

miRNA378 * 对柯萨奇 B3 病毒感染心肌细胞 凋亡、网腔钙结合蛋白、内质网应激 及信号通路因子的作用 *

杨焱¹ 王羽² 崔晓雪³ 邱祥春¹ 魏成喜² 赵明¹ 刘永峰²

[摘要] 目的:探讨上调 miRNA378 * 表达对柯萨奇 B3 病毒(CVB3)感染心肌细胞凋亡、网腔钙结合蛋白、内质网应激及信号通路因子的作用。方法:实验分 4 组:对照组(正常细胞)、CVB3 感染组(正常细胞+ CVB3)、miRNA378 * 过表达对对照组(正常细胞+CVB3+转染 miRNA378 * 空表达质粒)、miRNA378 * 过表达组(正常细胞+ CVB3+转染 miRNA378 * 过表达质粒)。原代培养乳鼠心肌细胞,采用免疫组织化学方法检测培养乳鼠心室肌细胞 α -SMA 蛋白,慢病毒质粒转染心室肌细胞,除对照组外,其他各组心肌细胞感染 CVB3,采用 TUNEL 技术检测各组心肌细胞凋亡率;用 Western blotting 技术检测各组心肌细胞网腔钙结合蛋白、内质网应激伴侣蛋白 GRP78 及内质网应激信号通路因子 PERK、P-PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 表达。结果:与 CVB3 感染组比较,miRNA378 * 过表达组心肌细胞凋亡率明显减少,网腔钙结合蛋白表达增加,而 GRP78、P-PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 表达均减少(均 $P < 0.01$),PERK 表达差异无统计学意义。结论:上调 CVB3 感染心肌细胞 miRNA378 * 表达可引起心肌细胞凋亡减少,网腔钙结合蛋白表达增多,进而缓解内质网应激,并抑制内质网应激凋亡信号通路因子表达。

[关键词] miRNA378 * ;柯萨奇 B3 病毒;内质网应激;网腔钙结合蛋白;凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2016.12.020

[中图分类号] R331.3 **[文献标志码]** A

The effect of miRNA378 * on the myocardial cells apoptosis, calumenin, endoplasmic reticulum stress and signaling pathway factor caused by Coxsackie virus

YANG Yan¹ WANG Yu² CUI Xiaoxue³ QIU Xiangchun¹
WEI Chengxi² ZHAO Ming¹ LIU Yongfeng²

(¹The Inner-mongolia National University Affiliated Hospital, Tongliao, Inner-mongolia, 028000, China; ²The Inner-mongolia National University Medical College; ³The Inner-mongolia National University medicinal chemistry and Pharmacology Institute)

Corresponding author: LIU Yongfeng, E-mail: dr.liudanial@gmail.com

Abstract Objective: To investigate the effect of miRNA378 * on the myocardial cells apoptosis, calumenin protein, endoplasmic reticulum stress and signaling pathway caused by Coxsackie virus **Method:** The suckling mouse myocardium of primary culture were randomly divided into control group, Coxsackie virus B3 infection group, lentivirus infection miRNA378 * overexpression control group, lentivirus infection miRNA378 * over expression group. Neonatal rat cardiomyocytes were cultured, α -SMA was monitored by immunohistochemical method, ventricular myocytes were transferred by lentivirus plasmids. Excepted control group, the myocardial cells of other groups infected with Coxsackie virus B3. TUNEL was used to detect the apoptosis rate of myocardial cells and the Western blotting was used to detect the expression change of calumenin, endoplasmic reticulum stress chaperone protein GRP78 and endoplasmic reticulum stress signaling pathway factors PERK, P-PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP. **Result:** Compared with Coxsackie virus infection group, myocardial cell apoptosis rate was significantly decreased, calumenin protein expression was increased, and GRP78, P-PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP expression were decreased in miRNA378 * overexpression group (all $P < 0.01$). While PERK expression had no statistical significance between the two groups. **Conclusion:** Upregulation of Coxsackie virus B3 infected myocardial cells miRNA378 * expression could decrease myocardial cell apoptosis, and increase calumenin expres-

* 内蒙古自治区自然科学基金资助课题(No:2015MS08153)

¹ 内蒙古民族大学附属医院(内蒙古通辽,028000)

² 内蒙古民族大学临床医学院

³ 内蒙古民族大学医学院药物化学与药理学研究所

通信作者:刘永峰,E-mail:dr.liudanial@gmail.com

sion, thereby alleviate the endoplasmic reticulum stress, and inhibit the expression of endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis signaling pathway.

