

# PTBP1介导长链非编码RNA RP11-879F14.2发挥抑制心肌纤维化的作用

杨莹<sup>1</sup>, 郭晶<sup>2</sup>, 温艺红<sup>2</sup>, 黄宇晴<sup>1</sup>, 易芷瑶<sup>1</sup>, 朱杰宁<sup>3</sup>, 方咸宏<sup>3</sup>, 单志新<sup>1,2,3,4</sup>  
(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006; 2. 华南理工大学医学院, 广东 广州 510006; 3. 广东省临床药理学重点实验室//广东省人民医院//广东省医学科学院, 广东 广州 510080; 4. 南方医科大学第二临床医学院, 广东 广州 510280)

**摘要:**【目的】研究长链非编码RNA(lncRNA)RP11-879F14.2调控心肌成纤维细胞纤维化表型的作用及机制。【方法】对心衰患者及健康对照者心肌组织进行Masson染色检测心肌胶原水平。lncRNA表达谱芯片检测心衰患者及健康对照者心肌中lncRNAs的表达变化,实时定量荧光PCR(RT-qPCR)验证RP11-879F14.2在心衰患者心肌中的表达。利用重组RP11-879F14.2腺病毒(rAd-RP11-879F14.2)感染人心房肌成纤维细胞(HAFs),检测纤维化相关基因*Col1a1*, *Col3a1*和*Acta2*表达。RT-qPCR检测HAFs的核/质组分中RP11-879F14.2的水平。基于生物信息学预测和双荧光素酶报告基因实验鉴定RP11-879F14.2与多聚嘧啶区结合蛋白(PTBP1)的结合作用。检测敲低HAFs中PTBP1表达对RP11-879F14.2调控心肌纤维化相关基因表达的影响。【结果】Masson染色结果显示,心衰病人心肌组织发生明显纤维化。RT-qPCR结果证实RP11-879F14.2在心衰患者心肌组织中表达增加( $P<0.01$ )。过表达RP11-879F14.2可在RNA及蛋白水平显著抑制心肌纤维化相关基因表达。核质分离及RT-qPCR检测结果证实RP11-879F14.2主要分布于细胞核中。RP11-879F14.2可与PTBP1结合,并促进HAFs中PTBP1表达,而敲低PTBP1可逆转RP11-879F14.2抑制HAFs中纤维化相关基因表达的作用。【结论】PTBP1可介导RP11-879F14.2发挥抑制心肌纤维化的作用。

**关键词:**长链非编码RNA;lncRNA RP11-879F14.2;PTBP1;心肌纤维化;心肌成纤维细胞

**中图分类号:**R363;R5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2021)01-0033-09

## PTBP1 Mediates the Effect of lncRNA RP11-879F14.2 on Suppression of Fibrosis-related Genes in Cardiac Fibroblasts

YANG Ying<sup>1</sup>, GUO Jing<sup>2</sup>, WEN Yi-hong<sup>2</sup>, HUANG Yu-qing<sup>1</sup>, YI Zhi-yao<sup>1</sup>, ZHU Jie-ning<sup>3</sup>,  
FANG Xian-hong<sup>3</sup>, SHAN Zhi-xin<sup>1,2,3,4</sup>

(1. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510006, China; 2. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Pharmacology//Guangdong Provincial People's Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 4. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China.)

Correspondence to: SHAN Zhi-xin E-mail: zhixinshan@gdph.org.cn

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of lncRNA RP11-879F14.2 on fibrotic phenotype of cardiac fibroblasts (CFs) and the mechanism involved. 【Methods】 Masson's trichrome staining was performed to detect the level of

收稿日期:2020-10-06

基金项目:国家自然科学基金(81770264, 82070254);广州市科技计划项目(202002030013)

作者简介:杨莹,在读硕士研究生,研究方向:心肌纤维化分子调控机制,E-mail,904528037@qq.com;单志新,通信作者,研究员,博士生导师,研究方向:非编码RNA与心肌重构,E-mail: shanzhixin@gdph.org.cn

myocardial fibrosis in the myocardium of patients with heart failure (HF) and the healthy controls. LncRNAs micro-array was used to detect the expression of lncRNAs in human myocardium samples. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to verify RP11-879F14.2 expression in the myocardium of HF patients and the healthy controls. The recombinant RP11-879F14.2 adenovirus (rAd-RP11-879F14.2) was used to infect human atrial myofibroblasts (HAFs). Expression of *Colla1*, *Col3a1* and *Acta2* was detected by RT-qPCR and Western blot assay, respectively. Distribution of RP11-879F14.2 in the nucleus and cytoplasm of HAFs was determined by RT-qPCR assay. According to the results of bio-informatic prediction, dual-luciferase reporter assay was performed to confirm the interaction between RP11-879F14.2 and polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1). Effect of PTBP1 knock-down on fibrosis-related genes expression modulated by RP11-879F14.2 in HAFs was determined.【Results】 Masson's trichrome staining showed that the myocardial fibrosis was significantly increased in the myocardium of HF patients. Consistent with lncRNA microarray results, RP11-879F14.2 was found obviously up-regulated in the myocardium of HF patients. Over-expression of RP11-879F14.2 inhibited mRNA and protein expression of myocardial fibrosis-related genes in HAFs. Results of nucleocytoplasmic separation and RT-qPCR assay showed that RP11-879F14.2 mainly distributed in the nucleus of HAFs. Dual-luciferase reporter assay revealed the interaction between RP11-879F14.2 and PTBP1. Over-expression of PTBP1 enhanced PTBP1 expression in HAFs, but knock-down of PTBP1 could reverse the anti-fibrotic effect of RP11-879F14.2 in HAFs.【Conclusion】 PTBP1 mediates the anti-fibrotic effect of RP11-879F14.2 in HAFs.

