

· 研究论文 ·

红景天苷干预人胚肺二倍体成纤维细胞衰老的 microRNA 芯片筛选与分析

张 婧, 苏慧丽, 王雅珍, 文晓林, 贾兵兵, 毛根祥*

(浙江医院, 浙江 杭州 310013)

摘要: 本文运用 microRNA 芯片方法检测红景天苷干预人胚肺二倍体成纤维细胞衰老过程中的 microRNA 表达变化, 并预测 miRNA 调控的靶基因功能与信号通路。将人胚肺二倍体成纤维细胞分为 3 组: 年轻细胞 (28 PD, young)、近复制衰老 (50 PD, old) 和红景天苷处理的 50 PD 细胞 (old+SAL), 进行 miRNA 表达谱分析。结果找到 43 个 miRNA 与细胞复制性衰老显著相关。58 个 miRNA 在红景天苷干预后表达发生了改变。6 个 miRNA 分子包括 hsa-let-7c、hsa-let-7e 和 hsa-mir-3620 表达量在衰老细胞组中表达降低而在红景天苷干预后表达增加, hsa-mir-411、hsa-mir-24-2-5p 和 hsa-mir-485-3p 则表现出相反的趋势。对已经报道过的靶基因进行功能聚类和信号通路分析, 靶基因功能明显富集于 31 个 GO, 11 条信号通路。挑选 4 个 miRNA 经 RT-PCR 验证结果与芯片结果相符。本研究结果为从 microRNA 水平探讨红景天苷抗衰老机制提供了线索。

关键词: 红景天苷; 衰老; miRNA 芯片; 成纤维细胞; let-7

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0550-06

The miRNA microarray analysis of salidroside's anti-aging function in human embryonic lung fibroblast 2BS cells

ZHANG Jing, SU Hui-li, WANG Ya-zhen, WEN Xiao-lin, JIA Bing-bing, MAO Gen-xiang*

(Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China)

Abstract: This study was designed to investigate the microRNA expression profile in human embryonic lung fibroblast 2BS cells upon salidroside (SAL) treatment, and predict the target genes of miRNAs and related pathways delaying cellular senescence. Samples were divided into three groups: young control (28 PD), old control (50 PD), and old+SAL (50 PD with SAL), RNA from three groups was used for miRNA microarray analysis. In late PD cells, 43 miRNAs were found significantly changed relatively to those in young cells, and 58 miRNAs were regulated by SAL. The miRNAs including hsa-let-7c, hsa-let-7e and hsa-mir-3620 were significantly down-regulated in late PD cells which could be reversed by SAL treatment. However, hsa-mir-411, hsa-mir-24-2-5p and hsa-mir-485-3p exhibited an opposite trend. Gene Ontology and Pathway analysis revealed that target genes were significantly enriched in 31 GO and 11 pathways. The microarray data was further validated with qRT-PCR. This research provides new clues regarding the underlying mechanisms of SAL on cellular senescence through miRNAs regulation.

Key words: salidroside; senescence; miRNA microarray; fibroblast; let-7

收稿日期: 2016-10-27; 修回日期: 2016-11-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201040); 浙江省医药卫生平台计划 (学科带头人)(2015DTA001); 国家卫计委科学研究基金项目 (WKJ2011-2-014); 浙江省中医药科学研究基金项目 (2015ZA002); 浙江省卫生医药科研项目 (2016KYB005).