Key words miRNA378 * ;Coxsackie virus B3;endoplasmic reticulum stress;calumenin;apoptosis

病毒性心肌炎(viralmyocarditis, VMC)是由病毒(主要由柯萨奇病毒)感染引起的心肌局限性或者弥漫性的急性或慢性炎性病变,病变可累及心肌细胞实质和(或)间质,导致心肌收缩能力减低,射血分数下降甚至无效射血,最终导致心力衰竭^[1-2]。文献报道心力衰竭患者心脏中存在心肌细胞凋亡,致使存活的心肌工作细胞数量减少,心脏射血能力降低,导致心力衰竭^[3]。心肌细胞凋亡途径众多,其中一条由内质网应激反应相关的凋亡信号通路所介导^[4]。网腔钙结合蛋白位于心肌细胞肌浆网,具有调节钙稳态作用。微小 RNAs(miRNAs)是由内源基因编码的一类长约 22 个核苷酸的非编码单链分子 RNA,参与转录后基因表达调控,抑制靶 mRNA 转录后的表达。文献报道,miRNA-378 * 能够抑制 H9c2 心肌细胞网腔钙结合蛋白表达^[5-6]。但 miRNA-378 * 对于柯萨奇 B 组病毒(CVB3)感染的心肌细胞中的凋亡、网腔钙结合蛋白、内质网应激及其凋亡信号通路是否具有作用以及是否通过抑制靶蛋白转录后的表达来影响心肌细胞凋亡的整个通路,还不得而知。本实验拟上调 CVB3 病毒感染心肌细胞 miRNA-378 * 表达,观察其对细胞凋亡、网腔钙结合蛋白、内质网应激及其信号通路因子的影响,完善 VMC 并发心力衰竭发病机制,为临床工作提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物药品与仪器

1~3 d 的 Balb/c 新生乳鼠购置于吉林大学基础医学院动物中心,许可证号:scxk(吉)2011-0004。网腔钙结合蛋白抗体购于 Bioss 公司,GRP78 抗体、PERK 抗体、P-PERK 抗体、eIF2 α 抗体、ATF4 抗体、CHOP 抗体购于 Boster 公司,内参抗体 β -actin 购于 Wanleibio 公司,miRNA378 * 过表达质粒由沈阳万类生物科技公司合成。CVB3、Woodruff 亲心肌株由吉林大学农牧学院提供。

1.2 乳鼠心肌细胞的分离与培养

将乳鼠心脏放入培养皿中,将清洗后的心脏组织剪碎,加入 0.1% II 型胶原酶以及 0.1% 胰蛋白酶混合液,离心,去上清。用 PBS 重悬沉淀,离心用培养基重悬细胞,筛网去除大块组织。再次离心,去上清,留沉淀,进行细胞计数后放置到培养板中。差速贴壁法去除成纤维细胞,剩余的心肌细胞放置在培养板后,每两天换 1 次培养液。按实验内容将细胞接种于 6 孔板中,细胞浓度为 5×10^4 /ml,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 的培养箱内培养 24 h 可进行转染。

1.3 免疫组织化学方法鉴定乳鼠培养心肌细胞

对培养的乳鼠心肌细胞进行免疫组织化学鉴定,以明确培养的心肌细胞为心室肌细胞,需经下列实验步骤:①0.1% TritonX-100 孵育;②3% 过氧化氢孵育;③血清封闭;④一抗孵育;⑤二抗孵育;⑥辣根酶标记;⑦ DAB 显色;⑧苏木素复染;⑨镜检。

1.4 细胞接种与培养

细胞培养于 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 的培养箱内培养。隔天换液处理,接种密度为 70% 为宜,便于病毒感染。

1.5 慢病毒转染

取出 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的病毒,感染目的细胞,使用移液器吸取准确体积(病毒数与细胞数比值为 100 : 1)的病毒液加入准备好的培养基中。在培养基中加入聚凝胺(6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)提高病毒的感染效率。在目的细胞和对照细胞中分别加入计算好的病毒液。混匀后放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 的培养箱内孵育过夜。24 h 后将含有慢病毒的培养液更换成含有 10% 血清的 DMEM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 继续培养。

