

# miR-29a 靶基因 ITG $\beta_1$ -3'UTR 萤光素酶报告基因质粒的构建及对心肌成纤维细胞增殖的影响

崔琳<sup>1</sup>, 刘卫红<sup>1\*</sup>, 高原<sup>1</sup>, 王幼平<sup>1</sup>, 申意彩<sup>2</sup>

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000, 2. 河南中医药大学, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:利用 microRNA 靶位点预测网站预测了 miR-29 靶基因及结合位点,构建含野生型及其突变型整合素  $\beta_1$  (integrin  $\beta_1$ , ITG $\beta_1$ )-3'端非翻译区(UTR)双萤光素酶报告基因(DLR)表达系统(pMIR-ITG $\beta_1$ -3'UTR),通过转染细胞、双萤光素酶活性分析初步确定 miR-29 的靶位点,以此研究 miR-29 对 ITG $\beta_1$  基因靶向调控的作用。方法:提取人全血 RNA,逆转录 mRNA 成 cDNA,以之为模板,逆转录 PCR(RT-PCR)扩增 ITG $\beta_1$ -3'UTR 片段,经酶切后连接至萤光素酶报告载体 pMIR-Report 上,构建出 pMIR-ITG $\beta_1$ -3'UTR 的萤光素酶报告基因载体及突变载体并进行鉴定。将 pMIR-Report Luciferase 载体,所构建的 pMIR-ITG $\beta_1$ -3'UTR 及突变载体分别同 miR-29 mimics 共转染至大鼠心肌成纤维细胞,采用双萤光素酶实验分析 miR-29 与 ITG $\beta_1$  的作用机制。结果:通过酶切及基因测序的方法证实所构建质粒序列正确,克隆获得的 DNA 片段大小及序列与 Genbank 报道的一致;成功构建 pMIR-ITG $\beta_1$ -3'UTR 双萤光素酶报告基因,双萤光素酶实验证实 miR-29 可以结合在 ITG $\beta_1$ -3'UTR 相应的碱基位点,并显著下调萤光素酶的表达。结论:该萤光素酶报告基因载体构建成功,转染 miR-29 mimics 后能显著下调萤火虫萤光素酶的表达。

**[关键词]** 野生型及其突变型;萤光素酶报告基因;突变型整合素  $\beta_1$ -3'端非翻译区;双萤光素酶报告基因;转录后调控;药物筛选

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0102-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170102

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160705.1444.026.html>

**[网络出版时间]** 2016-07-05 14:44

## Cloning of MiR-29a Target Genes ITG $\beta_1$ -3'UTR Luciferase Report Genes and Effects on Cardiac Fibroblasts Proliferation

CUI Lin<sup>1</sup>, LIU Wei-hong<sup>1\*</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>, WANG You-ping<sup>1</sup>, SHEN Yi-cai<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To build with wild type and mutant integrins beta 1 (integrin beta 1, ITG $\beta_1$ )-3'end of translation region (UTR) dual luciferase reporter gene expression system (DLR) (pMIR-ITG $\beta_1$ -3'UTR), through the dual luciferase report gene detects the kits ITG $\beta_1$ , this study miR-29 ITG $\beta_1$  gene targeting regulatory role. Which based on regulating ITG $\beta_1$  transcription level after the screening of tanshinone. **Method:** Extraction of whole blood RNA, reverse transcriptase mRNA into cDNA, for the template, RT-PCR amplification ITG $\beta_1$ -3'UTR fragments, after enzyme digestion to connect to the luciferase report carrier pMIR-Report, construct pMIR ITG $\beta_1$ -3'UTR luciferase reporter gene vector and mutation carriers and identified. Will pMIR-Report Luciferase control, constructed pMIR ITG $\beta_1$ -3'UTR and mutation carriers respectively with miR-mimics a total of 29

