

microRNA-378b对心脏成纤维细胞纤维化水平的影响及机制研究

姜敏[#], 李姗姗[#], 王春, 郑闻, 张伟, 邓慧, 戴阳, 顾寰宇^{*}

南京大学医学院附属鼓楼医院 老年科, 江苏 南京 210008

摘要: 目的 研究microRNA-378b (miR-378b)对心脏成纤维细胞的纤维化水平的影响及分子机制。方法 小鼠行慢性心肌梗死手术构建体内心肌纤维化模型, 利用转化生长因子- β (TGF- β) 诱导原代心脏成纤维细胞发生纤维化以构建体外心肌纤维化模型; 实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 法检测2种纤维化模型中miR-378b的表达水平; Western blotting法检测miR-378b模拟物和抑制物对心脏成纤维细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA, 心肌纤维化特异性指标)表达量的影响; TargetScan、miRDB和miRWalk软件预测miR-378b的下游靶基因, 双荧光素酶实验验证miR-378b与生长相关蛋白43(GAP43)的靶向关系; Western blotting法检测miR-378b模拟物和抑制物对心脏成纤维细胞GAP43表达的影响; Western blotting法检测体内和体外2种纤维化模型中GAP43的蛋白水平。结果 小鼠心肌纤维化模型组miR-378b表达量较假手术组显著降低($P < 0.01$), 心脏成纤维细胞TGF- β 处理组miR-378b表达量较对照组显著降低($P < 0.001$)。在基础水平和TGF- β 处理后, 与对照模拟物组比较, miR-378b模拟物显著降低细胞的 α -SMA蛋白水平($P < 0.05$); 在基础水平, 与对照抑制物组比较, miR-378b抑制物可显著升高细胞的 α -SMA蛋白水平($P < 0.05$); 但在TGF- β 处理的细胞中, miR-378b抑制物不能进一步增加 α -SMA蛋白表达量。GAP43是miR-378b直接作用的下游靶基因, 与对照组比较, miR-378b可负调控心脏成纤维细胞GAP43的蛋白表达水平($P < 0.01$)。心肌纤维化模型组小鼠心肌GAP43蛋白表达量较假手术组显著升高($P < 0.01$), 心脏成纤维细胞TGF- β 处理组GAP43蛋白表达量较对照组显著升高($P < 0.001$)。结论 miR-378b可抑制心脏成纤维细胞纤维化, 该功能可能通过抑制其下游靶基因GAP43发挥作用。

关键词: 心脏成纤维细胞; 心肌纤维化; microRNA-378b; GAP43; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R542.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 02-0370-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.02.018

Effect of microRNA-378b on cardiac fibroblasts fibrosis and its mechanism

JIANG Min, LI Shanshan, WANG Chun, ZHENG Wen, ZHANG Wei, DENG Hui, DAI Yang, GU Huanyu

Department of Geriatrics, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China

Abstract: Objective To investigate the effect of microRNA-378b (miR-378b) on the fibrosis level of cardiac fibroblasts and its molecular mechanism. **Methods** The model of myocardial fibrosis *in vivo* was established by operation of chronic myocardial infarction in mice, transforming growth factor- β (TGF- β) was used to treat cardiac fibroblasts to construct myocardial fibrosis model *in vitro*. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of miR-378b in two fibrosis models. The effects of miR-378b mimics and inhibitors on α -smooth muscle actin (α -SMA, a specific indicator of myocardial fibrosis) expression of cardiac fibroblasts were detected by Western blotting. The downstream target genes of miR-378b were predicted by three softwares (TargetScan, miRDB, and miRWalk), double luciferase experiment verified the targeting relationship between miR-378b and GAP43. Western blotting was used to detect the effects of miR-378b mimics and inhibitors on GAP43 in cardiac fibroblasts. The protein levels of GAP43 in two fibrosis models were detected by Western blotting. **Results** The expression of miR-378b in the mouse myocardial fibrosis model group was significantly decreased compared with the sham operation group ($P < 0.01$), and the expression of miR-378b in the cardiac fibroblast TGF- β treatment group was significantly decreased compared with the control group ($P < 0.001$). After treatment with TGF- β and in basal level, miR-378b mimics significantly decreased α -SMA

收稿日期: 2022-11-30

基金项目: 南京市卫生科技发展专项资金项目计划(YKK19052)

