

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.007

大鼠心肌梗塞后心室重构中 miRNA 的差异表达*

刘凤璇 王国坤 董斐斐 丁雪燕 赵仙先 秦永文[△]

(第二军医大学长海医院 心血管内科 上海 200433)

摘要 目的:筛选大鼠急性心梗后的心室重构过程中差异表达的微小 RNA(miRNA),为 miRNA 调控心室重构的机制研究提供靶标。**方法:**20 只成年雄性 Wistar 大鼠,分组如下:心肌梗死组(MI 组,n=10)和假手术组(Sham 组,n=10)。通过结扎大鼠左冠状动脉前降支构建急性心梗模型建模。4 周后对大鼠进行超声心动图检查和梗死边缘区心肌 HE 染色观察心室重构程度。利用 miRNA 芯片对心梗边缘区的 miRNA 进行差异表达检测,采用实时定量 PCR 验证芯片结果的可靠性。**结果:**心脏超声显示 MI 组大鼠左室重构明显,心梗边缘区心肌 HE 染色可见细胞间质大量胶原纤维沉积。miRNA 芯片结果显示 15 个 miRNA 在心梗 4 周后呈差异表达,其中 11 个 miRNA(miR-21、miR-23a、miR-125b、miR-132、miR-146b、miR-181b、miR-199a、miR-320、miR-324、miR-328 和 miR-499)表达上调,4 个 miRNA(miR-29、miR-30c、miR-133a 和 miR-208)表达下调。实时定量 PCR 验证结果与芯片结果一致。**结论:**这些差异表达的 miRNA 可能与心梗后心室重构相关,进一步深入研究特定 miRNA 的调控机制有望为基因治疗提供新靶点。

关键词:大鼠;心肌梗死;心室重构;微小 RNA;表达差异

中图分类号:Q95-3,R542.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2230-04

Differential Expression of miRNA in Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Rats*

LIU Su-xuan, WANG Guo-kun, DONG Fei-fei, DING Xue-yan, ZHAO Xian-xian, QIN Yong-wen[△]

(Department of Cardiology, Changhai Hospital affiliated to Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To screen the miRNA differential expression profile in ventricular remodeling after myocardial infarction in rats and identify the target of miRNA in the mechanism of ventricular remodeling. **Methods:** A total of 20 male Wistar rats were randomly assigned into MI group (n=10) and Sham group (n=10). MI rats were induced by ligation of the anterior descending coronary artery. Four weeks later, ventricular remodeling were measured by echocardiography and HE staining. The miRNA in the cardiac tissues of border zone were measured by miRNA microarray. The miRNA that expressed significantly differently would be verified by Real time quantitative PCR. **Results:** Echocardiographic results showed serious ventricular remodeling in the MI rats. HE staining revealed significant collagen deposition around the border area of the infarct region. By significance analysis of microarray based on microarray screening, 15 significantly different expression of miRNA were obtained after myocardial infarction for 4 weeks. 11 miRNA were significantly up-regulated (miR-21, miR-23a, miR-125b, miR-132, miR-146b, miR-181b, miR-199a, miR-320, miR-324, miR-328 and miR-499) and 4 miRNA were significantly down-regulated (miR-29, miR-30c, miR-133a and miR-208). Real time quantitative PCR approved the results as well. **Conclusions:** These significantly differently expressed miRNA might be related with ventricular remodeling after myocardial infarction and further studies of the mechanism of some specific miRNA would be a new target of gene therapy.

Key words: Rat; Myocardial infarction; Ventricular remodeling; miRNA; Differential expression

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3,R542.22 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)12-2230-04

前言

急性心肌梗死(Myocardial infarction, MI)后的心室重构是由于缺血坏死的心肌引起神经内分泌系统激活,继而引发一系列基因表达变化,导致心肌细胞、心肌成纤维细胞及细胞外基质等出现结构和功能的重塑^[1]。近年研究发现,微小 RNA(miRNA, miRNA) 是一种 21-23 个碱基组成的内源性非编码单

链小分子 RNA,可以在转录后水平沉默靶基因达到对生物体基因的精细调节^[2]。在哺乳动物中 miRNA 与靶 mRNA 不是序列严格互补的完全结合,每个 miRNA 都能阻止多个下游靶 mRNA 的翻译并干扰多个基因的表达,有望大大提高基因治疗的效果^[3]。目前研究显示,miRNA 与多种心脏疾病密切相关,包括心肌肥厚、心力衰竭、心律失常、心肌纤维化和局部缺血造成的血管损伤及血管生成等^[4-5]。本研究利用 miRNA 芯片技术筛

