

miR-29 下调 AKT 信号通路中多个基因的表达

熊玉娟 胡朝晖 邱峰 刘本荣

【摘要】 目的 AKT 信号通路在心力衰竭的病理机制中扮演重要角色,本研究旨在筛选调节 AKT 信号通路的 microRNA,为进一步研究 microRNA 在心力衰竭发生发展中的作用奠定基础。方法 首先用 Gene-Set Enrichment Analysis 方法及 Targetscan 和 RNAhybrid 软件寻找可能调节 AKT 信号通路的 microRNA,然后用双荧光素酶报告系统验证 microRNA 对 AKT 信号通路基因 3'-UTR 的调节作用。结果 Gene Set Enrichment Analysis 分析提示:miR-15/16、miR-21、miR-29、miR-103、miR-126、miR-128、miR-129、miR-200 和 miR-493 共 9 个 microRNA 家族可能调节 AKT 信号通路;利用 Targetscan 和 RNAhybrid 软件反向验证以上 9 个候选 microRNAs,miR-29 与 AKT 信号通路中的 10 个基因(TGF β 3、HDGF、VEGF、LEP、PDGFRB、PIK3RI、AKT1、AKT2、AKT3 和 HIF1A)的 3'-UTR 杂交分值较高,进一步实验验证发现 TGF β 3、VEGF、LEP、AKT1、AKT2、AKT3 和 HIF1A 都是 miR-29 的靶基因。结论 AKT 信号通路中的多个基因都是 miR-29 的靶基因,可受到 miR-29 的负调节作用。

【关键词】 心力衰竭; AKT 信号通路; miR-29

MiR-29 down-regulates the expression of several genes involved in the AKT signal pathway XIONG Yu-juan, HU Zhao-hui, QIU Feng, LIU Ben-rong. Department of Clinic Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510105, China
Corresponding author: LIU Ben-rong, Email: gyliubenrong@gmail.com

【Abstract】 Objective AKT signal pathway plays an important role in the pathogenesis of heart failure. This study intends to screen the microRNAs that participate in the regulation of AKT signal pathway, and lays a foundation for the investigation of microRNAs implicated in the development of heart failure. **Methods** First, the candidate microRNAs possibly involved in the regulation of AKT signal pathway was predicted by using GeneSet Enrichment Analysis (GEA), TargetScan, and RNAhybrid. Then, we verified the regulation of candidate microRNAs on the candidate genes was verified using a Dual Luciferase Reporter System (DLRS). **Results** GEA showed that miR-15/16, miR-21, miR-29, miR-103, miR-126, miR-128, miR-129, miR-200 and miR-493 may be implicated in the regulation of AKT pathway. Further analysis of the match degree of the 9 microRNAs with the 10 genes in the AKT pathway using TargetScan and RNAhybrid software indicated that TGF β 3, HDGF, VEGF, LEP, PDGFRB, PIK3RI, AKT1, AKT2, AKT3 and HIF1A may be the target genes of miR-29. Experimental verification with DLRS suggested that TGF β 3, VEGF, LEP, AKT1, AKT2, AKT3 and HIF1A are the target genes of miR-29. **Conclusions** Several genes in the AKT signal pathway are the targets of miR-29 and may be down-regulated by miR-29.

【Key words】 Heart failure; AKT signal pathway; miR-29

心力衰竭是各种器质性心脏病的终末表现,具有发病率高、再住院率高、死亡率高的特点,严重影响全球公众的健康。近年来,多种与心力衰竭相关的重要信号传导通路逐渐被揭示,其中 GSK3 β 被称之为信号

转导通路的“枢纽”^[1],而 AKT 信号通路则是 GSK3 β 抑制性磷酸化调节的主要通路之一,因此 AKT/GSK3 β 信号通路的调控则是预防和治疗心力衰竭的关键突破口。microRNA 是一类长约 21 个核苷酸的非编码小分子 RNA,通过与靶基因 3'-UTR 碱基互补结合来抑制蛋白的翻译。根据目前 microRNA 在癌症中研究的成熟经验, microRNA 广泛地参与癌症相关的多种重要信号通路的调节^[2-3],我们推测 microRNA 也可能参与 AKT 信号通路的调节。本研究应用生物信息学手段预测可调控 AKT 信号通路的 microRNAs,并结合双荧光素酶报告系统验证预测的 microRNAs,初步筛选调控 AKT 信号通路的 microRNAs,旨在为心力衰竭的防治提供一