**Key words:** long non-coding RNA; lncRNA RP11-879F14.2; PTBP1; myocardial fibrosis; cardiac fibroblasts

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2021, 42(1):33-41]

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是心肌组织中细胞外基质过度沉积并伴有胶原蛋白比例或胶原成分发生变化,引起心的硬度增加,弹性下降,顺应性发生改变,心输出量与供血能力受到严重影响,最终导致心肌功能障碍直至心衰的发生<sup>[1-2]</sup>。尽管目前所用的肾素-血管紧张素-醛固酮系统阻滞剂等抗纤维化药物可延缓心肌纤维化的进展,但并不能从根本上预防和治疗此类疾病,因此,研究并阐明心肌纤维化发生的病理生理学机制,发现关键的干预靶点对于心肌纤维化的治疗具有重要的意义<sup>[3]</sup>。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类核苷酸长度大于200 nt并且缺乏蛋白质编码功能的转录本,与编码蛋白的mRNA相比,lncRNA同样由RNA聚合酶Ⅱ或聚合酶Ⅲ转录而来,多数具有5'帽子和3'端多聚尾,但其物种间的保守序列小于10%,表达丰度不高,具有较强的组织和细胞特异性<sup>[4-6]</sup>。研究发现,lncRNAs可作为“分子信号”、“支架”和“诱饵”等与不同分子结合,在表观调控、转录以及转录后调控等多个层面参与基因表达的调节<sup>[7-8]</sup>。研究显示lncRNAs与心力衰竭的发生密不可分,并且参与心肌纤维化的发生过程<sup>[9-10]</sup>,深入探究lncRNAs调节心肌纤维化的作用机制,对于心肌纤维化的治疗研究具有重要意义。本文中,我们通过分析心衰患者与健

康人心肌组织的lncRNA表达谱,选取在心衰患者心肌中表达显著增加的lncRNA RP11-879F14.2,并探讨其调控心肌纤维化的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本

利用心衰病人和健康器官捐献者的心肌组织进行lncRNA表达谱分析和RP11-879F14.2表达的定量PCR检测。心衰病人和健康器官捐献者均知情同意,基本资料见表1。利用房颤(atrial fibrillation, AF)病人(持续出现房颤的时间不低于1年)、窦性心律(sinus rhythm, SR)病人左心耳切除术后废弃的新鲜心耳组织及无心源性疾病的器官捐献者的新鲜心耳组织进行心房肌成纤维细胞的分离。

本研究经广东省人民医院伦理委员会批准【批准号No.GDREC2019238H(R1)】,手术标本来源:广东省心血管病研究所。

### 1.2 主要试剂

Masson三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);限制性内切酶*Xho* I、*Eco*R I、*Pac* I和*Pme* I(NEB);BJ5183 *E. Coli*、载体pAd-Track-cmv vector和pAd-Easy I(Colon cancer);DMEM/F12细胞培

表1 患者临床资料

Table 1 Clinical characteristics of the patients with heart failure and healthy organ donors

	HF Patients	Healthy Organ Donors
Number	26	22
Gender (F/M)	22/4	18/4
Age	48.42±2.83	38.82±2.63
Medical history	Ischemic cardiomyopathy, coronary heart disease, dilated cardiomyopathy, cardiac function grade III	N/A
Medication	Digoxin, Metoprolol, FuroSDide, Warfarin, Spironolactone, Trimetazidine, Heparin, Norepinephrine...	N/A

N/A, not applicable; F/M, Female/Male

培养基、特级澳洲胎牛血清、2.5 g/L EDTA-胰蛋白酶 (Gibco); 100×青-链霉素混合抗生素 (solarbio); 转染试剂 Lipofectamine 2000、核质分离试剂盒和 TRIzol 试剂 (Invitrogen); 逆转录试剂盒、2×SYBR Green Mix、4×SDS loading buffer 和 RNase free water (TaKaRa); si-PTBP1 (广州锐博); SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 (碧云天); GAPDH 抗体、COL1A1 抗体、COL3A1 抗体 (Protein Technology);  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 抗体 (Abcam); BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo); 蛋白 Marker

(Fermentas); ECL 发光液 (Millipore); PVDF 膜 (Whatman); 血管紧张素 II (angiotensin II, Sigma)。其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。所用引物由 Invitrogen 公司合成, 具体序列见表 2。

### 1.3 主要方法

1.3.1 Masson 三色染色 剪取临床外科手术废弃的新鲜心耳组织, 用 40 g/L 多聚甲醛固定过夜后, 逐步脱水、透明、浸蜡、包埋后制作 4  $\mu$ m 厚度的连续石蜡切片, 用 Masson 三色染色试剂盒逐步染色胶原纤维, 观察心肌组织的胶原纤维沉积情况, 选择

表2 PCR引物序列

Table 2 The sequences of the primers for RT-qPCR

Gene	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>Col1a1</i>	F, CTGGTCCTGTTGGAAGTCGT	201
	R, CAGATGCACCTGTTTCTCCA	
<i>Col3a1</i>	F, CAATGTAAAGAAGTCTCTGAAG	240
	R, CAAACAGGGCCAAATGTCCAC	
<i>Acta2</i>	F, CTGTGCTATGTCGCTCTGGA	192
	R, ATAGGTGGTTTCGTGGATGC	
<i>RP11-879F14.2</i>	F, CAAGAGCGCACAGACTTTGA	239
	R, ACAATCCCAGCCTCTTGACA	
<i>PTBP1</i>	F, CCAGCCCATCTACATCCAGT	200
	R, TCTCCACGATGATCCTGAGC	
<i>GAPDH</i>	F, CAAGAAGGTGCTGAAGCAGG	200
	R, CCACCCTGTTGCTGTAGCC	
<i>U6</i>	F, GTCCGCGTCTCGCTTCGGCAGC	160
	R, GTGCGTGTCTGGAGTC	

F: forward primer; R: reverse primer.

