

刘俊, 孙佳, 刘维静, 等. *Apbb1* 基因对心肌细胞增殖影响的探究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 29–38.  
Liu J, Sun J, Liu WJ, et al. The effect of *Apbb1* gene on cardiomyocyte proliferation [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 29–38.  
doi: 10. 3969/j.issn.1671–7856. 2022. 05. 005

## *Apbb1* 基因对心肌细胞增殖影响的探究

刘 俊<sup>1</sup>, 孙 佳<sup>2</sup>, 刘维静<sup>3</sup>, 郝琰琰<sup>1</sup>, 廉 虹<sup>3\*</sup>, 王玉瑶<sup>1\*</sup>

(1.山西医科大学基础医学院 生物化学与分子生物学教研室,太原 030000;2.河北燕达陆道培医院检验科,河北 廊坊 065201;3.中国医学科学院,北京协和医学院,国家心血管病中心,动物实验中心,心血管植入材料临床前研究评价北京市重点实验室,北京 102300)

**【摘要】 目的** 探究  $\beta$  淀粉样蛋白前体蛋白结合蛋白 B-1(*Apbb1*) 基因对 H9c2 心肌细胞增殖的影响。**方法** 利用小干扰RNA 与 pcDNA3.1<sup>+</sup> 质粒对 H9c2 心肌细胞系进行敲低与过表达 *Apbb1* 基因处理,通过 CCK8 实验、qPCR 实验以及细胞免疫荧光实验检测细胞增殖情况,评价 *Apbb1* 基因对心肌细胞增殖的作用;利用在线数据库 String 分析 APBB1 蛋白的互作蛋白,探究其可能发挥作用的方式。实验分为 4 组:敲低对照组、敲低 *Apbb1* 组、过表达对照组和过表达 *Apbb1* 组。**结果** 相较于敲低对照组,敲低 *Apbb1* 组 *Apbb1* 基因表达下降 52% ( $P < 0.01, n = 3$ ),细胞增殖在 48 h 时下降 44% ( $P < 0.01, n = 3$ ),但是在 72 h 时细胞增殖增加 86% ( $P < 0.0001, n = 3$ );细胞周期相关基因 *Ccnb1* 和 *Ccna2* mRNA 表达水平分别升高 80% ( $P < 0.0001, n = 3$ ) 和 76% ( $P < 0.0001, n = 3$ );细胞免疫荧光实验发现 PH3 与 Aurora B 阳性细胞分别增加 4.33% ( $P < 0.01, n = 3$ ) 和 4.67% ( $P < 0.05, n = 3$ )。相较于过表达对照组,过表达 *Apbb1* 组 *Apbb1* 基因表达上调 119 倍 ( $P < 0.001, n = 3$ ),细胞增殖在 48 h 与 72 h 分别降低 1.23 倍 ( $P < 0.0001, n = 3$ ) 和 1.04 倍 ( $P < 0.0001, n = 3$ );细胞增殖标志分子 Ki67 和细胞周期相关基因 *Ccnb1* 和 *Ccna2* mRNA 表达水平分别降低 25% ( $P < 0.01, n = 3$ )、72% ( $P < 0.001, n = 3$ ) 和 38% ( $P < 0.001, n = 3$ );PH3 与 Aurora B 阳性细胞分别降低 3.7% ( $P < 0.01, n = 3$ ) 和 4.36% ( $P < 0.05, n = 3$ )。蛋白互作网络分析结果表明 KAT5、APP 与 APLP2 是 APBB1 互作最为显著的蛋白。**结论** 敲低 *Apbb1* 基因促进 H9c2 心肌细胞增殖,过表达 *Apbb1* 基因抑制 H9c2 心肌细胞增殖,*Apbb1* 可能通过影响细胞周期 G2/M 期影响心肌细胞增殖,KAT5 蛋白可能与 APBB1 蛋白互作影响心肌细胞增殖。

**【关键词】** H9c2 心肌细胞;*Apbb1*;增殖;蛋白互作网络分析

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0029-10

## The effect of *Apbb1* gene on cardiomyocyte proliferation

LIU Jun<sup>1</sup>, SUN Jia<sup>2</sup>, LIU Weijing<sup>3</sup>, HAO Yanyan<sup>1</sup>, LIAN Hong<sup>3\*</sup>, WANG Yuyao<sup>1\*</sup>

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China. 2. Department of Laboratorial Medicine, Hebei Yanda LU Dao-Pei Hospital, Langfang 065201. 3. Beijing Key Laboratory of Preclinical Research and Evaluation for Cardiovascular Implant Materials, Animal Experimental Centre, Fuwai Hospital, National Centre for Cardiovascular Disease, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 102300)

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81500364,81900343);山西省重点研发计划项目(201903D321091)。

**【作者简介】** 刘俊(1995—),男,硕士研究生,研究方向:心脏再生。E-mail: 18131376169@163.com

**【通信作者】** 王玉瑶(1981—),女,博士,副教授,研究方向:心脏再生。E-mail: wyybio@163.com

廉虹(1982—),女,博士,助理研究员,研究方向:心血管疾病与心肌再生。E-mail: lianhong@fuwaihospital.org

\* 共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of the amyloid beta precursor protein binding protein B1 (*Apbb1*) gene on H9c2 cardiomyocyte proliferation and its potential mechanism. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were treated with small interfering RNA and pcDNA3.1<sup>+</sup> plasmid for knockdown and overexpression of the *Apbb1* gene, and cell proliferation was detected by CCK8, qPCR and immunofluorescence assay, to evaluate the effect of this gene on cardiomyocyte proliferation. Next, the proteins interacting with the APBB1 protein were analyzed using the online database String to explore how APBB1 might function. In the experiment, four groups were established: knockdown control group, *Apbb1*-knockdown group, overexpression control group and *Apbb1*-overexpression group. **Results** Compared with that in the knockdown control group, expression of the *Apbb1* gene in the *Apbb1*-knockdown group decreased by 52% ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ) and cell proliferation decreased by 44% at 48 h ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), but cell proliferation increased by 86% at 72 h ( $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ ). The expression levels of *Ccnb1* and *Ccna2* mRNA were increased by 80% ( $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ) and 76% ( $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ), respectively. Immunofluorescence assay showed that PH3- and Aurora B-positive cells increased by 4.33% ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ) and 4.67% ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). Compared with that in the overexpression control group, the expression of the *Apbb1* gene was upregulated 119-fold in the *Apbb1*-overexpression group ( $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ ), and cell proliferation decreased by 1.23 times at 48 h ( $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ ) and 1.04 times at 72 h ( $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ ). The expression levels of *Ki67*, a marker of cell proliferation, and *Ccnb1* and *Ccna2* mRNA encoded by cell cycle-related genes were decreased by 25% ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), 72% ( $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ), and 38% ( $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ), respectively. Meanwhile, PH3- and Aurora B-positive cells decreased by 3.7% ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ) and 4.36% ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), respectively. The result of protein interaction network analysis showed that KAT5, APP and APLP2 were the proteins that most significantly interacted with APBB1. **Conclusions** Knockdown of the *Apbb1* gene promotes the proliferation of H9c2 cardiomyocytes, while its overexpression inhibits their proliferation. *Apbb1* may affect the proliferation of cardiomyocytes by influencing the G2/M phase of the cell cycle and KAT5 may interact with APBB1 protein to affect cardiomyocyte proliferation.

