文章编号:1000-5404(2014)10-1017-04

论著

miR-199a-5p在血管紧张素Ⅱ致心肌肥大细胞中的表达变化

刘红梅,陈 新,孙丹云,唐 渊,李晓辉 (400038 重庆,第三军医大学药学系药物研究所暨药剂学教研室)

[摘要] **目的** 研究miR-199a-5p在血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)导致肥大心肌细胞中的表达变化。**方法** 雄性SD大鼠30只,采用完全随机方法将其分为假手术组、模型组、氯沙坦组[10 mg/(kg·d)],每组10只。制备腹主动脉缩窄致心肌肥大模型,在术后第28天,检测心脏质量指数和左心室质量指数,HE染色观察左心室心肌细胞肥大情况,qRT-PCR方法测定左心室miR-199a-5p表达。取10只1~3 d SD乳鼠,消化获得心肌细胞,分为对照组、模型组(1×10^{-7} mol/L AngⅡ)和氯沙坦组(1×10^{-7} mol/L AngⅡ+1×10^{-6} mol/L氯沙坦钾),qRT-PCR方法测定心肌细胞miR-199a-5p表达;分别转染miR-199a-5p模拟物或者抑制物,观察[^{3}H]-亮氨酸的掺入情况。**结果** 腹主动脉缩窄大鼠左心室心肌细胞明显肥大,左心室miR-199a-5p表达显著升高($P<0.05$),AngⅡ受体拮抗剂氯沙坦可显著逆转上述变化。体外实验发现氯沙坦可显著降低AngⅡ刺激致乳鼠心肌细胞所致的miR-199a-5p显著升高($P<0.05$),采用转染miR-199a-5p抑制物的方法抑制miR-199a-5p表达可显著抑制AngⅡ刺激所致的心肌细胞[^{3}H]-亮氨酸掺入($P<0.01$);且转染miR-199a-5p模拟物增加miR-199a-5p表达可显著增加[^{3}H]-亮氨酸掺入($P<0.01$)。**结论** miR-199a-5p是介导AngⅡ致心肌细胞肥大的重要调节分子,可能在该信号通路中发挥重要作用。

[关键词] 腹主动脉缩窄;心肌肥大;血管紧张素Ⅱ;心肌细胞;miR-199a-5p
[中图法分类号] R363.21;R542.202;R977.6 [文献标志码] A

Alteration of miR-199a-5p expression in cardiomyocytes hypertrophy induced by angiotensin Ⅱ in rats

Liu Hongmei, Chen Xin, Sun Danyun, Tang Yuan, Li Xiaohui (Institute of Materia Medica, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the alteration of miR-199a-5p expression in cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin Ⅱ (AngⅡ). **Methods** The rat model of cardiac hypertrophy was established by transverse aortic coarctation. Thirty SD rats were randomly divided into 3 groups, sham group, model group, and losartan group ($n=10$ for each group). The losartan group was injected intraperitoneally with losartan potassium 10 mg/(kg·d). The sham group and model group were treated with the vehicle. On day 28, the cardiac mass index (CMI) and left ventricular mass index (LVMI) were measured. The myocardial tissue morphologic changes were detected by hematoxylin-eosin staining. Quantitative RT-PCR was performed to analyze the expression level of miR-199a-5p. Neonatal rat cardiac myocytes treated by AngⅡ were exposed to losartan, and miR-199a-5p expression level was detected by quantitative RT-PCR. MiR-199a-5p mimic and inhibitor were used to transfect neonatal rat cardiac myocytes, and cardiomyocyte hypertrophy was assessed by [^{3}H]-leucine incorporation. **Results** The cardiac myocytes were hypertrophic and the expression level of miR-199a-5p was significantly increased in left ventricle induced by transverse aortic coarctation ($P<0.05$). AngⅡ receptor antagonist losartan significantly reversed the changes. Losartan significantly decreased the expression level of miR-199a-5p in neonatal rat cardiac myocytes induced by AngⅡ ($P<0.05$). MiR-199a-5p inhibitor significantly decreased [^{3}H]-leucine incorporation in neonatal rat cardiac myocytes induced by AngⅡ

[基金项目] 国家科技重大专项课题"重大新药创制"(2011ZXJ09105X);国家自然科学基金(81273507)
[通信作者] 李晓辉,电话:(023)68753397,E-mail:xhl@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0955.015.html(2014-3-28)

($P<0.01$), while miR-199a-5p mimic significantly enhanced the incorporation ($P<0.01$). **Conclusion** MiR-199a-5p is an important regulator in myocyte hypertrophy induced by Ang Ⅱ, and may play a significant role in myocyte hypertrophy signaling pathways induced by Ang Ⅱ.