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.14.089

基金项目:国家自然科学基金(81100244/H2501);广东省优秀博士论文作者资助(sybzzxm201127);高等学校博士学科点专项科研基金(20104423120002)

作者单位:510105 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)检验科(熊玉娟、邱峰);广州金域医学检验中心(胡朝晖);广州医学院第二附属医院心血管病研究所(刘本荣)

通讯作者:刘本荣,Email:gyliubenrong@gmail.com

定理论依据。

材料与amp;方法

一、细胞培养

293T 细胞(中国典型培养物保藏中心,上海)生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,在 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度的条件下培养。当细胞生长接近 80% 汇合度时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

二、质粒构建

pGL3-control-MCS 是在 pGL3-control 质粒(图 1A) (Promega, Madison, WI) 的 Xba I 识别位点上游插入了 4 个多克隆位点(BstX I、EcoR I、EcoR V、Apa I)而得到(图 1B)^[4]。靶基因 3'-UTR 报告基因载体 pGL3-TAR-3'-UTR 携带靶基因的 3'-UTR。所有载体均以 pGL3-control-MCS 为基础,在 EcoR I 和 Xba I 的酶切位点间插入靶基因 3'-UTR 序列。

三、细胞转染及荧光素酶活性检测

转染前 1 d 将 293T 细胞培养于 48 孔板中,每孔 3 万个细胞,24 h 后利用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司,美国)进行表达质粒的转染,具体操作如下:将适量(终浓度 5 nmol/L)小分子 RNA(miR-29 duplex 或阴性对照 NC)和表达质粒(pGL3-TAR-3'-UTR 10 ng 和 Renilla 质粒 2 ng)稀释于 25 μl opti-MEM 中,轻柔混匀;将 1 μl Lipofectamine 2000 稀释于 25 μl opti-MEM 中,混匀,室温放置 5 min;将上述两液混合,室温放置 20 min;然后加入 48 孔板中,接着加入 200 μl 细胞稀释液,充分混匀后于 CO₂ 培养箱(GALAXY,美国)中培养 40 h,弃去上清,用 1 × PBS (pH 7.4)洗涤细胞一次,加入 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) 试剂盒配备的细胞裂解液 65 μl,置于 200 r/min 摇床上,摇动 15 min,待细胞充分裂解,取 30 μl 裂解液加入测量管中,加入 50 μl firefly 荧光素酶底物,混匀后立即置于单管化学发光仪(Lumat LB9507, Berthold, 德国)的测量架上进行测量,读数后取出测量管,继续加入 renilla 荧光素酶底物,放回仪器中测量、读数。

四、生物信息学分析

用 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 方法(<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)分析调控 PI3K/AKT/GSK3β 信号通路的 microRNA,再结合 Targetscan (www.targetscan.org) 和 RNA hybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) 软件分析预测的 microRNAs 的可能靶标,综合分析筛选出候选 microRNAs。

五、统计学分析

双荧光素酶报告系统检测结果用均数 ± 标准差

($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异用 *t* 检验,分析软件采用 SPSS 16.0。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、生物信息学预测调控 PI3K/AKT/GSK3B 信号通路的 microRNA