**[收稿日期]** 20160325(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81503435)

**[第一作者]** 崔琳, 硕士, 主管药师, 从事心血管药理学方面工作, Tel: 0371-66233478, E-mail: cuilin1234\_2006@126.com

**[通讯作者]** \*刘卫红, 硕士, 副主任药师, 从事中药药理学方面工作, Tel: 0371-66233478, E-mail: henantcm@126.com

transfection to ovarian granulosa cells, with double Luciferase experimental analysis of the mechanism of action of miR-29 and ITG $\beta_1$ . **Result:** By enzyme cutting and gene sequencing method confirmed by construction of plasmid sequence is correct; dual luciferase experiments have established that miR-29 can combine in ITG $\beta_1$ -3'UTR. Successful build pMIR ITG $\beta_1$ -3'UTR dual luciferase report gene, confirmed by the method of enzyme cutting and gene sequencing constructed plasmid sequence is correct. Cloning of DNA sequence fragment size and consistent with the reported in Genbank. **Conclusion:** The luciferase report gene build successful, miR-29 can combine after transcription ITG $\beta_1$ -3'UTR.

[**Key words**] wild type and mutant; luciferase reporter gene; integrins  $\beta_1$ -3' non-coding regions; dual luciferase reporter gene; transcription regulation; drug screening

慢性心力衰竭(CHF)是各种心脏疾病导致心功能不全的一种综合征,是心血管疾病死亡的主要原因之一。导致其发生发展的基本机制是心室重构(ventricular remodeling, VR)<sup>[1-3]</sup>。心肌细胞肥大、心肌间质纤维化是心室重构的主要特征,也是决定CHF的发病率、死亡率非常重要的病理因素。因此,如何逆转心室重构成为国内外研究热点。心脏重塑时心肌细胞和细胞外基质的基因表达及蛋白质功能发生显著改变<sup>[4-6]</sup>,细胞外基质(ECM)的结构和功能也发生了变化。胶原与细胞间的相互作用主要是通过整合素所介导的。整合素(integrin, ITG)是一类重要黏附分子,是广泛分布于细胞表面的跨膜糖蛋白,能与其他细胞黏附因子相互作用,也是细胞外基质的主要受体,介导细胞黏附。它参与心血管系统的发病,促进白细胞浸润,调节血栓形成。在整合素家族中,整合素 $\beta_1$ (ITG $\beta_1$ )表达于心肌,它的主要功能是作为心肌细胞与细胞外基质相互作用的黏附受体,使得细胞得以附着 ECM 形成整体,有研究显示心肌纤维化形成也与 ITG $\beta_1$  信号转导通路存在密切关系。

近年来研究发现的一种内源性、单链、非编码的小 RNA 分子,即微小 RNA (microRNA, miRNA),是一类长度约 22 个核苷酸大小的内源性非编码 RNA,它可通过识别靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区(3' UTR),并与之结合阻止翻译或导致 mRNA 降解,通过负性调控靶基因的表达<sup>[7-9]</sup>,在多种疾病生理及病理过程中起着质量的作用。miRNA 在发育调控、细胞增殖与凋亡、造血等方面都发挥作用<sup>[10-11]</sup>,一系列心脏特异性的 microRNA 在心肌肥大、心律失常、心肌梗死、心力衰竭等心脏疾病的发生发展中发挥作用,多种心脏疾病的发病受 miRNA 的调控<sup>[12-14]</sup>。如过表达 miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-214 基因引起心肌细胞发生肥大,过表达 miR-150 及 miR-181b 引起心肌细胞体积减

小<sup>[15]</sup>。miR-21 和 miR-29 在心肌梗死后的组织纤维化过程中发挥作用<sup>[16]</sup>。本研究通过合成 miR-29a(miR-29 的主要成员),将其转染至体外培养大鼠心肌成纤维细胞中转染 ITG $\beta_1$ -3'UTR 质粒,为后期筛查对心肌成纤维细胞有作用的 miRNA 提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** 原代培养并冻存的大鼠心肌成纤维细胞,本实验室液氮保存。1~3 d 新生 SD 乳鼠,雌雄不限,购自河南省动物实验中心,合格证号 SCXK(豫)2010-0002。

**1.2 仪器** Mini-PROTEAN 3 型电泳系统(美国 Bio-Rad 公司),Milli-Q 型超纯水仪(美国 Milipore 公司),CK40 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),Thermo Scientific Series 3000 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo 公司),Biofuge Stratos 型高速低温离心机(德国 Heraeus 公司),ABI7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),M3 型酶标仪(美国 MD 公司)。