**【Keywords】** H9c2 cardiomyocyte; *Apbb1*; proliferation; protein interaction network analysis

目前,缺血性心脏病是导致人类死亡的首要病因,而心肌梗死是缺血性心脏病产生的主要原因之一<sup>[1]</sup>。心肌梗死会导致大量的心肌细胞丢失,丢失的心肌细胞由于心肌细胞本身绝大部分都处于终末分化时期,不能通过剩余的心肌细胞增殖补充<sup>[2]</sup>。因此,如何诱导已处于终末分化的心肌细胞增殖对于缺血性心脏病的治疗异常重要。

H9c2 心肌细胞是一种大鼠胚胎心脏来源的心肌细胞系,由于其具有与心肌细胞相似的特性,并且经济易得,所以研究人员经常用其作为研究心脏与心肌细胞相关通路的研究对象。相较于 H9c2 细胞,从小鼠与大鼠体内分离的原代心肌细胞虽然更能代表体内心肌细胞的状态,但原代心肌细胞分离过程不仅复杂,而且分离后的状态很难保证。利用状态不佳的原代心肌细胞进行研究很有可能会得出不正确的结果与结论。因此,可以将 H9c2 心肌细胞作为心肌细胞增殖研究的实验对象,用于解析心肌细胞增殖涉及的具体机制。

$\beta$  淀粉样蛋白前体蛋白结合蛋白 B-1 (APBB1) 是一种衔接蛋白,其主要在神经性疾病如阿尔兹海默症中被研究<sup>[3]</sup>。然而, Mahmoud 等<sup>[4]</sup>发现,在显著促进心肌细胞增殖的 Meis1 敲除小鼠心脏中,

*Apbb1* mRNA 表达水平显著降低。此外, *Apbb1* 被视为心脏肥大的早期标志物<sup>[5]</sup>,而心脏肥大与心肌细胞肥大相关,心肌细胞肥大相关因子可能参与调控心肌细胞增殖<sup>[6]</sup>。但是, *Apbb1* 是否在心肌细胞增殖过程中发挥一定的生物学功能,从而影响心肌细胞的增殖,目前无相关文献报道。

因此,本研究通过 siRNA 敲低技术与质粒过表达的方式改变了 H9c2 心肌细胞中 *Apbb1* 基因的表达量,探究了 *Apbb1* 基因对 H9c2 心肌细胞增殖的影响,并利用在线数据库 String 分析了 APBB1 蛋白的互作蛋白,发现其互作蛋白 KAT5 的转录水平与 *Apbb1* 的调控趋势变化一致。这可能为解析心肌细胞增殖的机制,促进对心脏再生的理解,以及治疗缺血性心脏病提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

大鼠胚胎心脏来源的 H9c2 心肌细胞系购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库。

### 1.2 主要试剂与仪器

Gibco 澳洲胎牛血清与 DMEM 高糖基础培养基均购自美国 Gibco 公司,澳洲胎牛血清货号为

10099-141C; lipo3000 转染试剂、Optimem-Medium 与 TRIzol 均购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; CCK8 增殖检测试剂盒购自博士德生物公司; qPCR 试剂盒购自北京聚合美生物公司; Aurora B 一抗购自 Abcam 公司, 货号为 Ab239837; PH3 一抗购自美国 Millipore 公司, 货号为 3377; 荧光二抗 Alexa Fluor 488 购自美国 Invitrogen 公司, 货号为 A1108; 敲低组使用的非特异性小干扰 RNA (NC) 与特异性的 si-*Apbb1* 均购自汉恒生物科技(上海)有限公司; 过表达组使用的 pcDNA3.1<sup>+</sup> 空质粒与携带 *Apbb1* 基因的 pcDNA3.1<sup>+</sup> 质粒均购自通用生物系统(安徽)有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

用含 10% 血清与含 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基培养 H9c2 心肌细胞, 将细胞置于培养条件为 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中进行培养。

#### 1.3.2 siRNA 转染及分组

取处于对数生长期的 H9c2 细胞 10<sup>5</sup> 个, 接种至六孔板中, 待其生长至 70% 左右, 准备转染。转染方案确定前, 利用带荧光的 FAM siRNA 进行最佳 siRNA 转染浓度的摸索。具体摸索过程按照 siRNA 转染说明书所描述的进行, 固定 lipo3000 与 optimem-Medium 的用量, 对说明书推荐的 20、50 与 100 nmol/L 3 个浓度的 siRNA 进行转染。最终根据转染后细胞荧光强弱以及细胞状态, 确定 50 nmol/L 为最佳 siRNA 转染浓度, 50 nmol/L 在六孔板中对应的体积为 6.5 μL。正式转染时, 先分别配置转染复合物与敲低复合物。通过 6.5 μL lipo3000 与 125 μL Optimem-Medium 培养基配置转染复合物; 6.5 μL siRNA 与 125 μL Optimem-Medium 培养基配置敲低复合物。两种混合物配置完成之后, 室温静置 5 min。静置完成之后, 将两种混合物混匀, 室温再次静置 10 min, 然后再加入培养孔内, 开始转染。由于 lipo3000 对细胞生物毒性较小, 可以将转染处理时长延长至 12 h, 再将其传入 6 cm 皿中培养 36 h, 最后利用 qPCR 实验检测细胞转染效率。分组上, 将转染的组别按照所转染的 siRNA 不同分别设为 Si-NC 组、1Si-*Apbb1* 组、2Si-*Apbb1* 组和 3Si-*Apbb1* 组。Si-NC 组表示为转染非特异性小干扰 RNA 的对照组, 1Si-*Apbb1* 与 2Si-*Apbb1* 以及 3Si-*Apbb1* 组代表转染从公司购买的 3 组特异性针对 *Apbb1* 基因的 siRNA

序列的组。上述用到的 siRNA 具体序列如下(5'-3'), si-NC 正向: UUCUCCGAACGAACGUGUCACGUTT, 反向: ACGUGACACGUUCGGAGAATT; 1si-*Apbb1* 正向: CCUACGUAGCUCGAGAUAAATT, 反向: UUAUCUCGAGCUACGUAGGTT; 2si-*Apbb1* 正向: GCUCAAGUGCCACGUGUUUTT, 反向: AAACACGUGGCACUUGAGCTT; 3si-*Apbb1* 正向: CCCAGCACC AAAGAAUGAATTT, 反向: UUCAUUCUUUGGUGCUGGGTT; FAM siRNA 正向: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT, 反向: ACGUGACACGUUCGGAGAATT。