八个单独的视野(放大倍数=原始 $\times$ 400)计算心肌胶原纤维所占比例(CVF), $CVF = \text{胶原区域} / \text{总面积}$ 。

**1.3.2 lncRNAs 表达谱芯片分析** 取各5份心衰病人和健康捐献者的心肌组织进行lncRNAs表达谱分析,由上海康成公司协助完成芯片的杂交和结果分析。主要实验步骤:利用TRIzol试剂提取人心肌组织总RNA,用随机引物进行转录,扩增后与lncRNAs表达谱芯片(Arraystar human lncRNA Array)上的寡核苷酸cRNA探针(Arraystar Super RNA labeling kit)进行杂交反应。杂交后经Agilent Scanner G2505扫描并上传数据,最后由Feature Extraction Software进行数据处理和结果分析。

**1.3.3 人心房肌成纤维细胞(HAFs)的分离、培养和处理** 参考我们已报道方法<sup>[11]</sup>,用冷PBS清洗左心耳,只剪取近心房组织,去除淤血。用0.25% EDTA-胰蛋白酶消化法分离心房肌成纤维细胞。离心弃上清,沉淀用完全培养液(含100 mL/L胎牛血清、 $1 \times 10^5$  U/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM/F12培养液)重悬,接种于25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中,再置于37 ℃、体积分数为5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。培养24 h后,更换一次完全培养液。待细胞密度达90%时,消化传代。本实验使用的HAFs为P3-P5。分别将重组腺病毒 rAd-lncRNA RP11-879F14.2、rAd-PTBP1感染HAFs,以rAd-GFP(MOI=10)作为对照,感染后于37 ℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。用lipofectamine2000试剂将100 nmol/L si-NC阴性对照,si-PTBP1分别转染至HAFs中,并在37 ℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养24 h,收集细胞,进行后续测定。

**1.3.4 lncRNA RP11-879F14.2 和 PTBP1 重组腺病毒的制备** 根据我们报道的方法<sup>[12]</sup>,分别将RP11-879F14.2和PTBP1的模板DNA定向克隆到pAd-Track-cmv载体上。然后,将pAd-Track-RP11-879F14.2、pAd-Track-PTBP1分别转化入含pAd-Easy-I骨架质粒BJ5183的化学感受态大肠杆菌中进行同源重组。接着,将RP11-879F14.2、PTBP1的重组腺病毒质粒用限制酶Pac I线性化,并转染到HEK293T细胞中进行病毒包装和扩增。同时,制备rAd-GFP作为对照空载腺病毒。

**1.3.5 双荧光素酶报告基因实验** 参照已报道方法<sup>[11]</sup>构建包含RP11-879F14.2的重组萤光素酶报告质粒pGL3-RP11-879F14.2(基于pGL3-promoter载体)。利用人心肌AC16细胞,将AC16细胞(细胞

密度约为 $1 \times 10^5$ /每孔12孔板)转染1.0  $\mu$ g重组萤光素酶报告质粒,500 ng pAd-Track-PTBP1以及1 ng pRL-TK(表达海肾萤光素酶的内参照质粒)。转染24 h后,测定萤火虫萤光素酶(firefly luciferase, FL)及海肾萤光素酶(renilla luciferase, RL)强度,两种荧光强度比值(FL/RL)变化可反映RP11-879F14.2与PTBP1间的结合能力。

**1.3.6 实时定量PCR(RT-qPCR)** 采用TRIzol法提取总RNA后,定量1.0  $\mu$ g,用Oligo(dT)<sub>15</sub>和随机引物逆转录出cDNA。以Gapdh作为内部参照,用相应的引物检测RP11-879F14.2、PTBP1及纤维化相关基因的RNA表达水平。在vii A7 Quantitative PCR System(美国Applied Biosystems)进行PCR反应,以2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算RP11-879F14.2及纤维化相关基因的相对表达水平。

**1.3.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)** 在处理后的HAFs中,加入RIPA蛋白裂解液,冰上裂解后收集细胞,超声后于4 ℃ 10 000  $\times$ g转速离心15 min,取上清测定浓度后,进行蛋白定量分装。加入4 $\times$  SDS loading buffer,99 ℃加热10 min使蛋白质变性,然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。完成PVDF膜转印蛋白后,加入5%脱脂牛奶至完全覆盖PVDF膜,封闭1 h,分别用相应的一抗anti-COL1A1(1:1 000)、anti-COL3A1(1:5 000)、anti- $\alpha$ -SMA(1:5 000)、anti-PTBP1(1:2 000)4 ℃孵育过夜, TBST洗膜,加入二抗(1:5 000)室温孵育1 h。ECL发光试剂盒曝光显影,以GAPDH(1:5 000)为内参照, Image J扫描灰度值并分析蛋白表达相对含量。

## 1.4 统计学方法

用SPSS 25.0统计软件进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,两组计量资料的均数比较,如果每一组资料都呈正态分布并且方差齐性,组间比较采用 $t$ 检验,反之用校正 $t$ 检验或秩和检验;多组均数比较,各组定量资料都呈正态分布并且方差齐性采用One way-ANOVA进行分析,并用Bonferroni校正的 $t$ 检验进行组间两两比较,反之用Kruskal Wallis  $H$ 检验。