* 基金项目:上海市卫生局科研基金项目(20134089),长海医院 1255 科研基金项目(CH125542700)

作者简介:刘凤璇(1984-),女,博士研究生,主治医师、讲师,研究方向:心肌纤维化。电话:02131161266, E-mail:suxuan.liu@qq.com

△ 通讯作者:秦永文, E-mail:qin.yongwen@foxmail.com

(收稿日期:2013-12-20 接受日期:2014-01-15)

选心梗后心室重构中差异表达显著的 miRNA, 将为 miRNA 与心室重构的机制研究提供实验基础, 希望能进一步揭示心室重构的发病进程并提供新的基因治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 模型制备

健康清洁级成年雄性 Wistar 大鼠 20 只, 体重 180-220 g, 由第二军医大学动物实验中心提供。饲养温度为 22-25℃, 相对湿度 55-60%, 光照时间 12 h/d。分组如下: 心肌梗死组(MI 组, n=10)和假手术组(Sham 组, n=10)。大鼠适应环境 1 周, 采用冠状动脉左前降支结扎法制备 MI 模型。术前禁食 12 h, 以乙醚吸入麻醉。左侧 3-4 肋间开胸暴露心脏、将心脏迅速挤出胸腔外, 0 号丝线结扎左冠状动脉前降支(左心耳和肺动脉圆锥交界稍下方)。肉眼可见左室前壁颜色变白, 闭合胸腔, 开胸时间不超过 30s。标准肢体 II 导联心电图 ST 段抬高, 即为结扎成功。Sham 组只穿线不结扎前降支, 其余操作程序与 MI 组一致。

1.2 超声心动图检查

MI 建模 4 周后对各组大鼠进行超声心动图检查。采用加拿大 Visual Sonics 公司的多普勒超声诊断仪, 选用 RMV-716 探头, 探头频率为 17.5 MHz。术前禁食 12 h, 腹腔内注射氯胺酮(2 ml/kg)麻醉大鼠, 测量大鼠左室收缩末期径(Left ventricular internal dimensions at end systole, LVIDS)、左室舒张末期径(Left ventricular internal dimensions at end diastole, LVIDD)、左室射血分数(Ejection fraction, EF)和左室短轴缩短率(Fractional shortening, FS), 取 3 个心动周期记录数据的平均值。

1.3 心肌组织 HE 染色

大鼠心腔内注射 10% KCl 溶液 1 mL, 使心脏停跳在舒张期。迅速取出心脏, 计算梗死面积: 梗死区弧长/[(心外膜周长+心内膜周长)/2]×100%。沿垂直于心脏长轴的方向剪开左心室, 取左心室中部冠状切面心肌, 用 4% 多聚甲醛溶液固定。经石蜡包埋制成石蜡切片, 取部分心肌进行 HE 染色。石蜡切片乙醇梯度脱水后, 经历苏木精染色, 0.5% 盐酸酒精分化, 伊红复染, 中性树脂固定后观察。光学显微镜观察梗死边缘区心肌, 细胞核呈蓝色, 细胞质呈红色, 镜下(×100)随机选择 10 个区域观察心肌形态学变化并进行拍照分析。

1.4 总 RNA 提取和芯片检测

大鼠心腔内注射 10% KCl 溶液 1 mL, 使心脏停跳在舒张期。迅速取出心脏, 沿垂直于心脏长轴的方向剪开左心室。取梗死边缘区心肌组织和远离梗死区的正常心肌组织各 100 mg, 加入 1 mL TRIzol, 剪碎后置于组织匀浆器中匀浆, 按 TRIzol 一步法提取总 RNA (Invitrogen)。提取的 RNA 样品采用琼脂糖凝胶电泳进行质控分析, 光吸收法进行定量分析。

采用 Exiqon 公司的 miRCURY LNATM microRNA Array 检测心肌梗死边缘区和正常区的 miRNA 表达(包括 847 条 miRNA 探针, 针对人、大鼠、小鼠的成熟 miRNA 及预测的 miRNA)。为保证结果的重复性和可靠性, 每个实验组用三张芯片进行实验。用 Significance Analysis of Microarrays(SAM, version 3.0)软件挑选差异表达的基因, 差异基因筛选为: FDR 控制在 5% 以内, Fold change 为 2.0 倍。miRNA 表达的聚类分析采用每张芯片平均值归一化后的数据, 用 Cluster 3.0 软件进行聚类分析^[6]。