#### 1.3.3 pcDNA3.1<sup>+</sup> 质粒转染及分组

取处于对数生长期的 H9c2 细胞 10<sup>5</sup> 个, 接种至六孔板中, 待其生长至 70% 左右, 准备转染。转染时, 首先配置转染复合物与过表达复合物。配置转染复合物需要加入 2 μL lipo3000 与 125 μL Optimem-Medium 培养基。配置过表达复合物需要加入 1 μg pcDNA3.1<sup>+</sup> 的质粒与 2 μL P3000 以及 125 μL Optimem-Medium。配置完成之后, 先分别混匀室温静置 5 min, 然后再将两种混合物混合在一起, 室温静置 10 min。最后将混匀好的混合物分别加入相应的培养孔中, 开始转染。后续转染过程同 siRNA 转染过程, 最终利用 qPCR 实验检测细胞转染效率。根据转染的质粒不同, 将转染的组别分别设为 OE-NC 组与 OE-*Apbb1* 组, OE-NC 组代表转染 pcDNA3.1<sup>+</sup> 空质粒的组, OE-*Apbb1* 组代表转染携带 *Apbb1* 基因的 pcDNA3.1<sup>+</sup> 质粒的组。

#### 1.3.4 利用 qPCR 法检测 *Apbb1* 转染效率与细胞增殖

转染完成之后, 首先利用 TRIzol 提取出 RNA, 再将 RNA 逆转录为 cDNA, 最后完成 qPCR 反应。TRIzol 提取 RNA 过程按照提取细胞 RNA 的方式进行提取, 逆转录以及 qPCR 反应的具体操作、具体条件以及具体参数均按照所用试剂对应的说明书指示进行。数据统计时, 以 *Gapdh* 为内参, 利用<sup>ΔΔ</sup>CT 法定量分析 *Apbb1* 转染效率与细胞增殖相关基因的表达水平。上述实验所用相关引物序列如下(5'-3'): *Gapdh* 正向: CGCCTGGAGAAACCTGCC, 反向: GTAGGCCATGAGGTCCACCAC; *Apbb1* 正向: ACCTACTACTGGCACAATCCC, 反向: TCCTTCCTCAAAGCCTTCT; *Ccnb1* 正向: TCCCACACGGAGGAATCTCT, 反向: TCTGCAGACGAGGTAGTCCA; *Ki67* 正向: GCAAGAGGCAAATCATCCGAACCC, 反向: GAGAACCCTTGCCACTCTTCTGCCC; *PCNA* 正向: GCTGACAT

GGGACACTTA, 反向: CTCAGGTACAACTTGGTG;  
*Ccnd1* 正向: GAGGAGCAGAAGTGCGAAGA, 反向:  
 GGCGGATAGAGTTGTCTAGTGTAG; *Ccna2* 正向: AG  
 CAGGAAGACCAGGAGAAT, 反向: GGTGAAGGCAG  
 GCTGTTTA; *Kat5* 正向: CCTATAGCGCACTCAGCT  
 CC, 反向: CGATTATCTCCCCACCTCC; *App* 正向:  
 CCAACCGTGGCATCCTTTTG, 反向: GCGTCGACA  
 GGCTCAACTTC; *Lrp1* 正向: GCGGTGTGACAACGA  
 CAA, 反向: AACTGGGTACTGGAGCAGGA。

### 1.3.5 利用细胞免疫荧光法检测细胞增殖

取转染完成后的细胞按照相应组别以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞均匀铺入含爬片的 12 孔板孔中,待细胞长至 60%~70% 左右,利用细胞增殖标志物 Aurora B 与 PH3 的免疫荧光抗体对细胞进行细胞免疫荧光实验,以检测细胞增殖。实验具体过程如下:首先利用 PBS 清洗细胞 3 次,清洗后弃去废液,再用 4% 多聚甲醛对细胞进行固定 20 min。固定后,利用含 1% 的 Triton 对细胞进行通透 5 min,通透后再利用 5% BSA 封闭 1 h,封闭后利用一抗进行孵育,4℃ 过夜。孵育后利用 PBS 清洗 3 次洗去多余一抗,接着利用二抗室温孵育 1 h,注意荧光二抗操作时需要避光。孵育完二抗后,利用 PBS 洗 3 次洗去多余二抗,然后加入 DAPI 染液对细胞核进行染色,染 5~10 min。染核后,用 PBS 洗 3 次洗去多余 DAPI 染液,最后利用防荧光淬灭剂与盖玻片进行封片。

### 1.3.6 利用 CCK8 法检测细胞增殖

取转染完成后的细胞按照相应组别以每孔  $3 \times 10^3$  个细胞每孔均匀铺入 96 孔板中。铺的孔数取决于组别与检测的时间点以及复孔数。组别主要包括 Si-NC、Si-*Apbb1*、OE-NC 与 OE-*Apbb1* 4 个组

别,检测的时间点主要包括 24、48 与 72 h 3 个时间点,每个组别的每个时间点设置 6 个复孔。具体实验过程如下:铺完细胞后,每隔 24 h 往孔中加入无血清 DMEM 高糖培养基稀释的 CCK8 试剂,稀释比例为 10:1,每孔加入 100  $\mu$ L。加完 CCK8 试剂后,在培养箱中培养 2 h,然后在酶标仪中检测其在 OD<sub>450</sub> 的吸光度值。数据统计上为避免偏差,对于 6 个复孔吸光度值的处理方式是去掉一个最高值与一个最低值,然后利用归一化方法按照组别与时间点进行分析。

### 1.3.7 蛋白互作网络分析

进入在线数据库 String (<https://cn.string-db.org/>),输入目的蛋白与种属,得到目的蛋白的互作蛋白网络。为获得可信度较高的互作蛋白,将其互作得分设置为最高的可信度 0.9。

### 1.4 统计学方法

采用 Graphpad prism 8.02 对结果进行统计分析。实验数据采用平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用未配对的 student's *t* 检验与单因素方差分析,  $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。

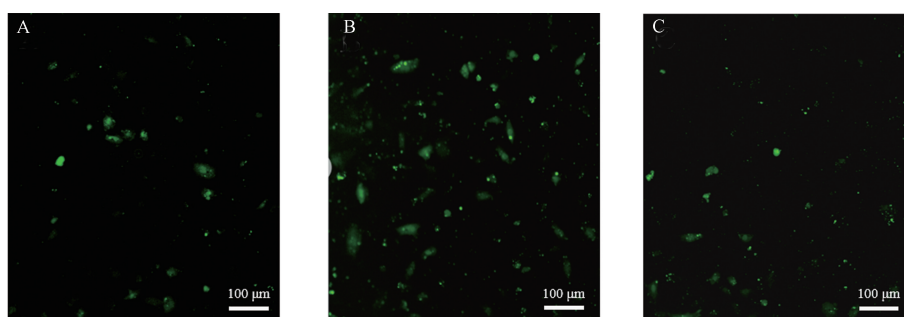
## 2 结果

### 2.1 siRNA 最佳转染浓度确定

为了探究 siRNA 最佳转染浓度,我们分别用 20、50 和 100 nmol/L 3 个浓度进行 H9c2 细胞的转染,镜下观察结果显示,siRNA 最佳转染浓度为 50 nmol/L,具体见图 1。

### 2.2 敲低效率最佳的 si-*Apbb1* 筛选

对从公司获得的 3 组特异性 si-*Apbb1* 进行转染,筛选敲低效率最佳的 si-*Apbb1*。qPCR 结果显



注:A:20 nmol/L siRNA 转染荧光图;B:50 nmol/L siRNA 转染转染荧光图;C:100 nmol/L siRNA 转染荧光图。

图 1 siRNA 最佳转染浓度的筛选

Note. A, Fluorescence plot of 20 nmol/L siRNA transfection. B, Fluorescence plot of 50 nmol/L siRNA transfection. C, Fluorescence plot of 100 nmol/L siRNA transfection.