## 2 结 果

### 2.1 lncRNA RP11-879F14.2在心衰患者心肌中表达增加

Masson染色结果表明,与健康对照组相比,心

衰患者心肌微血管周围和细胞间质的胶原沉积明显,发生显著的心肌纤维化(图1A)。LncRNA表达谱芯片结果显示,心衰患者心肌的lncRNAs表达谱发生改变,分别有230和262个lncRNAs呈2倍以上的表达上调和下调,其中lncRNA RP11-879F14.2在心衰心肌中升高表达2.81倍(图1B)。RT-qPCR结果证实,与健康对照组相比,RP11-879F14.2在心衰患者心肌组织中表达显著增加( $P < 0.01$ ;图1C)。

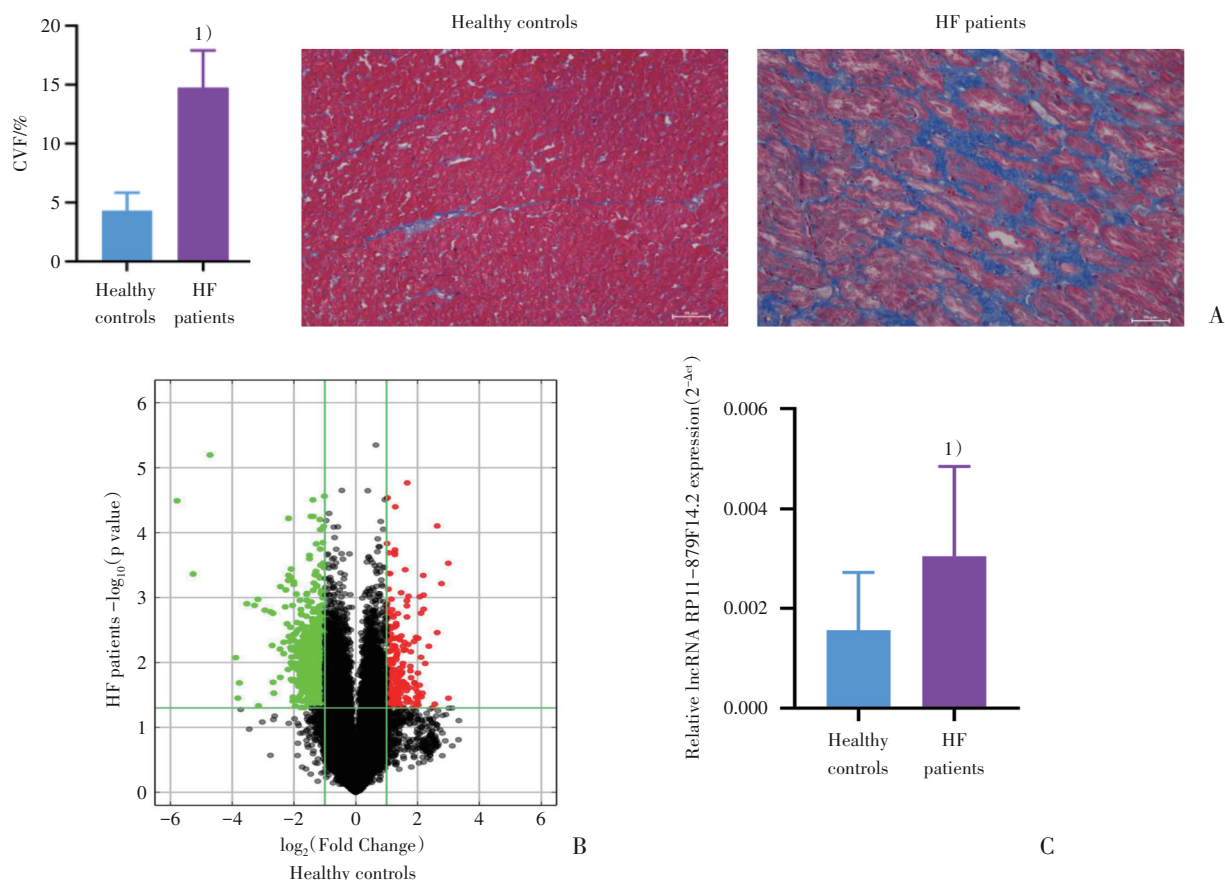
## 2.2 lncRNA RP11-879F14.2 富集于 HAFs 的细胞核中

RT-qPCR结果显示,在20  $\mu\text{mol/L}$  Ang- II 处理的HAFs中RP11-879F14.2表达显著增加( $P < 0.01$ ;图2A)。核质RNA组分分离和RT-qPCR结果显示,在Ang- II 处理前后的HAFs中,RP11-879F14.2均

