DOI:10.16016/j.2097-0927.202402085

miR-208b-3p 通过抑制线粒体基因表达加重心力衰竭小鼠能量代谢障碍

周双珊[1],刘 源[1],银 萍[1],石毓君[2],苏 立[1] 400014 重庆,重庆医科大学附属第二医院心血管内科[1];610041 成都,四川大学华西医院病理研究室[2]

[摘要] **目的** 探究 miR-208b-3p 对主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction,TAC)诱导的心力衰竭小鼠能量代谢的作用及机制。**方法** 将 24 只小鼠按照随机数字表法分为假手术组(Sham 组,$n=6$)和手术组($n=18$)。手术组采用 TAC 建立心力衰竭模型;假手术组采用 TAC 相同手术方式,但不结扎主动脉弓。于 TAC 术后第 2 周再随机分为 Antagomir 组($n=6$)、Antagomir-NC 组($n=6$)及 TAC 组($n=6$),Antagomir 组、Antagomir-NC 组尾静脉分别注射 miR-208b-3p antagomir(800 μg)及 miR-208b-3p antagomir 阴性对照(800 μg)试剂,每周 2 次,连续 4 周。术后第 6 周行超声心动图评估各组小鼠心功能。HE 染色及天狼星红染色观察小鼠心肌组织病理学形态。ATP 检测试剂盒检测各组小鼠心肌组织 ATP 水平。RT-qPCR 检测小鼠心肌组织 miR-208b-3p、线粒体基因(ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6、CO1、CO2、CO3、CYTB、ATP6、ATP8)及 POLRMT、12SrRNA 的表达。双荧光素酶报告基因实验检测 miR-208b-3p 与潜在靶基因 POLRMT 的相互结合作用。Western blot 检测心肌组织 POLRMT 及 ND1、CO2、CYTB、ATP8 蛋白表达水平。**结果** 与 Sham 组相比,TAC 组小鼠心肌 miR-208b-3p 表达显著增加($P<0.05$)。超声检测结果显示,Antagomir 组小鼠心脏的射血分数、收缩与舒张功能较 TAC 组明显改善($P<0.05$)。组织切片染色提示,Antagomir 组小鼠的心肌细胞肥大、排列紊乱、心肌间质炎细胞浸润等有明显改善($P<0.05$)。与 TAC 组相比,Antagomir 组 ATP 水平明显升高($P<0.05$);POLRMT 及线粒体基因转录产物(12SrRNA 和 13 个线粒体基因编码多肽)表达量均显著升高($P<0.05$),但 SDHA、SDHB 无变化。双荧光素酶报告基因实验显示 miR-208b-3p 与 POLRMT 的 CDS 区有结合作用。Antagomir 组小鼠心肌组织 POLRMT、ND1、CO2、CYTB、ATP8 蛋白水平表达较 TAC 组显著增加($P<0.05$)。**结论** miR-208b-3p 可通过靶向 POLRMT 抑制线粒体基因的表达,加剧线粒体能量代谢障碍,并加重心力衰竭小鼠心功能不全及心室重塑。

[关键词] miR-208b;心力衰竭;能量代谢;线粒体基因;POLRMT
[中图法分类号] R341;R394.1;R541.602 [文献标志码] A

MiR-208b-3p aggravates energy metabolism disorders in mice with heart failure by inhibiting mitochondrial gene expression

ZHOU Shuangshan[1], LIU Yuan[1], YIN Ping[1], SHI Yujun[2], SU Li[1] [1]Department of Cardiovascular Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]Department of Pathology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect and mechanism of miR-208b-3p on energy metabolism in mice with heart failure (HF) induced by transverse aortic constriction (TAC). **Methods** Twenty-four mice were randomly divided into sham operation group (Sham group, $n=6$) and surgery group ($n=18$). TAC

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX0208)
[通信作者] 苏 立,E-mail:sulicq@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

was used to establish an HF model in the surgical group, the sham group received the same surgical procedures as TAC, but no ligation of the transverse aortic arc. At the second week after TAC, the surgery group was randomly divided into Antagomir group (n=6), Antagomir-NC group (n=6) and TAC group (n=6). The mice of the Antagomir group and the Antagomir -NC group were injected with miR-208b-3p antagomir reagent (800 μg) and miR-208b-3p antagomir negative control reagent (800 μg), respectively by tail vein, twice a week, for 4 consecutive weeks. Echocardiography was performed at the 6th week after surgery to evaluate the cardiac function. HE staining and Sirius red staining were used to observe myocardial histopathology in mice. ATP assay was employed to detect the ATP level in myocardial tissues. RT-qPCR was applied to detect the expression of miR-208b-3p, mitochondrial genes (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, CO1, CO2, CO3, CYTB, ATP6 and ATP8), POLRMT and 12S rRNA in myocardial tissues. Double luciferase reporter assay was conducted to detect the interaction between miR-208b-3p and the potential target gene POLRMT. Western blotting was utilized to detect the changes in the protein levels of POLRMT and ND1, CO2, CYTB and ATP8 in myocardial tissues. **Results** The expression of miR-208b-3p was significantly higher in myocardial tissues of the TAC group than the Sham group (P<0.05). Echocardiography revealed that the ejection fraction, systolic and diastolic functions were significantly improved in the Antagomir group than the TAC group (P<0.05). Pathological observation showed significantly improved cardiomyocyte hypertrophy, arrangement disorder and myocardial interstititial cell infiltration in the Antagomir group (P<0.05). Compared with the TAC group, the ATP level was significantly increased (P<0.05), the expression levels of POLRMT and mitochondrial gene transcripts (12SrRNA and 13 mitochondrial gene-coding polypeptides) were significantly increased (P<0.05), but there were no changes in SDHA and SDHB levels in the Antagomir group. Double luciferase reporter assay indicated that miR-208b-3p bound to the CDS region of POLRMT. The protein levels of POLRMT, ND1, CO2, CYTB and ATP8 were significantly increased in the myocardial tissues in the Antagomir group than the TAC group (P<0.05). **Conclusion** MiR-208b-3p inhibits the expression of mitochondrial genes by targeting POLRMT, aggravates mitochondrial energy metabolism disorder, and deteriorates cardiac insufficiency and ventricular remodeling in HF mice.