[#]共同第一作者: 姜敏, 从事心肌纤维化相关研究。E-mail: jmin1212@hotmail.com

李姗姗, 从事心肌纤维化相关研究。E-mail: shshli133@163.com

^{*}通信作者: 顾寰宇, 从事心肌纤维化相关研究。E-mail: guhuanyu1989@sina.com

protein level compared with control mimics group ($P < 0.05$). At the basal level, compared with the control group, miR-378b inhibitors significantly increased the α -SMA protein level of cells ($P < 0.05$). However, miR-378b inhibitors did not further increase α -SMA protein expression in TGF- β -treated cells. GAP43 was a downstream target gene directly affected by miR-378b. Compared with the control group, miR-378b can negatively regulate the protein expression level of GAP43 in cardiac fibroblasts ($P < 0.01$). Compared with sham operation group, the expression level of GAP43 protein in myocardial fibrosis model group was significantly increased ($P < 0.01$), and that in cardiac fibroblast TGF- β treatment group was significantly increased compared with control group ($P < 0.001$). **Conclusion** miR-378b can inhibit fibrosis level of cardiac fibroblasts, which may play a role through its downstream target gene GAP43.

Key words: cardiac fibroblast; cardiac fibrosis; microRNA-378b; GAP43; α -smooth muscle actin

在心脏中发挥泵血功能的心肌细胞只占不到1/3,而非心肌细胞中大多数为心脏成纤维细胞,该细胞占心脏细胞总数的一半以上,它可以分泌胶原和生长因子等,对稳定心脏结构及正常生理功能有极为重要的作用^[1]。心脏组织在炎症、缺氧、代谢紊乱等病理性刺激下,心脏成纤维细胞增殖能力增加,并激活分化为肌成纤维细胞,特异性高表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),继而分泌大量胶原蛋白,导致细胞外基质胶原含量增加、比例失调^[2],形成疤痕,发生心肌重塑,这一过程称之为心肌纤维化^[3]。心肌纤维化参与大部分慢性心血管疾病的过程,例如心肌梗死、高血压、扩张型心肌病等,最终发展为心力衰竭,造成患者生活质量下降、死亡风险增加^[4]。所以控制心肌纤维化对改善心血管疾病进程很关键,其中抑制心脏成纤维细胞的异常增殖分化至关重要。

心肌纤维化的发生机制错综复杂,至今仍未阐明,目前主流机制有:肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统可加重氧化应激,引起炎症反应,刺激成纤维细胞合成胶原^[5];细胞因子包括转化生长因子- β (TGF- β)、结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)等的互相作用^[6-8];心脏成纤维细胞中 Ca^{2+} 信号转导机制^[9];微小RNA(microRNA)的表观遗传调控、转录后调控等^[10]。

microRNA是由20个左右核苷酸组成的单链非编码小分子RNA,其5'末端通过碱基配对与下游靶基因的3'-UTR端结合,在转录后水平抑制靶基因的表达^[11]。microRNA已被证实参与机体多种生理及病理过程,包括增殖、分化、衰老、凋亡等^[12]。另外,很多microRNA也被证实参与调控心肌纤维化的发生发展过程,例如:miR-21可抑制心脏成纤维细胞的增殖^[13]、miR-663通过与转化生长因子- β 1(TGF- β 1)相互作用来抑制心肌纤维化^[14]、miR-409-3p经由GPD1促进心肌纤维化的发生^[15]。

microRNA-378b(miR-378b)属于miR-378家族成员,既往研究结果表明它是骨肉瘤发生发展过程中的重要因子^[16],可抑制细胞的增殖、迁移和角质细胞分化^[17]。miR-378b还可抑制胶质瘤细胞增殖和糖酵解^[18]。纤维化相关研究提示miR-378可抑制肝星状细胞激活和肝脏纤维化^[19]。但miR-378和心肌纤维化的关系尚无文献报道。

小鼠慢性心肌梗死手术常用在心肌纤维化相关研究中,手术中冠状动脉左前降支根部被结扎,导致心脏前壁广泛缺血,3周后会形成较明显的纤维化。在本课题组前期研究中,microRNA测序结果表明,心肌梗死手术模型组小鼠的心脏组织中miR-378b水平较假手术组明显降低^[15],提示miR-378b可能参与了心肌纤维化。本研究通过小鼠心肌梗死手术模型和体外TGF- β 诱导心脏成纤维细胞的心肌纤维化模型,研究miR-378b对心肌纤维化的影响,并探讨其可能的作用机制,以期探索心肌纤维化的潜在治疗靶点提供新思路。