主要分布在细胞核中(图2B、C)。

## 2.3 lncRNA RP11-879F14.2 抑制 HAFs 中纤维化相关基因表达

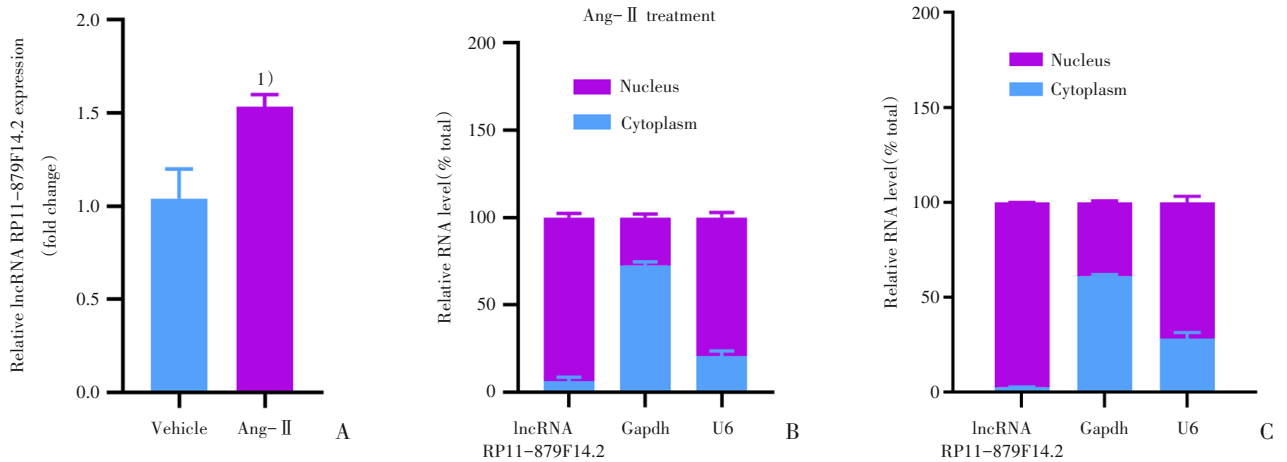
为进一步探究RP11-879F14.2对HAFs纤维化表型的影响,我们利用重组腺病毒rAd-RP11-879F14.2在HAFs过表达RP11-879F14.2,进而检测纤维化相关基因(*Colla1*、*Col3a1*、*Acta2*)的表达。rAd-RP11-879F14.2共表达的绿色荧光蛋白(GFP)显示rAd-RP11-879F14.2已充分感染HAFs(图3A)。RT-qPCR结果显示,腺病毒可充分介导RP11-879F14.2在HAFs中过表达,同时引起HAFs中纤维化相关基因表达显著降低(图3B)。Western blot结果显示,过表达RP11-879F14.2的HAFs中*Colla1*、*Col3a1*和 $\alpha$ -SMA的表达显著降低(图3C)。



A: Masson trichrome staining (Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ).  $t=6.639$ ,  $^1P=0.002$  vs. healthy controls. Data are shown as mean  $\pm$  SD,  $n=5$ . B: The Volcano Plot figure shows the representative dysregulated lncRNAs in the myocardium of HF patients. Red and green pots separately present the upregulated and down-regulated lncRNAs over 2-fold,  $n=5$ . C: Detection of RP11-879F14.2 in the myocardium of HF patients by RT-qPCR assay.  $t=3.333$ ,  $^1P=0.0017$  vs. healthy controls. Data are shown as mean  $\pm$  SD,  $n=22, 26$ .

图1 lncRNA RP11-879F14.2在心衰病人心肌中表达增强

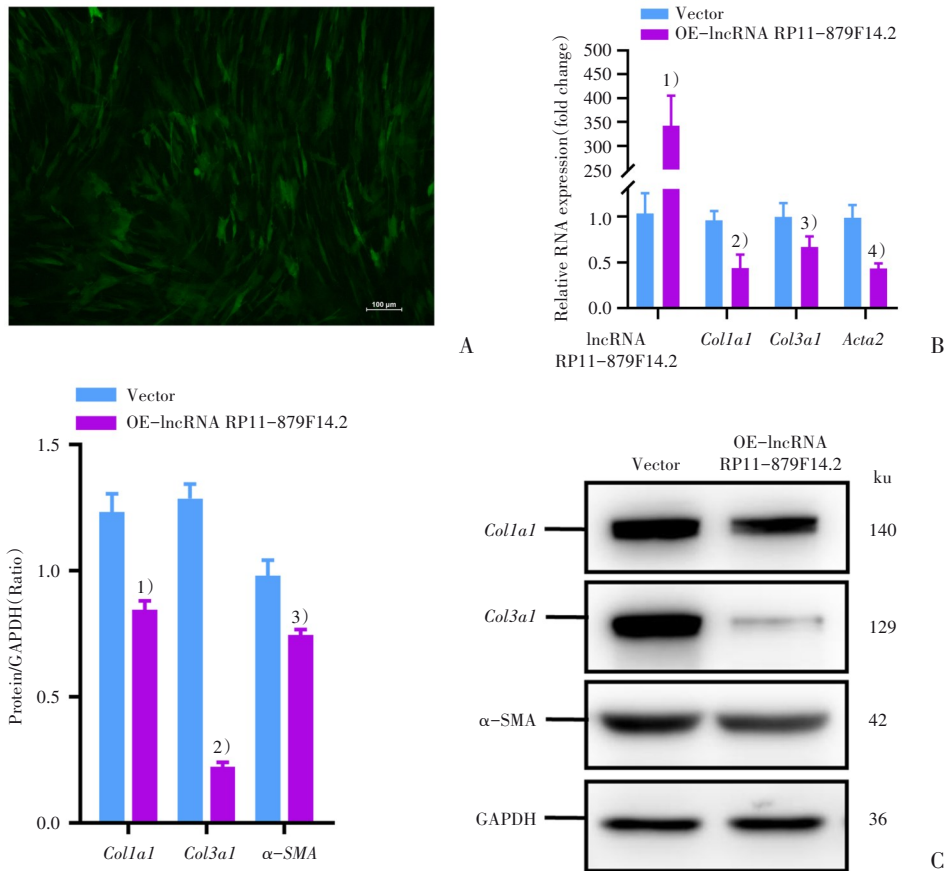
Fig. 1 Upregulation of lncRNA RP11-879F14.2 in the myocardium of patients with heart failure



A: Up-regulation of RP11-879F14.2 in Ang-II-induced HAFs.  $t=4.964$ , <sup>1)</sup>  $P=0.0077$  vs. Vehicle group. Data are shown as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . Location of RP11-879F14.2 in HAFs before (B) and after Ang-II treatment (C). Data are shown as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ .

