

过表达 LncRNA GAS5 对 SD 大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的影响

张家贵^{1,2}, 陶辉^{1,2}, 施鹏^{1,2}, 陈泽文^{1,2}, 曹炜^{1,2}, 占红英^{1,2}, 石开虎^{1,2}

摘要 目的 应用长链非编码 RNA GAS5 (LncRNA GAS5) 过表达质粒 (pEGFP-C1-GAS5) 转染 SD 大鼠心肌成纤维细胞, 观察其对心肌成纤维细胞活化增殖的影响。方法 提取 SD 大鼠心肌成纤维细胞, 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 刺激其增殖, 分为 pEGFP-C1-GAS5 组、阴性对照组和空白对照组, 应用 LncRNA GAS5 基因的过表达质粒 (pEGFP-C1-GAS5) 通过脂质体瞬时转染细胞, 48 h 后收获细胞。采用实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 GAS5、I 型胶原前胶原 (Col1A1) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的 mRNA 表达, Western blot 分析 Col1A1 和 α -SMA 蛋白表达变化, MTT 法检测细胞增殖活力。结果 TGF- β 1 刺激心肌成纤维细胞后, qRT-PCR 结果显示 LncRNA GAS5 的表达量较正常组下降 ($P < 0.05$); 与阴性对照组和空白对照组比较, 转染了 pEGFP-C1-GAS5 的实验组, qRT-PCR 结果显示实验组的 GAS5 表达均明显升高 ($P < 0.05$), 同时 α -SMA 和 Col1A1 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示转染 pEGFP-C1-GAS5 的实验组 α -SMA 和 Col1A1 蛋白表达量均明显降低 ($P < 0.05$); MTT 法检测结果表明在实验组心肌成纤维细胞的增殖活力低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$)。结论 过表达 LncRNA GAS5 可显著降低心肌成纤维细胞的增殖活力, 提示 GAS5 有抑制心肌成纤维细胞的活化增殖的

作用, 为以后进一步研究提供依据。

关键词 LncRNA GAS5; 心肌成纤维细胞; α -平滑肌肌动蛋白; I 型胶原前胶原

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0328-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.005

心肌纤维化是在各种损伤因素的作用下导致的心肌细胞间质出现的异常胶原纤维沉积, 是房颤等多种心脏疾病的病理基础, 是心肌重构的一个重要结构改变^[1]。心肌纤维化的发病机制非常复杂, 基因及信号通路的异常变化均会导致心肌纤维化的发生, 而心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 的活化增殖则是心肌纤维化发生发展中的中心事件^[2]。目前关于心肌纤维化发生机制已有许多研究^[3-4]表明一些长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, LncRNAs) 参与心脏疾病的发生发展。有文献^[5]证实, 生长特异性抑制 5 (growth arrest-specific 5, GAS5) 在细胞的增殖与生长过程中充当重要的调节器, 然而, 在心肌纤维化中关于 GAS5 的报道甚少。该研究通过体外培养的原代 CFs 为研究对象, 采用 Lipofectamine 2000 Reagent 瞬时转染 GAS5 基因的过表达质粒 (pEGFP-C1-GAS5), 观察随后的 CFs 增殖情况及相关 RNA 和蛋白水平的变化, 探寻 GAS5 在心肌纤维化中的作用, 为以后研究心肌纤维化的机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

2016-12-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81570295); 安徽省科技攻关计划项目 (编号: 1501041148); 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2015A320)

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: 张家贵, 男, 硕士研究生;

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

Histomorphology and biomechanics were evaluated in 3rd, 8th and 12th week after surgery. **Results** Histological pathology revealed that neovascularization and fibroblast cells infiltration in experimental group were higher than that in the control group. Ability of tissue healing was better than the control group owing to the formation of typical 4-layered tendon-bone interface at in 12th week postoperatively. Biomechanics test found that the maximum loads in the experimental group showed significant superior outcomes compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The modified BMSCs with gene co-expression of *bmp2* and *vegfl65* may improve the outcome of tendon-bone healing.