1 材料

1.1 实验动物

8周龄健康雄性SPF级C57BL/6小鼠14只,体质量25~30g,购于杭州医学院,实验动物生产许可证号SCXK(浙)2019-0059,自由饮水进食,饲喂全价营养颗粒饲料,适应性饲养7d后进行后续实验。出生3d内的雄性健康SPF级SD大鼠100只,购于江苏华创信诺医药科技有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2020-0009。本研究已通过南京鼓楼医院实验动物伦理委员会审查(批准号2021AE01062)。

1.2 细胞

原代心脏成纤维细胞,均从出生3d内的SD大鼠心脏组织分离而来。75%乙醇消毒乳大鼠胸腹部后剪开胸腔,用镊子夹出心室,预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3遍后剪碎至匀浆状;再将心室组织收集至30mL消化液(40%II型胶原酶+60%胰

酶)中,置于37℃、110 r·min⁻¹恒温摇床,15 min后加入马血清终止消化;吸出上清液,沉淀继续加入新鲜消化液,重复上一步骤,直到心室组织消化成白色絮状物;收集所有上清液,1 000 r·min⁻¹常温离心5 min后弃上清,用心脏成纤维细胞培养液[DMEM+10%胎牛血清(FBS)+1%双抗]吹打重悬,细胞悬液铺至细胞培养皿内,2 h后吸去上清,贴壁细胞即为心脏成纤维细胞^[15]。

293T细胞,南京鼓楼医院科研部实验室保存。

1.3 主要试剂

水合氯醛购于生工生物工程(上海)股份有限公司;TGF-β1购于美国Peprotech公司;miR-378b模拟物/抑制物、对照模拟物/抑制物、Bulge-loopTM miRNA qRT-PCR Primer Sets(microRNA引物试剂盒,内参为5S)购于广州市锐博生物科技有限公司;lipofectamine 2000(lipo 2000)购于美国Invitrogen公司;II型胶原酶、胰酶购于广州BioFroxx公司;DMEM、FBS、双抗购于美国Gibco公司;马血清购于以色列BI公司;RNA提取、逆转录试剂盒及SYBR Green qPCR试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;蛋白裂解液RIPA、PMSF购于南京凯基生物科技发展有限公司;BCA蛋白检测试剂盒购于日本TaKaRa公司;Western blotting实验中需要的上样缓冲液及蛋白标记物购于美国Thermo Fisher公司;一抗抗体[α-SMA、生长相关蛋白43(GAP43)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)]及二抗抗体Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)购于武汉Abclonal公司;ECL液购于上海Tanon公司;GAP43野生型/突变型双荧光素酶报告质粒购于通用生物(安徽)股份有限公司;双荧光检测试剂盒购于美国Promega公司。

1.4 主要仪器

恒温水浴锅、常温离心机、恒温摇床,上海力辰仪器科技有限公司;SW-CJ-2FD超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;细胞培养箱、酶标仪、荧光定量PCR仪,美国Thermo Fisher公司;蛋白免疫印迹电泳仪、转膜仪、曝光成像系统,美国Bio-Rad公司;RNA浓度检测仪,德国IMPLEN公司;脱色摇床,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;低温冷冻离心机,美国Sigma公司。

2 方法

2.1 体外心肌纤维化模型建立及miR-378b模拟物、抑制物处理

在无血清条件下,用20 ng·min⁻¹的TGF-β处理

心脏成纤维细胞48 h以构建体外心肌纤维化模型^[15]。分别在基础(不添加TGF-β)和TGF-β刺激的情况下,用miR-378b模拟物、抑制物处理。miR-378b(或对照)模拟物转染液配制(1 mL体系):5 μL模拟物+4 μL lipo 2000+1 mL无血清培养液;miR-378b(或对照)抑制物转染液配制(1 mL体系):10 μL抑制物+4 μL lipo 2000+1 mL无血清培养液,模拟物/抑制物转染液处理细胞48 h。