*通讯作者 Tel: 86-571-81595031, E-mail: maogengxiang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1040

红景天 (*Rhodiola rosea*) 系蔷薇目景天科 (Crassulaceae) 红景天属多年生草本或亚灌木植物, 是珍稀药用植物之一。其主要活性成分红景天苷 (salidroside, SAL), 具有保护神经及心血管系统、调节机体代谢、增强免疫系统功能以及干预衰老等多种药理作用^[1]。红景天苷具有良好的体内外延缓衰老的效果, 其对 *D*-半乳糖衰老小鼠展现出良好的整体抗衰老效应, 能够显著逆转 H_2O_2 诱导的细胞衰老样表型, 以及改善 UVB 诱导的成纤维细胞的衰老样改变^[2-4]。

衰老过程的调控涉及多个系统, 如氧化应激系统、端粒长度改变、p53-p21 和 p16-Rb 信号通路等。microRNAs (miRNAs) 主要通过靶基因 mRNA 3' 非编码区 (untranslated regions, UTR) 的完全或不完整配对引起 mRNA 降解或翻译抑制, 从而在转录后水平调控基因的表达, 进而参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生物过程^[5,6], 并且 miRNA 作为新的衰老调控系统越来越受到重视。本研究利用 miRNA 芯片研究红景天苷对人胚肺二倍体成纤维 2BS 细胞的复制性衰老的 miRNA 表达谱的影响, 拟从 miRNA 水平初步探讨红景天苷干预细胞复制性衰老的作用机制。

材料与方法

药品与试剂 红景天苷购自中国食品药品检定研究院, 采用 DMSO-乙醇 (1:1, v/v) 配置成 5 mmol·L⁻¹ 母液, 保存于 -20 °C 备用; DMEM-高糖培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); Trizol (Invitrogen 公司); miScript Reverse Transcription Kit、miScript SYBR Green PCR kit 200 试剂盒 (德国 Qiagen 公司); 其他生化试剂均为国产分析纯。

细胞株 人胚肺二倍体成纤维细胞 2BS 由北京天坛生物制品有限公司建株, 30 代 (PD) 以下为年轻细胞, 55 PD 以上为完全衰老细胞。2BS 细胞使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM-高糖培养基, 在饱和湿度、37 °C、5% CO₂ 通用培养条件下常规培养。当细胞生长至约 80%~90% 汇合时, 将细胞进行 1:2 传代。

红景天苷处理 2BS 细胞 2BS 细胞分为 3 组, 每组 3 例: 取 28 PD 2BS 细胞作为年轻组 (young), 50 PD 2BS 细胞分为溶媒对照组 (old) 和红景天苷干预组 (old+SAL), 其中年轻组细胞只加溶剂 1% DMSO: 乙醇 (1:1, v/v) 处理 24 h, 50 PD 细胞对照组加入 1% DMSO-乙醇 (1:1, v/v)、50 PD 细胞干预组加入

5 μmol·L⁻¹ 红景天苷, 处理 24 h 后收集细胞, 提取 RNA 用于 miRNA 芯片分析。

microRNA 芯片检测分析 2BS 细胞给予处理后, 立即收集细胞, Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA, 采用 Agilent Bioanalyzer 鉴定 RNA 的纯度和质量。对 RNA 3' 端加 poly(A), 并进行荧光标记, 进行杂交反应。本实验采用 LC Sciences microRNA 微阵列 (单色, miRbase 19.0 版本), 用激光共聚焦扫描仪对杂交结束后的芯片进行扫描, 对杂交信号值进行背景扣除, 归一化。

荧光定量 PCR 验证芯片结果 选取芯片结果中显著差异表达的 miRNA 进行验证。miR-let-7c、miR-let-7e、miR-466、miR-181d 以及内参 U6 的定量 PCR 引物购自德国 Qiagen 公司。按照 miScript Reverse Transcription Kit 试剂盒说明书, 将各例 RNA 样本逆转录为 cDNA, 反应程序为: 37 °C 60 min, 95 °C 5 min, 冰上保存。按照 miScript SYBR Green PCR Kit 的说明, 进行定量 PCR, 反应程序为: 95 °C 5 min 预变性, 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 70 °C 34 s (采集信号) 重复 40 个循环进行扩增; 溶解曲线采用 ABI 7000 默认程序。反应结束后仪器自动计算出 Ct 值 (threshold cycles)。每个样本设置 3 个重复管, 同时设无模板阴性对照。2^{-ΔΔCt} 法计算各组之间 miRNA 的表达差异。

