

miR-486-3p靶向调控*BMPR2*影响BMP信号通路 增加室间隔缺损的患病风险

彭楚玥¹ 王红艳² 姚晓英^{2*}¹复旦大学生命科学学院, 上海 200438; ²复旦大学附属妇产科医院, 上海 200011)

摘要 该研究发现在正常心脏发育窗口期和人胚胎干细胞向心肌细胞分化的早期, miR-486-3p低表达。但在室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)流产胎儿的心脏组织中对匹配的对照心脏组织显著高表达。miR-486-3p在C57BL/6小鼠的心肌、室间隔组织中高表达。过表达miR-486-3p显著抑制细胞增殖, 下调上皮细胞标志物表达, 上调间充质细胞标志物表达, 促进细胞迁移。借助生物信息学分析和小鼠模型, 鉴定了43个候选靶基因。qRT-PCR、蛋白免疫印迹和双荧光素酶报告基因实验验证了靶基因*BMPR2*。miR-486-3p抑制BMP信号通路活性, 下调BMP信号通路下游靶基因mRNA水平。综上, 该研究表明, miR-486-3p通过靶向下游基因*BMPR2*, 抑制BMP信号通路信号, 从而促进VSD发生, 该研究为VSD的诊疗新方案提供了理论依据。

关键词 先天性心脏病; 室间隔缺损; miR-486-3p; *BMPR2*

miR-486-3p Inhibiting BMP Signaling Pathway through Targeting on *BMPR2* Increases the Risk of Ventricular Septal Defect

PENG Chuyue¹, WANG Hongyan², YAO Xiaoying^{2*}¹School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China;²Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200011, China)

Abstract This study revealed that the expression of miR-486-3p was low during critical periods of early heart development, and it is found that the expression level was also low in human embryonic stem cells during the early stage of differentiation into cardiomyocytes. Yet, it is highly expressed in the heart tissue of the aborted fetus with VSD (ventricular septal defect) compared with the matched controls. In C57BL/6 mice, it is discovered that miR-486-3p was highly expressed in the myocardium and ventricular septum. The overexpression of miR-486-3p significantly inhibited cell proliferation, down-regulated the expression of epithelial cell markers, up-regulated the expression of mesenchymal cell markers and promoted cell migration. Forty-three candidate target genes were identified by bioinformatics and mouse models. The target gene *BMPR2* was identified by qRT-PCR, Western blot and dual luciferase reporter assay. Finally, it is confirmed that miR-486-3p inhibited the activity of the BMP signaling pathway, and down-regulated the mRNA levels of the downstream target genes of the BMP signaling pathway. In summary, this research indicated that miR-486-3p might promote the occurrence of VSD by inhibiting BMP sig-

收稿日期: 2021-04-09 接受日期: 2021-06-25

国家自然科学基金(批准号: 31771669、81930036)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13916738653, E-mail: 13916738653@139.com

Received: April 9, 2021 Accepted: June 25, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31771669, 81930036)

*Corresponding author. Tel: +86-13916738653, E-mail: 13916738653@139.com

nal pathway through targeting *BMPR2*. This research shed light on the future design of the possible therapeutic strategies of VSD.

Keywords congenital heart disease; ventricular septal defect; miR-486-3p; *BMPR2*

先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)简称先心病,是在胚胎心脏发育过程中发生的结构性缺陷。这些缺陷可能涉及心房和心室之间的隔膜、瓣膜、大动脉或静脉。缺损的临床表现取决于所累及心脏的特定部位^[1]。室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)是心脏畸形中最常见的一种亚型^[2],可以独立存在,也可作为复杂心脏畸形的组成部分^[2]。

miRNA(microRNA)是约含 18 nt的进化保守小RNA^[3], miRNAs可以协调调控多个靶基因的稳定性,因此 miRNAs的异常表达会影响多种细胞内信号通路转导,并与许多疾病(例如心脏病等)相关^[4-6]。miRNAs也是多种细胞谱系中心脏胚胎发育、正常心血管功能和心脏病理生理的关键组成部分^[7-12]。

引起心脏毒性的葱环类药物处理人胚胎多能干细胞诱导分化的心肌细胞后, has-miR-486-3p表达量呈剂量依赖性上升^[13]。完全大动脉转位患者与健康人群对照,患者 has-miR-486-3p的血清表达水平是对照组人群的8.67倍^[14]。在法洛氏四联症(一定有VSD发生)流产胎儿心脏组织中, miR-486-3p相较于对照组显著高表达^[15]。但 miR-486-3p在VSD的发生发展中的作用和机制尚不清楚。

胚胎 *Bmpr2*缺乏时,小鼠都表现出严重的心脏缺陷:包括VSD和异常的房室管发育^[16],心内膜细胞谱系 *Bmpr2*缺失导致心脏室间隔以及二尖瓣、三尖瓣发育畸形^[17]。在患肺动脉高压/先天性心脏病的成人和儿童队列中,成年人队列中大多数 *BMPR2*突变都发生在心内膜垫缺损的患者中,儿童队列表现为VSD等^[18-19]。因此,本研究希望进一步探索 *BMPR2*在心脏畸形发育中的致病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