[**Key words**] miR-208b; heart failure; energy metabolism; mitochondrial gene; POLRMT

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0208). Corresponding author: SU Li, E-mail: sulicq@163.com

心力衰竭(heart failure,HF)是各种心血管疾病的终末期综合征。随着我国人口老龄化进程加快,HF 的发病率呈逐年上升的趋势。据最新的心血管病调查报告显示:我国人群慢性心力衰竭患病率为 0.9%,保守估计约有 400 万例慢性心力衰竭患者,且目前心力衰竭患者的最主要病因是高血压(56.3%)[1]。心脏是一个高耗能器官,衰竭的心脏存在能量代谢障碍,能量不足又进一步加重 HF[2]。因此纠正心脏能量代谢障碍可能成为治疗 HF 的手段之一[3]。

线粒体基因的正常表达对心脏能量代谢非常重要。线粒体基因编码的 13 个多肽参与组装氧化磷酸化相关酶的亚基,影响氧化磷酸化效率。调控线粒体基因复制与转录的蛋白全部由核基因编码,其中,线粒体 RNA 聚合酶[polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed),POLRMT]对线粒体基因表达尤为重要。POLRMT 是核基因编码的一种 RNA 聚合酶,进入线粒体后参与线粒体基因转录。研究表明 POLRMT 基因的缺失会造成严重的扩张型心肌病,并伴有严重线粒体功能障碍[4]。

微小 RNA(microRNA,miRNA)是一类长度为 19~25 个核苷酸的内源性单链非编码小 RNA,可以在转录或转录后水平调控靶基因的表达,参与多种生物学过程和疾病进程[5]。研究证实,多种 miRNA 参与调控心力衰竭的能量代谢障碍,可能成为心力衰竭的潜在干预靶点[6-8]。miR-208b-3p 来源于肌球蛋白重链基因(myosin heavy chain 7, Myh7)的内含子区域,主要表达于胎儿心脏,正常成人心脏几乎不表达[9]。已有研究发现 miR-208b-3p 参与调控心肌肥厚及心肌纤维

化,且抑制 miR-208b-3p 的表达改善了扩张型心肌病的心脏功能[10-12]。但 miRNA-208b-3p 对心肌能量代谢的调控作用尚不清楚。本研究探究 miR-208b-3p 在主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction,TAC)诱导的心力衰竭小鼠能量代谢中的作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8~10 周龄 C57BL/6 雄性小鼠由四川大学华西医院临床病理研究所提供,质量为 22~25 g,在实验开始前适应性喂养 1 周,自由进水进食,12 h/12 h 明暗交替照明,严格按照 SPF 级饲养条件进行喂养。

1.2 主要试剂

异氟烷购自深圳瑞沃德公司;miR-208b-3p antagomir 及 antagomir 阴性对照试剂购自吉玛基因公司;5SrRNA 及 miR-208b-3p RT-qPCR 引物购自广州市锐博生物科技公司;HE 染色试剂盒、天狼星红染色试剂盒购自贝索生物技术公司;增强型三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术公司;miRNeasy 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;逆转录试剂盒、SYBR QPCR 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技公司;ECL 化学发光检测试剂盒购自翌圣生物公司;POLRMT 抗体、SDHA 抗体和 VDAC1 抗体购自华安生物公司;ND1 抗体购自成都正能生物公司;CO2 抗体和 CYTB 抗体购自 Abclonal 公司;ATP8 抗体购自 Proteintech 公司。

1.3 实验模型建立及分组给药方式

1.3.1 建立主动脉弓缩窄模型 按照随机数字表法将 24 只 C57BL/6 雄性小鼠分为假手术组(Sham 组,$n=6$)和手术组($n=18$)。采用 2%异氟烷+1 L/min 氧气流量对小鼠进行诱导麻醉,将小鼠头朝向术者、仰卧位固定于恒温加热垫上,改用 1.5%异氟烷+1 L/min 氧气流量进行小鼠维持麻醉。手术区域脱毛后消毒,纵向剪开胸前皮肤约 1 cm,从胸骨上窝正中线剪开胸骨至第二肋骨,约 5 mm,牵拉两侧胸骨暴露并向两侧轻柔分离胸腺,显露出主动脉弓。将 27 G 钝针(直径 0.4 mm)平行置于主动脉弓上,使用 6-0 丝线结扎主动脉弓后缓慢拔出针头。观察到右侧颈总动脉搏动明显大于左侧颈总动脉示为结扎成功。确认无出血后,关胸,逐层缝合。Sham 组小鼠开胸后同样操作,但不结扎主动脉弓。

1.3.2 分组给药方式 于 TAC 术后第 2 周,将手术组再次随机分为 Antagomir 组($n=6$)、Antagomir-NC 组($n=6$)及 TAC 组($n=6$)。Antagomir 组、Antagomir-NC 组尾静脉分别注射 antagomir 及 antagomir 阴性对照试剂 800 μg,每周 2 次,连续 4 周。

1.4 检测方法

1.4.1 小鼠超声心动图 TAC 术后第 6 周,进行小鼠超声心动图检测。使用 2%异氟烷和 1 L/min 氧气流量对小鼠进行全身麻醉,仰卧位固定于操作台,胸部及上腹部备皮。于胸骨旁左心室短轴切面采集二维和 M 型超声图像,测量反映心功能的指标:左心室收缩末内径(left ventricular internal dimension-systole,LVIDs)、左心室舒张末内径(left ventricular internal dimension-diastole,LVIDd)、左心室后壁舒张末厚度(left ventricular posterior wall thickness in diastole,LVPWd)、射血分数(ejection fraction,EF)及左心室短轴缩短率(fraction shortening,FS)等。

1.4.2 心脏组织病理学分析 将心肌组织中段浸泡在 10%中性福尔马林 48 h,石蜡包埋后做 4 μm 厚度连续切片。脱蜡后,行 HE 染色镜下观察心肌细胞形态及其排列等,天狼星红染色观察心肌纤维化。

1.4.3 心肌组织 ATP 水平 根据试剂盒说明书进行操作,以 20 mg 心肌组织/200 μL 裂解液的比例,称取心肌组织并加入相应体积的裂解液,充分匀浆裂解后离心,将上清液置于冰上保存用于后续蛋白浓度测定。待测孔加入 100 μL ATP 工作液,室温放置 3~5 min。每孔分别加入 50 μL 样品或适当浓度的标准品,混匀后测定 RLU 值,根据标准曲线计算样品中 ATP 浓度。余下的样品使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度,以排除蛋白浓度不同对 ATP 浓度的影响。