靶基因预测与功能显著性分析 采用生物信息学软件 (Mirtarbase <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>) 对芯片检测的差异表达 miRNA ($P < 0.05$) 进行靶基因预测, 选择预测结果中有实验验证过的靶基因进行功能分析。基于 GO (gene ontology) 数据库和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路数据库, 利用 David 软件 (the database for annotation, visualization and integrated discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>) 对靶基因进行 GO 显著性分析和信号通路显著性分析。

统计学处理 SPSS 10.0 软件进行数据分析, 采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1 miRNA 表达谱差异及聚类分析

本课题的前期研究表明红景天苷具有良好的体内外延缓衰老的效果^[2,3]。为了进一步探讨红景天苷干预细胞复制性衰老的分子机制, 采用 miRBase 19.0 版 microRNA Microarray 芯片对年轻细胞 (28 PD, young)、近复制衰老 (50 PD, old) 和红景天苷处理的

50 PD 细胞 (old+SAL) 进行 miRNA 表达谱分析。芯片结果显示, 在年轻细胞组和衰老细胞组之间, 有 43 个 miRNA 表达差异显著 ($P < 0.05$), 其中有 11 个 miRNA 的 P 值小于 0.01 (图 1), 推测其可能与细胞复制性衰老显著相关。衰老细胞组和红景天苷处理的衰老细胞组间的比较结果则显示有 58 个 miRNA 在红景天苷干预后表达发生了改变 ($P < 0.05$), 其中 17 个 miRNA 差异非常显著 ($P < 0.01$, 图 1), 这些 miRNA 的表达可能受到红景天苷的调控。

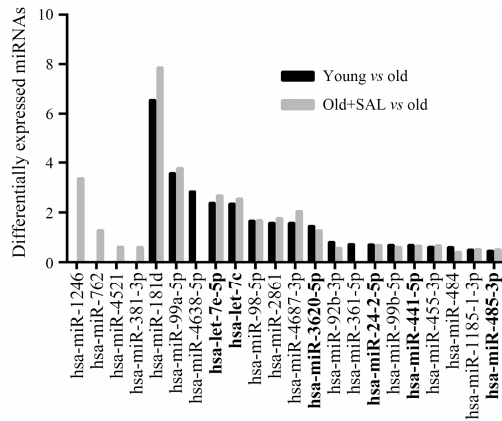


Figure 1 Differentially expressed miRNAs. Bold fonts: miRNAs differentially expressed in both young/old and old+SAL/old groups. SAL: Salidroside

进一步分析发现, 31 个 miRNA ($P < 0.05$, 图 2) 在以上两组比较间均表现出明显的差异, 说明这些 miRNA 分子很有可能是在衰老的细胞受到红景天苷干预后参与细胞衰老调控的关键 miRNA 分子, 其中有 6 个 miRNA 分子 ($P < 0.01$, 图 1) 包括 hsa-let-7c、hsa-let-7e 和 hsa-mir-3620 表达量在衰老细胞组中降低, 而在红景天苷干预后表达增加, hsa-mir-411、hsa-mir-24-2-5p 和 hsa-mir-485-3p 则表现出相反的趋势。

2 荧光定量 RT-PCR 验证差异表达的 miRNA

为了验证 miRNA 芯片结果, 选择了差异表达较为明显的 hsa-mir-466、hsa-let-7c、hsa-let-7e 和 hsa-mir-181d 进行验证, 利用荧光定量 PCR 方法检测年轻细胞 (28 PD, young)、近复制衰老 (50 PD, old) 和红景天苷处理的 50 PD 细胞 (old+SAL) 3 组之间 4 种 miRNA 差异表达情况。结果表明, 这 4 个 miRNA 表达趋势与芯片结果相符 (图 3)。