已知 microRNA 通过对下游靶基因蛋白表达水平的调控行使其生物功能,目前研究表明它们常通过识别并结合靶基因 3'-UTR 上的 MRE (microRNA Regulatory Element, MRE) 位点抑制靶基因的翻译。我们首先采用 GSEA 程序分析调控 PI3K/AKT/GSK3β 信号通路的 microRNA,共寻找出 9 个可能的 microRNA 家族:miR-15/16、miR-21、miR-29、miR-103、miR-126、miR-128、miR-129、miR-200、miR-493。因单种软件预测 microRNA 的靶标有较高的假阳性率,我们使用 Targetscan 和 RNAhybrid 软件反向验证这 9 个 microRNA 家族可能调控的靶基因,筛选到 miR-29 家族的预测靶基因在 PI3K/AKT/GSK3B 信号通路上富集,这些基因分别是 TGFβ3、HDGF、VEGF、LEP、PDGFRB、PIK3RI、AKT1、AKT2、AKT3 和 HIF1A,见图 2。

二、miR-29 靶基因的验证

为了验证 TGFβ3、HDGF、VEGF、LEP、PDGFRB、PIK3RI、AKT1、AKT2、AKT3 和 HIF1A 是否直接受 miR-29b 的调控,我们将含有 miR-29 调控元件 MRE 的靶基因(TAR)3'-UTR 片段克隆到报告基因载体 pGL3-MCS-control 中,得到 pGL3-TAR-3'-UTR 报告载体。然后利用双荧光素酶报告系统检测在过表达 miR-29b 后荧光素酶活性的改变情况(图 3)。我们发现,在 293T 细胞中转染 miR-29b,与转染阴性对照(NC)相比,它可使 AKT3-3'-UTR 和 LEP-3'-UTR 报告载体的荧光素酶活性下降 50% 以上,分别为 61% 和 56% (*P* < 0.05);使 AKT2-3'-UTR、VEGF-3' UTR、AKT1-3'-UTR、HIF1A-3' UTR 及 TGFβ3-3'-UTR 报告载体荧光素酶活性分别下降 49%、44%、39%、35% 及 28% (*P* < 0.05);而对 HDGF-3'UTR、PDGFRB-3'-UTR 及 PIK3RI-3'-UTR 报告载体的荧光素酶活性没有明显抑制作用(*P* > 0.05)。上述结果提示 miR-29 可通过 3'-UTR 上的调控元件抑制 TGFβ3、VEGF、LEP、AKT1、AKT2、AKT3 和 HIF1A 基因的表达。

讨 论

我们的研究结果提示 miR-29b 可能抑制 AKT 信号通路上的 VEGF、TGFβ3、LEP、AKT1、AKT2、AKT3 及 HIF1A 基因的转录后翻译,在 AKT 信号通路中起负调节作用。由于 AKT 信号通路广泛存在于不同的组织细

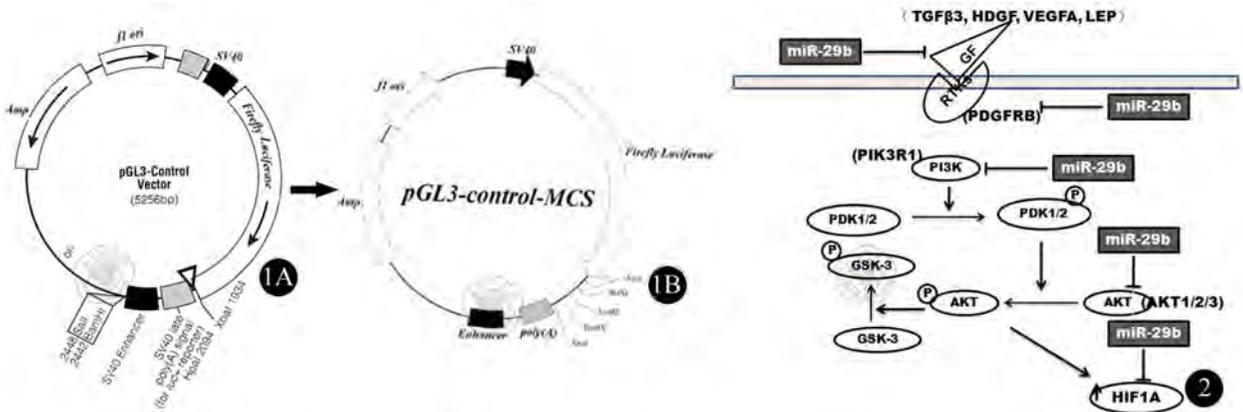


图1 质粒图谱。1A: pGL3-control原始质粒图谱, 三角形指示的位置为进行质粒改造的位置; 1B: pGL3-control经改造后的质粒图谱 图2 miR-29预测的靶基因通路。GF: 生长因子; RTKs: 受体酪氨酸激酶

