筛选结果的可靠性。正常人胚胎发育第 4 周, 原始心室底部出现肌性嵴, 逐渐向上延伸, 由疏松多孔的肌性组织变为肌部室间隔, 同时心球内膜下组织形成左右心球嵴, 相向增生融合, 形成室间隔窦部的一部分。在胚胎第 8 周, 室间隔肌部和心内膜垫增生, 以及心脏球嵴延伸, 共同构成室间隔膜部^[11]。本研究孕早期亚组时间上正好是室间隔三部分 (肌部、窦部、膜部) 相互融合形成完整室间隔的

表 1 miR-23b 的物种保守性分析

Table 1 Species conservation analysis of miR-23b

物种	miRNA	保守序列
人 (<i>Homo sapiens</i>)	hsa-miR-23b	58-aucacauugccagggauuacc-78
大猩猩 (<i>Pongo pygmaeus</i>)	ppy-miR-23b	58-aucacauugccagggauuaccac-80
小鼠 (<i>Mus musculus</i>)	mmu-miR-23b	46-aucacauugccagggauuacc-66
大鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)	rno-miR-23b	58-aucacauugccagggauuacc-78
猪 (<i>Sus scrofa</i>)	ssc-miR-23b	50-aucacauugccagggauuacca-71
牛 (<i>Bos Taurus</i>)	bta-miR-23b	38-aucacauugccagggauuaccac-60
狗 (<i>Canis familiaris</i>)	cfa-miR-23b	36-aucacauugccagggauua-54
鸡 (<i>Gallus gallus</i>)	gga-miR-23b	52-aucacauugccagggauuacc-72
非洲蟾蜍 (<i>Xenopus tropicalis</i>)	xtr-miR-23b	53-aucacauugccagggauuacc-73
斑马鱼 (<i>Danio rerio</i>)	dre-miR-23b	51-aucacauugccagggauuacca-72



A: miR-23b 靶基因预测; B: 基因功能; C: 信号通路。

图 2 miR-23b 的生物信息学分析

Figure 2 Bioinformatic analysis of miR-23b

过程,期间涉及细胞增殖、迁移、凋亡、分化等细胞功能,miR-23b 在此期异常高表达可能导致心肌细胞功能的改变,从而导致 VSD 的发生。小鼠心脏在解剖、生长、发育等方面与人心脏非常相似,使得小鼠成为研究心脏发育最重要的动物模型之一^[12]。Saija 等^[13]证实小鼠胚胎发育 d12.5~d18.5 完成了房室间隔以及心室流出道和主肺动脉分隔,室间隔分化则在 d12.5~d14.5 完成,本研究通过检测正常发育的小鼠胚胎 4 个时间点 miR-23b 表达,发现 miR-23b 表达逐渐增高,室间隔分化过程的表达量是相对较低的,考虑到小鼠胚胎发育和人胚胎发育的相似性,孕早期 miR-23b 的表达上调很有可能在某种程度上影响了室间隔甚至整个心室的发育。P19 细胞来源于小鼠恶性畸胎瘤,在 0.5%~1.0%浓度的 DMSO 诱导下可以逐渐分化为具有搏动能力的心肌细胞^[14],这也使得 P19 细胞成为心脏相关研究最常用的一种工具细胞。本研究在 P19 细胞定向分化为心肌细胞的过程中检测 miR-23b 表达情况,结果显示分化第 0、4 天的 miR-23b 表达没有明显差异,分化第 6~10 天 miR-23b 表达显著降低,这提示 miR-23b 表达下调可能对于心肌细胞的成功分化是必要的。因此,孕早期 miR-23b 表达上调是否涉及心肌细胞分化障碍导致成熟心肌细胞数量减少从而引起室间隔的发育受限,值得进一步探讨。

对 miR-23b 生物信息学分析发现,miR-23b 成熟序列在进化上高度保守,提示 miR-23b 具有重要的生物学功能,而针对 miR-23b 靶基因的 GO 分析和 Pathway 分析提示,miR-23b 可能涉及 TGF- β 、Wnt、Notch 信号通路。现已知不论心脏瓣膜还是房室间隔的发育都依赖心内膜垫的正确形成^[15],而 TGF- β 信号通路被证明在心内膜垫的形成中起关键作用^[16]。此外,已有研究表明 Notch 信号通路中基因 JAG 的突变与法洛四联症的发生密切相关^[17-18],而 VSD 则是法洛四联症 4 种合并畸形中的 1 种,从生物信息学分析结果看,miR-23b 很有可能通过上述信号通路的调控而影响室间隔的发育,其表达异常可能导致室间隔发育缺陷,从而引发以 VSD 为表现之一的单纯或复杂先天性心脏病。

本研究以 miRNA 表达谱芯片差异表达的 miR-23b 为研究对象,通过检测人胚胎心肌组织、小鼠胚胎心肌组织和 P19 细胞分化过程 miR-23b 的表达特点,初步肯定了 miR-23b 表达异常与心脏发育缺陷的相关性,通过生物信息学分析预测了可能的靶基因以及涉及的信号通路,明确了 miR-23b 作为心脏发育的

重要调节因子的潜在研究价值。但 miR-23b 是否在心脏发育过程中起重要调控作用仍需进一步深入研究,包括经典的过表达和沉默策略研究 miR-23b 对心肌细胞功能的影响,以及其他分子机制的研究。

[参考文献]

- [1] 冯倩,李练兵,马明福. 出生缺陷一级预防研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志,2013,21(10):133-135
- [2] Zhou XL,Liu JC. Role of Notch signaling in the mammalian heart[J]. Braz J Med Biol Res,2014,47(1):1-10
- [3] Thomas PS,Rajderkar S,Lane J,et al. AcvR1-mediated BMP signaling in second heart field is required for arterial pole development:Implications for myocardial differentiation and regional identity[J]. Dev Biol,2014,390(2):191-207
- [4] Tanaka SS,Kojima Y,Yamaguchi YL,et al. Impact of WNT signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo[J]. Dev Growth Differ,2011,53(7):843-856
- [5] Li Y,Kowdley KV. MicroRNAs in common human diseases [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics,2012,10(5):246-253
- [6] Wystub K,Besser J,Bachmann A,et al. miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development[J]. PLoS Genet,2013,9(9):e1003793
- [7] Qin DN,Qian L,Hu DL,et al. Effects of miR-19b overexpression on proliferation,differentiation,apoptosis and Wnt/beta-catenin signaling pathway in P19 cell model of cardiac differentiation *in vitro* [J].Cell Biochem Biophys,2013,66(3):709-722
- [8] 余章斌,韩树萍,朱春,等. 室间隔缺损胎儿心室肌组织微小 RNAs 时序性表达差异研究[J].中国循证儿科杂志,2011,6(5):368-375
- [9] Wang J,Song Y,Zhang Y,et al. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice[J]. Cell Res,2012,22(3):516-527
- [10] Dweep H,Sticht C,Pandey P,et al. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes[J]. J Biomed Inform,2011,44(5):839-847
- [11] 丁文祥,苏肇杭. 现代小儿心脏外科学[M].济南:山东科学技术出版社,2013:2-3
- [12] Wessels A,Sedmera D. Developmental anatomy of the heart;a tale of mice and man[J]. Physiol Genomics,2003,15(3):165-176
- [13] Savolainen SM,Foley JF,Elmore SA. Histology atlas of