研究对象来自中国上海地区,汉族,平均胎龄为(23±5)周的4例室间隔缺损流产胎儿,平均胎龄(19.2±5)周的5例对照组流产胎儿。本研究经复旦大学生命科学学院伦理委员会批准,研究目标对象的临床信息及样本采集均获得其书面知情同意。

人胚肾细胞系 HEK293T、人脐静脉内皮细胞

系 HUVEC、人脐静脉内皮细胞系 EA.hy926均购自中国科学院细胞库; 0.05% Trypsin-EDTA、DMEM培养基购自美国 Gibco公司; 胎牛血清购自美国 Corning公司; Lipofectamine[®] 2000、anti-*BMPR2*、Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 488 Imaging Kit购自美国 Invitrogen公司; miR-NC mimic、miR-486-3p mimic、miR-486-3p inhibitor购自上海吉玛制药技术有限公司; All-in-One[™] miRNA qRT-PCR Reagent Kits购自美国 GeneCopoeia公司; miRNeasy[®] Mini kit购自德国 Qiagen公司; ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、HiScript III All-in-one RT supermix perfect for qPCR购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit购自美国 CST公司; Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自日本同仁化学研究所; Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System购自美国 Promega公司; HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)购自美国 Proteintech公司。

1.2 方法

1.2.1 miRNA qRT-PCR定量检测 取部分心脏组织,再加入700 μL QIAzol裂解液,电动研磨器进行研磨。参照miRNeasy[®] Mini kit说明书纯化miRNA,并参考All-in-One[™] miRNA qRT-PCR Reagent Kits说明书逆转录生成cDNA,参照ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒说明书定量检测miRNA的表达量。

1.2.2 生物信息学分析 运用miRDB(<http://www.mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>)、TargetScan(http://www.targetscan.org/vert_71/)预测可能受miRNA调控的靶基因,分别预测到942、5 235个候选靶基因。

1.2.3 qRT-PCR检测*BMPR2*的mRNA水平 Trizol试剂提取细胞总RNA,利用反转录试剂盒合成cDNA,以cDNA为模板进行qRT-PCR扩增。*BMPR2*正向引物序列为5'-AGA GAC CCA AGT TCC CAG AAG C-3',反向引物序列为5'-CCT TTC CTC AGC ACA CTG TGC A-3'。以*GAPDH*为内参,2^{-ΔΔCt}法计算*BMPR2* mRNA相对表达水平,*GAPDH*正向引物

序列为5'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-3', 反向引物序列为5'-ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A-3'。

1.2.4 质粒构建 参照天根生化科技有限公司DP304说明书提取细胞基因组DNA, 以此为模板进行PCR扩增, 获得*BMP2* 3'UTR片段, *BMP2* 3'UTR正向引物序列为5'-CCG CTC GAG TTG ACT GCA GTG GTG TCT GG-3'(加粗部分为*Xho* I酶切位点序列), 反向引物序列为5'-ATA AGA ATG CGG CCG CGC AGC CCT TCC TTC ATA GGG-3'(加粗部分为*Not* I酶切位点序列), 构建psiCHECK-2-*BMP2* 3'UTR野生型质粒。以该质粒为模版, PCR扩增获得突变型环状质粒。*BMP2* 3'UTR-mut正向引物序列为5'-AAT ATA AAC ACT TTT AAT AAA ATT CTC CCA TAC TTT TG-3', 反向引物序列为5'-CAA AAG TAT GGG AGA ATT TTA TTA AAA GTG TTT ATA TT-3'。

1.2.5 双荧光素酶报告基因实验 当HEK293T细胞汇聚度达70%时, 参考Lipofectamine 2000 Reagent说明书进行转染, 转染组: psiCHECK-2-*BMP2*-3'UTR-WT+miR-NC(图4F图注为*BMP2*-3'UTR-WT+miR-NC)、psiCHECK-2-*BMP2*-3'UTR-WT+miR-486-3p(图4F图注为*BMP2*-3'UTR-WT+miR-486-3p)、psiCHECK-2-*BMP2*-3'UTR-mut+miR-NC(图4F图注为*BMP2*-3'UTR-mut+miR-NC)、psiCHECK-2-*BMP2*-3'UTR-mut+miR-486-3p(图4F图注为*BMP2*-3'UTR-mut+miR-486-3p)、miR-NC+Renila+pGL3-BRE-Luciferase(图5A图注为miR-NC)、miR-486-3p+Renila+pGL3-BRE-Luciferase(图5A图注为miR-486-3p)、miR-NC+Renila+pGL3-BRE-Luciferase+miR-486-3p inhibitor(图5A图注为miR-NC+miR-486-3p inhibitor)、miR-486-3p+Renila+pGL3-BRE-Luciferase+miR-486-3p inhibitor(图5A图注为miR-486-3p+miR-486-3p inhibitor), pGL3-BRE-Luciferase为BMP信号通路报告基因质粒, 于37 °C、5% CO₂培养箱中静置培养, 转染24 h后, 参照Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System说明书检测酶活。