3 差异表达 miRNA 靶基因显著富集的 GO 与 Pathway

使用 Mirtarbase 数据库对 31 个 miRNA 的靶基因进行检索, 整理出已经实验验证过的 196 个靶基因并对其功能分析, 结果显示红景天苷调控的

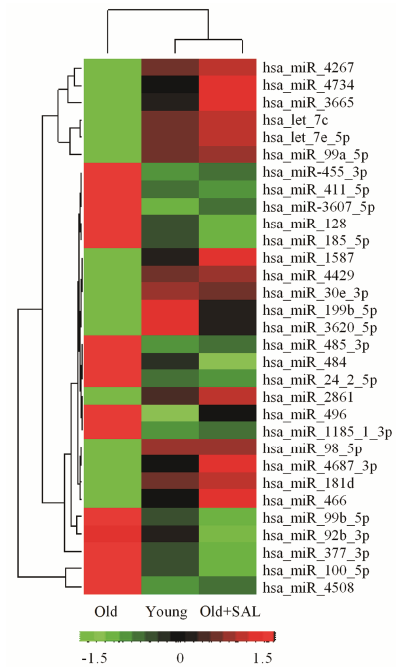


Figure 2 Hierarchical clustering analysis of the 31 miRNAs differentially expressed in both young/old ($P < 0.05$) and old+SAL/old ($P < 0.05$) groups. The colors display miRNA expression variance: red indicates a higher gene expression, green lower expression, and black the median value

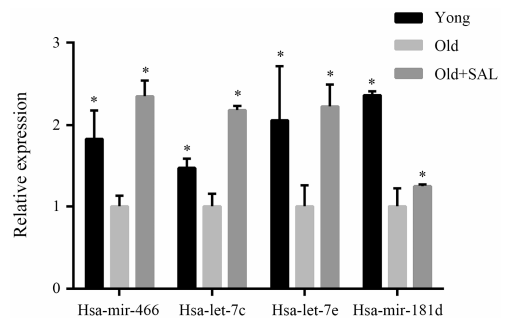


Figure 3 Validation of miRNA microarray data via RT-PCR. The relative expression value of hsa-mir-466, hsa-let-7c, hsa-let-7e and hsa-mir-181d were normalized to U6 RNA level. * $P < 0.05$ vs old group

miRNA 分子的靶基因功能明显富集于 31 个 GO (图 4A), 包括转录因子活性调节、细胞泛素化调节和蛋白激酶等。Pathway 显著性分析显示靶基因明显富集于 11 条信号通路 (图 4B), 包括 p53 信号通路、转录因子 CREB 信号通路和 AKT/mTOR 信号通路等。

讨论

2BS 人胚肺二倍体成纤维细胞系是国内外广受认可的一种细胞衰老模型。细胞衰老包括复制性和早发性衰老。复制性衰老是细胞衰老的最常见类型, 已报道 p53 在复制性衰老中起到重要作用^[7]。p21 在转录