1.4.4 RT-qPCR 检测 根据 RNA 提取试剂盒说明书,称取 10 mg 心肌组织提取含 miRNA 的总 RNA。根据 miRNA 茎环法逆转录试剂盒说明书以 5SrRNA 为内参,将 5SrRNA 和 miR-208b-3p 分别逆转录为相应的 cDNA(42 ℃,2 min;25 ℃,5 min→50 ℃,15 min→85 ℃,5 min)后再进行 qPCR 检测(95 ℃,5 min→95 ℃,10 s→60 ℃,30 s)×40 个循环。提取的总 RNA 根据 mRNA 逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA(42 ℃,2 min;37 ℃,15 min→85 ℃,5 s)后再进行 qPCR 检测(95 ℃,30 s→95 ℃,10 s→60 ℃,30 s)×40 个循环。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 对结果进行量化并统计分析。具体引物序列见表 1。

1.4.5 双荧光素酶报告基因检测 BiBiServ 网站预测到 miR-208b-3p 的种子序列与 POLRMT 的 mRNA 序列存在结合位点。合成 POLRMT 基因野生型

(WT)/突变型(MT)序列(序列见表2),将该段序列构建到 pmirGLO 载体上。合成 miR-208b-3p 的 mimics 以及 NC 对照。按照 NC-mimics+POLRMT-WT、miR-208b-3p-mimics+POLRMT-WT、NC-mimics+POLRMT-MT、miR-208b-3p-mimics+POLRMT-MT 质粒组合共转染进 293T 细胞中,转染 48 h 后测定萤火虫荧光素酶(FL)和海肾荧光素酶(RL)活性。用 FL/RL 的相对比值来判断 miR-208b-3p 与 POLRMT 基因的结合作用。

1.4.6 Western blot 检测 称取小鼠心肌组织后加入 RIPA 裂解液,充分匀浆,冰上裂解离心后,取上清。用 BCA 法测定样品蛋白浓度。根据剩余上清液体积加入 5×蛋白上样缓冲液,充分混匀后煮沸变性。使用 SDS-PAGE 凝胶电泳,再冰浴条件下将蛋白印迹转印至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 1.5 h 后,一抗 VDAC1(1∶1 000)、ND1(1∶500)、CO2(1∶1 000)、ATP8(1∶500)、CYTB(1∶500)、POLRMT(1∶500) 4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜后加入兔二抗(1∶5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜。配制 ECL 化学发光液,凝胶成像仪曝光。采用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.5 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.3 软件进行统计作图和分析,计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布的 2 组间比较采用独立样本 t 检验,不符合正态分布的 2 组间比较采用非参数检验;多组间数据比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心力衰竭小鼠心肌组织 miR-208b-3p 表达增加

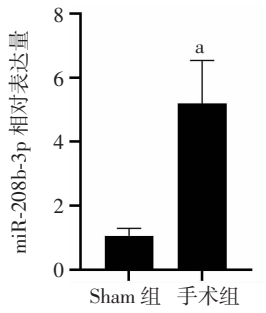
RT-qPCR 检测小鼠心肌组织 miR-208b-3p 的相对表达量。结果显示,手术组 miR-208b-3p 表达水平较 Sham 组明显增加($P<0.05$,图 1)。结果提示:在主动脉弓缩窄诱导的心力衰竭小鼠中,心肌组织的 miR-208b-3p 表达明显增加。

表 1 RT-qPCR 引物序列

引物名称	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
ND1	CCCATTCTAATCGCCATAGCCTTCC	TGCCGTATGGACCAACAATGTTAGG
ND2	GGGCATGAGGAGGACTTAACCAAAC	TGAGGTTGAGTAGAGTGAGGGATGG
ND3	CGACCCTACAAGCTCTGCAC	TGCTCATGGTAGTGGAAGTAGAAGA
ND4	ACCCCTTCATCCTTCTCTCCCTATG	ACAAGTGCTATGTGGCTAACTGAGG
ND4L	CAACCTCACCATAGCCTTCTCA	CCTTCCAGGCATAGTAATGTGGA
ND5	CCTGCAGACGAACAAGACATCC	AGGGCGAGGCTTCCGATTACTAG
ND6	TGTTGGAAGGAGGGATTGGGGTAG	CGCAAACAAAGATCACCCAGCTAC
SDHA	GGAACACTCCAAAAACAGACCT	CCACCACTGGGTATTGAGTAGAA
SDHB	AATTTGCCATTTACCGATGGGA	AGCATCCAACACCATAGGTCC
CYTB	ACAAGCCACCTTGACCCGATTC	GAGGAAGAGGAGGTGAACGATTGC
CO1	CCCACTTCGCCATCATATTCGTAGG	AGTCTGAGTAGCGTCGTGGTATTCC
CO2	GGGCACCAATGATACTGAAGCTACG	TGGCAGAACGACTCGGTTATCAAC
CO3	ACCTACCAAGGCCACCACACTC	GCAGCCTCCTAGATCATGTGTTGG
ATP6	GCTCACTTGCCCACTTCCTTCC	GCCGGACTGCTAATGCCATTGG
ATP8	AACATTCCCACTGGCACCTT	ATTGTTGGGGTAATGAATGAGGC
POLRMT	TGGGCGCAAAAGCTAGAGG	GTGAAGGGTCCAGAACTCCTG
12SrRNA	CAAACTGGGATTAGATACCCCACTAT	GAGGGTGACGGGCGGTGTGT
RPS11	AGATGAAGATGCAGAGGACCATT	GACGCTTCTCAAAGCGATTGT