1.2.6 蛋白免疫印迹 将EA.hy926细胞均匀接种到10 cm细胞培养皿中, 待细胞汇聚度为50%时, 参考Lipofectamine 2000 Reagent说明书进行转染。48 h后, 参考碧云天P0033说明书, 提取蛋白。根据蛋白溶液

体积按比例加入5× SDS-PAGE上样缓冲液, 100 °C、10 min使蛋白充分变性。取部分样品进行电泳, 电泳结束后, 将蛋白样品转移至PVDF膜上。封闭液室温孵育1 h, 一抗(1:1 000) 4 °C过夜孵育, 1× TBST洗去抗体, 二抗(1:5 000)室温孵育1 h, 1× TBST洗去抗体, 化学成像仪进行显影。

1.2.7 细胞增殖能力检测 将HUVEC细胞均匀接种到96孔细胞培养板(5 000个/孔), 37 °C、5% CO₂培养箱中静置培养, 待细胞贴壁稳定生长后, 参考Lipofectamine 2000 Reagent说明书进行转染, 转染24 h后参照同仁化学研究所CK04说明书进行实验操作。

待HUVEC细胞汇聚度为20%~30%时进行转染, 24 h后, 参照Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 488 Imaging Kit试剂盒说明书进行实验。

1.2.8 细胞迁移能力检测 HUVEC细胞接种于6孔板, 待细胞汇聚度达到40%时, Lipofectamine 2000转染miR-NC/miR-486-3p, 37 °C培养箱静置培养。转染48 h后, 利用枪头在板底划出几道竖直划痕, PBS润洗孔板, 除去细胞碎片, 更换新鲜的DMEM。普通光学显微镜观察记录0 h、6 h、12 h、24 h 4个时间点的细胞迁移状态。

1.2.9 数据统计分析 采用Graph Pad Prism 8绘制图表, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 采用独立样本*t*检验分析组间差异, 以*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

1.2.10 心肌细胞分化 第0天, 待H9人胚胎干细胞(约50代)汇聚度为90%时, 加入3 mL预热的RB培养基, 3 μL CHIR-99021(10 μmol/L)进行培养。第1天, 吸弃旧培养基, 加入4 mL预热的RB培养基, 37 °C培养。第3天, 弃旧培养基, 加入3 mL RB培养基, 2 μL IWR-1(10 μmol/L), 培养箱静置培养。第5天, 弃培养基, 加入4 mL RB⁻, 静置培养。第7天, 弃培养基, 再加入4 mL RB⁺培养基, 静置培养2天, 直到心肌细胞开始搏动。加入2 mL CaridoEasy[®]人心肌细胞纯化培养基, 3天后, 更换为RB⁺培养基培养2天, 直到心肌细胞搏动。

1.2.11 胎儿microRNA芯片 样本来源于复旦大学附属妇产科医院, 共收集18例未发现任何心脏结构畸形的胎儿心脏组织。5周胎龄的样本8例, 7周、9周各7例, 胎龄为23周的胎儿心脏组织5例。

microRNA芯片由北京博奥生物有限公司完成, poly A加尾后, 利用FlashTag ligation mix确认microRNA, 与Affmetrix GeneChip miRNA 2.0芯片杂交,

清洗芯片、扫描,对探针强度进行威尔科克森秩和检验, \log_2 转换原始信号,经双侧学生 t 检验 $P \leq 0.06$ 的micorRNA信号被认为在心脏组织中表达。对芯片样本数据利用R limma软件法则进行线性回归分析,比较孕期4个时间点microRNA表达量变化。

2 结果

2.1 miR-486-3p在野生型小鼠心肌层、室间隔组织中高表达

检测C57BL/6野生型小鼠不同心脏组织的miR-486-3p表达水平,实验结果证明相对于右心室流出道,miR-486-3p在室间隔、心肌层组织中显著高表达,且两者之间无显著性差异(图1)。因为室间隔主要由膜部和肌部—心内膜细胞、心肌细胞组成,因此,这一实验结果提示我们miR-486-3p可能在室间隔的生长发育过程中发挥一定的功能。

2.2 miR-486-3p可能参与室间隔缺损的发生

为了探究miR-486-3p在VSD的发生发展中是否有作用,我们收集了中国汉族,胎龄为(23±5)周的VSD流产胎儿($n=4$), (19.2±5)周的对照组流产胎儿($n=5$)的右心室心肌层组织。应用qRT-PCR对样本进行了miRNA定量检测,发现miR-486-3p在VSD流产胎儿右心室心肌组织显著高表达(** $P=0.0080$),其表达量大约是正常对照组的2倍(图2A),提示我们miR-486-3p可能参与了室间隔缺损的发生。