图2 lncRNA RP11-879F14.2在HAFs中的核质分布情况

Fig. 2 Cellular distribution of lncRNA RP11-879F14.2 in the cytoplasm and nucleus of HAFs



A: Co-expression of green fluorescent protein (GFP) in HAFs after infection with rAd-lncRNA RP11-879F14.2. B: Detection of RP11-879F14.2 and fibrosis-related genes in HAFs by RT-qPCR assay. RP11-879F14.2:  $t=12.03$ , <sup>1)</sup>  $P<0.0001$  vs. Vector; *Col1a1*:  $t=6.491$ , <sup>2)</sup>  $P=0.0002$  vs. Vector; *Col3a1*:  $t=3.838$ , <sup>3)</sup>  $P=0.0050$  vs. Vector; *Acta2*:  $t=8.443$ , <sup>4)</sup>  $P<0.0001$  vs. Vector. Data are shown as mean  $\pm$  SD,  $n=5$ . C: Protein expression of fibrosis-related genes in HAFs by Western blotting assay. *Col1a1*:  $t=4.800$ , <sup>1)</sup>  $P=0.0086$  vs. Vector; *Col3a1*:  $t=17.59$ , <sup>2)</sup>  $P<0.0001$  vs. Vector; *Acta2*:  $t=3.554$ , <sup>3)</sup>  $P=0.0237$  vs. Vector. Data are shown as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ .

图3 LncRNA RP11-879F14.2抑制HAFs中纤维化相关基因表达

Fig. 3 LncRNA RP11-879F14.2 inhibits fibrosis-related genes expression in HAFs

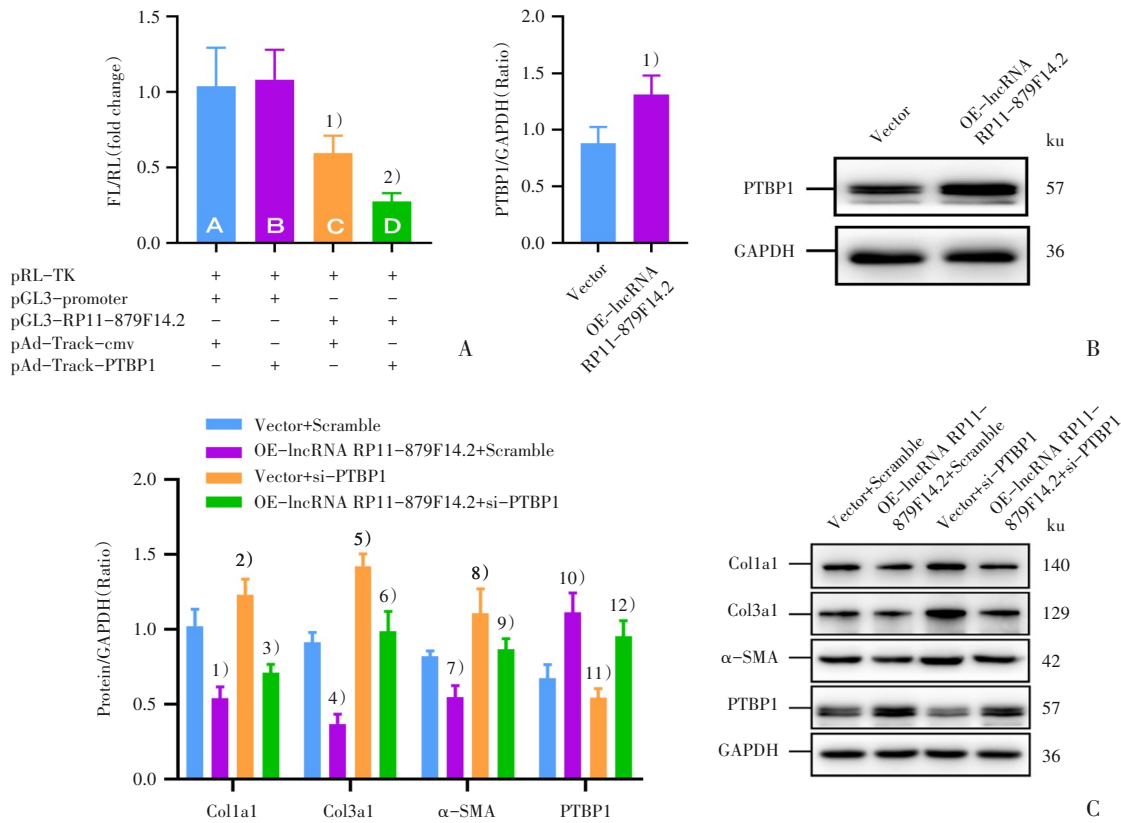
### 2.4 PTBP1 介导 lncRNA RP11-879F14.2 抑制 HAFs 中纤维化相关基因表达