Figure 1 Screening for optimal transfection concentration of siRNA



示,相较于 Si-NC 组,2Si-Apbb1 组的敲低效率最高, *Apbb1* mRNA 水平的敲低效率可以达到 51% (Si-NC 组:  $(1.01 \pm 0.21)$ ; 2Si-Apbb1 组:  $(0.49 \pm 0.03)$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ) (见图 2), 因此,敲低实验最终选用 2si-*Apbb1*, 文章后续提到的 Si-Apbb1 组均指利用 2si-*Apbb1* 进行转染。

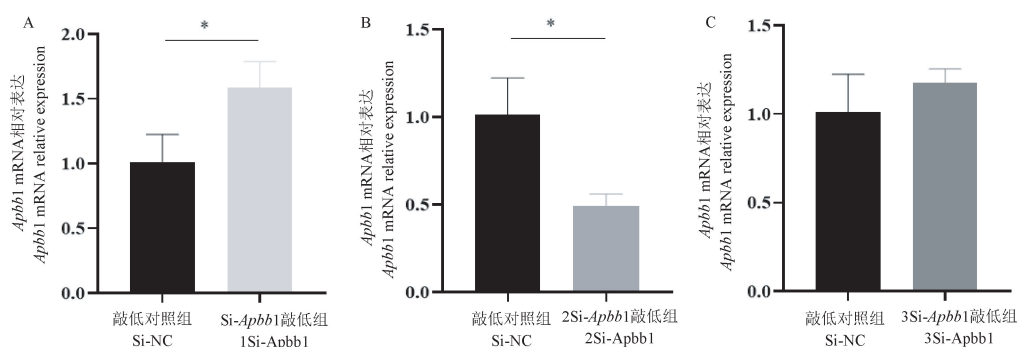
### 2.3 CCK8 实验检测 *Apbb1* 对 H9c2 心肌细胞增殖的影响

CCK8 细胞增殖实验中,相较于 Si-NC 组, Si-Apbb1 组 H9c2 心肌细胞虽然在 48 h 时增殖显著下降 0.44 倍 (Si-NC 组:  $(3.06 \pm 0.12)$ ; Si-Apbb1 组:  $(2.62 \pm 0.16)$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), 但是在 72 h 时增殖显著增加 0.86 倍 (Si-NC 组:  $(5.30 \pm 0.13)$ ; Si-

Apbb1 组:  $(6.16 \pm 0.36)$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ ), 见图 3A。相较于 OE-NC 组, OE-Apbb1 组 H9c2 心肌细胞在 48 h 与 72 h 增殖分别降低 1.23 倍 (OE-NC 组:  $(4.4 \pm 0.14)$ ; OE-Apbb1 组:  $(3.17 \pm 0.53)$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ ) 和 1.04 倍 (OE-NC 组:  $(6.04 \pm 0.22)$ ; OE-Apbb1 组:  $(5.00 \pm 0.27)$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ ), 增殖明显受到抑制, 见图 3B。

### 2.4 qPCR 实验检测 *Apbb1* 对细胞增殖的影响

相较于 Si-NC 组, Si-Apbb1 组敲低效率达到 52% (Si-NC 组:  $(1.00 \pm 0.12)$ ; Si-Apbb1 组:  $(0.48 \pm 0.03)$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ); Si-Apbb1 组典型的细胞增殖标志分子 *Ki67* 与 *PCNA* mRNA 表达水平虽然具有升高趋势, 但不具有显著差异性, 然而细胞周期标

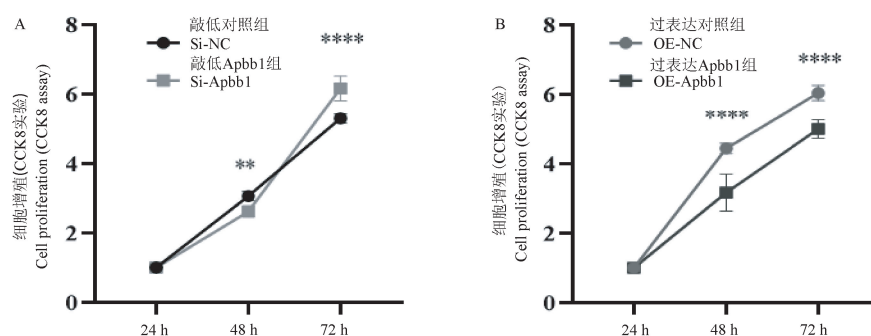


注: A: 1Si-Apbb1 组的敲低效率; B: 2Si-Apbb1 组的敲低效率; C: 3Si-Apbb1 组的敲低效率。与 Si-NC 组相比,  $*P < 0.05$ 。

图 2 筛选敲低效率最佳的 si-*Apbb1*

Note. A, Knockdown efficiency of 1Si-Apbb1 group. B, Knockdown efficiency of 2Si-Apbb1 group. C, Knockdown efficiency of 3Si-Apbb1 group. Compared with Si-NC group,  $*P < 0.05$ .

Figure 2 Screening for Si-*Apbb1* with the best knockdown efficiency



注: A: 利用 CCK8 法检测 Si-NC 组与 Si-Apbb1 组的增殖情况; B: 利用 CCK8 法检测 OE-NC 组与 OE-Apbb1 组的增殖情况。与各自的 NC 组相比,  $**P < 0.01$ ,  $****P < 0.0001$ 。

图 3 CCK8 实验检测 H9C2 心肌细胞增殖结果

Note. A, Proliferation of Si-NC group and Si-Apbb1 group was detected by CCK8 assay. B, Proliferation of Si-NC group and Si-Apbb1 group was detected by CCK8 assay. Compared with their respective NC group,  $**P < 0.01$ ,  $****P < 0.0001$ .