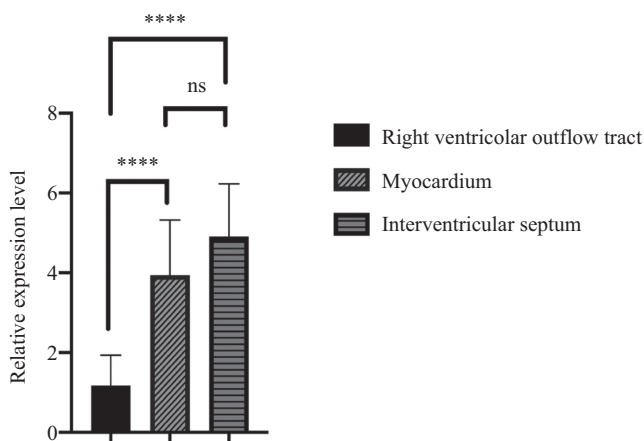
人胚胎干细胞诱导分化的心肌细胞(human embryonic stem cells derived cardiomyocytes, hESC-CMs)的分化

早期,miR-486-3p的表达水平随分化时间推移而降低(图2B)。胎儿心脏发育时期microRNA表达谱(由复旦大学李笑天教授课题组提供)分析显示:人类心脏室间隔发育的关键时期(图2C红色虚线指示的区域)的早期,miR-486-3p表达量减少。表明miR-486-3p的低表达有利于心脏的正常发育。但miR-486-3p在VSD流产胎儿中高表达(图2A),提示我们异常高表达的miR-486-3p可能不利于干细胞的成功分化,干扰早期心脏发育。

2.3 miR-486-3p促进细胞上皮间充质转化标志物的表达和迁移能力

室间隔膜部缺损占VSD的60%~70%^[20],膜部主要由心内膜细胞即内皮细胞组成,因此我们选用人脐静脉内皮细胞进行进一步研究。CCK-8试剂盒、Edu脉冲标记检测HUVEC细胞增殖变化情况。发现miR-486-3可以显著抑制内皮细胞增殖(图3A和图3B)。

心内膜细胞经历上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)形成胚胎期的心脏隔膜,EMT的失调会导致间隔缺损^[21-22],miR-486-3p促进EMT转录因子ZEB1、ZEB2、SNAIL1以及EMT事件发生标志物N-Cadherin和VIMENTIN(间质细胞标志物)的表达,抑制E-Cadherin(上皮细胞标志物)(图3C)。上调N-Cadherin和ZEB-1蛋白表达量,抑制ZO-1(上皮细胞标志物)蛋白表达(图3D)。细胞迁移能力增强也是发生EMT事件的标志之一^[23],miR-486-3p处理后,HUVEC细胞的迁移能力得到显著促进(图3E)。