表 2 双荧光素酶报告实验基因序列

基因	序列
POLRMT-WT	AAAATGGCTTCCCGCCCAACTTCATCCACTCCCTGGACTCCTCCCACATGATGCTGACCGCCCTACACTGCTACAGGAAG GGCCTGATTTTCGTCTCCGTGCACGACTGCTTCTGGACACATGCCGCTGACATCCCCACGATGAACGAGGTATGCCGCGA GCAATTCGTGCG CCTGCACAGCCAGCCCATCCTGGAAGAC
POLRMT-MT	AAAATGGCTTCCCGCCCAACTTCATCCACTCCCTGGACTCCTCCCACATGATGCTGACCGCCCTACACTGCTACAGGAAT TTTTCGATTCCTACTCCCGTGCACGACTGCTTCTGGACACATGCCGCTGACATCCCCACGATGAACGAGGTATGCCGCGA GCAATTCGTGCGCCTGCACAGCCAGCCCATCCTGGAAGAC



a:$P<0.05$,与 Sham 组比较

图 1 RT-qPCR 检测 miR-208b-3p 在小鼠心肌组织中的表达

2.2 体内抑制 miR-208b-3p 改善 TAC 诱导的小鼠心脏功能障碍

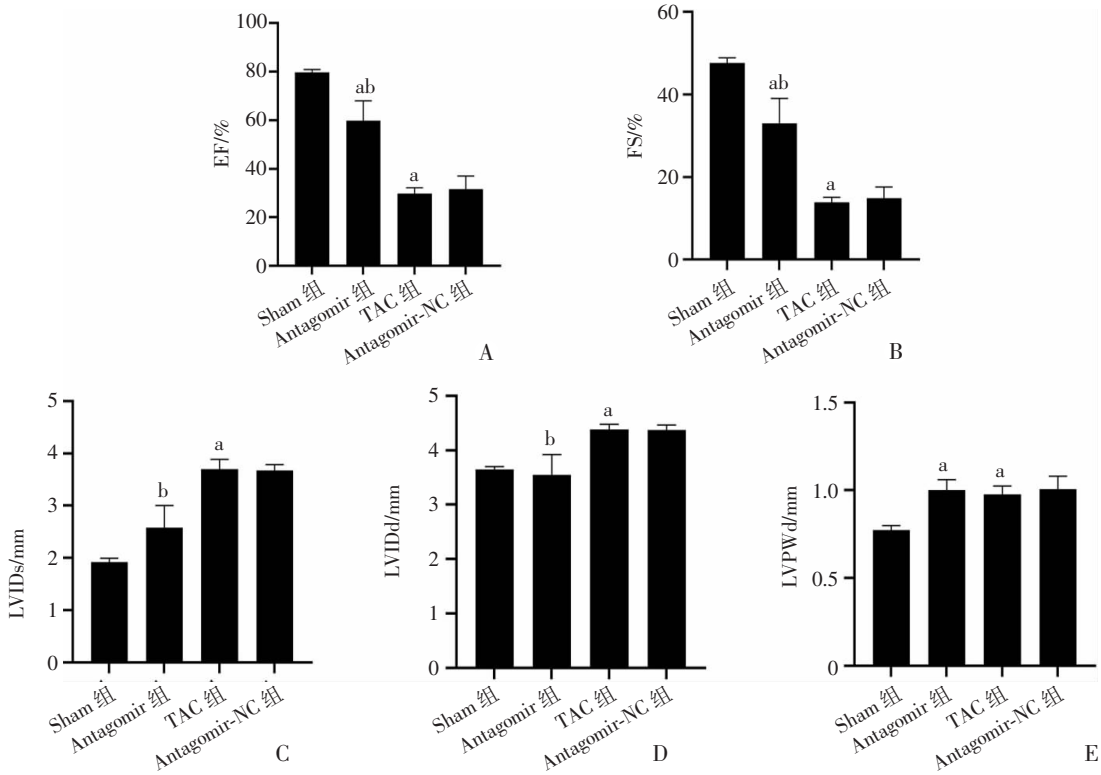
尾静脉给药结束后,于 TAC 术后第 6 周行小鼠超声心动图检测。结果提示:与 Sham 组小鼠比较,TAC 组小鼠的 EF、FS 明显下降,LVIDs、LVIDd、LVPWd 明显增大($P<0.05$, 图 2),提示 TAC 手术成功并导致小鼠心功能明显恶化;而与 TAC 组比较,Antagomir 组的 EF、FS明显升高($P<0.05$,图2A、B),LVIDs、LVIDd明显减小($P<0.05$, 图 2C、D),但 LVPWd 无明显变化(图 2E);Antagomir-NC 组与 TAC 组比较差异无统计学意义。提示体内抑制 miR-208b-3p 可以改善 TAC 诱导的小鼠心脏功能障碍。

2.3 体内抑制 miR-208b-3p 改善 TAC 诱导的小鼠心室重塑

显微镜下组织切片染色发现:TAC 组小鼠表现出明显心肌细胞增大、排列紊乱、炎细胞浸润及纤维化;而对比 TAC 组,Antagomir 组小鼠的心肌细胞排列紊乱及炎细胞浸润明显减轻,但仍有纤维化改变(图 3)。提示体内抑制 miR-208b-3p 部分改善了 TAC 诱导的小鼠心室重塑。