2.2 小鼠心肌梗死手术

小鼠用5%水合氯醛麻醉后仰卧位固定;气管切开插管,连接呼吸机;暴露心脏,用6-0缝合线结扎冠状动脉左前降支根部;缝合皮肤,呼吸稳定后拔除气管插管,等待苏醒。假手术组的小鼠只打开胸腔,不结扎血管,其他步骤相同。术后常规饲养3周以构建慢性心肌梗死模型^[20]。3周后,用5%水合氯醛麻醉小鼠,暴露胸腔,取出心脏剪取心室留作后续实验用。

2.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)实验

利用Trizol法RNA提取试剂盒获得细胞或心脏组织总RNA,NanoPhotometer测定RNA浓度,根据试剂盒说明书反转录;配制microRNA的qPCR体系。qRT-PCR反应过程:95℃、20 s,1个循环;95℃、10 s,60℃、20 s,72℃、10 s,40个循环。数据分析采用2^{-ΔΔCt}法。

2.4 Western blotting实验

RIPA+PMSF混合液冰上裂解细胞或打碎的心脏组织30 min,4℃、12 000×g离心15 min,吸取上清为总蛋白溶液;BCA试剂盒测定蛋白浓度,调定每个样本的蛋白浓度相同;4体积蛋白溶液+1体积5×上样缓冲液混匀,100℃变性10 min。

将蛋白样本加入10% SDS-PAGE胶的上样孔中进行蛋白分离,设置电泳仪100 V电泳1.5 h;设置转膜仪300 mA恒流转膜1~2 h,将蛋白转印至PVDF膜上;5%脱脂牛奶封闭2 h;一抗(α-SMA、GAP43、GAPDH)孵育过夜;TBST洗3遍,二抗孵育2 h,再TBST洗3遍;滴加ECL液,成像系统曝光观察条带。蛋白条带用Image J软件进行定量分析。

2.5 生物信息学分析

预测miR-378b的下游靶基因:取3个预测软件TargetScan (<https://www.targetscan.org>)、miRDB (<http://mirdb.org/>)和miRWalk (<http://129.206.7.150/>)的并集,并集结果共32个:Extl2、Eml5、Jund、Klhl31、Gspt1、Klf10、Mbl2、Tsen2、Timm44、Acly、Nrip1、Vmp1、Nefh、Tnpo3、Bsdcl1、

Scn3a、Hdgp、Rab6b、Mpdz、Zdhhc9、Kcnc2、Nsd1、Morn2、Pdyn、Srxn1、Swi5、Coll15a1、My11、Fat2、Gap43、Spopl、Cdh2。从并集中再筛选可能和心肌纤维化有关的下游靶基因GAP43进行验证。

2.6 双荧光素酶实验

委托南京腾科生物有限公司构建野生型和突变型的GAP43-UTR双荧光报告质粒(GAP43-WT和GAP43-MUT);GAP43-WT、GAP43-MUT分别和miR-378b(或对照)模拟物转染(步骤同“2.1”项)293T细胞;培养48h,根据双荧光素酶报告基因试剂盒的步骤检测荧光素酶活性。

2.7 数据统计

计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组比较用独立样本 t 检验,4组比较用单因素方差分析,使用的统计学软件为SPSS 20.0和GraphPad Prism 5。

3 结果

3.1 体内、体外心肌纤维化模型中miR-378b的表达量

本团队既往报道的研究^[15]显示,小鼠行慢性心肌梗死手术构建心肌纤维化模型,microRNA测序结果表明miR-378b表达水平在心梗组织中显著降低。本研究用qRT-PCR验证,模型组miR-378b表达量较假手术组显著降低($P < 0.01$),结果相同。同时,利用TGF- β 体外诱导心脏成纤维细胞纤维化,与对照组比较,TGF- β 处理组miR-378b表达量显著降低($P < 0.001$)。结果提示miR-378b与心肌纤维化可能存在密切的关系。结果见图1。

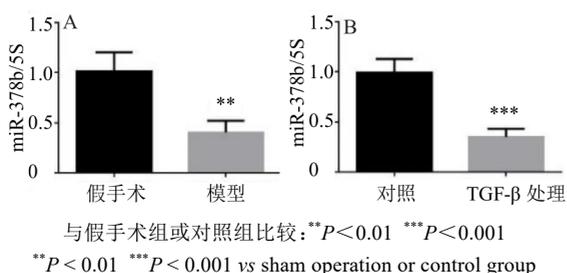


图1 慢性心肌梗死模型小鼠心脏(A)和TGF- β 诱导纤维化的心脏成纤维细胞(B)中miR-378b表达量($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 1 Expression of miR-378b in chronic myocardial infarction model mouse heart (A) and fibrous cardiac fibroblasts induced by TGF- β (B) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