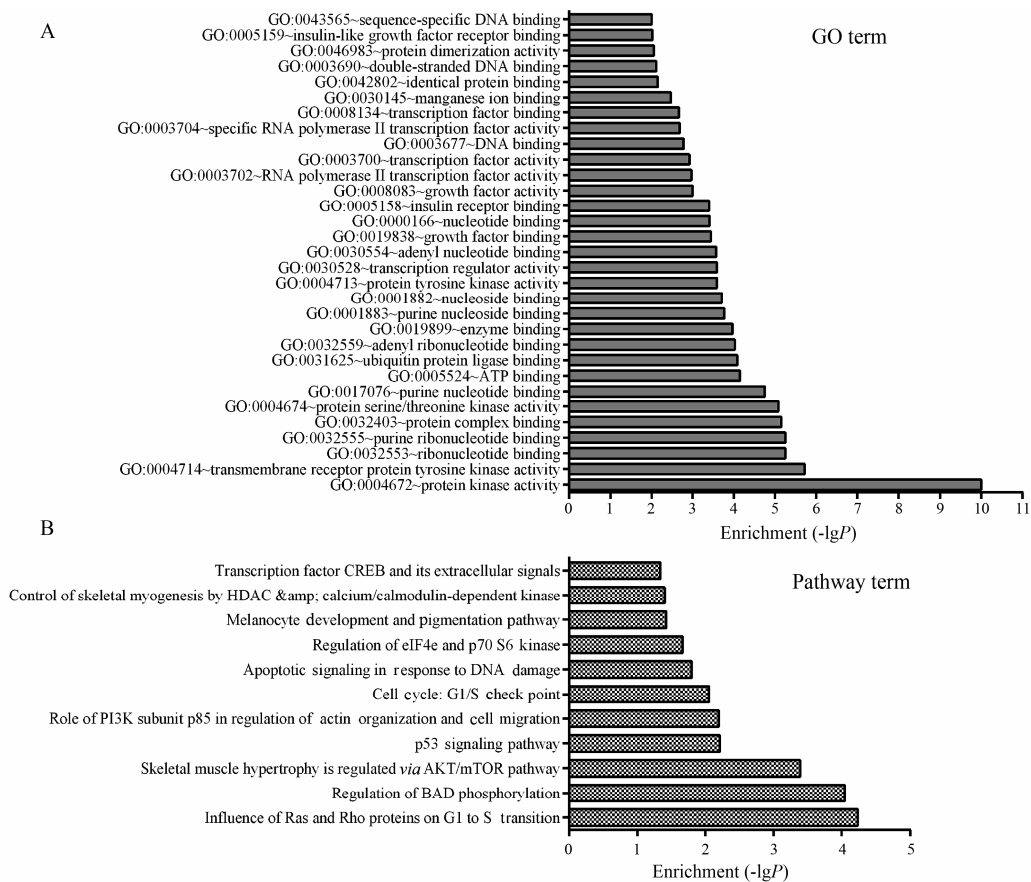


Figure 4 GO and Pathway analysis on differentially expressed miRNAs. A: 31 GO terms enriched in SAL anti-senescence; B: 11 pathways enriched in SAL anti-senescence. The $-\lg P$ is the negative logarithm of the P -value.

水平由 p53 活化, 介导端粒依赖和 DNA 损伤等引起的衰老。p21 能结合并抑制多种 cyclin-CDK 复合物活性, 在调控 G₁ 期和 G₂/M 期阻滞中有着重要作用^[8]。

红景天苷具有良好的体内外延缓衰老的效果, 本课题采用 microRNA Microarray 芯片对红景天苷干预人胚肺二倍体成纤维细胞衰老的机制进行分析。找到了 43 个 miRNA 与细胞复制性衰老显著相关, 58 个 miRNA 在红景天苷干预后表达发生了改变。6 个 miRNA 分子包括 hsa-let-7c、hsa-let-7e 和 hsa-mir-3620 在衰老细胞组中表达降低而在红景天苷干预后表达增加, hsa-mir-411、hsa-mir-24-2-5p 和 hsa-mir-485-3p 则表现出相反的趋势。

let-7 最初是在控制线虫干细胞发育分化中被发现的, 也是在人体发现的第一个 miRNA 分子。在高等生物中, let-7 的表达随着胚胎发育而增加, let-7 的失调将导致细胞分化程度异常和疾病的发生, 包括肿瘤等。本研究的芯片结果显示 hsa-let-7c 和 hsa-let-7e 随着细胞复制性衰老而表达降低, 且该结果与先前的报道相符^[9]。荧光定量 PCR 结果进一步验证了这一结果, 并且在红景天苷干预后 hsa-let-7c 和 hsa-