序列分析结果 ([http://service.tartagliolab.com/page/catrapid\\_omics\\_group](http://service.tartagliolab.com/page/catrapid_omics_group)) 提示, RP11-879F14.2 与 PTBP1 蛋白间存在结合作用, 我们通过双荧光素酶报告基因实验结果证实, 与 PTBP1 蛋白的结合可降低 AC16 细胞中 RP11-879F14.2 的稳定性 (图 4A)。Western blot 结果显示, 腺病毒介导有效表达 RP11-879F14.2 的 HAFs 中, PTBP1 蛋白表达显著增加 (图 4B)。沉默 HAFs 中 PTBP1 表达, 可显著逆转 RP11-879F14.2 抑制 HAFs 中纤维化相关基因表达的作用 (图 4C)。

## 3 讨论

心肌纤维化是引发心力衰竭的主要原因, 其特征主要为成纤维细胞增殖, 并向肌成纤维细胞转化, 细胞外基质蛋白过度沉积, 该过程可引起心脏室壁顺应性降低, 舒缩功能减弱以及心脏传导异常等, 最终导致心功能不全, 进而引起心衰<sup>[13]</sup>。本文基于 lncRNA 表达谱芯片和 RT-qPCR 结果, 证实 RP11-879F14.2 在心衰患者心肌和 AngII 诱导的 HAFs 中表达均增强; 功能研究发现在 HAFs 中过表达 RP11-879F14.2 可以显著抑制 HAFs 中纤维化相关基因的表达, 进而证实心衰时心肌中高表达的 RP11-879F14.2 具有抑制心肌纤维化的作用。

研究表明, lncRNA 在心脏发育以及多种心血管系统疾病中发挥重要作用, 可能成为多种心血管疾病提供治疗靶点。如慢性压力超负荷后的小鼠



A: Identification of interaction between PTBP1 and RP11-879F14.2 by dual-luciferase assay.  $F=24.33$ ,  $P<0.0001$ , <sup>1)</sup>  $P=0.0027$  vs. group A, <sup>2)</sup>  $P=0.0266$  vs. group C. B: PTBP1 protein expression in HAFs with over-expression of RP11-879F14.2.  $t=3.339$ , <sup>1)</sup>  $P=0.0289$  vs. Vector control. C: Protein expression of fibrosis-related genes and PTBP1 in HAFs by Western blotting assay. Col1a1:  $F=44.26$ ,  $P<0.0001$ , <sup>1)</sup>  $P=0.0003$  vs. Vector+Scramble, <sup>2)</sup>  $P=0.0177$  vs. Vector+Scramble, <sup>3)</sup>  $P=0.0001$  vs. Vector+si-PTBP1; Col3a1:  $F=68.71$ ,  $P<0.0001$ , <sup>4)</sup>  $P=0.0002$  vs. Vector+Scramble, <sup>5)</sup>  $P=0.0004$  vs. Vector+Scramble, <sup>6)</sup>  $P=0.0009$  vs. Vector+si-PTBP1;  $\alpha$ -SMA:  $F=16.06$ ,  $P=0.0010$ , <sup>7)</sup>  $P=0.0243$  vs. Vector+Scramble, <sup>8)</sup>  $P=0.0192$  vs. Vector+Scramble, <sup>9)</sup>  $P=0.0443$  vs. Vector+si-PTBP1; PTBP1:  $F=30.41$ ,  $P=0.0001$ , <sup>10)</sup>  $P=0.0013$  vs. Vector+Scramble, <sup>11)</sup>  $P=0.0298$  vs. Vector+Scramble, <sup>12)</sup>  $P=0.0004$  vs. Vector+si-PTBP1. Data are shown as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ .

图4 PTBP1介导 lncRNA RP11-879F14.2抑制 HAFs 中纤维化相关基因表达

Fig. 4 Participation of PTBP1 in attenuation of fibrosis-related genes expression by lncRNA RP11-879F14.2 in HAFs

心肌成纤维细胞中 lncRNA 母系表达基因 3 (maternally expressed gene3, Meg3) 表达上调, 沉默 Meg3 可降低 p53 与基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase 2, Mmp-2) 启动子区域的相互作用, 防止心肌 Mmp-2 的诱导产生, 促进心脏纤维化和压力超负荷后舒张功能受损<sup>[14]</sup>。在心肌梗死小鼠中促纤维化 lncRNA PFL 可以通过内源性竞争吸附 microRNA let-7d, 解除 let-7d 对血小板活化因子受体的抑制作用, 促进肌成纤维细胞生成<sup>[15-16]</sup>。为了探究 RP11-879F14.2 抑制心肌纤维化的可能机制, 通过核/质 RNA 分离和 RT-qPCR 检测, 证实 RP11-879F14.2 主要位于心肌细胞核中。鉴于核内 lncRNA 一般通过 RNA 结合蛋白来发挥生物学作用<sup>[17]</sup>, 本文根据生物信息学分析 ([http://service.tartagliolab.com/page/catrapiid\\_omics\\_group](http://service.tartagliolab.com/page/catrapiid_omics_group)) 结果, 利用双荧光素酶报告基因实验来鉴定 RP11-879F14.2 与 PTBP1 间可能的结合作用。我们利用 pGL3-promoter 载体, 将 RP11-879F14.2 序列插入到萤火虫荧光素酶基因的 3' 端, 证实增加 PTBP1 表达后萤火虫荧光素酶基因表达降低, 提示 PTBP1 与 RP11-879F14.2 间发生结合作用, 进而降低萤火虫荧光素酶基因转录本的稳定性和表达。在后续研究中我们将通过 RNA pull-down 和序列突变实验进一步明确 RP11-879F14.2 与 PTBP1 间的结合作用。