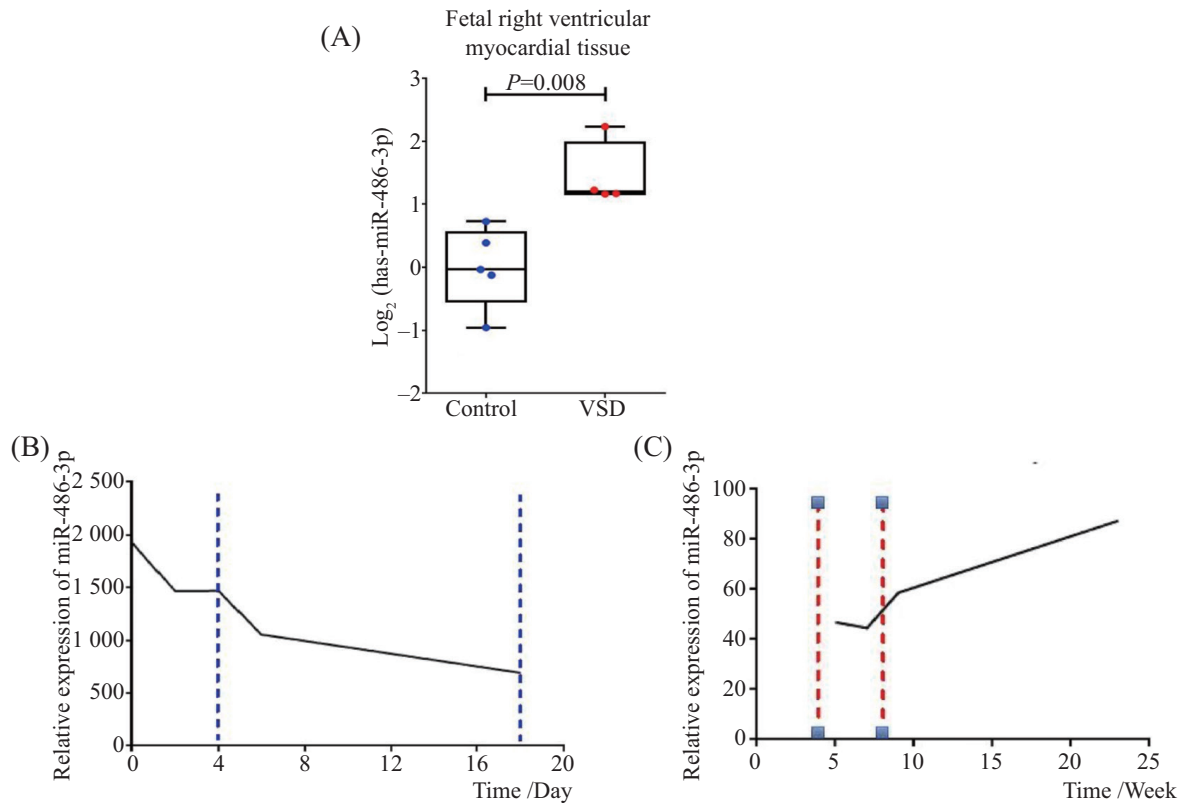


ns: 无显著性差异, **** $P < 0.0001$ 。

ns: no significant difference, **** $P < 0.0001$ 。

图1 qRT-PCR分析C57BL/6野生型小鼠心脏不同组织中的miR-486-3p表达

Fig.1 qRT-PCR analysis of the expression of miR-486-3p in different tissues in the heart of C57BL/6 wild-type mice



A: VSD流产胎儿右心室心肌组织miR-486-3p表达; B: hESCs向心肌细胞分化的不同阶段miR-486-3p表达量分析(蓝色虚线区域标示hESCs向心肌细胞分化的早期); C: 不同发育阶段胎儿心脏miR-486-3p表达量分析(红色虚线表示正常胚胎心脏发育窗口期)。

A: the expression of miR-486-3p in right ventricular myocardium of aborted fetus with VSD; B: the expression of miR-486-3p during different stages of hESCs differentiation into cardiomyocytes (blue dotted area indicates the early stage of the differentiation from hESCs to cardiomyocytes); C: the expression of miR-486-3p in fetal heart at different developmental stages (red dotted area indicates critical periods for the normal heart development).

图2 miR-486-3p异常高表达可能是造成室间隔缺损发生的风险因素

Fig.2 Abnormally high expression of miR-486-3p may be a risk factor for ventricular septal defect

2.4 miR-486-3p靶向下调*BMPR2*

miRNA通过降低mRNA稳定性、抑制翻译调控靶基因表达来发挥功能。我们利用两个软件: miRDB和TargetScan预测了miR-486-3p可能调控的靶基因, 分别预测到942和5 235个候选靶基因, 两个数据库之间取交集共有853个基因。利用小鼠基因组信息学数据库分析小鼠模型是否有VSD相关表型、突变小鼠胚胎致死率, 以及是否有文献报道与VSD发生相关等三个方面考虑, 找到了43个候选靶基因(图4A)。

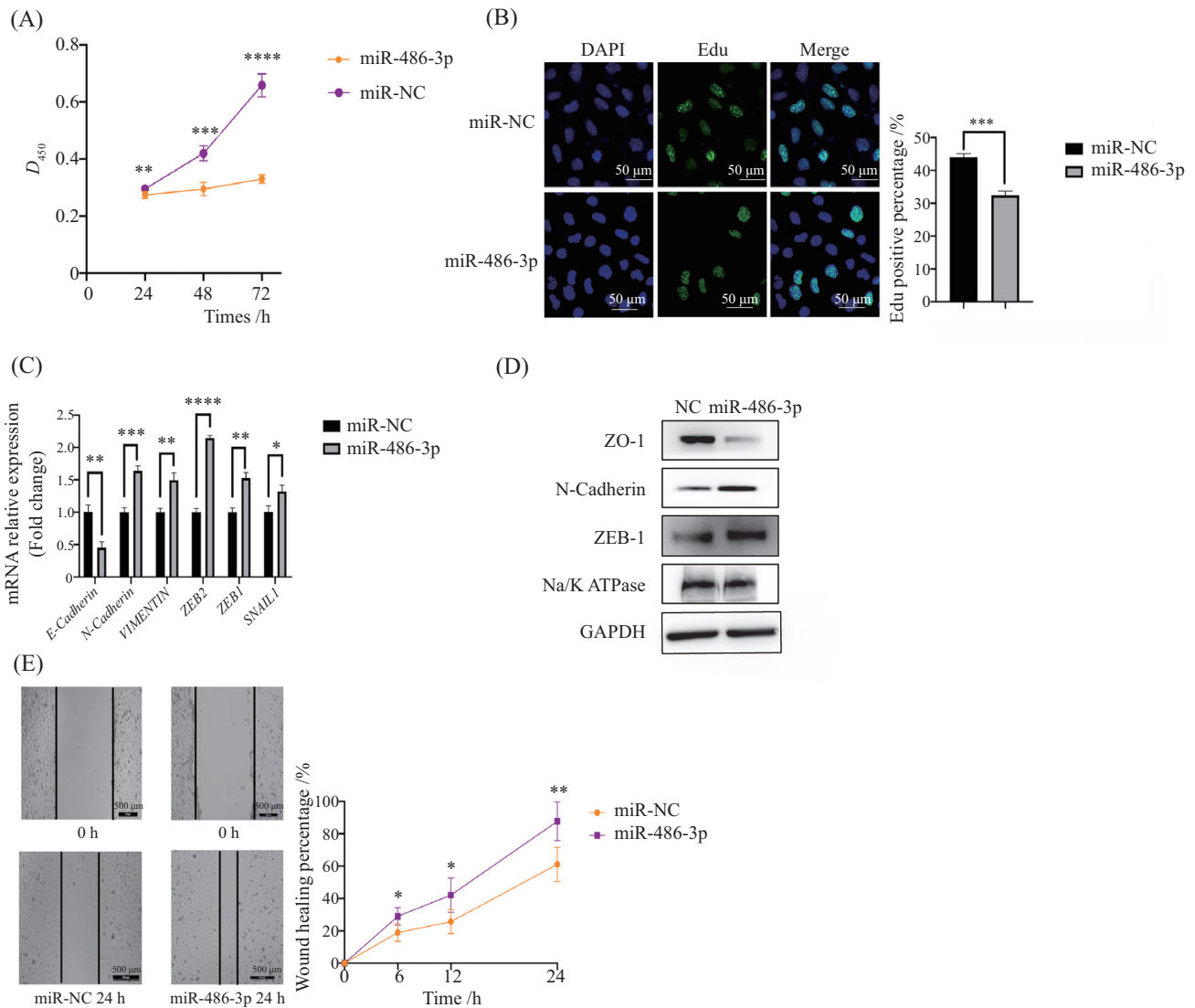
HUVEC细胞中转染miR-486-3p后, 21个候选靶基因的mRNA水平发生显著性变化, 9个基因表达量上调, 12个基因表达水平下调(图4B), 其中*BMPR2*的mRNA水平显著下调约31%, 小鼠内皮特异性敲除*BMPR2*会导致室间隔缺损发生但未有机制研究^[17], 并且目前尚无研究报道*BMPR2*受miR-486-3p调控, 因此我们选取*BMPR2*进行下一步的研究(图4C)。在