[**Key words**] transverse aortic coarctation; myocardial hypertrophy; angiotensin Ⅱ; cardiac myocytes; miR-199a-5p

Supported by the Special Projec for Military Special Drugs of National Major New Drug Innovation (2011ZXJ09105X) and the National Natural Science Foundation of China(81273507). Corresponding author: Li Xiaohui, Tel:86-23-68753397, E-mail:xhl@mail.tmmu.com.cn

心肌肥大是心脏对高血压、心脏瓣膜病、急性心肌梗死及肺心病等心血管疾病的多种病理刺激反应,是最终导致心力衰竭的主要病理基础,但其发病机制未完全阐明[1-2]。血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)可增加心肌收缩力,引起心室肥大,对高血压时心肌肥大的形成起着重要作用。microRNA(miRNA)属于转录后调控,主要通过作为RNA诱导的沉默复合体(RISC)的一个元件,识别mRNA的3′端非编码区,引起该mRNA降解或者翻译抑制,从而负性调节靶蛋白的表达,发挥其生物学功能。近年来,对心血管疾病中miRNA变化的研究刚刚起步[3-4]。我们通过targetscan、PicTar、miRanda软件预测miR-199a-5p的靶基因发现,Ang Ⅱ下游存在miR-199a-5p的可能结合位点,而关于miR-199a-5p在Ang Ⅱ诱导的心肌细胞肥大中的变化少见文献报道。

本实验利用腹主动脉缩窄心脏后负荷升高导致Ang Ⅱ表达增加,进而引起心肌肥大模型[5],观察Ang Ⅱ受体拮抗剂氯沙坦对miR-199a-5p变化的影响及其与心肌肥大的关系;并进一步采用体外乳鼠心肌细胞培养及抑制或增加心肌细胞miR-199a-5p表达等方法,初步探讨了miR-199a-5p在Ang Ⅱ诱导心肌细胞肥大中的变化及意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠30只,体质量180~200 g;SPF级1~3 d SD乳鼠10只,购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 主要仪器、药品及试剂

荧光定量PCR仪(Eppendoff, realplex);NanoDrop超微量分光光度计(Thermo, ND-2000);氯沙坦钾原料药(重庆科瑞,249001);血管紧张素Ⅱ(Sigma, A9525);has-miR-199a-5p ID: MC10893 mirVana™ miRNA mimic(Ambion, 4464066);has-miR-199a-5p ID: MH10893 mirVana™ miRNA inhibitor(Ambion, 4464084);Opti-MEM® Ⅰ Reduced Serum Medium(Invitrogen, 31985-062);Lipofectamine® RNAiMAX Reagent(Invitrogen, 13778-150);[^{3}H]-亮氨酸(Perkinelmer, NET135H001MC);miRcute miRNA提取分离试剂盒(天根公司,DP501);miRcute miRNA cDNA第1链合成试剂盒(天根公司,KR201);miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒(天根公司,FP401)。

1.3 动物模型建立及分组

采用腹主动脉缩窄法复制压力超负荷型大鼠心肌肥大模型[6]:7%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,将大鼠仰卧于鼠板固定,无菌操作后于大鼠剑突下腹中线处切开皮肤及肌肉,寻找腹主动脉,将8号注射器针头平行置于腹主动脉,用4号手术丝线将腹主动脉和注射器针头一同结扎(假手术组不结扎),然后缓慢将针头抽出,逐层缝合肌肉及皮肤。氯沙坦组腹腔注射氯沙坦钾10 mg/kg,假手术组与模型组腹腔注射等体积生理盐水。术后第3天开始给药,每天1次,连续26 d。

1.4 大鼠的一般生存情况

实验期间,密切观察大鼠的一般情况,包括进食、活动情况、精神状态、皮毛光泽、体质量等,记录各组死亡动物数。

1.5 心脏指数测定

术后第28天,称量大鼠体质量(body weight, BW)后,给予水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,迅速开胸取出心脏,冰冷生理盐水洗去血迹,滤纸吸干,称量心脏质量(cardiac mass, CM);除去心房和右心室,称量左心室(left ventricular weight, LVW)和室间隔质量(septum, SEP);以(LVW+SEP)与BW之比作为左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI);以CM与BW之比作为心脏质量指数(cardiac mass index, CMI)。