2.4 体内抑制 miR-208b-3p 增加小鼠心肌组织 ATP 水平

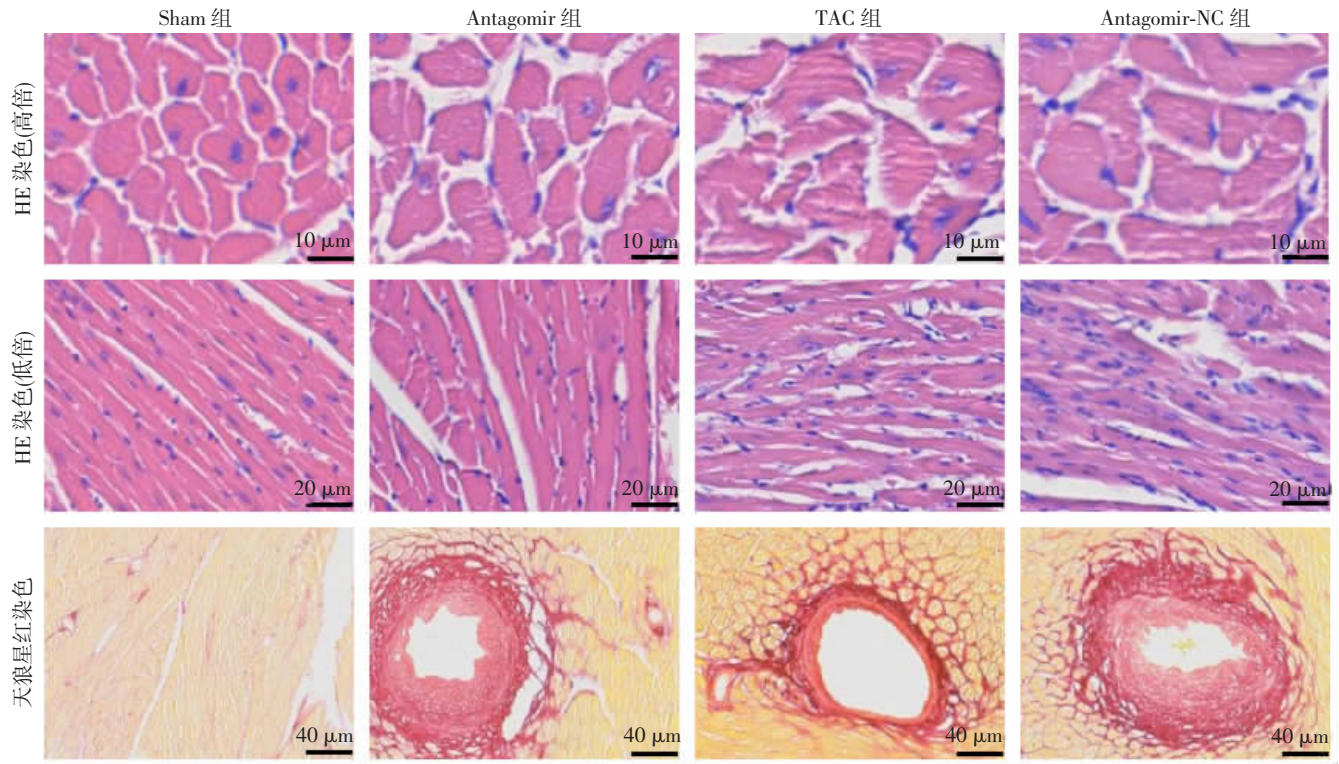
TAC 组小鼠心肌组织 ATP 水平较 Sham 组明显降低,且与 TAC 组小鼠比较,Antagomir 组小鼠心肌组织的 ATP 水平显著上升($P<0.05$,图 4)。说明体内抑制 miR-208b-3p 改善了 TAC 诱导的小鼠心肌能量代谢障碍。



a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 TAC 组比较

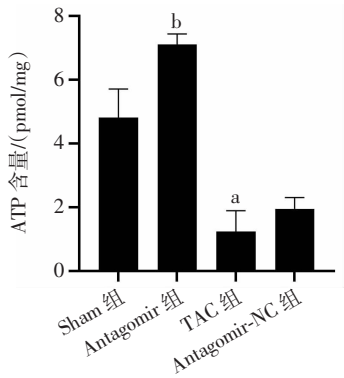
A:各组小鼠左心室射血分数(EF)比较;B:各组小鼠左心室短轴缩短率(FS)比较;C:各组小鼠左心室收缩末内径(LVIDs)比较;D:各组小鼠左心室舒张末内径(LVIDd)比较;E:各组小鼠左心室后壁舒张末厚度(LVPWd)比较

图 2 体内抑制 miR-208b-3p 对心力衰竭小鼠心脏功能的影响



HE 染色高倍显示 Antagomir 组小鼠心肌细胞肥大和排列紊乱较 TAC 组减轻,低倍显示 Antagomir 组小鼠炎细胞浸润较 TAC 组减轻;天狼星红染色显示 Antagomir 组小鼠心肌及 TAC 组均出现血管纤维化