另一个人脐静脉内皮细胞系EA.hy926中验证了miR-486-3p在mRNA和蛋白质水平负调控*BMPR2*表达(图4D和图4E)。

应用TargetScan软件预测*BMPR2*与miR-486-3p可能结合的位点序列。构建野生型质粒psiCHECK-2-*BMPR2*-3'UTR-WT和突变型质粒psiCHECK-2-*BMPR2*-3'UTR-mut。HEK293T细胞中共转染野生型质粒和miR-486-3p/miR-NC, miR-486-3p处理后双荧光素酶相对活性降低。且突变*BMPR2* 3'UTR区域的结合序列后, 两组间没有显著性差异, 表明miR-486-3p会与*BMPR2*的3'UTR结合, 沉默其mRNA表达(图4F)。

2.5 miR-486-3p显著抑制BMP信号通路活性和BMP信号通路下游靶基因

*BMPR2*是BMP信号通路的重要受体蛋白, miR-486-3p下调*BMPR2*的蛋白表达水平, 可能干扰了BMP信号通路。miR-486-3p转染HEK293T细胞



A: CCK-8检测转染miR-486-3p/miR-NC的HUVEC细胞增殖; B: Edu染色表明miR-486-3p显著抑制细胞增殖; C: miR-486-3p/miR-NC转染HUVEC细胞中EMT标志物的mRNA的定量分析; D: 蛋白免疫印迹实验验证miR-486-3p促进HUVEC细胞的上皮间充质转化; E: 细胞划痕实验证实miR-486-3p转染后HUVEC细胞迁移能力显著增强。**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.000 1。

A: cell proliferation of HUVEC transfected with miR-486-3p/miR-NC was evaluated by CCK-8; B: Edu staining showed that miR-486-3p significantly inhibited cell proliferation; C: quantitative analysis of mRNA level of EMT marker in HUVEC cells transfected with miR-486-3p/miR-NC; D: Western blot verified that miR-486-3p promoted the epithelial-mesenchymal transition of HUVEC cells; E: wound scratch confirmed that the cell migration ability of HUVEC cells transfected with miR-486-3p was significantly enhanced. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.000 1.