**1.3 试剂** miR-29 mimics(广州市锐博生物科技有限公司,批号 AJ421751);报告基因表达载体 pMIR-Report Luciferase(美国 Ambion 公司,批号 AM5795);双荧光素酶检测试剂盒(Dual luciferase assay system(美国 Promega 公司,批号 E1910);PUC19T 载体,大肠埃希菌 JM109 感受态菌株,DL15000 marker, DL5000 bp DNA marker(大连 Takara 公司,批号分别为 3219, 9052, 3582Q, 3428Q);人血总 RNA 提取试剂盒(北京天根公司,批号 DP433);聚合酶链式反应(PCR)扩增试剂盒(美国 Genscript 公司,批号 L00342);DNA 凝胶回收试剂盒,DNA 质粒小量提取试剂盒(美国 Axygen 公司,批号分别为 AP-GX-50, AP-MN-P-50);限制性内切酶 SpeI, HindIII, T4 DNA 连接酶(美国 Fermentas 公司,批号分别为 ER1252, ER0505, EL0011);琼脂

糖(西班牙 Biowest 公司,批号 111860);脂质体 Lipofectamine2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 11668027);胰蛋白酶,DMEM 培养基(北京 Solarbio 公司,批号分别为 T1300,12100);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 10099141);Trizol 提取试剂,cDNA 合成试剂盒,实时荧光定量 PCR 试剂(Invitrogen 公司,批号分别为 15596026,C28025032,C11744500)。

## 2 方法

**2.1 RNA 提取及逆转录** 直接取新鲜的血液,加入 3 倍体积红细胞裂解液,混匀后室温放置 10 min,1 万  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min。彻底吸弃上清,收集白细胞沉淀。血液每 100 ~ 200  $\mu\text{L}$  收集的白细胞沉淀加入 Trizol 1 mL,室温放置 5 min,使样品充分裂解。每 1 mL Trizol 加入三氯甲烷 200  $\mu\text{L}$ ,剧烈振荡混匀后室温放置 3 ~ 5 min 使其自然分相。4  $^{\circ}\text{C}$ ,12 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 ~ 15 min。样品分成 3 层:黄色的有机相,中间层和无色的水相,RNA 主要在水相中,把水相转移到新的灭 RNA 酶 1.5 mL 离心管中。在上清液中加入等体积异丙醇,室温放置 10 ~ 20 min。4  $^{\circ}\text{C}$ ,12 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,弃上清,RNA 沉淀于管底。RNA 沉淀中加入 75% 乙醇 1 mL 振荡离心管,悬浮沉淀。每 1 mL Trizol 加入 75% 乙醇 1 mL。4  $^{\circ}\text{C}$ ,5 000 ~ 8 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 ~ 2 min,弃上清;室温放置 1 ~ 2 min 晾干,RNA 沉淀中加入 RNase-free 水 50 ~ 100  $\mu\text{L}$  充分溶解 RNA,-70  $^{\circ}\text{C}$  保存。

逆转录体系如下:RNA 1  $\mu\text{L}$ ;Random primer 1  $\mu\text{L}$ ;DEPC  $\text{H}_2\text{O}$  至 12  $\mu\text{L}$ ;70  $^{\circ}\text{C}$ ,5 min;4  $^{\circ}\text{C}$ ,2 min;5  $\times$  reaction buffer 4  $\mu\text{L}$ ;Ribolock Ribonodease inhibitor 1  $\mu\text{L}$ ;10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 2  $\mu\text{L}$ ;200  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  M-Mulv 1  $\mu\text{L}$ ;25  $^{\circ}\text{C}$ ,10 min;42  $^{\circ}\text{C}$ ,60 min;70  $^{\circ}\text{C}$ ,10 min;4  $^{\circ}\text{C}$ ,2 min。反转录生成的 cDNA,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**2.2 PCR 扩增 ITG $\beta_1$ -3'UTR 片段及突变片段** 根据基因数据库中 ITG $\beta_1$ -3'UTR 序列(全长 1 207 bp),采用 Primer Premier 5.0 软件进行 PCR 引物设计,引物由南京金斯瑞公司合成。引物序列见表 1。ITG $\beta_1$ -3'UTR 序列以 SpeI, HindIII 克隆到 pMIR-REPORT Luciferase。通过 overlap PCR 法将野生型基因突变。突变引物 ITG $\beta_1$ -tb-3'UTR 设计:5'端 2 ~ 8 位为保守序列,突变之 Hsa-miR-29a 靶位点 TGGTGC 突变成 ATCACC。