1.6 左心室HE染色

取左心室心肌组织置于4%多聚甲醛中固定。石蜡包埋切片后HE染色。石蜡切片用二甲苯脱蜡3 min×2次,再用梯度乙醇脱水3 min×2次,蒸馏水洗2 min后,用苏木精染色1 min,蒸馏水洗1 min,1%盐酸乙醇分化20 s,蒸馏水洗1 min,1%稀氨水返蓝30 s,蒸馏水洗1 min,最后用伊红染色1 min,蒸馏水洗30 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。在光镜下观察心肌组织形态学改变。

1.7 qRT-PCR方法检测左心室miR-199a-5p变化

取50 mg左心室心肌组。按照试剂盒说明书提取miRNA,miRNA的3′末端加Poly(A)处理,37 ℃ 60 min,将Poly(A)修饰的miRNA进行反转录反应,37 ℃ 60 min。qRT-PCR检测miR-199a-5p含量,条件为94 ℃预变性2 min,94 ℃变性20 s,60 ℃退火、延伸34 s。miR-199a-5p上游引物:5′-GCCCAGTGTTCAGACTACCTGTTCA-3′,下游引物由天根公司提供。以5 s

rRNA 为内参基因，利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法对结果进行分析。

1.8　SD 乳鼠心肌细胞培养

取 1～3 d SD 乳鼠 10 只，处死后无菌取心脏，反复用 PBS 液冲洗后，剪成 0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm 大小的组织块，加入含 0.1% 胰蛋白酶与 0.1% 胶原酶的消化液 6 mL，混匀后 37 ℃水浴 10 min。取上清，1 000 r/min 离心 3 min，弃上清后加入 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM/F12，收集于培养瓶。200 目不锈钢网滤除未消化组织，收集的心肌细胞经 2 h 差速贴壁后，取悬浮细胞移至另一培养瓶中，置于常规培养箱中，48 h 后换液继续培养。

1.9　qRT-PCR 方法检测心肌细胞 miR-199a-5p 变化

将心肌细胞以 3×10^5/mL 细胞浓度接种于 24 孔板，共 3 组，每组 6 个孔。模型组给予终浓度为 1×10^{-7} mol/L 的 AngⅡ，氯沙坦组加入 AngⅡ的同时给予终浓度为 1×10^{-6} mol/L 氯沙坦钾，对照组给予等体积的 PBS，培养 12 h。将心肌细胞用 PBS 冲洗 3 遍后。其他步骤按照检测大鼠左心室 miR-199a-5p 变化的方法进行。

1.10　心肌细胞转染及[^{3}H]-亮氨酸掺入

将心肌细胞以 1×10^4/mL 细胞浓度接种于 96 孔板，共 5 组，每组 5 个孔。用 Lipofectamine® RNAiMAX Reagent 按说明书转染的 has-miR-199a-5p mimic 或 inhibitor。模型组给予终浓度为 1×10^{-7} mol/L 的 AngⅡ；inhibitor 转染组在加入 AngⅡ的同时转染终浓度为 3×10^{-8} mol/L 的 has-miR-199a-5p inhibitor；氯沙坦组加入 AngⅡ的同时给予终浓度为 1×10^{-6} mol/L 氯沙坦钾；mimic 组仅转染终浓度为 3×10^{-8} mol/L 的 has-miR-199a-5p mimic；对照组用等体积的 Opti-MEM® Ⅰ Reduced Serum Medium 补足体积，各孔再加入终浓度为 1 μCi/mL 的[^{3}H]-亮氨酸。48 h 后，检测各孔 cpm 值。

1.11　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠一般生存情况

假手术组大鼠皮毛顺滑有光泽，精神佳，进食活动自如；模型组大鼠逐渐出现精神萎靡、活动较少；而氯沙坦组大鼠活动基本自如，精神可。在整个实验期间，由于术后 24 h 内急性心衰，假手术组、模型组、氯沙坦组各死亡 3、3、4 只，各组间无明显差异。

2.2　大鼠 LVMI 及 CMI 的变化

术后第 28 天，与假手术组相比，模型组 LVMI 与 CMI 均明显增加（$P<0.01$，$P<0.05$）。与模型组比较，氯沙坦组 LVMI 及 CMI 均明显降低（$P<0.01$，$P<0.05$）（表 1）。

表 1　氯沙坦对各组大鼠心脏指数的影响（mg/g，$\bar{x}\pm s$）

组别	n	LVMI	CMI
假手术组	7	2.039±0.172	2.596±0.190
模型组	7	2.433±0.317[b]	2.960±0.364[a]
氯沙坦组	6	2.015±0.240[d]	2.590±0.233[c]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与假手术组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与模型组比较