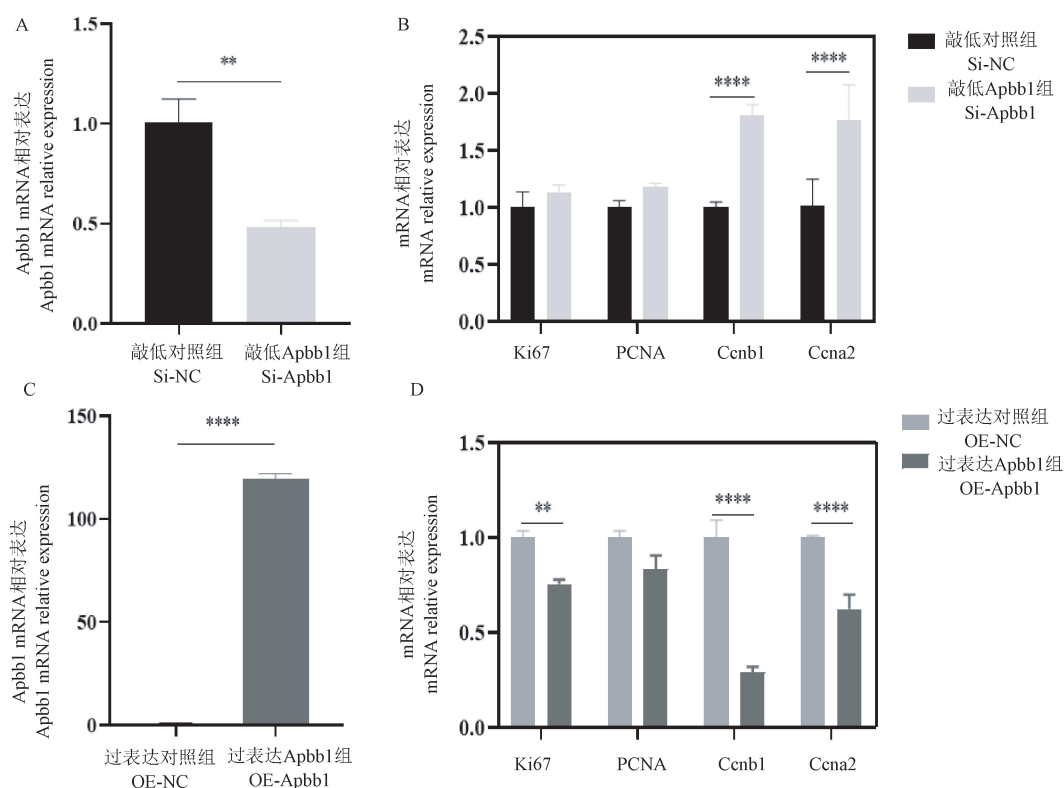
Figure 3 Determination of proliferation of H9C2 cardiomyocytes by CCK8 assay

志分子 *Ccnb1* 与 *Ccna2* 表达显著增加, *Ccnb1* 和 *Ccna2* 分别增加 80% (Si-NC 组:  $(1.00 \pm 0.05)$ ; Si-Apbb1 组:  $(1.81 \pm 0.09)$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ) 和 76% (Si-NC 组:  $(1.01 \pm 0.22)$ ; Si-Apbb1 组:  $(1.76 \pm 0.30)$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), 具体见图 4A 与图 4B。相较于 OE-NC 组, OE-Apbb1 组过表达效率达到 119 倍 (OE-NC 组:  $(1.00 \pm 0.10)$ ; OE-Apbb1 组:  $(119.33 \pm 2.64)$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ); OE-Apbb1 组细胞增殖标志分子 *Ki67* 与细胞周期标志分子 *Ccnb1* 与 *Ccna2* 均发生显著下调, *Ki67*、*Ccnb1* 和 *Ccna2* 分别下调 25% (OE-NC 组:  $(1.00 \pm 0.03)$ ; OE-Apbb1 组:  $(0.75 \pm 0.02)$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )、72% (OE-NC 组:  $(1.00 \pm 0.09)$ ; OE-Apbb1 组:  $(0.28 \pm 0.03)$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ) 和 38% (OE-NC 组:  $(1.00 \pm 0.01)$ ; OE-Apbb1 组:  $(0.62 \pm 0.08)$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ), 其中另一个增殖标志分子 *PCNA* 也呈现下调趋势, 但无统计

学意义, 具体见图 4C 与图 4D。

## 2.5 细胞免疫荧光法检测 *Apbb1* 对细胞增殖的影响

为了进一步确定 *Apbb1* 对 H9c2 心肌细胞增殖的影响, 我们采用细胞免疫荧光实验检测了心肌细胞增殖的标志物 Aurora B 与 PH3。相较于 Si-NC 组, Si-Apbb1 组 PH3 与 Aurora B 阳性细胞增加 4.33% (Si-NC 组:  $(12.00 \pm 1.00)\%$ ; Si-Apbb1 组:  $(16.33 \pm 1.52)\%$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ) 和 4.67% (Si-NC 组:  $(14.67 \pm 1.53)\%$ ; Si-Apbb1 组:  $(19.33 \pm 1.53)\%$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ) (图 5A~5D)。相较于 OE-NC 组, PH3 与 Aurora B 阳性细胞分别降低 3.7% (OE-NC 组:  $(13.00 \pm 1.02)\%$ ; OE-Apbb1 组:  $(9.33 \pm 0.58)\%$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ) 和 4.36% (OE-NC 组:  $(14.33 \pm 1.15)\%$ ; OE-Apbb1 组:  $(9.67 \pm 1.52)\%$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ) (图 5E~5H)。