PCR 反应体系如下:10  $\times$  PCR buffer 10  $\mu\text{L}$ ;10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP mixture 8  $\mu\text{L}$ ;模板 2  $\mu\text{L}$ ;20  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  primer F 4  $\mu\text{L}$ ;20  $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$  primer R 4  $\mu\text{L}$ ;5  $\text{U} \cdot$

表 1 ITG $\beta_1$ -3'UTR 片段及突变片段引物

Table 1 Primer of ITG $\beta_1$ -3'UTR and ITG $\beta_1$ -tb-3'UTR mutation

引物	序列(5'-3')
ITG $\beta_1$ -3'UTR	上游 AAGCTGCGCACTAGTTACTGCCCGTGC AAATCCCA
	下游 ATCCTTTATTAAGCTTCGATTTAAGT ATTTTAGGC
ITG $\beta_1$ -tb-3'UTR	上游 ACAGAAACGTGATGACATTAACAAAAAT
	下游 AATGTCATCACGTTTCTGTACCTCTTCT

注:长度均为 1 207 bp。

$\text{pL}^{-1}$  DNA Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$ ;dH $_2\text{O}$  69.5  $\mu\text{L}$ ;PCR 条件:94  $^{\circ}\text{C}$ ,45 s;60  $^{\circ}\text{C}$ ,30s;72  $^{\circ}\text{C}$ ,1 min;循环 30 次。最后 1 次延伸 72  $^{\circ}\text{C}$ ,5 min。

**2.3 Spe I 和 Hind III 双酶切 ITG $\beta_1$ -3'UTR 片段及载体 pMIR-Report 反应体系如下:**10  $\times$  R buffer 5  $\mu\text{L}$ ;pMIR-Report 或 PCR 产物 10  $\mu\text{L}$ ;10  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  Hind III 2  $\mu\text{L}$ ;10  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  Mlu 12  $\mu\text{L}$ ;dH $_2\text{O}$  31  $\mu\text{L}$ ;37  $^{\circ}\text{C}$  水浴,反应过夜。

1% 琼脂糖凝胶,100 V 电泳 3 h,分离酶切片段。pMIR-Report 质粒(pMIRMH)与 ITG $\beta_1$ -3'UTR 连接成 pMIR-ITG $\beta_1$ -3'UTR 和 pMIR-ITG $\beta_1$ -tb-3'UTR。

**2.4 pMIR-Report 质粒与 ITG $\beta_1$ -3'UTR 连接成 pMIR-ITG $\beta_1$ -3'UTR 和 pMIR-ITG $\beta_1$ -tb-3'UTR 反应体系:**10  $\times$  T4 DNA Ligase Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ;pMIRMH 酶切 1  $\mu\text{L}$ ;ITG $\beta_1$ -3'UTR 或者 ITG $\beta_1$ -tb-3'UTR 酶切 3  $\mu\text{L}$ ;T4 DNA Ligase 0.5  $\mu\text{L}$ ;dH $_2\text{O}$  18  $\mu\text{L}$ ;16  $^{\circ}\text{C}$  过夜反应,70  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min 灭活酶活性。