1.6 CVB3 感染心肌细胞

乳鼠心肌细胞按照细胞浓度为 5×10^4 /ml 接种于 6 孔板,并将其置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 的培养箱内培养过夜,次日, CVB3 病毒感染组、miRNA378 * 过表达对照组及 miRNA378 * 过表达组按每个心肌细胞感染 100 PFU 的 CVB3 病毒,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置于 CO $_2$ 培养箱中 3 d。

1.7 TUNEL 法检测各组心肌细胞凋亡

各组心肌细胞经过 TUNEL 法标准实验步骤:透化;PBS 漂洗;封闭;滴加 TUNEL 反应液 50 μl ;保湿、避光、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min;滴加 Converter-POD 50 μl ;保湿、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;DAB 显色;加 DAB 底物 50 μl ;苏木素复染;显微镜下观察染色效果,400 \times 镜下拍照。

1.8 Western blotting 检测网腔钙结合蛋白、GRP78 及 PERK、P-PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 表达

各组乳鼠心肌细胞经下列实验步骤:蛋白质抽提;采用 BCA 法进行蛋白质定量;取 15 μl 的样品进行 SDS-PAGE;转印至 PVDF 膜;封闭;孵育一抗;孵育二抗;ECL 底物发光;图像保存;Imaga J 软件分析各条带的灰度值。普通抗体的封闭液、一抗孵育液、二抗孵育液为 5% 脱脂奶粉溶液。检测各组心肌细胞网腔钙结合蛋白、内质网应激伴侣蛋白 GRP78 及 PERK、P-PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 表达。

1.9 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 软件进行数据分析,不同组间采用配对 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

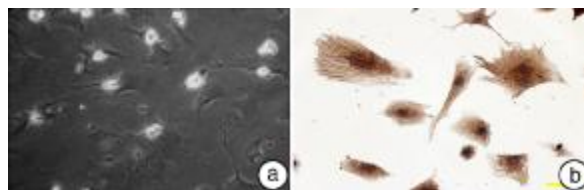
2.1 心室肌细胞检测

乳鼠培养心肌细胞经免疫组织化学实验,检测出心肌细胞特有的 α -SMA 蛋白,确定为心室肌细胞。见图 1。

2.2 心肌细胞凋亡情况

TUNEL 法检测显示,对照组心肌细胞仅有少量凋亡,凋亡率为 $(6.51 \pm 0.83)\%$; CVB3 感染组心肌细胞凋亡明显,凋亡率为 $(52.86 \pm 9.40)\%$; miRNA378 * 过表达组心肌细胞凋亡量较 CVB3 感染组明显减少,凋亡率为 $(15.45 \pm 3.2)\%$ ($P < 0.01$)。见图 2。

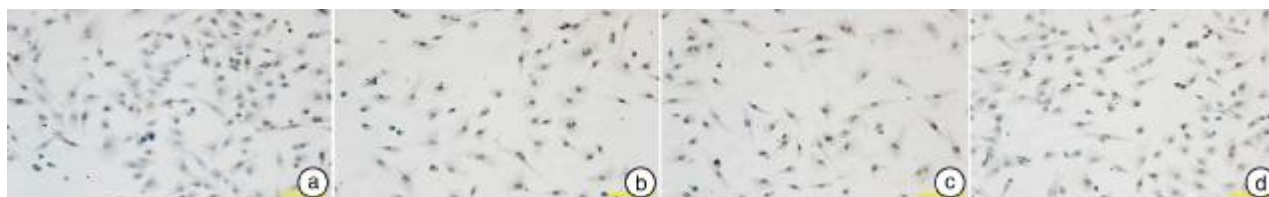
2.3 网腔钙结合蛋白、GRP78 及 PERK、P-PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 表达



a: 原代培养乳鼠心肌细胞(400 \times); b: 原代培养乳鼠心肌细胞免疫组织化学图片。

图 1 原代培养乳鼠心肌细胞
 Figure 1 cultured cardiomyocytes

与对照组比较, CVB3 感染组心肌细胞网腔钙结合蛋白表达显著减少, GRP78 及 P-PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 表达显著增加(均 $P < 0.01$); 与 CVB3 感染组比较, miRNA378 * 过表达组网腔钙结合蛋白表达显著增加, GRP78 及 P-PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 表达显著减少(均 $P < 0.01$)。各组心肌细胞 PERK 无明显统计学差异。见表 1 和图 3。



a: 对照组; b: CVB3 感染组; c: miRNA378 * 过表达对照组; d: miRNA378 * 过表达组。

图 2 各组凋亡心肌细胞
 Figure 2 Apoptotic cardiomyocytes

表 1 各组网腔钙结合蛋白、GRP78 及 PERK、P-PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 表达水平