图 3 各组小鼠心脏组织病理学观察



a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 TAC 组比较

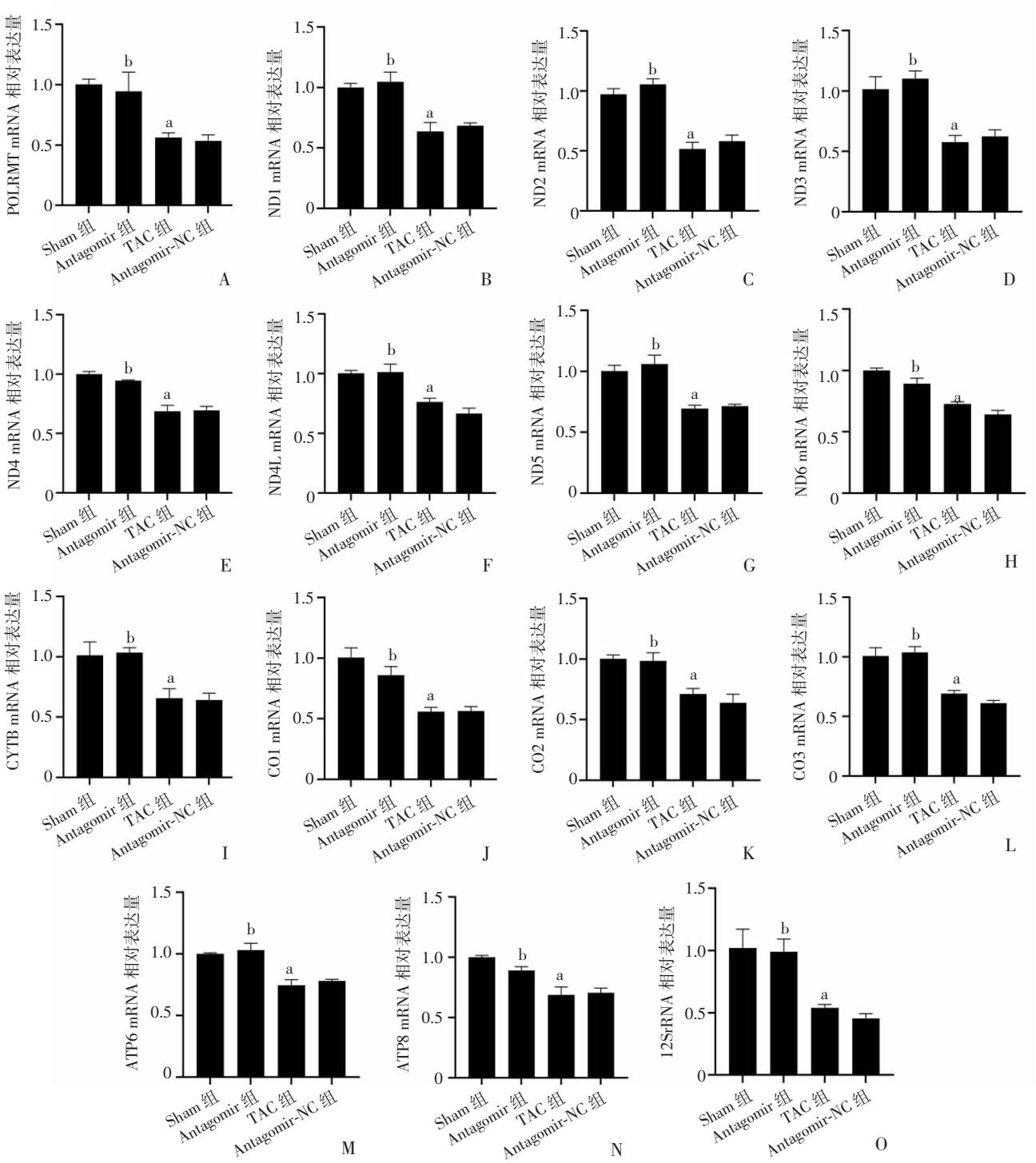
图 4 各组小鼠心肌组织 ATP 含量

2.5 体内抑制 miR-208b-3p 增加小鼠心肌线粒体转录相关产物的表达

RT-qPCR 检测分析线粒体基因转录产物发现:TAC 组小鼠线粒体基因的转录产物水平降低(13 个线粒体基因编码的多肽及线粒体基因编码的 12SrRNA 等),与线粒体转录相关的POLRMT基因的mRNA水平也明显降低;而与 TAC 组小鼠比较,Antagomir 组小鼠心肌组织的线粒体转录产物及 POLRMT 基因 mRNA 水平均出现明显升高($P<0.05$,图 5),但同样与氧化磷酸化有关的线粒体复合物Ⅱ亚基的 mRNA 水平却无变化(图 6)。说明体内抑制 miR-208b-3p 在线粒体转录水平促进了线粒体基因的表达。

2.6 miR-208b-3p 靶向 POLRMT 发挥抑制线粒体转录的作用

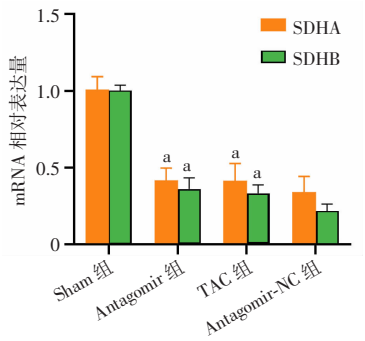
通过对前述 RT-qPCR 和 Western blot 结果分析提示,miR-208b-3p 可能通过与 POLRMT 基因作用参与线粒体基因表达的调控。BiBiServ 网站预测到 miR-208b-3p 与小鼠 POLRMT 基因的蛋白翻译区(CDS 区)存在结合位点(图 7A)。双荧光素酶报告基因实验结果提示:miR-208b-3p mimics 与 POLRMT 基因野生型(WT)反应后导致荧光素酶活性降低,而 miR-208b-3p mimics 与 POLRMT 基因突变型(MT)反应后荧光素酶活性无变化(图 7B),说明 miR-208b-3p 与小鼠 POLRMT 基因 CDS 区有特异的结合作用。



a:$P<0.05$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 TAC 组比较

A:POLRMT 的 mRNA 相对表达量;B~H:线粒体呼吸链复合物Ⅰ亚基(ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6)的 mRNA 相对表达量;I:线粒体呼吸链复合物Ⅲ亚基(CYTB)的 mRNA 相对表达量;J~L:线粒体呼吸链复合物Ⅳ亚基(CO1、CO2、CO3)的 mRNA 相对表达量;M、N:线粒体呼吸链复合物Ⅴ亚基(ATP6、ATP8)的 mRNA 相对表达量;O:线粒体基因转录产物 12SrRNA 的相对表达量