PTBP1 属于核糖核蛋白家族, 为基因表达过程中主要的剪接因子, 该蛋白主要位于细胞核中, 作

为一种穿梭蛋白, PTBP1 可通过影响 mRNA 剪接翻译等过程参与调控基因表达进程<sup>[18]</sup>, 研究发现 PTBP1 与细胞发育及癌症等多种疾病的发生发展密切相关<sup>[19-21]</sup>。LncRNA Meg3 可通过招募 PTBP1 蛋白促进 shp mRNA 的降解, 进而诱导胆汁淤积性肝损伤<sup>[22]</sup>。而在成纤维细胞重编程为心肌细胞过程中, PTBP1 会出现下调, 表明 PTBP1 为成纤维细胞获得心肌细胞特异性的剪接模式的一种关键的阻碍物<sup>[23]</sup>。

本文中, 我们证实 RP11-879F14.2 可与 PTBP1 相互作用, 并可上调 PTBP1 表达, 而沉默 PTBP1 可促进 HAFs 中纤维化相关基因表达, 并逆转 RP11-879F14.2 抑制纤维化相关基因表达的作用, 提示 PTBP1 可介导 RP11-879F14.2 发挥抑制心肌纤维化的作用。我们推测 RP11-879F14.2 可能作为“支架”通过招募 PTBP1 而促进 PTBP1 调控与纤维化相关基因的表达, 进而发挥抑制心肌纤维化的作用, 但具体机制有待进一步研究证实。

综上所述, 本文证实 RP11-879F14.2 在心衰患者心肌中表达增强, 通过结合 PTBP1 发挥抑制 HAFs 中纤维化相关基因表达的作用。在后续研究中, 我们将继续探明 RP11-879F14.2 与 PTBP1 的结合作用及其下游基因的调控作用, 并在整体动物水平上进一步阐明 PTBP1 介导 RP11-879F14.2 抑制心肌纤维化的作用机制。

#### 参考文献

- [1] Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(4):549-574.
- [2] Piek A, de Boer RA, Silljé HH. The fibrosis-cell death axis in heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(2):199-211.
- [3] Li AH, Liu PP, Garcia RA, et al. Dynamic changes in myocardial matrix and relevance to disease: translational perspectives [J]. *Circ Res*, 2014, 114(5): 916-927.
- [4] Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription [J]. *Science*, 2007, 316(5830): 1484-1488.
- [5] El Azzouzi H, Doevendans PA, Sluijter JP. Long non-coding RNAs in heart failure: an obvious lnc [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(9):182.
- [6] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1):47-62.
- [7] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs [J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6): 904-914.
- [8] Dykes IM, Emanuelli C. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA [J]. *Genom Proteom Bioinf*, 2017, 15(3): 177-186.
- [9] Creemers EE, van Rooij E. Function and therapeutic

- potential of noncoding RNAs in cardiac fibrosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(1):108-118.
- [10] Tao H, Yang JJ, Hu W, et al. Noncoding RNA as regulators of cardiac fibrosis: current insight and the road ahead[J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(6):1103-1111.
- [11] Yang Z, Xiao Z, Guo H, et al. Novel role of the clustered miR-23b-3p and miR-27b-3p in enhanced expression of fibrosis-associated genes by targeting TGFBR3 in atrial fibroblasts [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5):3246-3256.
- [12] 袁淑菁,梁景南,张铭,等. CircRNA\_005647 通过结合 miR-27b-3p 抑制小鼠心肌成纤维细胞中纤维化相关基因表达[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(11): 1312-1319.
- Yuan SJ, Liang JN, Zhang M, et al. CircRNA\_005647 inhibits the expression of fibrosis-related genes in cardiac fibroblasts via sponging miR-27b-3p [J]. *J South Med Univ*, 2019, 39(11): 1312-1319.
- [13] Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2014, 19(2): 173-185.
- [14] Piccoli MT, Gupta SK, Viereck J, et al. Inhibition of the cardiac fibroblast-enriched lncRNA Meg3 prevents cardiac fibrosis and diastolic dysfunction [J]. *Circ Res*, 2017, 121(5):575-583.
- [15] Liang H, Pan Z, Zhao X, et al. LncRNA PFL contributes to cardiac fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of let-7d [J]. *Theranostics*, 2018, 8(4):1180-1194.
- [16] Leisegang MS. LET's sponge: How the lncRNA PFL promotes cardiac fibrosis [J]. *Theranostics*, 2018, 8(4):874-877.
- [17] Johnsson P, Lipovich L, Grandér D, et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2014, 1840(3):1063-1071.
- [18] Sawicka K, Bushell M, Spriggs KA, et al. Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt4):641-647.
- [19] Liu C, Yang Z, Wu J, et al. Long noncoding RNA H19 interacts with polypyrimidine tract-binding protein 1 to reprogram hepatic lipid homeostasis [J]. *Hepatology*, 2018, 67(5):1768-1783.
- [20] Ramos AD, Lim DA, Zarabi H, et al. The long non-coding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(4): 439-447.
- [21] Fochi S, Lorenzi P, Galasso M, et al. The emerging role of the RBM20 and PTBP1 ribonucleoproteins in heart development and cardiovascular diseases [J]. *Genes*, 2020, 11(4):402.
- [22] Zhang L, Yang Z, Trottier J, et al. Long noncoding RNA MEG3 induces cholestatic liver injury by interaction with PTBP1 to facilitate shp mRNA decay [J]. *Hepatology*, 2017, 65(2):604-615.
- [23] Liu Z, Wang L, Welch JD, et al. Single-cell transcriptomics reconstructs fate conversion from fibroblast to cardiomyocyte [J]. *Nature*, 2017, 551(7678): 100-104.

(编辑 孙慧兰)