1.5 实时定量 PCR(qRT-PCR)

根据 miRNA 前体特异的茎-环结构, 设计 miRNA 特异性的逆转录引物和 PCR 引物。取 500 ng 总 RNA, 利用 miRNA 特异性逆转录引物和 oligo-dT16, 在逆转录酶的作用下反转录合成 cDNA。以 U6 为内参, 利用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 法检测相应 miRNA 的相对表达水平(TAKARA)。通过溶解曲线和琼脂糖凝胶电泳确定基因扩增的效率和特异性。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 student's t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MI 大鼠心室重构和心功能的检测

MI 组大鼠存活 8 只, 死亡 2 只, 死亡率为 20%。心梗建模 4 周后, 与 Sham 组相比, MI 组 EF、FS 显著下降($P < 0.05$), LVIDS 和 LVIDD 显著增加($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.2 心肌 HE 染色

表 1 心梗组大鼠和假手术组大鼠心脏彩超结果比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of echocardiographic results between MI group and Sham group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Infarct size (%)	EF (%)	FS (%)	LVIDS (mm)	LVIDD (mm)
Sham	10	0	73.17±6.18	41.17±3.54	3.10±0.72	5.62±0.82
MI	8	39.09±5.39	20.50±5.58*	9.50±3.08*	8.22±0.60*	8.98±0.50*

注: EF 左室射血分数, FS 左室短轴缩短率, LVIDS 左室收缩末期径, LVIDD 左室舒张末期径; * $P < 0.05$ vs Sham 组

Note: EF Ejection fraction, FS Fractional shortening, LVIDS Left ventricular internal dimensions at end systole, LVIDD Left ventricular internal dimensions at end diastole; * $P < 0.05$ vs Shamgroup

Sham 组大鼠心肌细胞核呈蓝色, 细胞质呈红色, 细胞排列整齐、间隙正常; MI 组大鼠梗死边缘区表现为细胞核染色质凝聚、胞核染色深, 细胞有皱缩, 间质可见大量胶原纤维分布, 见图 1。

2.3 miRNA 芯片检测结果

与远离梗死区的正常心肌相比, 利用 miRNA 芯片在梗死边缘区共筛选出 15 个 2 倍以上差异表达的 miRNA(图 2)。其中 11 个 miRNA 显著上调, 分别是 miR-21、miR-23a、miR-125b、miR-132、miR-146b、miR-181b、miR-199a、miR-320、miR-324、miR-328 和 miR-499; 4 个 miRNA 显著下调, 分别是

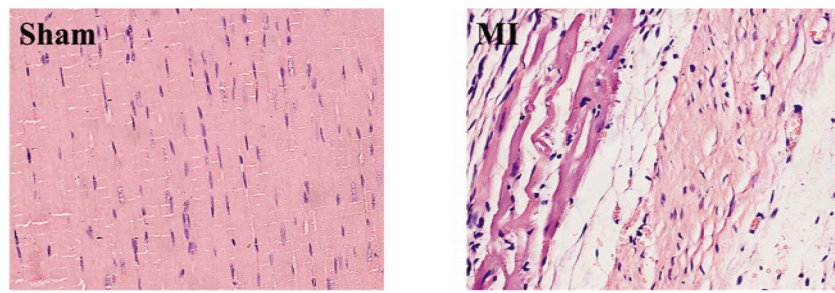


图1 心梗组大鼠和假手术组心肌 HE 染色比较(× 100)

Fig.1 Comparison of HE staining in cardiac tissues between MI group and Sham group(× 100)