3.2 miR-378b模拟物对心脏成纤维细胞纤维化的抑制作用

分别在基础水平和TGF- β 刺激下,miR-378b模拟物处理心脏成纤维细胞,利用Western blotting检测细胞的 α -SMA蛋白水平, α -SMA表达量指示心脏

成纤维细胞的纤维化水平。结果显示,细胞用TGF- β 处理后, α -SMA蛋白较基础水平显著升高($P < 0.01$),说明纤维化模型建立成功;在基础水平和TGF- β 处理后,与对照模拟物组比较,miR-378b模拟物显著降低细胞的 α -SMA蛋白水平($P < 0.05$)。结果见图2。

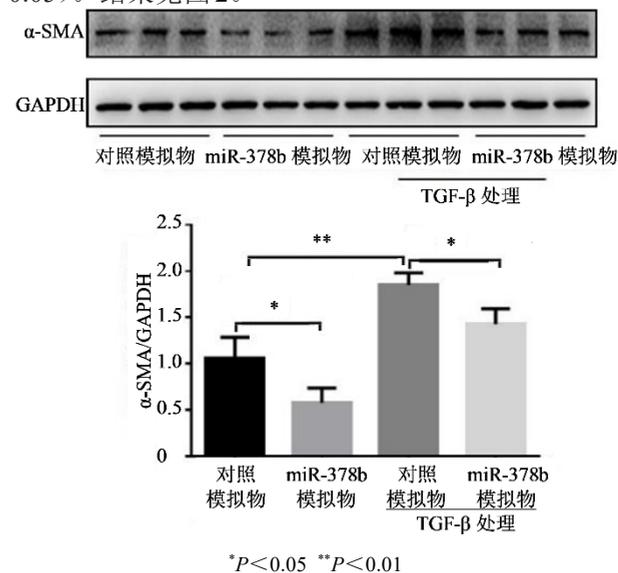


图2 基础水平和TGF- β 刺激情况下miR-378b模拟物对心脏成纤维细胞 α -SMA蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of miR-378b mimics on α -SMA protein levels in cardiac fibroblasts at foundation level and TGF- β stimulation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 miR-378b抑制物对心脏成纤维细胞分化的影响

进一步检测了miR-378b抑制物对心脏成纤维细胞纤维化的影响,结果显示:在基础水平,与对照抑制物组比较,miR-378b抑制物可显著上调细胞的 α -SMA蛋白水平($P < 0.05$);但在TGF- β 处理的细胞中,miR-378b抑制物并不能进一步增加 α -SMA蛋白表达量。结果见图3。

3.4 miR-378b与GAP43靶向关系的验证

为了预测miR-378b的下游靶基因,选取3个预测网站TargetScan、miRDB和miRWalk的预测结果并集。其中和增殖有关,且与心脏损伤相关的分子——GAP43引起了本课题的注意。GAP43是从再生的外周神经中发现的一种突触前蛋白^[21],是神经元生长发育的标志性蛋白质,促进神经元轴突的生长和发育^[22]。在急性心梗的大鼠心脏组织中,GAP43含量是上调的^[23]。GAP43敲除小鼠的心脏可发生肥大、重构^[24]。