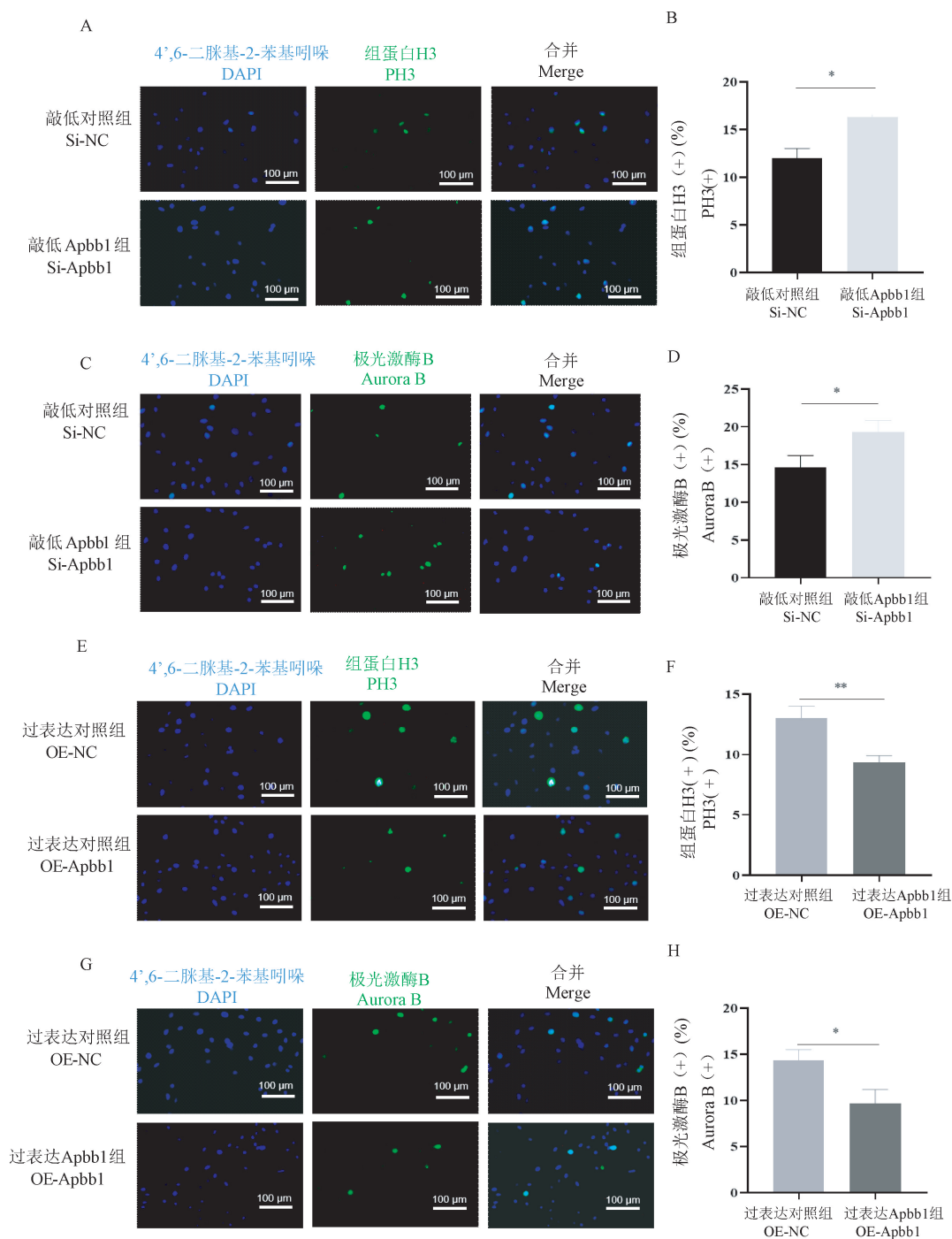


注: A, Si-Apbb1 组的敲低效率; B, Si-Apbb1 组的细胞增殖标志物与细胞周期标志物的表达变化; C, OE-Apbb1 组的过表达效率; D, OE-Apbb1 组细胞增殖标志物与细胞周期标志物的表达变化。与各自的 NC 组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 4 qPCR 实验检测 *Apbb1* 对 H9C2 心肌细胞增殖标志物与细胞周期标志物表达的影响

Note. A, Knockdown efficiency of Si-Apbb1 group. B, Expression changes of cell proliferation markers and cell cycle markers in OE-Apbb1 group. C, Overexpression efficiency of OE-Apbb1 group. D, Expression changes of cell proliferation markers and cell cycle markers in OE-Apbb1 group. Compared with their respective NC group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Figure 4 qPCR assay was used to detect the effects of *Apbb1* on the expression of proliferation and cell cycle markers in H9C2 cardiomyocytes



注:A:Si-Apbb1 组与 Si-NC 组的 PH3 的表达情况;B:Si-Apbb1 组相较于 Si-NC 组 PH3 的统计结果;C:Si-Apbb1 组与 Si-NC 组的 Aurora B 的表达情况;D:Si-Apbb1 组相较于 Si-NC 组 Aurora B 的统计结果;E:OE-Apbb1 组与 OE-NC 组的 PH3 的表达情况;F:OE-Apbb1 组相较于 OE-NC 组 PH3 的统计结果;G:OE-Apbb1 组与 OE-NC 组的 Aurora B 的表达情况;H:OE-Apbb1 组相较于 OE-NC 组 Aurora B 的统计结果。与各自的 NC 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 5 细胞免疫荧光检测细胞增殖

Note. A, Expression of PH3 in Si-Apbb1 group and Si-NC group. B, Compared with Si-NC group, the statistic results of PH3 in Si-Apbb1 group. C, Expression of Aurora B in Si-Apbb1 group and Si-NC group. D, Compared with Si-NC group, the statistic results of Aurora B in Si-Apbb1 group. E, Expression of PH3 in OE-Apbb1 group and OE-NC group. F, Compared with OE-NC group, the statistic results of PH3 in OE-Apbb1 group. G, Expression of Aurora B in OE-Apbb1 group and OE-NC group. H, Compared with OE-NC group, the statistic results of Aurora B in OE-Apbb1 group. Compared with their respective NC group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Figure 5 Cell proliferation was detected by cell immunofluorescence

## 2.6 APBB1 可能通过与 KAT5 蛋白互作影响心肌细胞增殖

为了进一步确定 *Apbb1* 调控心肌细胞增殖的机制,我们利用在线数据库 String 分析了与大鼠 APBB1 蛋白相互作用的蛋白,发现赖氨酸乙酰转移酶 5(KAT5)、淀粉样前体蛋白(APP)与淀粉前体样蛋白(Aplp2)等蛋白可能是 APBB1 蛋白的互作蛋白,其中 KAT5 与 APP 蛋白相互作用最强,具体见图 6。KAT5 是一种组蛋白乙酰转移酶,下调 KAT5 影响前列腺癌细胞、乳腺癌细胞与肝癌等癌细胞增殖<sup>[7-9]</sup>。在心肌细胞中,单敲 KAT5 能激活心肌细胞细胞周期进而影响心肌细胞增殖<sup>[10]</sup>。KAT5 作为 APBB1 最为显著的互作蛋白,APBB1 蛋白可能通过与 KAT5 蛋白互作抑制心肌细胞增殖。

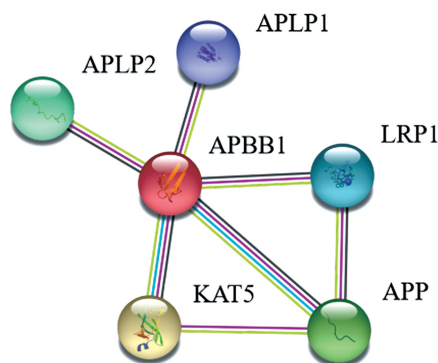
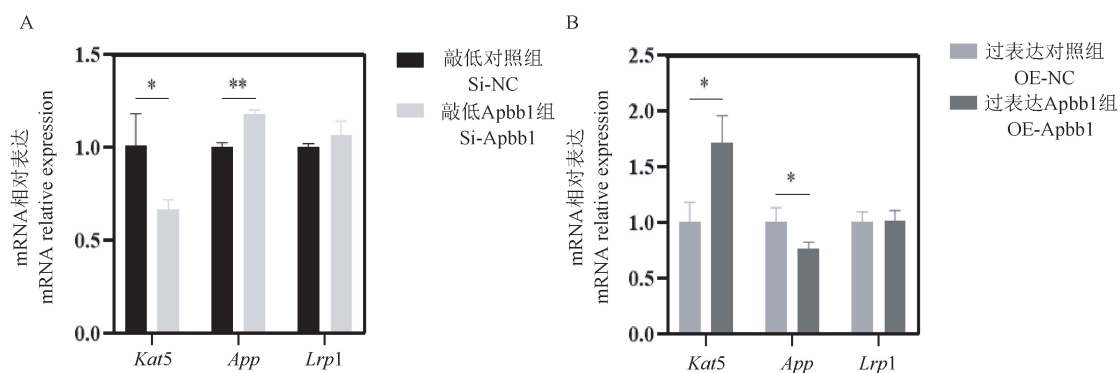