let-7e 的表达随着细胞衰老的减缓而有所增加。有研究报道 let-7c 通过下调其靶基因 Bcl-x1 抑制肿瘤细胞凋亡^[10, 11]。Xu 等^[12]发现 let-7a 可以通过与衔接蛋白 p66Shc mRNA 上的种子序列结合, 抑制 p66Shc 的翻译表达, 从而延缓人二倍体成纤维细胞的复制性衰老的过程。miR-24 可以通过调控一系列细胞周期相关的基因 MYC、AURKB、CCNA2、CDC2、CDK4 和 FEN1, 并直接抑制靶基因 E2F₂, 使细胞周期阻滞于 G₁ 期从而抑制细胞增殖^[13]。DNA 损伤的积累是细胞衰老的重要标志。DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) 损伤时, 组蛋白 2A 变异体 (histone family 2A variant, H₂AX) 可以发生不同的翻译后修饰标记损伤的 DNA 双链, 促进局部 DNA 修复因子和染色体重塑因子的募集, 维持基因组的稳定性。miR-24-2 可以通过靶向抑制 H2AX 和 BCL-2, 同时下调 p53-p21 信号相关基因 MDM-2 和 p21, 阻碍 DNA 损伤修复, 促进细胞的凋亡^[14, 15]。

miRNA 芯片结果结合 Mirtarbase 数据库进行生物信息学分析, 对已经报道过的靶基因进行功能聚类 and 信号通路分析, 发现红景天苷调控的 miRNA 分子

的靶基因功能明显富集于 31 个 GO, 11 条信号通路。其中 cAMP/CREB 信号通路在调控葡萄糖稳态、细胞生存以及维持学习和记忆功能中发挥重要作用^[16]。CREB 是一种组成型核转录因子, 在 cAMP 及各种激酶作用下, 其第 133 位 Ser 磷酸化而活化, 与 DNA 反应元件 CRE “TGACGTCA” 序列结合, 并与 p300 和 CBP 形成复合物, 促进下游靶基因 BDNF 等的转录。CREB 的活性和表达随着年龄增长而降低^[17]。CREB 及其靶基因 BDNF 在老龄大脑中表达降低, 与学习认知能力下降有关。在阿尔茨海默病中, Rosa 等^[18]发现 A β 蛋白通过抑制 CREB 转录, 抑制 CREB 下游基因 BDNF 表达。mTOR 通过磷酸化其底物核糖体蛋白 S6 激酶 1 和 eIF4E 结合蛋白 1 调节 mRNA 的翻译起始和过程, 从而控制蛋白的合成速率。当营养充分时, mTOR 被激活并促进生长和合成代谢。相反, 当养分缺失时, mTOR 活性受到抑制从而转向生长抑制和分解代谢^[19]。mTOR 信号在热量限制延长机体寿命中起到重要作用^[20]。在果蝇中, 热量限制同时抑制 mTOR, 激活 eIF4E 结合蛋白 1, 导致线粒体电子传递链增加, 使线粒体呼吸作用增强, 减少 ROS 的产生, 降低 ROS 导致的衰老并延长了寿命^[21]。另外, mTOR 还可通过减少溶酶体对细胞内容物的降解而抑制自噬, 进而影响细胞衰老^[7]。Wu 等^[22]通过研究 mTOR 缺失小鼠发现, 虽然 mTOR 缺失小鼠表现出比野生型小鼠较小的体型, 但在食量、代谢等方面没有差异, 并表现出更长的寿命。Marcais 等^[23]报道, 在 T 细胞中 let-7c 直接作用于 mTOR 的 UTR 区域, 抑制其翻译。let-7 家族成员在发育、肿瘤的发生发展中起到了重要的作用, 红景天苷调控 let-7 是否通过抑制 mTOR 信号延缓衰老还需要进一步验证。

综上所述, 本研究利用 miRNA 表达谱芯片, 筛选出红景天苷干预细胞复制性衰老的相关 miRNA, 并对其调控的靶基因和信号通路进行了分析, 从 miRNA 角度初步探讨了红景天苷抗细胞衰老的分子机制, 为进一步深入研究其抗衰老作用机制提供了基础。