图 5 RT-qPCR 检测各组 POLRMT 基因的 mRNA 水平及线粒体基因转录产物水平

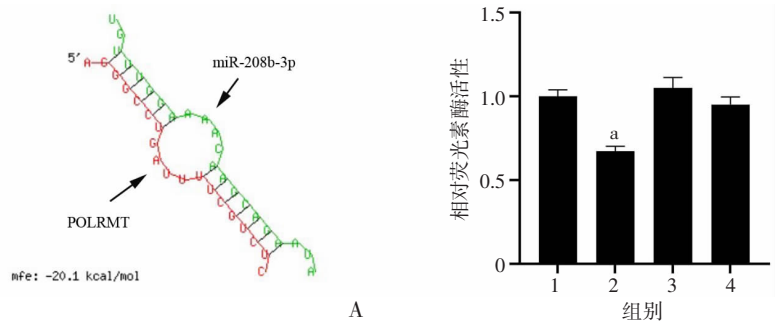


a：$P<0.05$，与 Sham 组比较

图 6　RT-qPCR 检测各组线粒体呼吸链复合物Ⅱ亚基（SDHA、SDHB）mRNA 水平

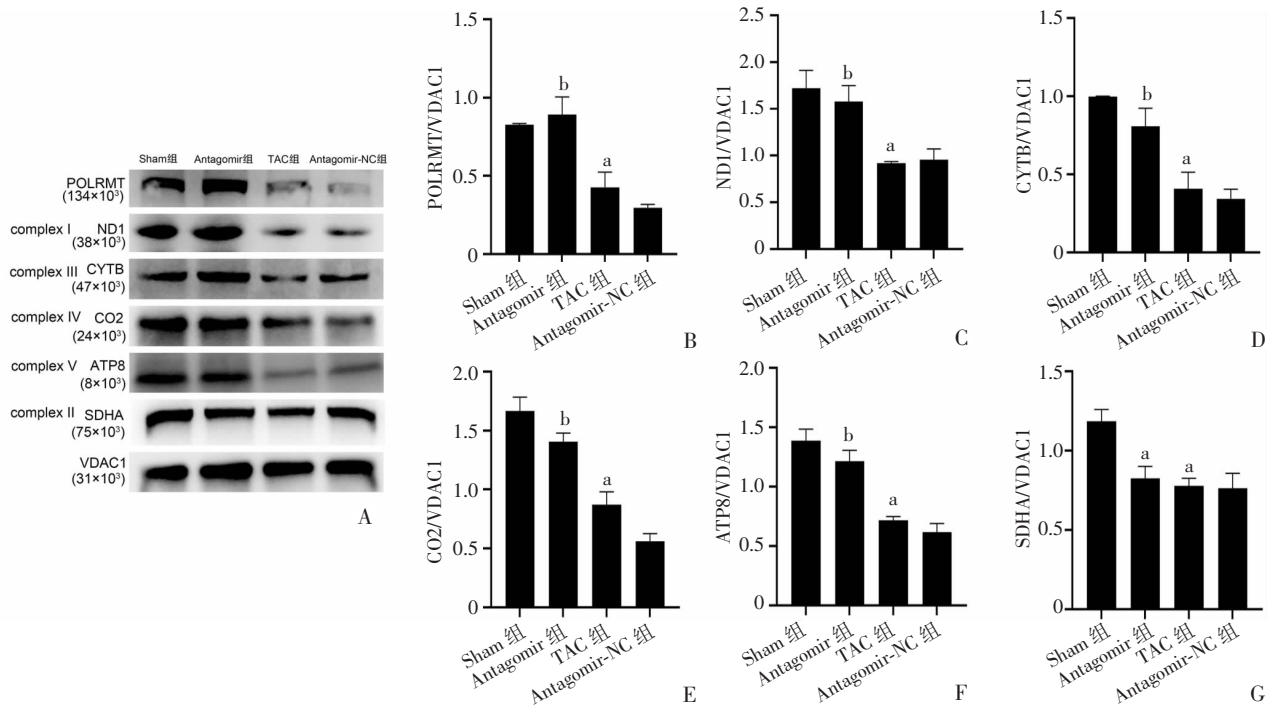
2.7　体内抑制 miR-208b-3p 增加小鼠心肌组织线粒体呼吸链复合体相关蛋白的表达

Western blot 实验表明，TAC 组小鼠心肌组织的线粒体呼吸链复合物Ⅰ～Ⅴ（complex Ⅰ～Ⅴ）相关蛋白的表达水平均出现不同程度降低，但 Antagomir 组小鼠线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ相关蛋白表达水平较 TAC 组明显增加，而线粒体呼吸链复合物Ⅱ却无变化（图 8）。结果说明体内抑制 miR-208b-3p 增加了线粒体呼吸链复合物Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ的相关蛋白表达水平，从而改善线粒体能量代谢障碍。



A：miR-208b-3p 种子序列与 POLRMT 的 mRNA 序列存在结合位点；B：双荧光素酶基因报告实验结果　1：NC-mimics + POLRMT-WT；2：miR-208b-3p-mimics + POLRMT-WT；3：NC-mimics + POLRMT-MT；4：miR-208b-3p-mimics + POLRMT-MT；a：$P<0.05$，与 NC-mimics+POLRMT-WT 组比较

图 7　miR-208b-3p 靶向抑制 POLRMT 基因表达



a：$P<0.05$，与 Sham 组比较；b：$P<0.05$，与 TAC 组比较

A：Western blot 检测结果；B：POLRMT 蛋白半定量分析；C：ND1 蛋白半定量分析；D：CYTB 蛋白半定量分析；E：CO2 蛋白半定量分析；F：ATP8 蛋白半定量分析；G：SDHA 蛋白半定量分析

图 8　Western blot 检测各组小鼠心肌组织线粒体呼吸链复合体相关蛋白及 POLRMT 蛋白表达

3 讨论

以往研究发现 miR-208b-3p 在心肌肥大阶段即随着 Myh7 的激活而表达[13],本研究证实 miR-208b-3p 在主动脉弓缩窄诱导的心力衰竭小鼠心肌中的水平仍然显著升高。那么,miR-208b-3p 的表达对心力衰竭的发生发展的作用又是什么呢? 本研究发现,通过尾静脉注射 miR-208b-3p 拮抗剂能够改善主动脉缩窄诱导的小鼠的心脏功能障碍及心室重塑,并且这种改善作用可能与增强线粒体基因表达纠正线粒体能量代谢障碍有关。

已有大量研究证实 miRNA 参与调控心血管疾病的发生发展,近年来也发现了部分 miRNA 可以直接调控线粒体能量代谢相关蛋白表达[14-16]。本研究发现,TAC 组小鼠心肌的线粒体能量代谢相关蛋白的 mRNA 水平均降低,包括全部线粒体呼吸链复合物Ⅰ~Ⅴ的相关亚基,且相关蛋白水平同样降低;而通过体内抑制 miR-208b-3p 后,仅线粒体基因编码的 13 个蛋白的 mRNA 水平升高,核基因编码的线粒体内相关蛋白无变化,且心肌 ATP 含量增加,说明 miR-208b-3p 拮抗剂通过增强线粒体基因表达而非核基因编码的线粒体蛋白改善了线粒体能量代谢障碍,从而对心肌起到了保护作用。而在急性心肌损伤的心肌缺血再灌注损伤模型中,抑制 miR-208b-3p 后,也出现了心肌缺血再灌注损伤程度减轻的现象[17],与本研究的抑制 miR-208b-3p 对心肌起保护作用的结论相一致。

然而,本研究于 TAC 术后第 2 周开始通过尾静脉注射 miR-208b-3p 拮抗剂干预 miR-208b-3p 表达,通过 4 周的长期干预,出现改善心功能的作用;但是,对于已经出现慢性心功能障碍后,再通过抑制 miR-208b-3p 能否起到改善线粒体能量代谢及进一步延缓或纠正心功能障碍的作用尚不清楚,还需要进一步的探索,为以抑制 miR-208b-3p 为潜在干预靶点的慢性心衰治疗研究提供更完善的科学资料。