图 6 利用在线数据库 String 进行 APBB1 蛋白互作网络分析

Figure 6 APBB1 protein interaction network analysis using online database String

## 2.7 qPCR 实验探究与细胞增殖相关的 APBB1 互作蛋白的 mRNA 表达变化

在 APBB1 蛋白的 5 个互作蛋白中,APP 能够调控肺腺癌细胞与卵巢癌细胞增殖<sup>[11-12]</sup>;LRP1 能够调控成纤维细胞与内皮细胞增殖<sup>[13-14]</sup>;KAT5 能够调控肝癌细胞与甲状腺癌细胞增殖,并影响心肌细胞周期<sup>[10,15-16]</sup>。为了进一步探究 APBB1 蛋白能否通过与其互作蛋白互作进而影响心肌细胞增殖,我们检测了敲低与过表达 *Apbb1* 基因对 *Kat5*、*App* 和 *Lrp1* 的 mRNA 表达变化的影响。相较于 Si-NC 组, Si-*Apbb1* 组 *Kat5* mRNA 表达水平显著降低 0.34 倍 (Si-NC 组:  $(1.00 \pm 0.14)$ ; Si-*Apbb1* 组:  $(0.66 \pm 0.04)$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), *App* mRNA 表达水平显著上调 0.18 倍 (Si-NC 组:  $(1.00 \pm 0.02)$ ; Si-*Apbb1* 组:  $(1.17 \pm 0.02)$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), *Lrp1* mRNA 表达水平没有发生显著变化,具体见图 7A。相较于 OE-NC 组, OE-*Apbb1* 组 *Kat5* mRNA 表达水平显著升高 0.72 倍 (OE-NC 组:  $(1.00 \pm 0.13)$ ; OE-*Apbb1* 组:  $(1.72 \pm 0.20)$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), *App* mRNA 表达水平显著下调 0.24 倍 (OE-NC 组:  $(1.00 \pm 0.10)$ ; OE-*Apbb1* 组:  $(0.76 \pm 0.05)$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), *Lrp1* mRNA 表达水平没有发生显著变化,具体见图 7B。*Kat5* mRNA 变化趋势与 *Apbb1* mRNA 的变化趋势一致, APBB1 蛋白可能通过与 KAT5 蛋白互作抑制心肌细胞增殖。



注:A: Si-*Apbb1* 组与 Si-NC 组的 *Kat5*、*App* 与 *Lrp1* 的表达情况; B: OE-*Apbb1* 组与 OE-NC 组 *Kat5*、*App* 与 *Lrp1* 的表达情况。与各自的 NC 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 7 qPCR 实验检测与细胞增殖相关的 APBB1 互作蛋白的 mRNA 表达变化

Note. A, Expression of *Kat5*, *App* and *Lrp1* in Si-*Apbb1* group and Si-NC group. B, Expression of *Kat5*, *App* and *Lrp1* in OE-*Apbb1* group and OE-NC group. Compared with their respective NC group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Figure 7 qPCR assay was used to detect the mRNA expression of APBB1 interacting protein associated with cell proliferation



### 3 讨论

APBB1 蛋白是一种衔接蛋白,目前主要在神经领域被研究<sup>[3]</sup>。基于 *Apbb1* 在再生心脏中发生显著降低以及其可作为心脏肥大前期的标志物<sup>[5-6]</sup>,我们试图探究 *Apbb1* 与心肌细胞增殖之间的关系。我们的研究表明 *Apbb1* 能够影响 H9c2 心肌细胞增殖,敲低 *Apbb1* 基因促进 H9c2 心肌细胞增殖,过表达 *Apbb1* 基因抑制 H9c2 心肌细胞增殖。为了进一步了解 *Apbb1* 如何在机制上调控心肌细胞增殖,我们利用在线数据库 String 分析了 APBB1 的互作蛋白,探究 APBB1 能否通过互作蛋白影响心肌细胞增殖。此外,我们还以细胞增殖这个表型入手,查阅了目前 *Apbb1* 与细胞增殖的相关研究,试图通过了解 *Apbb1* 调控细胞增殖的机制进而明确 *Apbb1* 调控 H9c2 心肌细胞增殖的具体机制。

目前,关于 APBB1 调控细胞增殖的方式主要有 3 种可能:第 1 种可能是通过调节淀粉样前体蛋白(APP),APP 是 APBB1 的经典下游,在阿尔茨海默症的发病中发挥关键作用<sup>[17]</sup>。有研究表明 APBB1 能通过调节 APP 进而影响 T-47D 和 ZR-75-1 乳腺癌细胞增殖<sup>[18]</sup>。第 2 种可能是通过调节 Notch 信号,Kim 等<sup>[19]</sup>研究表明 APBB1 能够对 Notch 信号进行双向调控,而 Notch 信号是调节脊椎动物与无脊椎动物细胞增殖的关键调节器,大量的研究表明 Notch 能够调控心肌细胞增殖<sup>[20-23]</sup>。最后一种可能是通过与互作蛋白互作进而影响细胞增殖,Schröter 等<sup>[24]</sup>研究表明 APBB1 与 BLM 和 MCM 蛋白的相互作用可能有助于在受阿尔茨海默病影响的大脑中的神经元细胞重新进入细胞周期。我们的 APBB1 互作蛋白网络分析结果表明 KAT5、APP 与 APLP2 等蛋白是 APBB1 的互作蛋白,在这些互作蛋白中有研究表明 KAT5 蛋白能影响心肌细胞增殖<sup>[10]</sup>。我们的 qPCR 实验结果表明,APP 与 *Apbb1* 的变化趋势相反,两者之间可能存在负反馈调节。在敲低 *Apbb1* 基因诱导心肌细胞增殖时,*Kat5* mRNA 表达显著下调;在过表达 *Apbb1* 基因抑制心肌细胞增殖时,*Kat5* mRNA 表达显著上升。因此,APBB1 有可能通过与 KAT5 互作进而影响心肌细胞增殖。心肌细胞增殖受 Notch 信号与 APBB1 蛋白互作蛋白 KAT5 调控,那么 APBB1 能否通过调控 Notch 信号或者与 KAT5 互作进而影响心肌细胞增殖呢?这值得我们下一步进行实验探究。

对于某些因素对细胞系增殖影响的实验验证,CCK8 实验是目前常用的验证方式之一。我们的 CCK8 实验结果表明过表达 *Apbb1* 基因能够显著抑制 H9c2 心肌细胞增殖,而敲低 *Apbb1* 基因虽然在第 48 h 不能表现出促进 H9c2 心肌细胞增殖的趋势,但是在第 72 h 能显著诱导 H9c2 心肌细胞增殖。这表明 siRNA 敲低 *Apbb1* 基因后,可能需要经历较长的时间才能影响 H9c2 心肌细胞增殖。