Key words vascular endothelial growth factor 165; bone morphogenetic protein 2; bone mesenchymal stem cells; tendon-bone healing; anterior cruciate ligament

1.1.1 实验动物 SD 乳鼠 60 只,雌雄不限,5~7 d 龄,20~22 g,SPF 级,购于安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基(美国 HyClone 公司);胎牛血清(英国 Gibco 公司);胰蛋白酶(美国 WISENT 公司);Lipofectamine 2000 Reagent、TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司);过表达质粒(pEGFP-C1-GAS5)和空载体(pEGFP-C1)、LncRNA GAS5 引物、I 型胶原前胶原(collagen I -alpha1, Col1A1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)引物合成(上海生工生物工程公司);逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司);Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2 \times)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Col1A1 抗体(英国 Abcam 公司); α -SMA 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);内参 β -actin 抗体(武汉博士德公司);二抗山羊抗兔、山羊抗小鼠(北京中杉金桥生物技术有限公司);MTT 相关试剂(美国 Sigma 公司)。

1.1.3 主要仪器 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);倒置相差显微镜(德国 Leica 公司);StepOne Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司);分光光度计(德国 Implen GmbH 公司);Western blot 相关设备(美国 Bio-Rad 公司);超净工作台(苏州泰安空气技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 SD 乳鼠 CFs 的提取与细胞培养 用酒精浸泡 SD 乳鼠消毒并处死,无菌操作下取出心脏,用预冷的磷酸盐缓冲液冲洗两遍。小心将心脏转移至 5 ml EP 管中,剪刀剪碎并用混合酶液(胰蛋白酶:I 型胶原酶比例为 2:1)消化,所提取的细胞置于含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中。2 h 后 CFs 贴壁,更换新的培养基,加入转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)刺激其生长,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱。继续培养并传代,至 2~4 代可用于实验。

1.2.2 实验分组的建立 pEGFP-C1-GAS5 组:向 CFs 中转染 GAS5 基因的过表达质粒,用来过量表达 GAS5 的作用;阴性对照组:向 CFs 中转入空载体质粒 pEGFP-C1 的阴性对照组,而不对 GAS5 基因产生影响;空白对照组:对 CFs 不作任何处理。

1.2.3 细胞转染 将对数生长期的 CFs 用胰蛋白酶消化,进行细胞计数,然后种于 6 孔板中,加入 Opti-MEM 稀释以备转染。生长约 24 h 待细胞长

满,分别采用 Lipofectamine 2000 转染。向 pEGFP-C1-GAS5 过表达组中加入质粒 pEGFP-C1-GAS5 进行转染,向阴性对照组转入空载体质粒 pEGFP-C1,空白对照组不作处理。各组分别吹散混匀,静止 10~20 min,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱孵育,24 h 后提取细胞产物。

1.2.4 qRT-PCR 检测 CFs 中 LncRNA GAS5 及 α -SMA 和 Col1A1 mRNA 的表达 细胞转染 48 h 后,采用 TRIzol 法提取其总 RNA,并用 TaKaRa 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。用 ABI StepOne Real-Time PCR 系统进行反应扩增。反应条件:50 $^{\circ}$ C、2 min,95 $^{\circ}$ C、10 min;95 $^{\circ}$ C、20 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、30 s,共 40 个循环;95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、1 min,95 $^{\circ}$ C、15 s。以 β -actin 作为内参,2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因	序列(5'-3')
LncRNA GAS5	F: AGCCAGAAAATGGGATGGTGG R: ACTGCACTGTCCACTTGTCA
α -SMA	F: TGGCCACTGCTCTTCTCTTCTT R: GGGGCCAGCTTCGTCATACTCTCT
Col1A1	F: GGAGAGAGCATGACCCGATGG R: GGGACTTCTTGAGGTTGGCA
β -actin	F: TGGAACTCTGTGGCATCCATGAAAC R: ACCGAGCTCAGTAACAGTCCG