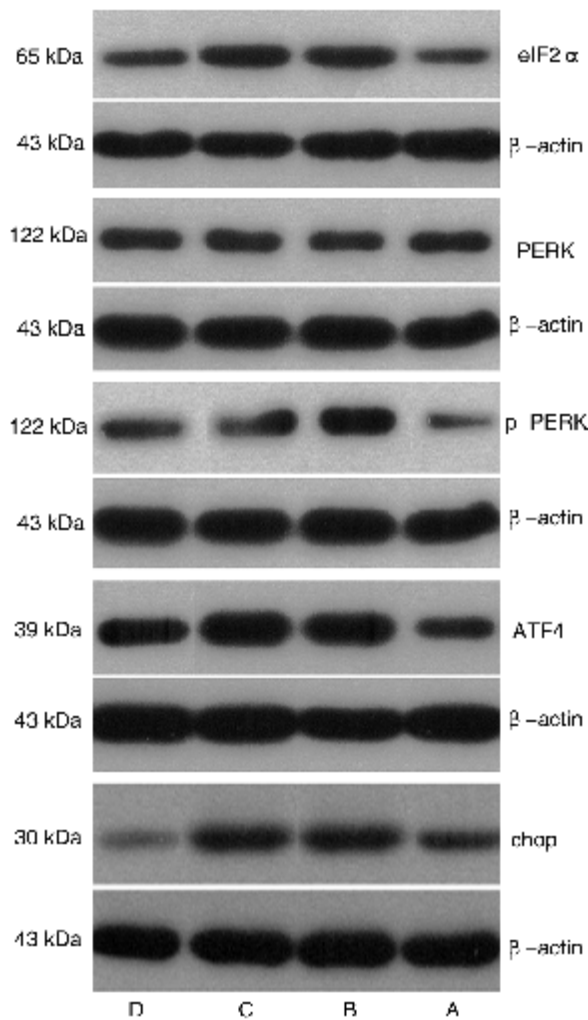
组别	网腔钙结合蛋白	GRP78	PERK	P-PERK	eIF2 α	ATF4	CHOP
对照组	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.98	1.00 \pm 0.11
CVB3 感染组	0.62 \pm 0.05 ¹⁾	1.86 \pm 0.17 ¹⁾	0.99 \pm 0.08	1.85 \pm 1.60 ¹⁾	1.59 \pm 0.14 ¹⁾	1.70 \pm 0.16 ¹⁾	1.72 \pm 0.15 ¹⁾
miRNA378 * 过表达对照组	0.62 \pm 0.06	1.87 \pm 0.17	1.01 \pm 0.1	1.8 \pm 0.168	1.72 \pm 0.18	1.67 \pm 0.17	1.68 \pm 0.16
miRNA378 * 过表达组	0.74 \pm 0.08 ²⁾	1.53 \pm 0.16 ²⁾	1.01 \pm 0.09	1.59 \pm 0.15 ²⁾	1.06 \pm 0.98 ²⁾	1.48 \pm 0.15 ²⁾	1.38 \pm 0.14 ²⁾

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$; 与 CVB3 感染组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

心肌细胞网腔钙结合蛋白与 RyR2 通道及钙泵(SERCA2a)相互作用以调节心肌细胞钙释放、回摄与储存,共同维持钙循环稳态^[7]。文献报道,VMC 时,网腔钙结合蛋白不但表达明显减少,且与心肌细胞内质网钙泵结合能力减弱,从而使心肌细胞钙循环稳态失衡,心脏功能降低^[8]。同时,VMC 又可以导致心肌细胞发生内质网应激,并激活内质网应激凋亡信号通路引起心肌细胞凋亡,引发心力衰竭^[9]。研究发现,网腔钙结合蛋白可以缓解心肌