2.3　大鼠左心室心肌组织形态学变化

术后第 28 天，左心室 HE 染色显示：与假手术组相比，模型组左心室的心肌细胞排列紊乱，心肌细胞肥大，细胞质肿胀，部分心肌细胞核宽大畸形，氯沙坦组心肌细胞排列基本无紊乱，细胞质无明显肿胀，细胞核无明显宽大畸形（图 1）。

2.4　左心室心肌组织 miR-199a-5p 的表达

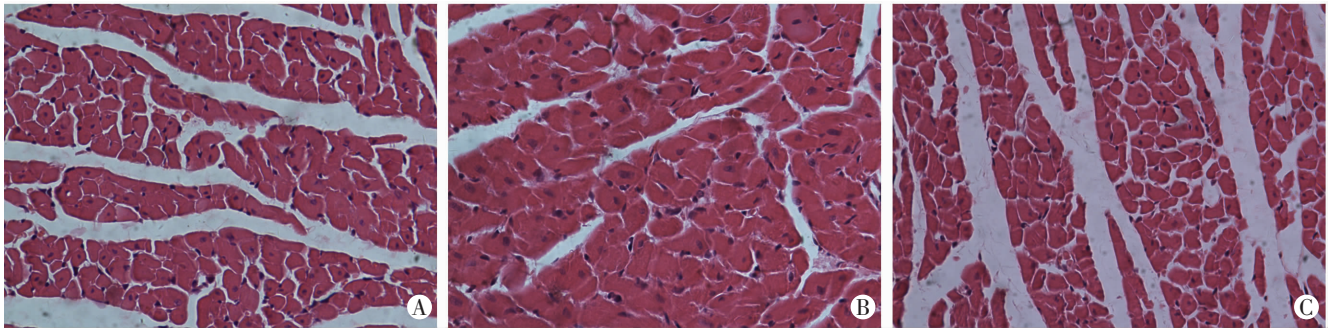
qRT-PCR 结果显示，腹主动脉缩窄模型组 miR-199a-5p 表达（1.961±0.254）较假手术组（1.000±0.583）增加了 96%（$P<0.01$），氯沙坦组 miR-199a-5p 表达（1.220±0.313）明显低于模型组（$P<0.05$），与假手术组相比无统计学差异。

2.5　心肌细胞 miR-199a-5p 的表达

模型组 miR-199a-5p 表达（2.276±0.588）较对照组（1.000±0.300）显著增加了 128%（$P<0.01$），氯沙坦组 miR-199a-5p 表达（1.243±0.201）显著低于模型组（$P<0.05$），与对照组相比无统计学差异。

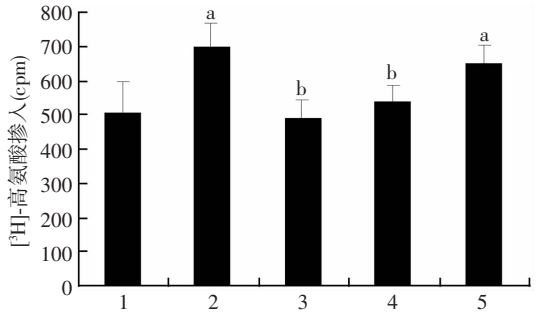
2.6　心肌细胞[^{3}H]-亮氨酸掺入

在培养的大鼠乳鼠心肌细胞中，终浓度 1×10^{-7} mol/L 的 AngⅡ造模可显著增加[^{3}H]-亮氨酸的掺入量（$P<0.01$），1×10^{-6} mol/L 氯沙坦可显著降低[^{3}H]-亮氨酸的掺入（$P<0.01$）；inhibitor 组可显著减少 AngⅡ导致的[^{3}H]-亮氨酸的掺入增加，并且与氯沙坦组无显著差别。与对照组相比，在培养的心肌细胞中仅转染 mimic 可显著增加[^{3}H]-亮氨酸的掺入量（$P<0.01$）（图 2）。