本研究证实 miR-208b-3p 通过靶向 POLRMT 发挥抑制线粒体基因转录的作用。首先,功能实验结果显示,体内抑制 miR-208b-3p 后,线粒体基因的转录产物水平均出现升高;通过筛查与线粒体基因转录相关的基因发现 POLRMT 的蛋白水平明显增加,且通过 POLRMT 序列对比发现其与 miR-208b-3p 种子序列存在可能结合的位点。进一步双荧光素酶检测实验结果显示 miR-208b-3p 能特异性结合 POLRMT mRNA 的 CDS 区,从而导致 POLRMT 的 mRNA 水平降低并降低其蛋白表达。线粒体基因的正常表达对于线粒体能量代谢功能的维持非常重要。线粒体基因转录过程由 POLRMT 及线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factors A, TFAM)和线粒体转录因子 B2(mitochondrial transcription factors B2, TFB2M)协作完成,且 POLRMT 是这一过程的关键参与者;已有研究发现,在 POLRMT 缺失的小鼠心脏中,线粒体基因的转录产物均减少,明显降低线粒体基因表达效率[4]。这与本研究结果一致,TAC 组小鼠心脏 POLRMT 蛋白表达降低,线粒体基因转录产物水平降低,对应线粒体呼吸链复合物亚基蛋白表达降低,氧化磷酸化效率降低,生成 ATP 减少;而通过抑制 miR-208b-3p 后,POLRMT 蛋白表达增加,线粒体基因转录产物水平增加,对应线粒体呼吸链复合物亚基表达量增加,ATP 生成增多。有研究表明,在细胞实验中,POLRMT 抑制剂对线粒体转录及氧化磷酸化具有剂量依赖效应[18]。然而,miR-208b-3p 也可以看作是 POLRMT 抑制剂的一种,至于多高的 miR-208b-3p 水平会显著影响 POLRMT 的表达及多大的 miR-208b-3p 拮抗剂剂量会提高 POLRMT 蛋白表达并增强线粒体能量代谢尚不清楚,还需要通过更大样本量来进行研究。或许这也说明了高血压所致的心肌肥厚有一部分最终发展成慢性心衰,而一部分可能始终停留在心肌肥厚阶段,这一现象可能与个体的 miR-208b-3p 水平有一定关系,同样需要更多研究去证实。

综上所述,本研究结果证实,在动物水平,体内抑制 miR-208b-3p 明显改善慢性心衰小鼠的心脏功能、心肌重塑及能量代谢障碍,其中改善心肌能量代谢障碍是通过靶向 POLRMT 增强线粒体基因表达实现的,至于是否还存在其他调控能量代谢的机制,还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要[J]. 中国循环杂志, 2023, 38(6): 583-612. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2023.06.001.
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2022: an updated summary[J]. Chin Circ J, 2023, 38(6): 583-612. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2023.06.001.

[2] LOPASCHUK G D, KARWI Q G, TIAN R, *et al*. Cardiac energy metabolism in heart failure[J]. Circ Res, 2021, 128(10): 1487-1513. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318241.

[3] PIQUEREAU J, BOITARD S E, VENTURA-CLAPIER R,

et al. Metabolic therapy of heart failure: is there a future for B vitamins? [J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 30. DOI: 10.3390/ijms23010030.

[4] KUHL I, MIRANDA M, POSSE V, *et al*. POLRMT regulates the switch between replication primer formation and gene expression of mammalian mtDNA[J]. Sci Adv, 2016, 2(8): e1600963. DOI: 10.1126/sciadv.1600963.

[5] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, *et al*. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 5451-5465. DOI: 10.1002/jcp.27486.

[6] ZHAO P, WANG Y K, ZHANG L P, *et al*. Mechanism of long non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in lipid metabolism and inflammation in heart failure[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(3): 5. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4838.

[7] HEGGERMONT W A, PAPAGEORGIOU A P, QUAEGEBEUR A, *et al*. Inhibition of microRNA-146a and overexpression of its target dihydrolipoyl succinyltransferase protect against pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction[J]. Circulation, 2017, 136(8): 747-761. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024171.

[8] LIN B, FENG D G, XU J. MicroRNA-665 silencing improves cardiac function in rats with heart failure through activation of the cAMP signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 13169-13181. DOI: 10.1002/jcp.27987.

[9] ZHAO X, WANG Y, SUN X L. The functions of microRNA-208 in the heart[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2020, 160: 108004. DOI: 10.1016/j.diabres.2020.108004.

[10] COULIS G, LONDHE A D, SAGABALA R S, *et al*. Protein tyrosine phosphatase 1B regulates miR-208b-argonaute 2 association and thyroid hormone responsiveness in cardiac hypertrophy[J]. Sci Signal, 2022, 15(730): eabn6875. DOI: 10.1126/scisignal.abn6875.

[11] 张梦珍, 翟琳, 郭林林, 等. 肌球蛋白重链7基因来源的miR-208b-3p促进心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2023, 44(4): 642-650. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20230421.002.

ZHANG M Z, ZHAI L, GUO L L, *et al*. Myosin heavy chain 7 gene-derived miRNA-208b-3p enhances the fibrosis-related gene expression in cardiac fibroblasts[J]. J Sun Yat Sen Univ Med Sci, 2023, 44(4): 642-650. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20230421.002.

[12] ZHOU Q F, SCHOTTERL S, BACKES D, *et al*. Inhibition of miR-208b improves cardiac function in titin-based dilated cardiomyopathy[J]. Int J Cardiol, 2017, 230: 634-641. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.12.171.

[13] CALLIS T E, PANDYA K, SEOK H Y, *et al*. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2772-2786. DOI: 10.1172/JCI36154.

[14] HE R, DING C, YIN P, *et al*. MiR-1a-3p mitigates isoproterenol-induced heart failure by enhancing the expression of mitochondrial ND1 and COX1[J]. Exp Cell Res, 2019, 378(1): 87-97. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.03.012.

[15] DAS S, BEDJA D, CAMPBELL N, *et al*. MiR-181c regulates the mitochondrial genome, bioenergetics, and propensity for heart failure *in vivo*[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96820. DOI: 10.1371/journal.pone.0096820.

[16] YAN K W, AN T, ZHAI M, *et al*. Mitochondrial miR-762 regulates apoptosis and myocardial infarction by impairing ND2[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 500. DOI: 10.1038/s41419-019-1734-7.

[17] 温淑珍,王娜娜,徐晓明,等. 沉默miR-208b-3p对心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(19): 4332-4336. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2021.19.054.

WEN S Z, WANG N N, XU X M, *et al*. Protective effect and mechanism of silencing miR-208b-3p on ischemia-reperfusion injury of cardiomyocytes[J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(19): 4332-4336. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.19.054.

[18] BONEKAMP N A, PETER B, HILLEN H S, *et al*. Small-molecule inhibitors of human mitochondrial DNA transcription[J]. Nature, 2020, 588(7839): 712-716. DOI: 10.1038/s41586-020-03048-z.

(**收稿**:2024-02-27;**修回**:2024-04-14)

(编辑 汪勤俭)