图3 miR-486-3p抑制细胞增殖、促进细胞上皮间充质标志物表达和细胞迁移能力

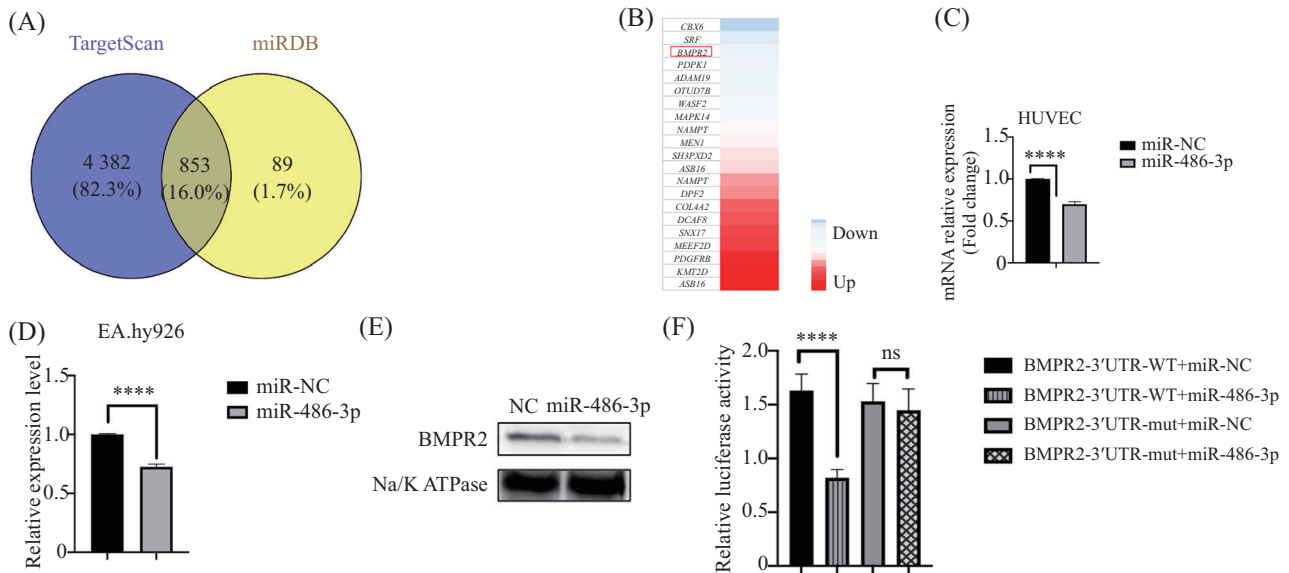
Fig.3 miR-486-3p inhibited cell proliferation, promoted the expression of epithelial-mesenchymal markers and cell migration

后, 双荧光素酶相对活性显著降低, BMP信号通路活性受到抑制, miR-486-3p的抑制剂可以挽救miR-486-3p的抑制作用(图5A); 并且, miR-486-3p抑制EA.hy926细胞中BMP信号通路下游靶基因的mRNA水平(图5B)。由于BMP信号通路对于胚胎心脏发育十分重要, 因此我们的研究提示, miR-486-3p可能参与了心脏发育, miR-486-3p的异常表达会影响BMP信号通路活性, 可能干扰早期心脏的正常发育, 进而

导致先天性心脏病的发生。

3 讨论

我们的研究首次证实了miR-486-3p在野生型小鼠的室间隔、心肌层组织中显著高表达, 提示miR-486-3p可能参与室间隔的发育。miR-486-3p在VSD流产胎儿右心室心肌组织中高表达, 这一实验结果提示我们, 异常高表达的miR-486-3p可能参与了室间

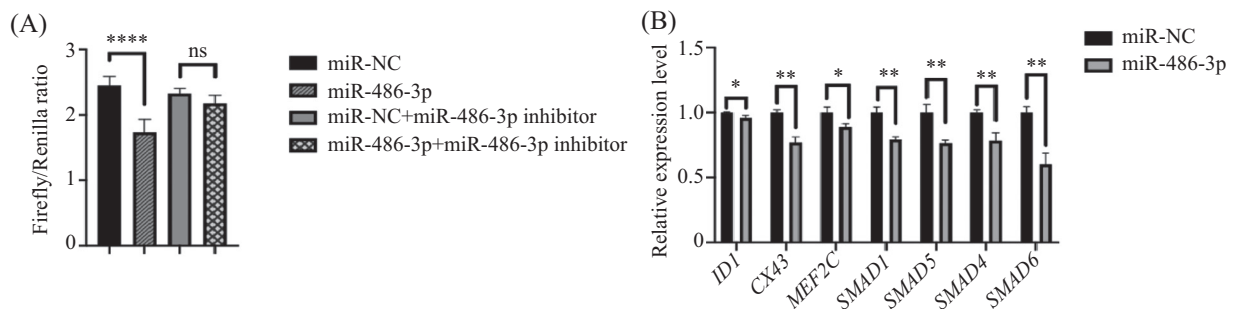


A: miR-486-3p候选靶基因筛选策略; B: HUVEC细胞验证受miR-486-3p调控的候选靶基因; C: 候选靶基因*BMPR2*的qRT-PCR结果分析; D: EA.hy926细胞中*BMPR2* qRT-PCR结果分析; E: 免疫印迹实验验证在EA.hy926细胞中miR-486-3p显著降低*BMPR2*蛋白的表达水平; F: 双荧光素酶报告基因实验证实miR-486-3p与*BMPR2*的3'UTR区域结合。ns: 无显著性差异, **** $P < 0.0001$ 。

A: screening strategy for miR-486-3p candidate target genes; B: validation of candidate target genes regulated by miR-486-3p in HUVEC cells; C: the analysis of qRT-PCR results of the candidate target gene *BMPR2*; D: the analysis of qRT-PCR result of *BMPR2* in EA.hy926 cells; E: Western blot verified that miR-486-3p significantly reduced the expression level of *BMPR2* protein in the EA.hy926 cells; F: dual luciferase reporter gene experiment confirmed that miR-486-3p bound to the 3'UTR region of *BMPR2*. ns: no significant difference, **** $P < 0.0001$.