A：假手术组；B：模型组；C：氯沙坦组

图 1　各组大鼠左心室心肌组织形态学变化（HE ×400）



1:对照组;2:模型组;3:氯沙坦组;4:inhibitor 组;5:mimic 组

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与模型组比较

图2 miR-199a-5p 对 AngⅡ刺激心肌细胞[^{3}H]-亮氨酸掺入的影响

($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

AngⅡ是肾素-血管紧张素系统中重要的活性成分,它可作用于 AT1 受体,激活一系列信号通路使 MAPK 磷酸化,调节细胞生长,是导致心肌肥大的重要因素[7-9]。AngⅡ不但对心肌细胞具有显著的正性肌力作用,还具有生长因子样作用,可直接刺激心肌细胞蛋白质合成增加,引起心肌细胞肥大[10-11]。本研究采用经典的腹主动脉缩窄方法制备心肌肥大模型,该模型心脏后负荷升高导致 AngⅡ表达增加,进而引起心肌肥大[5]。

miRNA 属于转录后调控,主要通过作为 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)的一个元件,识别 mRNA 的3′端非编码区,引起该 mRNA 降解或者翻译抑制,从而负性调节靶蛋白的表达,发挥其生物学功能。本研究发现,腹主动脉缩窄模型组大鼠左心室组织中 miR-199a-5p 表达较假手术组增加了96%($P<0.01$),心肌出现明显肥大;AngⅡ的 AT1 受体选择性阻断剂氯沙坦组在逆转心肌肥大的同时,其 miR-199a-5p 表达明显降低,这强烈提示 miR-199a-5p 在血管紧张素Ⅱ致心肌肥大中可能具有重要病理作用。

为了证明上述推测,本研究进一步利用了原代心肌细胞培养模型,观察 AngⅡ刺激及 AT1 受体选择性阻断剂氯沙坦对 miR-199a-5p 表达的影响,结果发现,AngⅡ刺激组心肌细胞 miR-199a-5p 增加了128%,心肌细胞出现明显肥大;氯沙坦在阻止心肌细胞肥大的同时则能显著降低 miR-199a-5p 的表达,这提示 miR-199a-5p 可能作为 AngⅡ的下游通路参与了心肌肥大的发生。为了进一步观察 miR-199a-5p 与 AngⅡ诱导的心肌细胞肥大之间的关系,我们对 AngⅡ作用的心肌细胞转染 miR-199a-5p inhibitor 以阻断 miR-199a-5p 的表达,结果发现可显著降低 AngⅡ引起的心肌细胞[^{3}H]-亮氨酸掺入,抑制蛋白合成;另一方面,我们采用转染 miR-199a-5p mimic 的方法以模拟 miR-199a-5p 的过表达,结果可显著增加[^{3}H]-亮氨酸掺入,这表明 miR-199a-5p 极有可能是 AngⅡ诱导的心肌细胞肥大的重要调节机制。结合我们的软件预测即 AngⅡ下游的 MAPK 家族中 MAP3K11、MAP3K12 的3′端非编码区存在 miR-199a-5p 的可能结合位点,miR-199a-5p 可能是 AngⅡ下游重要的信号调节分子。但是,miR-199a-5p 是否通过调节 MAPK 家族信号通路而发挥作用,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Rohini A, Agrawal N, Koyani C N, *et al*. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy[J]. Pharmacol Res, 2010, 61(4): 269-280.

[2] Hellawell J L, Margulies K B. Myocardial reverse remodeling[J]. Cardiovasc Ther, 2012, 30(3): 172-181.

[3] Gladka M M, da-Costa-Martins P A, De-Windt LJ. Small changes can make a big difference - microRNA regulation of cardiac hypertrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(1): 74-82.

[4] van-Rooij E, Olson E N. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(11): 860-872.

[5] Lorell B H. Cardiac renin-angiotensin system: role in development of pressure-overload hypertrophy[J]. Can J Cardiol, 1995, 11(Suppl F): 7F-12F.

[6] 杨涛, 张伟, 张雷. 大鼠腹主动脉缩窄模型的制备及其效果的探讨[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(1): 24-26.

[7] Muslin A J. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. Clin Sci (Lond), 2008, 115(7): 203-218.

[8] Nishida M, Tanabe S, Maruyama Y, *et al*. G alpha 12/13 and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes[J]. J Biol Chem, 2005, 280(18): 18434-18441.

[9] Akazawa H, Komuro I. Mechanisms underlying angiotensin Ⅱ-independent activation of angiotensin Ⅱ type 1 receptor[J]. Nihon Rinsho, 2012, 70(9): 1492-1498.

[10] Palomeque J, Delbridge L, Petroff M V. Angiotensin Ⅱ: a regulator of cardiomyocyte function and survival[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009, 14: 5118-5133.

[11] Zhang S Q, Ding B, Guo Z G, *et al*. Inhibitory effect of antisense oligodeoxynucleotide to p44/p42 MAPK on angiotensin Ⅱ-induced hypertrophic response in cultured neonatal rat cardiac myocyte[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(1): 41-46.

(**收稿**:2013-12-11;**修回**:2014-01-03)

(编辑 张 维)