1.2.5 Western blot 法检测 CFs 中 Col1A1 和 α -SMA 蛋白表达 细胞转染 48 h 后,用蛋白裂解液裂解细胞提取总蛋白,分组标记。等量加入蛋白样品,二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,接着转至聚偏二氟乙烯膜上,TBST 漂洗后用 5% 脱脂奶粉封闭 1~2 h,再用 TBST 漂洗 8 min \times 4 次,按说明书分别稀释并敷上 Col1A1 和 α -SMA 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 漂洗 4 次,敷上用 5% 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000),于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床 1~2 h。TBST 漂洗 4 次后,采用天能凝胶成像仪进行 ECL 发光显色。以 β -actin 为内参,用分析软件计算各条带灰度值与内参的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.2.6 MTT 比色法检测 CFs 的增殖 预先在 96 孔板设置好分组。将生长处于对数期的各组 CFs 消化后,在完全培养基中混成细胞悬液,按 1×10^4 /孔、接种于 96 孔板中,每组 5 个复孔。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养,连续监测 2 d。从种板后至 24 h 和 48 h,每孔分别加入 MTT(5 mg/ml) 10 μ l,继

续培养 4 h, 然后吸去各孔中的培养液, 加入二甲基亚砷 150 μl /孔, 室温下在摇床上震荡 5 ~ 10 min, 用酶标仪测定 490 nm 的吸光值。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素变量两组之间比较采用 *t* 检验方法, 多组均数比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活化的 CFs 中 LncRNA GAS5 的表达 未做转染过表达质粒 pEGFP-C1-GAS5 前, 采用 TGF- β 1 刺激心肌成纤维细胞生长至 2 ~ 4 代对数期, 即为 TGF- β 1 组, qRT-PCR 结果显示, TGF- β 1 刺激后的 TGF- β 1 组与没有 TGF- β 1 作用的正常组 CFs 中 LncRNA GAS5 的表达明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 8.14, P < 0.05$)。见图 1。

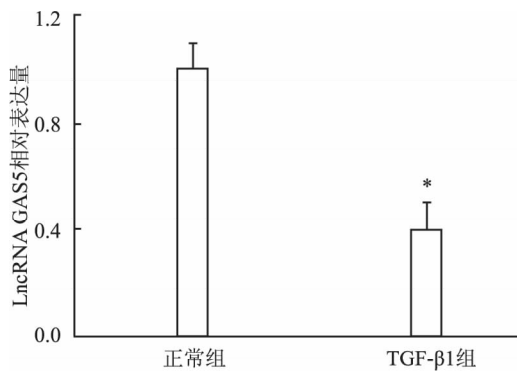


图 1 qRT-PCR 检测 TGF- β 1 刺激后 LncRNA GAS5 表达的变化与正常组比较: * $P < 0.05$

2.2 qRT-PCR 检测瞬时转染 pEGFP-C1-GAS5 CFs 中 LncRNA GAS5 的表达 对处于对数期的原代 CFs 瞬时转染过表达质粒 pEGFP-C1-GAS5 后, 48 h 后收获细胞, qRT-PCR 结果显示, 转染了过表达质粒 pEGFP-C1-GAS5 的实验组, 其 LncRNA GAS5 的表达量与阴性对照组和空白对照组相比有明显升高, 差异均有统计学意义 ($F = 141.16, P < 0.05$)。见图 2。

2.3 qRT-PCR 检测 CFs 中 α -SMA 和 Col1A1 mRNA 的表达 瞬时转染 pEGFP-C1-GAS5 之后, 收获细胞并提取 RNA, qRT-PCR 结果显示, 与阴性对照组和空白对照组比较, pEGFP-C1-GAS5 组的 α -SMA 和 Col1A1 mRNA 表达量明显下降, 差异均有统计学意义 ($F = 20.70, 12.59, P < 0.05$)。见图 3。

2.4 Western blot 法检测 CFs 中 α -SMA 和

Col1A1 蛋白表达 Western blot 结果显示, 在转染 pEGFP-C1-GAS5 之后, 与阴性对照组和空白对照组比较, 内参 β -actin 表达量相近, 但 pEGFP-C1-GAS5 组 α -SMA 和 Col1A1 蛋白表达量均较阴性对照组和空白对照组降低, 差异均有统计学意义 ($F = 21.83, 16.29, P < 0.05$)。见图 4。