TargetScan软件预测了rno-miR-378b与GAP43的3'UTR结合位点,位于GAP43的3'UTR区319~

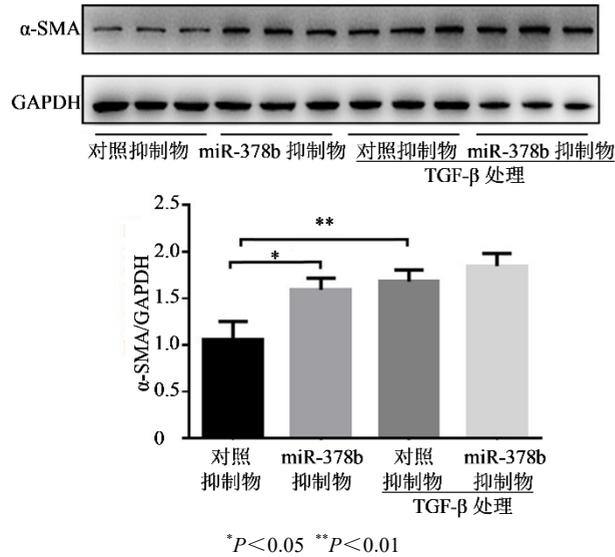
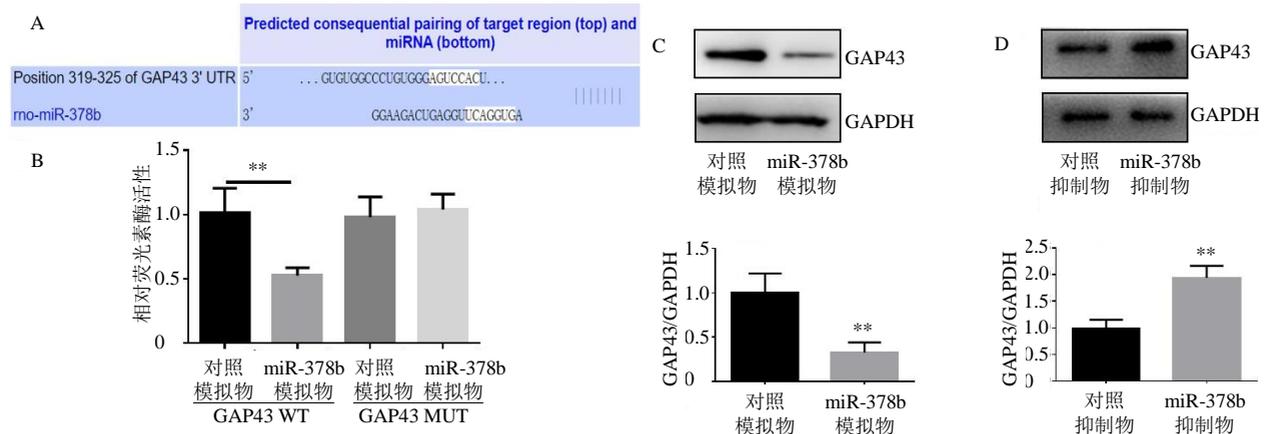


图 3 miR-378b 抑制物对心脏成纤维细胞 α -SMA 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of miR-378b inhibitors on α -SMA protein levels of cardiac fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-TargetScan 预测 rno-miR-378b 与 GAP43 的 3' UTR 结合位点; B-双荧光素酶实验验证 miR-378b 与 GAP43 的靶向关系; C、D-Western blotting 法检测 miR-378b 模拟物和抑制物对心脏成纤维细胞内 GAP43 蛋白水平的影响; 与对照模拟物/抑制物组比较: $**P < 0.01$

A-TargetScan predicted binding site of 3'UTR in GAP43 with rno-miR-378b; B-Targeting relationship between miR-378b and GAP43 was verified by double luciferase assay; C, D-Effect of miR-378b mimics and inhibitors on protein levels of GAP43 in cardiac fibroblasts; $**P < 0.01$ vs control mimics/inhibitors group

图 4 miR-378b 与 GAP43 靶向关系的验证 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Validation of targeting relationship between miR-378b and GAP43 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

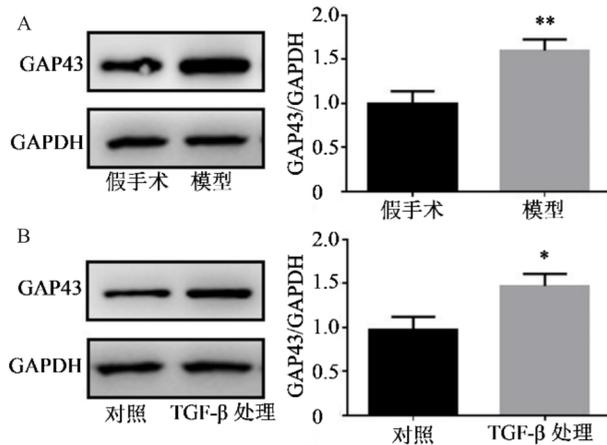
心肌纤维化是心室重塑过程中的重要病理变化,也是众多心血管疾病的共同归路,最终导致心脏功能减退、心力衰竭,严重影响患者生活质量,给国家医保带来巨大负担,因此,有效的抗纤维化治疗对于改善这些疾病的预后具有重要意义。miR-378b 是否参与心肌纤维化发生发展的过程尚未被揭示,而在本团队已报道的研究中^[15],对慢性心梗的小鼠心脏组织行 microRNA 测序发现 miR-378b 显著下降,提示 miR-378b 可能参与了慢性心梗导致