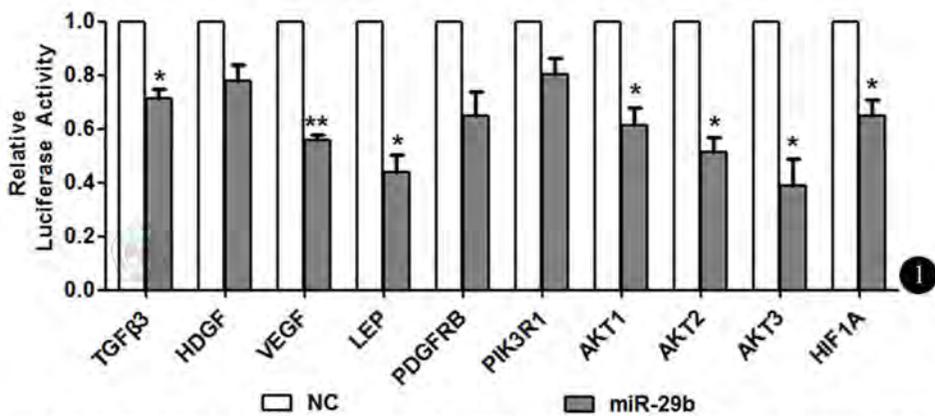


图3 miR-29对pGL3-TAR-3'-UTR萤光素酶活性的影响。以上bar图以三次独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示; 实验数据处理: 每次实验测得的firefly萤光素酶活性除以renilla萤光素酶活性(内参), 然后都除以阴性对照的值, 每次实验的阴性对照值都变为“1”, 所以标准误差为“0”, 没有误差线; pGL3-TAR-3'-UTR的值变为相对于阴性对照升高或降低的倍数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

胞中,参与生长、增殖、分化等多种生命活动,是组织细胞生存及功能实现的重要通路之一。大量的研究证明AKT信号通路可调节心肌细胞生长、心脏收缩及冠状动脉血管形成,在病理性心肌肥大及心力衰竭中扮演着重要的角色。AKT是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,有三个家庭成员 AKT1、AKT2 和 AKT3,研究显示在血管紧张素 II 诱导的心肌肥大模型中可检测到 AKT 的磷酸化水平显著增加,在心脏中长时间激活 AKT 会导致病理性的心肌肥厚^[5-6]。VEGF、TGFβ3、LEP 是 AKT 的上游调控因子,它们通过与各自的受体结合激活 PI3K,PI3K 被激活后,可对磷脂酰肌醇环上的 3 位羟基进行磷酸化产生磷酸化的磷脂酰肌醇 PIP3,从而激活 PDK1,PDK1 可磷酸化 AKT 进而激活 AKT。可见,VEGF、TGFβ3 和 LEP 中的任一个成员受到抑制都将影响 AKT 的激活,而 miR-29 使 VEGF、TGFβ3 和 LEP 的 3'-UTR 报告载体的萤光素酶活性分别下降了 44%、28% 和 56%,提示 miR-29 可能同时下调 VEGF、TGFβ3 和 LEP 基因的表达,从而对 AKT 的活性起较强的负调控作用,进而抑制病理性心肌肥厚。HIF1A 则是 AKT