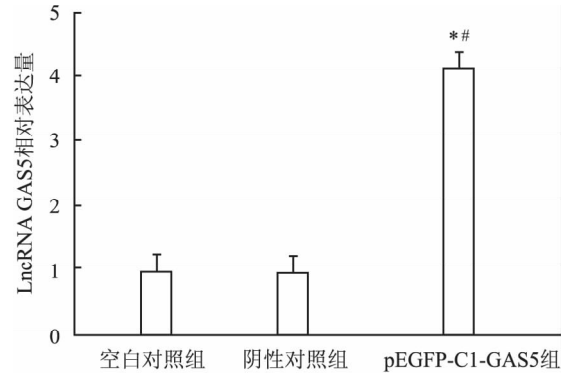


图 2 qRT-PCR 检测过表达 LncRNA GAS5 表达的变化与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: ** $P < 0.05$

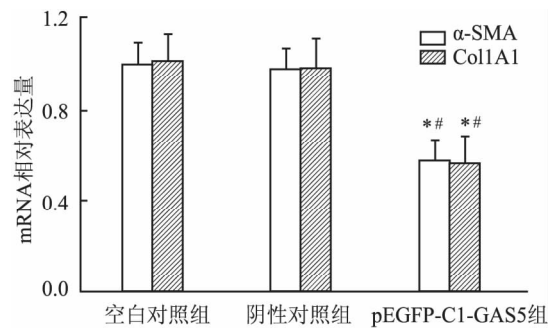


图 3 qRT-PCR 检测 α -SMA 和 Col1A1 mRNA 表达的变化与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: ** $P < 0.05$

2.5 MTT 比色法检测 CFs 的增殖 瞬时转染心肌成纤维细胞 pEGFP-C1-GAS5 0、24、48 h 后, 与阴性对照组和空白对照组比较, 在转染 24 h 和 48 h 后, pEGFP-C1-GAS5 组的 CFs 增殖活力明显降低, 差异均有统计学意义 ($F = 12.68, 27.12, P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

目前认为, 心肌纤维化与心律失常 (尤其是房颤)、心功能不全和心肌肥厚等疾病有关^[6]。分析这些疾病的发病机制进而寻找有效的治疗方法, 是预防和抑制心肌纤维化发生发展的重要途径。而在心肌纤维化的形成过程中, CFs 的活化增殖和相关表型转变是其重要环节^[2]。各种致病因素作用下,

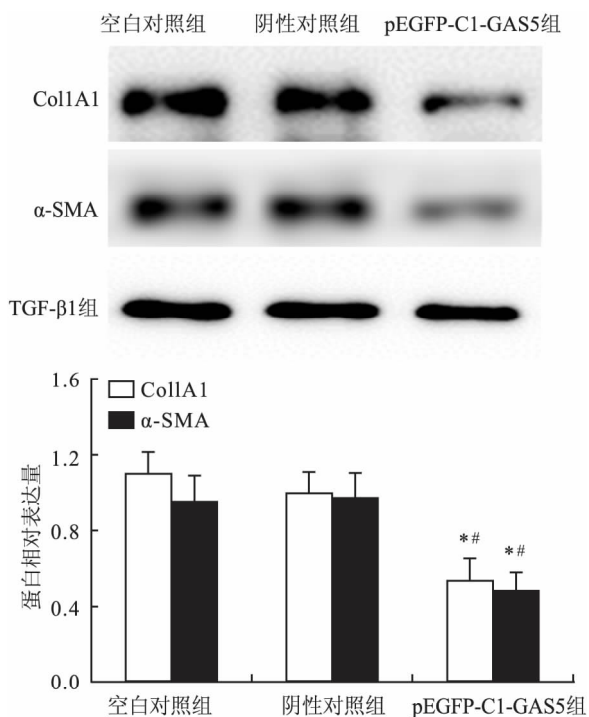


图4 Western blot法检测 α -SMA和Col1A1蛋白表达的变化与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