**2.5 JM109 感受态菌的制备及 pMIR-ITG $\beta_1$ -3'UTR 和 pMIR-ITG $\beta_1$ -tb-3'UTR 重组质粒的筛选** 取出冻存的感受态菌株 50  $\mu\text{L}$ ,置于冰盒上融化。将重组质粒 5  $\mu\text{L}$  加入菌液中,冰上放置 30 min。42  $^{\circ}\text{C}$  水浴 90 s,取出置于冰上 2 min。无菌条件加入 SOB 600  $\mu\text{L}$ ,200  $r \cdot \text{min}^{-1}$  摇菌培养 1 h。无菌条件取出菌液 200  $\mu\text{L}$ ,涂于具有抗性的培养板上。37  $^{\circ}\text{C}$  温箱培育过夜,挑取单菌落接种至 15 mL 培养基中过夜培养。4  $^{\circ}\text{C}$ ,12 000  $\times g$  离心 30 s 收集菌体。倒掉上清,并轻轻吸干残余 Luria-Bertani 培养基。预冷的 STE 1 mL 重悬菌体,12 000  $\times g$  离心 30 s 收集菌体。加入 Solution I 100  $\mu\text{L}$ ,Rnase 漩涡震荡,轻轻转移悬液置于 1.5 mL 离心管中。加入 SolutionII 200  $\mu\text{L}$ ,盖紧管盖,快速颠倒 5 次,置于冰上小于 5 min。加入 Solution III 150  $\mu\text{L}$ ,盖紧管盖,温和震荡,冰上放置 5 min。4  $^{\circ}\text{C}$ ,12 000  $\times g$  离心 5 min,转移上清置于新离心管中。加入 2 倍体积无水乙醇,室温放置

2 min。4 ℃, 12 000 × *g* 离心 5 min, 去掉上清, 收集沉淀。加入预冷 70% 乙醇 1 mL 洗涤沉淀, 4 ℃, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 2 min, 收集沉淀。晾干, 加入 TE/H<sub>2</sub>O 溶液溶解质粒。挑取 8 个菌落分别增菌, 小量快速提取质粒, 酶切初步鉴定取 5 μL 重组质粒进行双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳 50 min, 鉴定正确者送金斯瑞生物工程有限公司测序, 测序正确后进行质粒大量提取, 步骤同上。

**2.6 细胞培养及荧光素酶活性检测** 复苏细胞传代 1 次后, 取指数生长期的细胞, 按 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的密度接种于 24 孔板中, 用 DMEM 培养基在 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 直到细胞达到 85% 以上汇合, 更换 Opti-MEM 无血清培养基, 进行细胞分组: 空白组, miR-29a 组, 空白 + ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 组, 空白 + ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 突变组, miR-29a + ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 组, miR-29a + ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 突变组, 阳性质粒组。配置重组质粒与载体与脂质体悬液 2 μL 置于 1.5 mL 离心管中用加样枪混合均匀, 静置 20 min, 使质粒与脂质体充分结合, 再与 miR-29a 同时加入培养板每孔中。在 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 h 后, 吸弃培养板中的转染培养液, 向各孔加入 Opti-MEM 无血清培养基, 在 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 收集 24 h 处理样品, 分别检测 firefly /Renilla 荧光素酶活性。pcDNA3.1-EGFP 阳性组荧光显微镜下观察荧光以确定转染效率。

**2.7 纤维化细胞模型中 ITGβ<sub>1</sub> 表达分析** 传代并培养的心肌成纤维细胞以 AngII 预处理 24 h 制备细胞纤维化模型, 然后进行细胞分组: 空白组、模型组、空白 + miR-29a 组、模型 + miR-29a 组, 分别作用 24

h 后, 收集细胞, 用 Trizol 提取总 RNA, 紫外分光法确定 RNA 的浓度和纯度, 将其逆转录为 cDNA。实时荧光定量反应条件: 95 ℃ 预变性 90 s 后进入 PCR 循环, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 共 40 个循环; 扩增反应结束后, 从 65 ℃ 缓慢加热到 95 ℃, 以建立 PCR 产物的溶解曲线, 每个标本均设置复管 PCR 反应。以 GAPDH 为内部对照, 采用 2<sup>ΔΔC<sub>t</sub></sup> 相对定量法计算各组基因表达情况。基因引物序列见表 2。