下游的一个调节靶标,AKT 通过抑制 GSK3β 来抑制 HIF1A 的降解,间接增加 HIF1A 的蛋白水平,研究显示增高 HIF1A 的水平可促进血管生成,从而促进心肌肥厚^[7]。miR-29 不但对 AKT 家族 3 个成员的 3'-UTR 载体萤光素酶活性都具有较强的抑制作用,还对其下游基因 HIF1A 的 3'-UTR 报告基因萤光素酶活性也有较强抑制,由此可见,miR-29 不仅可抑制 AKT 及其上游基因,也可直接抑制 HIF1A,从而降低 HIF1A 蛋白水平,进而抑制心肌肥厚。由于 miR-29 可能下调 AKT 信号通路中的多个基因,当 AKT 信号通路中的大部分环节出现异常时,miR-29 都可发挥其对整个通路的负调控作用,防止 AKT 下游分子的过量激活致使细胞的病理改变,因此,miR-29 很可能通过对 AKT 信号通路的负调控作用而在心肌肥厚等病理过程中起保护作用。

目前也有较多的研究证明 microRNA 与心肌肥厚及心力衰竭相关,如 miR-21 通过抑制 Spry1 的表达来调节 ERK-MAP 激酶信号通路,从而影响心肌结构和功能^[8],它还可通过抑制 PDCD4 的表达保护心肌免受过氧化氢导致的损伤^[9]。过表达 miR-195 的转基因小鼠

出现心脏肥厚、功能恶化、甚至出现心力衰竭而死亡^[10]。在小鼠行胸主动脉结扎或 calcineurin 转基因小鼠诱导的心肌肥大模型中,miR-208 被敲除后则不发生心肌肥大和纤维化^[11]。miR-133 和 miR-1 是肌肉组织特异的,它们参与心脏发育的许多通路,大量的研究证明 miR-133 和 miR-1 的异常表达与心脏疾病有关。miR-133 和 miR-1 的表达下调将导致严重的心肌肥厚,在体外过表达 miR-133 和 miR-1 则可以抑制心肌肥厚,从而改善肥厚心肌细胞的状态^[12-13]。由此可见 microRNA 参与心力衰竭的发生是一个普遍现象。其他学者的研究也发现 miR-29 与心血管疾病密切相关,其在心血管疾病中的角色也是多样化的,如 van Rooij 等^[14]发现心肌梗死的患者 miR-29 的表达下调,miR-29 的下调导致纤维增生,而 Ye 等^[15]则发现下调 miR-29 可避免缺血再灌注损伤。综上所述,miR-29 不但可通过负调控 AKT 信号通路抑制心肌肥厚,还在其他心血管事件中扮演重要角色,从而抑制心力衰竭的发生。

参 考 文 献

- [1] Mudd JO, Kass DA. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, 2008, 451: 919-928.
- [2] 徐彪,朱彦君. microRNA 与肺癌[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5:6406-6408.
- [3] 许浚实. microRNA 与前列腺癌的发生和转移[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5:1400-1404.
- [4] Su H, Yang JR, Xu T, et al. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res*, 2009, 69: 1135-1142.

- [5] Ananthakrishnan R, Moe GW, Goldenthal MJ, et al. Akt signaling pathway in pacing-induced heart failure. *Mol Cell Biochem*, 2005, 268: 103-110.
- [6] Li HH, Willis MS, Lockyer P, et al. Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins. *J Clin Invest*, 2007, 117: 3211-3223.
- [7] Sano M, Minamino T, Toko H, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*, 2007, 446: 444-448.
- [8] Sayed D, Rane S, Lypowy J, et al. MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 3272-3282.
- [9] Cheng Y, Liu X, Zhang S, et al. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PD-CD4. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47: 5-14.
- [10] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 18255-18260.
- [11] van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 2007, 316: 575-579.
- [12] Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 2007, 13: 613-618.
- [13] Mishima Y, Stahlhut C, Giraldez AJ. miR-1-2 gets to the heart of the matter. *Cell*, 2007, 129: 247-249.
- [14] van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 13027-13032.
- [15] Ye Y, Hu Z, Lin Y, et al. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2010, 87: 535-544.

(收稿日期:2012-04-01)

(本文编辑:戚红丹)

熊玉娟,胡朝晖,邱峰,等. miR-29 下调 AKT 信号通路中多个基因的表达[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(14):3871-3874.

中 华 临 床 医 生 杂 志