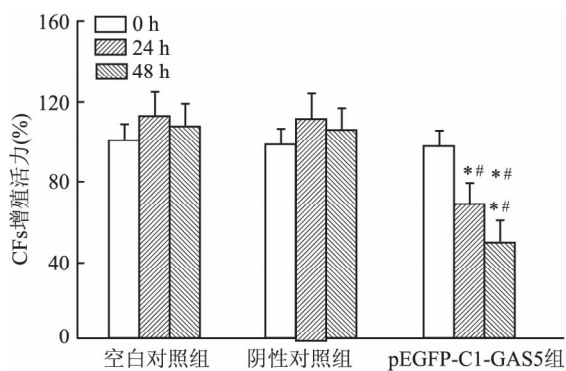


图5 MTT法检测转染pEGFP-C1-GAS5后CFs增殖活力的变化与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

CFs被激活并增殖,细胞外基质合成与分泌增加,且导致 α -SMA、I型胶原等细胞外基质沉积进一步促进纤维化^[7]。

LncRNAs是一种长度>200个核苷酸的非编码RNAs,可调节基因在转录和转录后水平的表达^[8]。近年来关于LncRNAs的诸多研究^[9]显示其在机体生理过程中起着重要作用,一些生物学功能如RNA加工、结构脚手架、调节凋亡和细胞侵袭、诱导多能干细胞的重新编排和染色质的重新编排等。在心脏方面,诸如敲除LncRNA SENCR^[3]或LncRNA Mhrt^[4]会引起血管平滑肌细胞大量迁移、心脏肥大

或心衰等一些病理改变,而Mhrt更是人类心脏特有且富含于心肌组织。Yu et al^[10]在研究肝纤维化中发现,过表达LncRNA GAS5可抑制体外原代肝星状细胞的活化及在纤维化的肝组织中减轻胶原的积累,此外,已有的文献^[11-12]已能证明GAS5在多种恶性肿瘤里低表达,具有抑癌特点,参与细胞周期的调节。本研究显示TGF- β 1刺激CFs活化增殖后,其表达GAS5比正常的CFs低。

本研究采用具有过表达GAS5作用载体质粒pEGFP-C1-GAS5,转染体外培养的SD乳鼠原代CFs后,GAS5表达量显著升高,而Col1A1和 α -SMA在RNA和蛋白水平上均有下降。这些结果提示过表达GAS5会抑制CFs的活化增殖,使 α -SMA和Col1A1表达下调,且这些指标被认为是与纤维化密切相关^[13]。但是过表达GAS5后如何抑制CFs的增殖活化,具体机制不明,但有文献^[14]报道GAS5可以抑制miR-21来调控细胞的增殖和凋亡。另有报道^[15]指出过表达GAS5会导致基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的升高,如MMP-2、MMP-9,其具体相关性也有待于进一步研究。

然而对于LncRNA GAS5还有诸多问题尚需深入探究,比如,GAS5对CFs影响的确切机制及途径,GAS5与microRNAs的靶向作用关系,以及体外实验是否与体内实验得到的结论相同等。本课题组采用pEGFP-C1-GAS5转染CFs,GAS5在CFs中表达升高,使得CFs活化增殖明显下降,同时 α -SMA和Col1A1低表达,表明GAS5的正常表达能抑制CFs的活化增殖,这也为探究LncRNA GAS5的作用机制提供了基础,同时也为研究心肌纤维化提供新的方向。

参考文献

- [1] Dzeshka M S, Lip G Y, Snezhitskiy V, et al. Cardiac fibrosis in patients with atrial fibrillation: mechanisms and clinical implications [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 66(8): 943-59.
- [2] Liang H, Zhang C, Ban T, et al. A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGF β RIII is involved in cardiac fibrosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(12): 2152-60.
- [3] Uchida S, Dimmeler S. Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases [J]. Circ Res, 2015, 116(4): 737-50.
- [4] Han P, Li W, Lin C H, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy [J]. Nature, 2014, 514(7520): 102-6.
- [5] Hu G, Lou Z, Gupta M. The long non-coding RNA GAS5 cooperates with the eukaryotic translation initiation factor 4E to regulate c-Myc translation [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107016.