325 位置(图 4-A)。双荧光素酶报告实验结果显示,与对照模拟物组相比,miR-378b 模拟物组 GAP43-WT 细胞的荧光素酶活性强度显著降低($P < 0.01$),而在 GAP43-MUT 细胞中则无统计学差异(图 4-B)。这表明 miR-378b 靶向结合 GAP43。另外,由于 microRNA 通常在转录后水平抑制靶基因的表达,Western blotting 法验证 miR-378b 可负调控 GAP43 的蛋白表达水平,其模拟物、抑制物组 GAP43 蛋白表达水平较相应对照组均差异显著($P < 0.01$,图 4-C、D),进一步证明 GAP43 是 miR-378b 直接作用的靶基因。

3.5 体内、体外心肌纤维化模型中 GAP43 的变化

如图 5 所示,模型组小鼠心肌 GAP43 蛋白表达量较假手术组显著升高($P < 0.01$);在心脏成纤维细胞中,与对照组比较,TGF- β 处理组 GAP43 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$)。GAP43 变化趋势和“3.1”项中 miR-378b 的变化趋势相反,该结果提示 GAP43 可能是 miR-378b 影响心肌纤维化相关的靶基因。

的纤维化。本研究首先用 qRT-PCR 实验验证了 microRNA 测序结果,趋势相同。接着,主要在 TGF- β 刺激心脏成纤维细胞构建的体外心肌纤维化模型中,利用功能获得性和缺失性实验初步探索 miR-378b 对心脏成纤维细胞纤维化水平的影响,结果表明 miR-378b 可抑制心脏成纤维细胞分化为肌成纤维细胞。在基础水平和 TGF- β 处理条件下,miR-378b 模拟物均可下调细胞的 α -SMA 水平,而 miR-378b 抑制物仅在基础水平可上调细胞的 α -SMA 水平,这可能是由于 TGF- β 刺激已经使细胞达到了纤维化



与假手术组或对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs sham or control group

图5 慢性心肌梗死模型小鼠心脏(A)和TGF- β 诱导纤维化的心脏成纤维细胞(B)中GAP43蛋白表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Protein levels of GAP43 in chronic myocardial infarction model mouse heart (A) and fibrous cardiac fibroblasts induced by TGF- β (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的上限,其他刺激不能再继续上调细胞的纤维化水平。

心脏成纤维细胞发生纤维化主要有2个特征,除了分化能力增加、特异性高表达 α -SMA外,其增殖能力也会增强。本研究目前只研究了细胞 α -SMA蛋白表达量的变化,指示了细胞的分化程度,后续还需利用流式细胞学、EdU染色、Ki67染色等实验方法完善细胞增殖率的检测。另外,本课题组目前只使用了1种体外心肌纤维化模型,在后续的实验中,还需利用其他的模型进一步证明这一结论,比如血管紧张素II诱导、细胞牵拉等。

本课题还初步探索了miR-378b对心脏成纤维细胞的作用机制,明确了GAP43是其直接作用的靶基因,且在体内外模型中,二者表达趋势相反。GAP43在本研究慢性梗死心脏组织中上调,这与之前报道其在急性梗死大鼠心脏组织中的变化趋势相同^[24],提示GAP43参与了心肌纤维化。但仍需完善功能挽救实验来证实miR-378b是否通过GAP43影响心肌纤维化。

本研究结果表明microRNA-378b可能通过下游靶基因GAP43改善心肌纤维化,这或许可为未来探索心肌纤维化的潜在治疗靶点提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ma Y G, Iyer R P, Jung M, et al. Cardiac fibroblast activation post-myocardial infarction: Current knowledge

gaps [J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38(5): 448-458.