表 2 引物序列

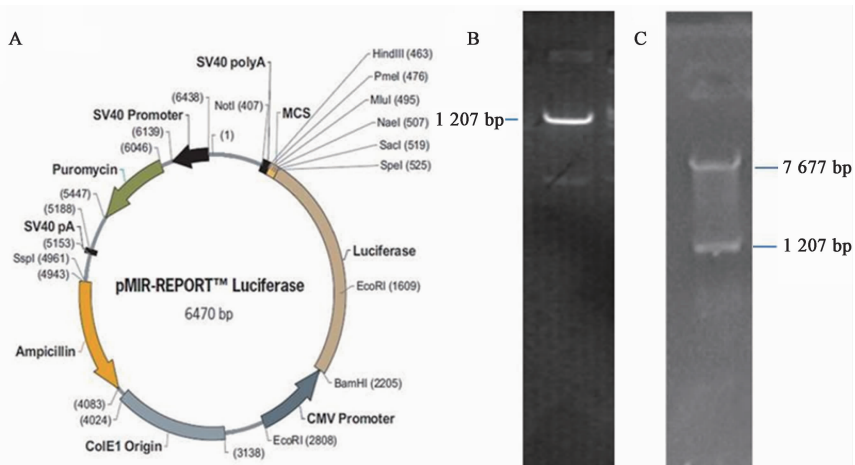
Table 2 Primer Sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 ACCCAGAAGACTGTGGATGG	201
	下游 TTCTAGACGGCAGGTCAGGT	
ITGβ <sub>1</sub>	上游 CTGAAACTCTCCGAGGAAA	180
	下游 AATGGCTTGTGCTTGTTCAT	

### 3 结果

**3.1 pMIR-Report 质粒与 ITGβ<sub>1</sub>-3' UTR 连接成 pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3' UTR 和 pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-tb-3' UTR** pMIR-REPORT miRNA 表达报告基因载体系统由 1 个实验萤火虫荧光素酶报告载体组成, 全长 6 470 bp。利用 PCR 技术扩增 ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 片段为 1 207 bp, pMIR-Report 质粒与 ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 经过酶切和 T4DNA 连接酶连接后, pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 片段为 7 677 bp, 琼脂糖凝胶电泳显示出的 PCR 产物片段大小符合。见图 1。

**3.2 测序鉴定结果** 挑取酶切鉴定正确的 pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 克隆进行测序。经测序, 质粒序列与 Genbank 报道一致, 证明目的基因已成功转入 pMIR-REPORT 载体中。见图 2。



A. pMIR-REPORT Luciferase 质粒; B. pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 质粒 SpeI 和 Hind III 双酶切; C. pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-tb-3'UTR 质粒 SpeI 和 Hind III 双酶切

图 1 pMIR-Report 质粒与 ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 连接成 pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 和 pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-tb-3'UTR 的电泳

Fig.1 Electrophoresis images of pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR digested by SpeI and Hind III

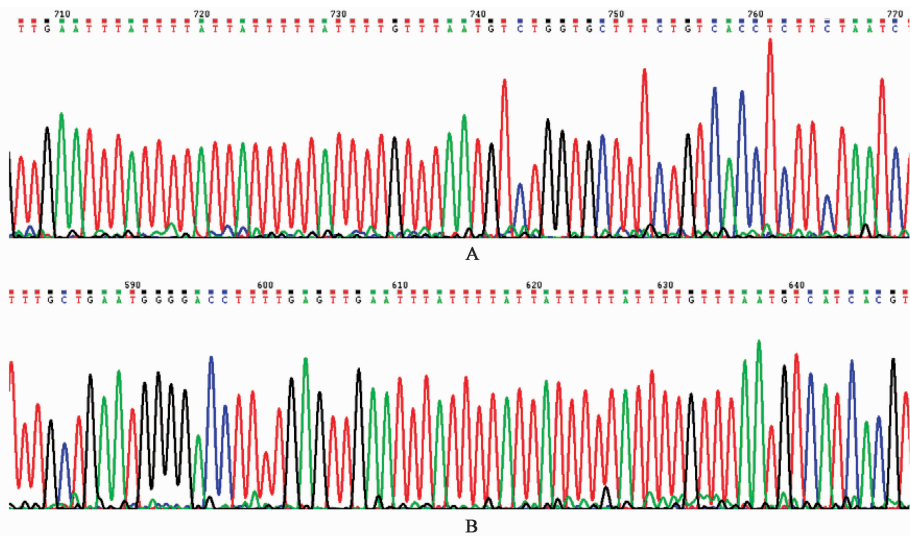


图 2 pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR (A), pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-tb-3'UTR (B) 质粒测序