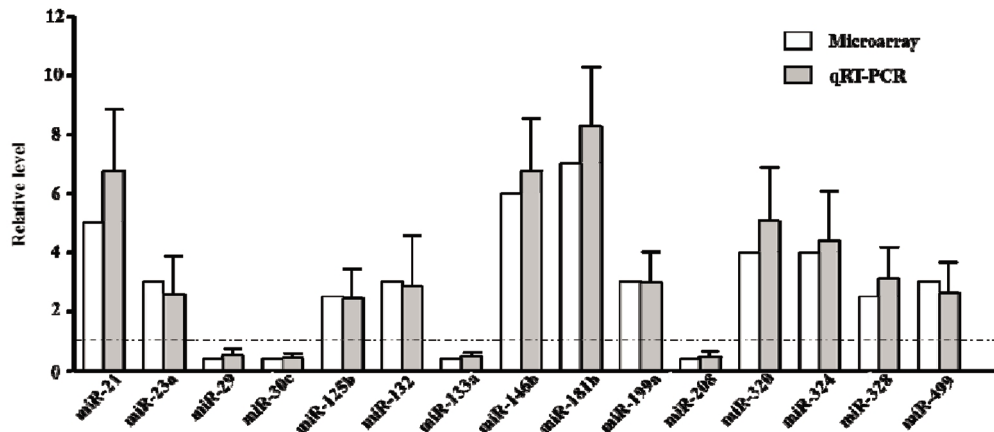


图2 心梗大鼠梗死边缘区 miRNA 的基因芯片和 qRT-PCR 结果

Fig.2 miRNA microarray results and qRT-PCR verification from the border zone tissues in MI rats

miR-29、miR-30c、miR-133a 和 miR-208

2.4 实时定量 PCR 结果

对 15 个 miRNA 进行实时定量 PCR 验证,将心梗大鼠正常心肌的相对 miRNA 表达量设为 1,与梗死边缘区的 miRNA 表达量进行比较分析。以 U6 为内参,梗死边缘区的 miR-21、miR-23a、miR-125b、miR-132、miR-146b、miR-181b、miR-199a、miR-320、miR-324、miR-328 和 miR-499 的表达均上调;梗死边缘区的 miR-29、miR-30c、miR-133a 和 miR-208 表达均下调。实时定量 PCR 结果与 miRNA 芯片结果一致,见图 2。

3 讨论

本研究通过探索 MI 后梗死边缘区的 miRNA 表达变化,力图寻找与心室重构密切相关的 miRNA 并寻找基因治疗的新靶点。我们通过 miRNA 芯片初步筛选和鉴定了心室重构后表达差异显著的 miRNA。芯片结果显示,梗死边缘区 2 倍以上显著上调的有 11 个 miRNA,包括:miR-21、miR-23a、miR-125b、miR-132、miR-146b、miR-181b、miR-199a、miR-320、miR-324、miR-328 和 miR-499;梗死边缘区 2 倍以上显著下调的 miRNA 有:miR-29、miR-30c、miR-133a 和 miR-208。这些变化显著的 miRNA 可能参与了心室重构的发生发展,通过干预 miRNA 进行基因调节,有望降低梗死边缘区的胶原沉积,改善心梗后心室重构并提高心脏功能^[7,8]。

MI 后心肌成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,导致细胞外基质过度沉积,在心室重构的进程中发挥重要的作用^[9,10]。miR-21 和 miR-29 主要在心肌成纤维细胞中表达,是与心肌纤

维化密切相关的 miRNA。我们的研究显示,miR-21 在心室重构大鼠的梗死边缘区存在显著高表达。Liang 等^[11]发现 MI 小鼠的梗死边缘区也存在 miR-21 的表达上调,对心肌成纤维细胞转染 miR-21 后发现 miR-21 可以通过抑制转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) III 型受体激活 TGF- β /Smad 通路,进而促进肌成纤维细胞分化并大量分泌胶原纤维参与心室重构的进程。Roy 等^[12]发现 miR-21 通过 PTEN 途径介导基质金属蛋白酶-2(metalloprotease-2, MMP-2)表达上调,参与梗死区域的胶原代谢和心室重构。Qin 等^[13]的研究显示,miR-21 在心梗后的心肌成纤维细胞中显著高表达,通过抑制 SPRY1 调节 ERK-MAP 激酶信号通路,导致心肌成纤维细胞的增殖和胶原纤维大量沉积。我们的研究发现,miR-29 在心室重构大鼠的梗死边缘区出现显著下调。van Rooij 等^[14]发现小鼠梗死边缘区 miR-29 的表达下降,miR-29 的靶 mRNA 编码与纤维化相关的胶原蛋白,体内外试验证实抑制 miR-29 表达均可以诱导胶原蛋白大量生成,而过表达 miR-29 则可以显著减少胶原蛋白的分泌。对 miR-29 进行进一步的机制研究发现,TGF- β 介导的信号通路触发了心肌成纤维细胞下调 miR-29 的表达,继而诱导胶原蛋白大量沉积,最终影响心肌纤维化的进程。

我们的芯片结果显示除了 miR-29 外,miR-30c、miR-133a 和 miR-208 也在大鼠梗死边缘区出现表达的显著下调。miR-133 是在心肌和骨骼肌中特异表达的 miRNA,在心肌细胞的增殖和分化中发挥重要作用^[15]。Duisters 等^[16]发现 miR-30c 在心肌成纤维细胞中高表达,左心室肥厚的小鼠模型中 miR-30c