- [2] Ma Z G, Yuan Y P, Wu H M, et al. Cardiac fibrosis: New insights into the pathogenesis [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(12): 1645-1657.
- [3] Soliman H, Rossi F M V. Cardiac fibroblast diversity in health and disease [J]. Matrix Biol, 2020, 91/92: 75-91.
- [4] Tikhomirov R, Donnell B R, Catapano F, et al. Exosomes: From potential culprits to new therapeutic promise in the setting of cardiac fibrosis [J]. Cells, 2020, 9(3): 592.
- [5] Yu B, Chen H, Guo X Q, et al. CIHH protects the heart against left ventricular remodelling and myocardial fibrosis by balancing the renin-angiotensin system in SHR [J]. Life Sci, 2021, 278: 119540.
- [6] Yousefi F, Shabaninejad Z, Vakili S, et al. TGF- β and WNT signaling pathways in cardiac fibrosis: Non-coding RNAs come into focus [J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 87.
- [7] Folestad E, Kunath A, Wågsäter D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models [J]. Mol Aspects Med, 2018, 62: 1-11.
- [8] Vainio L E, Szabó Z, Lin R Z, et al. Connective tissue growth factor inhibition enhances cardiac repair and limits fibrosis after myocardial infarction [J]. JACC Basic Transl Sci, 2019, 4(1): 83-94.
- [9] Falcón D, Galeano-Otero I, Martín-Bórnez M, et al. TRPC channels: Dysregulation and Ca^{2+} mishandling in ischemic heart disease [J]. Cells, 2020, 9(1): 173.
- [10] Indolfi C, Iaconetti C, Gareri C, et al. Non-coding RNAs in vascular remodeling and restenosis [J]. Vasc Pharmacol, 2019, 114: 49-63.
- [11] Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors [J]. Science, 2004, 303(5654): 95-98.
- [12] Liu X Y, Luo G Z, Bai X J, et al. Bioinformatic analysis of microRNA biogenesis and function related proteins in eleven animal genomes [J]. J Genet Genom, 2009, 36(10): 591-601.
- [13] Ramanujam D, Schön A P, Beck C, et al. microRNA-21-dependent macrophage-to-fibroblast signaling determines the cardiac response to pressure overload [J]. Circulation, 2021, 143(15): 1513-1525.
- [14] Wu X Y, Zhu J, Wei Y L, et al. microRNA-663 participates in myocardial fibrosis through interaction with TGF- β 1 [J]. Exp Ther Med, 2019; 18: 3172-3176.
- [15] Wang C, Yin S X, Wang Q, et al. miR-409-3p regulated by GATA2 promotes cardiac fibrosis through targeting Gpd1 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8922246.
- [16] Xie L, Yao Z, Zhang Y, et al. Deep RNA sequencing

- reveals the dynamic regulation of miRNA, lncRNAs, and mRNAs in osteosarcoma tumorigenesis and pulmonary metastasis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7): 772.
- [17] Wang X L, Zhang T, Wang J, et al. miR-378b promotes differentiation of keratinocytes through NKX3.1 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136049.
- [18] Zhao Z H, Li G, Han Y G, et al. Circular RNA ZNF609 enhances proliferation and glycolysis during glioma progression by miR-378b/SLC2A1 axis [J]. *Aging*, 2021, 13(17): 21122-21133.
- [19] Hyun J, Wang S, Kim J, et al. microRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10993.
- [20] Tao L C, Bei Y H, Chen P, et al. Crucial role of miR-433 in regulating cardiac fibrosis [J]. *Theranostics*, 2016, 6 (12): 2068-2083.
- [21] Skene J H. Axonal growth-associated proteins [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1989, 12: 127-156.
- [22] Chakravarthy B, Rashid A, Brown L, et al. Association of Gap-43 (neuromodulin) with microtubule-associated protein MAP-2 in neuronal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(4): 679-683.
- [23] Chabot A, Meus M A, Hertig V, et al. The neurogenic response of cardiac resident nestin (+) cells was associated with GAP43 upregulation and abrogated in a setting of type I diabetes [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 114.
- [24] Bevere M, Morabito C, Guarnieri S, et al. Mice lacking growth-associated protein 43 develop cardiac remodeling and hypertrophy [J]. *Histochem Cell Biol*, 2022, 157(5): 547-556.

【责任编辑 兰新新】