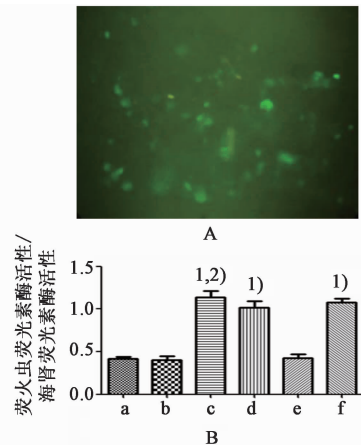
Fig. 2 Plasmid DNA sequencing results of pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR (A), pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-tb-3'UTR (B)

**3.3 pMIR-ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 载体荧光素酶报告基因检测**  
转染 24 h 后即可在荧光显微镜下观察到 pcDNA3.1-EGFP 阳性组发出绿色荧光,提示质粒转染效率较高。结果显示,空白组荧光素酶活性较低,单独转染 miR-29a 组荧光素酶活性与空白组比较,差异没有统计学意义,ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 组可以明显促进 firefly/Renilla 活性,ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR-tb 组荧光素酶活性与空白组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), miR-29a + ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 突变组荧光素酶活性显著下降,与单独转染 ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 组相比,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示 miR-29a 与 ITGβ<sub>1</sub> 基因 3'UTR 结合,抑制 3'UTR 双荧光素酶报告基因系统的荧光素酶活性,即可以在转录后水平对 ITGβ<sub>1</sub> 基因表达进行调控。见图 3。

**3.4 实时荧光定量 PCR 检测 ITGβ<sub>1</sub>-基因表达**  
AngII 作用 24 h, ITGβ<sub>1</sub> mRNA 表达明显增高,与空白组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), miR-29a + AngII 组 ITGβ<sub>1</sub> 表达降低,与空白组相比差异无统计学意义。见图 4。

#### 4 讨论

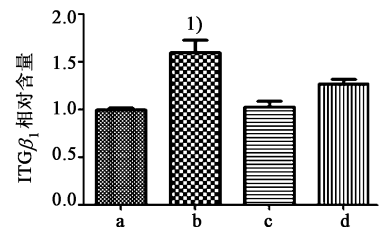
整合素是一类多种细胞的心肌细胞外基质受体,与组织修复、纤维化形成、炎症血管化、基质沉积等病理过程密切相关<sup>[17]</sup>。整合素是由 α 和 β 链组成的异二聚体,含 β<sub>1</sub> 亚单位的整合素主要介导细胞与细胞外基质成分之间的黏附作用。大部分整合素胞外域可以识别配体分子中的特定序列,如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列 (RGD),而大多数细胞外基质蛋白都含有 RGD 顺序<sup>[18]</sup>。细胞外基质成分的改变



a. 空白组; b. miR-29a 组; c. ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 组; d. ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 突变组; e. miR-29a + ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 组; f. miR-29a + ITGβ<sub>1</sub>-3'UTR 突变组; A. pcDNA3.1-EGFP 阳性组:加入绿色荧光蛋白质粒,荧光显微镜观察绿色荧光量,以判断转染效率; B. 各组荧光素酶活性比较分析;与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$

图 3 对细胞荧光素酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effects of miR-29a on luciferase activity of fibroblast cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



a. 空白组; b. 模型组; c. 空白 + miR-29a 组; d. 模型 + miR-29a; 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 4 ITGβ<sub>1</sub> mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 mRNA expression of ITGβ<sub>1</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