- [6] Dzeshka M S, Lip G Y, Snezhitskiy V, et al. Cardiac fibrosis in patients with atrial fibrillation: mechanisms and clinical implications [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(8): 943–59.
- [7] Tao H, Yang J J, Shi K H, et al. DNA methylation in cardiac fibrosis: new advances and perspectives [J]. *Toxicology*, 2014, 323: 125–9.
- [8] Kino T, Hurt D E, Ichijo T, et al. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor [J]. *Sci Signal*, 2010, 3(107): 692–702.
- [9] Ounzain S, Burdet F, Ibberson M, et al. Discovery and functional characterization of cardiovascular long noncoding RNAs [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt A): 17–26.
- [10] Yu F, Zheng J, Mao Y, et al. Long non-coding RNA GAS5 inhibits liver fibrogenesis through a mechanism of competing endogenous RNA [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(47): 28286–98.
- [11] Renganathan A, Kresoja-Rakic J, Echeverry N, et al. GAS5 long non-coding RNA in malignant pleural mesothelioma [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1): 1–12.
- [12] He X, Chen X, Zhang X, et al. An Lnc RNA (GAS5)/SnoRNA-derived piRNA induces activation of TRAIL gene by site-specifically recruiting MLL/COMPASS-like complexes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): 3712–25.
- [13] 张猛, 陶辉, 陈泽文, 等. 化学合成 microRNA-21 inhibitors 对大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(5): 577–81.
- [14] Hu L, Ye H, Huang G, et al. Long noncoding RNA GAS5 suppresses themigration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via miR-21 [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 2691–702.
- [15] Song J, Ahn C, Chun C H, et al. A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(12): 1628–35.

Effect of overexpression of LncRNA GAS5 on proliferation and activation of cardiac fibroblasts in SD rats

Zhang Jiagui^{1,2}, Tao Hui^{1,2}, Shi Peng^{1,2}, et al

(¹Dept of Cardio-Thoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ²Dept of Cardiovascular Disease Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To transfect the cardiac fibroblasts (CFs) *in vitro* with the overexpression plasmid pEGFP-C1-GAS5, and investigate its effect on activation and proliferation of cardiac fibroblasts in rats. **Methods** Cardiac fibroblasts were extracted from SD neonate rats and cultured. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was used to stimulate their proliferation. CFs were divided into pEGFP-C1-GAS5 group, negative control group and blank control group. Lipofectamine 2000 Reagent was used to transfect CFs with overexpression plasmid pEGFP-C1-GAS5, and cells were harvested after 48 hours. The expressions of GAS5 and mRNA of α -SMA and Col1A1 were analyzed by qRT-PCR. The expressions of α -SMA and Col1A1 in protein level were detected by Western blot. The activities of cells proliferation were confirmed by MTT assay. **Results** After stimulate cardiac fibroblasts with TGF- β 1, qRT-PCR showed that the expression of LncRNA GAS5 than the normal CFs decreased. Compared with the negative and no-treatment control group, qRT-PCR results showed that the expression of LncRNA GAS5 was significantly increased in pEGFP-C1-GAS5 transfected CFs ($P < 0.05$), and down-regulated the mRNA levels of α -SMA and Col1A1 ($P < 0.05$). Results from Western blot demonstrated significant decrease of α -SMA and Col1A1 in the group that cells transfected with pEGFP-C1-GAS5 ($P < 0.05$). MTT assay results suggested that in the experimental group the CFs proliferation activity decreased significantly than the negative and no-treatment control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of LncRNA GAS5 can significantly weaken the proliferation activity of cardiac fibroblasts, which indicates that GAS5 can inhibit CFs proliferation activity, and provide the basis for further studies.

Key words LncRNA GAS5; cardiac fibroblasts; α -SMA; Col1A1