qPCR 实验中,敲低 *Apbb1* 基因能够显著提升 *Ccnb1* 与 *Ccna2* 的表达水平,同时诱导 *Ki67* 与 *PCNA* 不显著升高;而过表达 *Apbb1* 基因能够诱导 *Ki67*、*Ccnb1* 与 *Ccna2* 显著下降,同时诱导 *PCNA* 不显著下降。*Ki67* 与 *PCNA* 作为细胞增殖的典型标志分子,为什么敲低 *Apbb1* 基因能够诱导 H9c2 心肌细胞增殖却不能诱导这两个分子同时发生显著变化呢?这可能与这两种标记分子在细胞增殖周期中发挥的作用以及 *Apbb1* 在细胞周期中发挥的作用有关。一个完整的细胞增殖周期包括 G0 期、G1 期、S 期、G2 期、M 期。*Ki67* 是一种增殖细胞相关的核抗原,其功能与有丝分裂密切相关,主要在有丝分裂期即 M 期发挥作用。*PCNA* 是一种 DNA 聚合酶  $\delta$  的辅助蛋白,与 DNA 合成显著相关,其表达量与 DNA 合成一致,在 G0/G1 期细胞中表达无明显变化,G1 晚期表达大幅度增加,S 期达到高峰,G2/M 期明显下降。*Ccnb1* 代表的是 G2/M 期转变的周期蛋白,*CCNA2* 代表的是控制细胞周期 G1/S 和 G2/M 过渡阶段的周期蛋白。*Ki67* 与 *PCNA* 的表达没有在敲低 *Apbb1* 基因组与过表达 *Apbb1* 基因组同时发生显著变化的原因可能在于 *Apbb1* 主要在 H9c2 心肌细胞的 G2/M 期发挥作用,所以 *PCNA* 无论是在敲低与过表达 *Apbb1* 基因组,变化趋势均不明显;*Ki67* 在敲低时可能基于 *Apbb1* 本身的表达水平不高没有非常显著的变化,但是过表达 119 倍发生显著变化,显著影响 H9c2 细胞完成 G2/M 期的过渡。

总之,本研究证明敲低 *Apbb1* 基因促进心肌细胞增殖,过表达 *Apbb1* 基因抑制心肌细胞增殖,此结论开拓了 *Apbb1* 基因在心脏领域的功能研究,提示 *Apbb1* 有可能成为诱导心肌细胞增殖的潜在靶点。此外,本研究还利用在线网络数据库 String 预测了 APBB1 的互作蛋白,qPCR 探究了其互作蛋白随 *Apbb1* 干预的变化,推测 APBB1 可能通过与 KAT5 蛋白互作进而影响心肌细胞增殖,为进一步了解 *Apbb1* 基因调控心肌细胞增殖的机制提供了思路。

## 参考文献:

- [ 1 ] Roth G, Mensah G, Johnson C, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: update from the GBD 2019 study [ J ]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [ 2 ] Bulluck H, Yellon D, Hausenloy DJH. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities [ J ]. Heart, 2016, 102(5): 341-348.
- [ 3 ] Xu P, Chang J, Zhou X, et al. GSAP regulates lipid homeostasis and mitochondrial function associated with Alzheimer's disease [ J ]. J Exp Med, 2021, 218(8): e20202446.
- [ 4 ] Mahmoud A, Kocabas F, Muralidhar S, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest [ J ]. Nature, 2013, 497(7448): 249-253.
- [ 5 ] Parreira R, Gómez-Mendoza D, de Jesus I, et al. Cardiomyocyte proteome remodeling due to isoproterenol-induced cardiac hypertrophy during the compensated phase [ J ]. Proteomics Clin Appl, 2020, 14(4): e2000017.
- [ 6 ] Nguyen N, Canseco D, Xiao F, et al. A calcineurin-Hoxb13 axis regulates growth mode of mammalian cardiomyocytes [ J ]. Nature, 2020, 582(7811): 271-276.
- [ 7 ] Kim C, Lee DJAc. KAT5 Negatively regulates the proliferation of prostate cancer LNCaP cells via the caspase 3-dependent apoptosis pathway [ J ]. Anim Cells Syst, 2019, 23(4): 253-259.
- [ 8 ] Li H, Liu W, Zhang X, et al. Ketamine suppresses proliferation and induces ferroptosis and apoptosis of breast cancer cells by targeting KAT5/GPX4 axis [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 585: 111-116.
- [ 9 ] Yu Z, Chen T, Mo H, et al. BRD8, which is negatively regulated by miR-876-3p, promotes the proliferation and apoptosis resistance of hepatocellular carcinoma cells via KAT5 [ J ]. Arch Biochem Biophys, 2020, 693: 108550.
- [ 10 ] Fisher J, Horst A, Wan T, et al. Depletion of Tip60 from *in vivo* cardiomyocytes increases myocyte density, followed by cardiac dysfunction, myocyte fallout and lethality [ J ]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164855.
- [ 11 ] Fan X, Xu S, Yang C. miR-373-3p promotes lung adenocarcinoma cell proliferation via APP [ J ]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 1046-1050.
- [ 12 ] Fan X, Liu Y, Jiang J, et al. miR-20a promotes proliferation and invasion by targeting APP in human ovarian cancer cells [ J ]. Acta Biochim Biophys Sin, 2010, 42(5): 318-324.
- [ 13 ] Mao H, Lockyer P, Townley-Tilson W, et al. LRP1 regulates retinal angiogenesis by inhibiting PARP-1 activity and endothelial cell proliferation [ J ]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(2): 350-360.
- [ 14 ] Chieosilapatham P, Yue H, Ikeda S, et al. Involvement of the lipoprotein receptor LRP1 in AMP-IBP5-mediated migration and proliferation of human keratinocytes and fibroblasts [ J ]. J Dermatol Sci, 2020, 99(3): 158-167.
- [ 15 ] Wei X, Cai S, Boohaker R, et al. KAT5 promotes invasion and metastasis through C-MYC stabilization in ATC [ J ]. Endocr Relat Cancer, 2019, 26(1): 141-151.
- [ 16 ] Yu Z, Chen T, Mo H, et al. BRD8, which is negatively regulated by miR-876-3p, promotes the proliferation and apoptosis resistance of hepatocellular carcinoma cells via KAT5 [ J ]. Arch Biochem Biophys, 2020, 693: 108550.
- [ 17 ] Sabo S, Ikin A, Buxbaum J, et al. The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses *in vitro* and *in vivo* [ J ]. J Neurosci, 2003, 23(13): 5407-5415.
- [ 18 ] Xu J, Iwabuchi E, Miki Y, et al. FE65 in breast cancer and its clinicopathological significance [ J ]. Breast Cancer, 2021, 29(1): 144-155.
- [ 19 ] Kim M, Mo J, Ann E, et al. Dual regulation of notch1 signaling pathway by adaptor protein fe65 [ J ]. J Biol Chem, 2012, 287(7): 4690-4701.
- [ 20 ] Zhao L, Borikova A, Ben-Yair R, et al. Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration [ J ]. Proc Natl Acad Sci, 2014, 111(4): 1403-1408.
- [ 21 ] Zhao L, Ben-Yair R, Burns C, et al. Endocardial notch signaling promotes cardiomyocyte proliferation in the regenerating zebrafish heart through wnt pathway antagonism [ J ]. Cell Rep, 2019, 26(3): 546-54, e5.
- [ 22 ] Miao L, Lu Y, Nusrat A, et al. The spatiotemporal expression of notch1 and numb and their functional interaction during cardiac morphogenesis [ J ]. Cells, 2021, 10(9): 2192.
- [ 23 ] Collesi C, Zentilin L, Sinagra G, et al. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes [ J ]. J Cell Biol, 2008, 183(1): 117-128.
- [ 24 ] Schrötter A, Mastalski T, Nensa F, et al. FE65 regulates and interacts with the bloom syndrome protein in dynamic nuclear spheres-potential relevance to Alzheimer's disease [ J ]. J Cell Sci, 2013, 126: 2480-2492.

[ 收稿日期 ] 2021-11-18