细胞内质网应激并减少其介导的心肌细胞凋亡数量^[10]。重度心力衰竭患者 miRNA-378 * 表达显著下降,随着患者心功能好转, miRNA-378 * 表达也明显增加^[11]。miRNA-378 和 miRNA-378 * 是一个基因出来的产物,分别为正义链和反义链。miRNA 前体有发卡结构,在成熟过程中发卡结构被剪掉,形成 miRNA-378 和 miRNA-378 *, 也叫左臂和右臂。通常正义链有功能,反义链无功能被降解,但是近年来,人们发现反义链有时候有功能,



A:对照组;B:CVB3 感染组;C:miRNA378* 过表达对照组;D:miRNA378* 过表达组。

图3 各组网腔钙结合蛋白、GRP78 及 PERK、P-PERK、eIF2α、ATF4、CHOP 表达条带图

Figure 3 Expression of calumenin, GRP78, PERK, P-PERK, eIF2α, ATF4 and CHOP

可以协助正义链功能,也可以拮抗正义链,或者和正义链功能毫无关系。根据上述资料和本课题组研究结果,提出如下科学假说:CVB3 病毒通过干预心肌细胞 miRNA-378* 表达来影响网腔钙结合蛋白表达,进而引起内质网应激并通过其凋亡信号通路 P-PERK→eIF2α→ATF4→CHOP 介导心肌细胞凋亡。

本实验观察到上调 CVB3 病毒感染心肌细胞 miRNA-378* 表达后心肌细胞凋亡率明显减少,并出现网腔钙结合蛋白表达增加,同时 GRP78 及

P-PERK、eIF2α、ATF4、CHOP 表达减少,而 PERK 表达无明显改变。上述实验结果印证了上述科学假说。但沉默 CVB3 病毒感染心肌细胞 miRNA-378* 是否会出现网腔钙结合蛋白表达减少,以及 GRP78 及 P-PERK、eIF2α、ATF4、CHOP 表达减少增多,还不得而知,需要在后续实验中进一步阐明。

参考文献

[1] 刘磊,王洪军,赵明,等. 病毒性心肌炎所致小鼠心力衰竭心肌组织内质网应激相关的凋亡关系的研究[J]. 中国应用生理学杂志,2014,30(4):465-468.

[2] 牛晓峰,赵雅君,赵明,等. 黄芪总黄酮通过抑制内质网应激对小鼠病毒性心肌炎保护作用的实验研究[J]. 临床心血管病杂志,2015,31(2):129-132.

[3] BOON R A, DIMMELER S. MicroRNAs in myocardial infarction[J]. Nat Rev Cardiol, 2015, 12: 135-142.

[4] 周晓敏,陶谢鑫,赵明,等. 黄芪总黄酮与丹参酮 II A 磺酸钠对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞内质网伴侣蛋白及 L-型钙通道表达的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(3): 254-256.

[5] 黄侠,邱祥春,赵明. 网腔钙结合蛋白的研究进展[J]. 生理科学进展,2015,46(6):458-460.

[6] MALLAT Y, TRITSCH E, LADOUCE R, et al. Proteome modulation in H9c2 cardiac cells by microRNAs miR-378 and miR-378* [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13: 18-29.

[7] 赵雅君,王伊林,赵明,等. 阿霉素致心肌细胞凋亡时网腔钙结合蛋白的变化[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(8): 895-898.

[8] ZHOU X M, XIN Q, ZHAO M, et al. Total flavonoids of astragalus plays a cardioprotective role in viral myocarditis[J]. Acta Cardiol Sin, 2016, 32: 81-88.

[9] 王洪军,于森,赵明,等. 黄芪总黄酮对柯萨奇 B3 病毒感染心肌细胞内质网应激及促凋亡信号因子作用实验研究[J]. 临床心血管病杂志,2016,32(1):70-73.

[10] LEE J H, KWON E J, KIM D H. Calumenin has a role in the alleviation of ER stress in neonatal rat cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439: 327-332.

[11] OOI J Y, BERNARDO B C, MCMULLEN J R. The therapeutic potential of miRNAs regulated in settings of physiological cardiac hypertrophy[J]. Future Med Chem, 2014, 6: 205-222.

(收稿日期:2016-05-30 修回日期:2016-08-05)