与 ITG $\beta_1$  介导信号在细胞骨架与基质之间进行传递有密切关系。

本实验前期结果显示,桂枝甘草汤具有良好的改善心率失常的作用,但其具体的分子生物学机制尚不明确,笔者推测其心脏保护作用可能与 miR-29 改善 ITG $\beta_1$  转录后活性有关。转录后调控是指在基因转录起始后对转录产物进行的一系列加工和修饰的过程,通常位于成熟 mRNA 的 5' 或 3' 端非翻译区(UTR)的特异序列与相应蛋白相互作用,介导 mRNA 的出核转运、胞质中的定位、翻译起始以及 mRNA 的降解,于转录后水平调控基因的表达水平<sup>[19-20]</sup>。基于此,构建了包含 ITG $\beta_1$ -3'UTR 全长的荧光素酶报告基因质粒,并与 Renilla luciferase 质粒共转构成双荧光素酶报告基因系统,基于该报告基因系统在心肌成纤维细胞上对其进行鉴定和活性检测。实验结果表明,miR-29 可抑制 ITG $\beta_1$ -3'UTR 双荧光素酶报告基因系统的荧光素酶活性,即可以在转录后水平对 ITG $\beta_1$  基因表达进行调控。有文献报道,纤维化过程中,miR-29 表达下降,且胶原表达下降<sup>[21]</sup>。在此基础上,笔者在 AngII 诱导的心肌成纤维模型上初步检测了 ITG $\beta_1$  基因表达。结果提示 AngII 组 ITG $\beta_1$  表达增高,而 miR-29a 组表达下降,与文献报道一致。综上所述,通过研究 miR-29 和靶基因 ITG $\beta_1$ -3'UTR 的结合位点,作为进一步研究中药及其有效成分对心肌成纤维细胞调控及其生物学作用的基础。

#### [参考文献]

[1] 吕仕超,张军平. 中医药调控心脏稳态与重构的研究[J]. 中华中医药杂志,2014,29(12):3892-3895.

[2] 张蓓蓓,蔡辉. 肝细胞生长因子与心肌纤维化的相关性研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(12):1545-1547.

[3] 王国钦,李瑞满,金伟,等. 麦冬抑制大鼠心肌成纤维细胞胶原合成的作用及其机制[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(4):615-618.

[4] 杨丽,胡慧媛,郝丽英. MicroRNA 与心血管疾病关系的研究[J]. 生理科学进展,2015(5):365-370.

[5] 王世强,李丹,李博雅,等. microRNA 调控心肌纤维化研究进展[J]. 生命的化学,2015,35(4):565-570.

[6] 王洁,刘学波. miRNA 在心脏疾病中的研究进展[J]. 同济大学学报:医学版,2014,35(6):124-128.

[7] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J] Cell, 2004, 116 (2): 281-297.

[8] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature,2004, 4(4):689-696.

[9] Carthew R W, Sontheimer E J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. Cell, 2009, 136 (4): 642-655.

[10] Brennecke J, Hipfner D R, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila [J]. Cell,2003, 113(1):25-36.

[11] Chen C Z, Li L, Lodish H F, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. Science, 2005, 303(303):83-86.

[12] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. Nature, 2005, 436 (7048): 214-220.

[13] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure [J]. Circulation, 2007, 116(3): 258-267.

[14] 张振辉, 尤祥宇, 刘少军, 等. MicroRNA-29a 对大鼠心肌细胞  $\beta_1$  和  $\beta_2$  表达的调控作用及其机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(11):1928-1932.

[15] Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart; do they play a role in cardiac hypertrophy? [J]. Am J Pathol, 2007, 170(6): 1831-1840.

[16] Van Rooij E, Sutherland L B, Thatcher J E, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(35):13027-13032.

[17] 付金容, 唐其柱, 沈涤非. 整合素  $\beta_1$  在自身免疫性心肌炎小鼠心肌的表达 [J]. 心脏杂志, 2005, 17(1): 25-28.

[18] 沈雁, 韦红. 瓜蒌薤白半夏汤对心肌纤维化中整合素  $\beta_1$  的抑制作用 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4): 277-281.

[19] 印翠, 张俊玲, 施志仪, 等. 应用于 miRNA 靶标检测的双荧光素酶报告载体的构建及鉴定 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(12):180-185.

[20] 邱瑜, 黄建平, 周勤仙, 等. Hsa-miR-218 靶向调控 LASP1 对宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(9):1572-1577.

[21] 王家骥, 贾竹青, 周春燕, 等. microRNA 在心脏发育和心脏疾病中的作用 [J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(12):957-966.

[责任编辑 邹晓翠]