和 miR-133 出现表达显著下调,两者通过负向调节结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)促进细胞外基质沉积、影响心肌纤维化进程。我们的研究发现 miR-30c 和 miR-133a 在大鼠梗死边缘区出现表达显著下降,推测也可能是通过上调 CTGF 的表达继而参与了心肌纤维化的进程。miR-208 由 α -MHC 基因的一个内含子编码,是具有心肌表达特异性的 miRNA,也是参与心肌纤维化的重要分子^[17]。我们前期的研究发现 miR-208 在急性期 MI 患者的血浆中表达明显升高,可以作为一种新型的早期心肌损伤诊断标志物^[18]。Bostjancic 等^[19]对死亡的 MI 患者进行梗死区心肌尸检发现 miR-208 表达显著升高,并且可能参与了梗死区域的心室重构。本研究对梗死边缘区的 miR-208 进行检测,发现 miR-208 出现显著下调。与文献报道的 miR-208 表达出现不同,我们推测一方面可能与 miR-208 在死亡患者的坏死心肌大量释放有关;另一方面也可能与 miR-208 在梗死区和梗死边缘区的心室重构中作用不同有关,具体机制还需要进一步研究。

除了上述在心肌纤维化中作用明确的 miRNA 外,我们的芯片结果显示,miR-23a、miR-125b、miR-132、miR-146b、miR-181b、miR-199a、miR-320、miR-324、miR-328 和 miR-499 等也在梗死边缘区出现表达上调。目前,这些 miRNA 在心梗后心室重构中的作用机制都没有得到深入的研究。研究显示,miR-199a 和 miR-320 等在心肌缺血再灌注模型中发挥了重要作用^[20]。miR-499 也是一类在心肌和骨骼肌中特异表达的 miRNA,并且被确定作为一种新型的心肌损伤生物标志物^[21]。即使 miR-21、miR-29 这些纤维化作用明确的 miRNA,对它们在心室重构中的下游靶基因及信号通路也仍需要进一步的深入研究。

作为特异性调控基因表达的重要靶点,研究 miRNA 在心室重构中的作用不仅有助于阐明心室重构的发生发展过程,对于改善 MI 后心室重构也有可能提供重要的治疗方向。目前,miRNA 在心室重构中的发病机制及靶向治疗研究还处于摸索阶段,但是其在心室重构中的重要作用却不容小觑。通过心室重构中 miRNA 作用机制的研究,寻找关键性的 miRNA 或者进行有效的组合,必将成为未来心室重构基因治疗的新靶点。

参考文献(References)

- [1] Zhang Y, Kanter EM, Yamada KA. Remodeling of cardiac fibroblasts following myocardial infarction results in increased gap junction intercellular communication [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2010, 19 (6): e233-240
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
- [3] Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(1):19-31
- [4] Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2009, 6(6): 419-429
- [5] Thum T, Mayr M. Review focus on the role of microRNA in cardiovascular biology and disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93 (4): 543-544
- [6] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(25): 14863-14868
- [7] Van den Borne SW, Diez J, Blankestijn WM, et al. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(1): 30-37
- [8] Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, et al. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64(3): 526-535
- [9] Rouleau JL, de Champlain J, Klein M, et al. Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1993, 22(2): 390-398
- [10] Unger T. Neurohormonal modulation in cardiovascular disease [J]. *Am Heart J*, 2000, 139(1 Pt 2): S2-8
- [11] Liang H, Zhang C, Ban T, et al. A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGFbetaR1 is involved in cardiac fibrosis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(12): 2152-2160
- [12] Roy S, Khanna S, Hussain SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(1): 21-29
- [13] Qin Y, Yu Y, Dong H, et al. MicroRNA 21 inhibits left ventricular remodeling in the early phase of rat model with ischemia-reperfusion injury by suppressing cell apoptosis [J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9(6): 413-423
- [14] Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, 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
- [15] Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, et al. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(1): 71-84
- [16] Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling[J]. *Circ Res*, 2009, 104 (2): 170-178
- [17] van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. *Science*, 2007, 316(5824): 575-579
- [18] Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(6): 659-666
- [19] Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction[J]. *Cardiology*, 2010, 115(3): 163-169
- [20] Ye Y, Perez-Polo JR, Qian J, et al. The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(10): 534-542
- [21] Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(7): 1183-1185