图4 miR-486-3p靶向负调控*BMPR2*

Fig.4 miR-486-3p targeted *BMPR2* through a negative regulation



A: 双荧光素酶报告基因实验证实miR-486-3p显著抑制BMP信号通路活性; B: miR-486-3p抑制BMP信号通路下游靶基因mRNA水平。ns: 无显著性差异, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

A: dual luciferase reporter gene experiment confirmed that miR-486-3p significantly inhibited the activity of BMP signaling pathway; B: miR-486-3p significantly inhibited the expression levels of downstream target genes of BMP signaling pathway. ns: no significant difference, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图5 miR-486-3p显著抑制BMP信号通路活性和BMP信号通路下游靶基因的表达水平

Fig.5 miR-486-3p significantly inhibited BMP signaling pathway activity and the expression level of downstream target genes of BMP signaling pathway

隔缺损的发生。综上,我们的工作证明了miR-486-3p在正常发育心脏关键时期和人胚胎干细胞诱导分化为心肌细胞过程中低表达,提示低表达的miR-486-3p可能更有利于心脏的发育。miR-486-3p抑制细胞增殖,参与促进EMT事件的发生,可能因为在心脏发育早期促进了EMT事件的发生,导致发育后期会形成

室间隔膜部的心内膜细胞(内皮细胞)缺乏现象,最后导致VSD的发生。也阐明了miR-486-3p通过靶向负调控*BMPR2*影响BMP信号通路导致VSD可能的分子机制。因此我们的研究为将来VSD的诊断和治疗设计新方案提供了理论基础,但仍缺乏动物模型体内实验数据的支持,后续实验需要进一步探索。

参考文献 (References)

- [1] SHABANA N A, SHAHID S U, IRFAN U. Genetic contribution to congenital heart disease (CHD) [J]. *Pediatr Cardiol*, 2020, 41(1): 12-23.
- [2] PENNY D J, VICK G W. Ventricular septal defect [J]. *Lancet*, 2011, 377(9771): 1103-12.
- [3] SMITH T, RAJAKARUNA C, CAPUTO M, et al. MicroRNAs in congenital heart disease [J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(21): 333.
- [4] TRIONFINI P, BENIGNI A, REMUZZI G. MicroRNAs in kidney physiology and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11(1): 23-33.
- [5] SIMPSON L J, ANSEL K M, et al. MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(6): 2242-9.
- [6] CHEN J. Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications [J]. *Rev Med Virol*, 2015, 25(Suppl 1): 24-53.
- [7] HEIDENREICH P A, TROGDON J G, KHAVJOU O A, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the united states a policy statement from the american heart association [J]. *Circulation*, 2011, 123(8): 933.
- [8] ZHAO Y, RANSOM J F, LI A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 303-17.
- [9] CATALUCCI D, LATRONICO M, CONDORELLI G. MicroRNAs control gene expression: importance for cardiac development and pathophysiology [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1123: 20-9.
- [10] THOMAS T, DANIELE C, JOHANN B. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 79(4): 562-70.
- [11] CHEN J, WANG D Z. microRNAs in cardiovascular development [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(5): 949-57.
- [12] HAN S P. microRNA expression profiling in fetal single ventricle malformation identified by deep sequencing [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(1): 53-60.
- [13] NEMADE H, CHAUDHARI U, ACHARYA A, et al. Cell death mechanisms of the anti-cancer drug etoposide on human cardiomyocytes isolated from pluripotent stem cells [J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(4): 1507-24.
- [14] CLARE L, ENDERS N G, CHOW P C, et al. Circulating microRNA expression profile and systemic right ventricular function in adults after atrial switch operation for complete transposition of the great arteries [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2013, 13(1): 73.
- [15] O'BRIEN J E, KIBIRYEVA N, ZHOU X G, et al. Noncoding RNA expression in myocardium from infants with tetralogy of Fallot [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012, 5(3): 279-86.
- [16] TALLQUIST M D, SORIANO P. Epiblast-restricted Cre expression in more mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function [J]. *Genesis*, 2000, 26(2): 113-5.
- [17] BEPPU H, MALHOTRA R, BEPPU Y, et al. BMP type II receptor regulates positioning of outflow tract and remodeling of atrioventricular cushion during cardiogenesis [J]. *Dev Biol*, 2009, 331(2): 167-75.
- [18] ROBERTS K E, MCELROY J J, WONG W P, et al. *BMP2* mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease [J]. *Eur Respir J*, 2004, 24(3): 371-4.
- [19] GAUSSIN V, PUTTE T, MISHINA Y, et al. Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor *ALK3* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 2878-83.
- [20] MINETTE M S, SAHN D J, et al. Ventricular septal defects [J]. *Circulation*, 2006, 114(20): 2190-7.
- [21] THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-90.
- [22] ACLOQUE H, ADAMS M S, FISHWICK K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1438-49.
- [23] BISCHOFF J. Endothelial-to-mesenchymal transition-purposeful versus maladaptive differentiation [J]. *Circ Res*, 2019, 124(8): 1163-5.