References

- [1] Shen JJ, Mao GX, Chen JJ, et al. Research progress of pharmacological actions and mechanisms of active components of *Rhodiola L* [J]. *Int J Geriatrics* (国际老年医学杂志), 2012, 33: 206–210.
- [2] Mao GX, Deng HB, Yuan LG, et al. Protective role of salidroside against aging in a mouse model induced by *D-galactose* [J]. *Biomed Environ Sci*, 2010, 23: 161–166.
- [3] Mao GX, Wang Y, Qiu Q, et al. Salidroside protects human fibroblast cells from premature senescence induced by H₂O₂ partly through modulating oxidative status [J]. *Mech Ageing Dev*, 2010, 131: 723–731.
- [4] Mao GX, Xing WM, Wen XL, et al. Salidroside protects against premature senescence induced by ultraviolet B irradiation in human dermal fibroblasts [J]. *Int J Cosmet Sci*, 2015, 37: 321–328.
- [5] Zahnow CA, Baylin SB. Epigenetic networks and miRNAs in stem cells and cancer [J]. *Mol Cell*, 2010, 39: 661–663.
- [6] Fabbri M, Calore F, Paone A, et al. Epigenetic regulation of miRNAs in cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 754: 137–148.
- [7] Rufini A, Tucci P, Celardo I, et al. Senescence and aging: the critical roles of p53 [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 5129–5143.
- [8] Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, et al. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 8493–8497.
- [9] Marasa BS, Srikantan S, Martindale JL, et al. MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence [J]. *Aging (Albany NY)*, 2010, 2: 333–343.
- [10] Zhan M, Qu Q, Wang G, et al. let-7c sensitizes acquired cisplatin-resistant A549 cells by targeting ABCC2 and Bcl-XL [J]. *Pharmazie*, 2013, 68: 955–961.
- [11] Qin B, Xiao B, Liang D, et al. MicroRNA let-7c inhibits Bcl-xl expression and regulates ox-LDL-induced endothelial apoptosis [J]. *BMB Rep*, 2012, 45: 464–469.
- [12] Xu F, Pang L, Cai X, et al. let-7-repressed Shc translation delays replicative senescence [J]. *Aging Cell*, 2014, 13: 185–192.
- [13] Lal A, Navarro F, Maher CA, et al. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements [J]. *Mol Cell*, 2009, 35: 610–625.
- [14] Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX [J]. *Science*, 2002, 296: 922–927.
- [15] Srivastava N, Manvati S, Srivastava A, et al. miR-24-2 controls H2AFX expression regardless of gene copy number alteration and induces apoptosis by targeting antiapoptotic gene BCL-2: a potential for therapeutic intervention [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13: R39.
- [16] Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the

- phosphorylation-dependent factor CREB [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 599–609.
- [17] Hansen RT 3rd, Zhang HT. Senescent-induced dysregulation of cAMP/CREB signaling and correlations with cognitive decline [J]. *Brain Res*, 2013, 1516: 93–109.
- [18] Rosa E, Fahnestock M. CREB expression mediates amyloid beta-induced basal BDNF downregulation [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36: 2406–2413.
- [19] Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4: a011593.
- [20] Grandison RC, Piper MD, Partridge L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila* [J]. *Nature*, 2009, 462: 1061–1064.
- [21] Zid BM, Rogers AN, Katewa SD, et al. 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2009, 139: 149–160.
- [22] Wu JJ, Liu J, Chen EB, et al. Increased mammalian lifespan and a segmental and tissue-specific slowing of aging after genetic reduction of mTOR expression [J]. *Cell Rep*, 2013, 4: 913–920.
- [23] Marcais A, Blevins R, Graumann J, et al. microRNA-mediated regulation of mTOR complex components facilitates discrimination between activation and anergy in CD4 T cells [J]. *J Exp Med*, 2014, 211: 2281–2295.