

MicroRNA-137 与 Ang II 在自发性高血压大鼠心脏重构中的作用

侯永兰*, 李石林, 刘玲玲

(河南省新乡市中心医院心内一科, 河南 新乡 453000)

【摘要】 目的 探讨微小核糖核酸 195 (MicroRNA-137, miRNA-137)、TGF- β 1/Smads 信号转导通路及血管紧张素 II (Ang II) 在自发性高血压大鼠 (SHR) 心脏重构中的作用。**方法** 取雄性 SHR 大鼠 16 只, 随机分为 SHR 干预组 (卡托普利 10 mg/kg·d) 和 SHR 对照组 (蒸馏水) 各 8 只, 另取 Wistar 大鼠 8 只为正常对照组, 分别给予 SHR 大鼠卡托普利 10 mg/kg·d 和蒸馏水灌服, 共持续 8 周。造模前后测大鼠尾动脉血压, 8 周后股动脉放血处死大鼠, HE 染色观察大鼠心脏形态学改变, 实时荧光定量多聚酶链式反应 (qRT-PCR) 法检测大鼠心脏中 miRNA-137 的表达, Western-blot 检测转化生长因子 β 1 (transforming growth factor beta1, TGF- β 1)、血管紧张素 II (Ang II)、Smad 蛋白 3 (small mother against decapen-taplegic protein three, Smad3)、I 型胶原 (Col-I) 和 III 型胶原 (Col-III) 蛋白表达水平。**结果** SHR 大鼠心脏 miRNA-137、Ang II、TGF- β 1、Smad3、Col-I 及 Col-III 的表达量均高于 Wistar 大鼠 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), SHR 干预组大鼠心肌细胞较 SHR 对照组明显变小, 细胞排列较其紧密有序, miRNA-137、Ang II、TGF- β 1、Smad3、Col-I 及 Col-III 表达量均明显降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** miRNA-137 可能通过上调 Ang II 及 TGF- β 1/Smads 信号转导通路促进 SHR 心脏重构; 卡托普利干预可抑制 miRNA-137 表达。

【关键词】 心脏重构; miRNA-137; 自发性高血压大鼠; TGF- β 1/Smads 信号通路

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0052-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.009

Effects of MicroRNA-137 and Ang II on cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats

HOU Yong-lan*, LI Shi-lin, LIU Ling-ling

(Department of Cardiology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of small RNA 195 (MicroRNA-137), TGF- β 1/Smads signal transduction pathway and angiotensin II (Ang II) in cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** 16 SHR male rats were randomly divided into intervention group SHR (captopril 10 mg/kg·d) and SHR control group (distilled water), the other 8 Wistar rats were normal control group, rats were given captopril 10 mg/kg·d or distilled water for 8 weeks. Caudal arterial pressure was measured before and after the intervention, intervention after 8 weeks rats were killed by exsanguination, HE staining was used to observe the morphological changes of rat heart, qRT-PCR method was used to detect the expression of miRNA-137 in rat heart, Western-blot detection of TGF- β 1 and Ang II,

Smad3, Col- I and Col- III protein. **Results** Compared to the normal control groups, the miRNA-137, Ang II, TGF- β 1, Smad3, Col- I and Col- III were higher expressed in SHR treatment group and SHR control groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); Compared to the SHR control group, the cardiomyocyte of SB group becomes smaller and arranged more closely and orderly, the miRNA-137, Ang II, TGF- β 1, Smad3, Col- I and Col- III were significantly lower expressed ($P < 0.01$ or $P < 0.05$).

Conclusions MiRNA-137 may promote SHR cardiac remodeling by up regulation of Ang II and TGF- β 1/Smads signaling pathway; the captopril intervention can inhibit miRNA-137 expression.

【Key words】 Heart Remodeling; miRNA-137; SHR; TGF- β 1/Smads signaling pathway

高血压等疾病是心内科最为常见的疾病,长期的高血压,心肌缺血会引起动脉硬化和心肌纤维化,对心肌功能影响甚大^[1-2]。近年来发现,微小核糖核酸(microRNA)通过对基因转录后调控而介导了一系列的基因表达调控方式。已有研究证实 miRNA 参与动脉硬化和心肌纤维化等一系列病理过程^[3-4]。miRNA-137 为 microRNA 重要成员之一,近年来,多种研究提示其与心肌重构关系密切,可能成为高血压、缺血性心脏病等疾病的一个新的治疗靶点^[5]。目前对于 miRNA-137 在心血管重构中的作用及机制尚未完全清。MicroRNA-137 在 SHR 大鼠心脏重构中的作用及其机制,及卡托普利干预对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)大鼠心脏形态结构及表达心血管重构相关因子的影响。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 SHR 16 只和 Wistar 大鼠 8 只,均购自上海交通大学医学院实验动物中心[SCXK(沪)2013-0013],体重(215~245)g,所有大鼠均在新乡市中心医院动物实验室[SYXK(豫)2011-0076]的清洁环境下饲养观察,室温 20℃~24℃,普通饲料适应性喂养 1 周后使用。按实验动物使用的“3R”原则给人以人道主义关怀。

1.2 主要试剂及仪器

Trizol 和 Lipofectamine2000 转染试剂(Invitrogen 公司);10 × Annealing Buffer、蛋白裂解液和 SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒购(上海碧云天生物技术公司);ABI-7500 型实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);PVDF 膜和蛋白发光液(美国 Millipore 公司);miR-137 inhibitor 和其对照剂(上海 GenePharma 有限公司);DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Hyclone 公司);TGF- β 1 一抗、Angiotensin II 一抗、Smad3 一抗、Collagen I 一抗、Collagen III 一抗、二抗(美国 Assay Biotechnology 公司);ALC-NIBP 型无创大鼠血

压心率测定仪(上海奥尔科特生物科技有限公司);卡托普利片(中美上海施贵宝制药有限公司,国药准字 H20084569);ZH06-T16 型大鼠灌胃针(中西集团);RM2155 型超薄石蜡切片机(德国 LEICA 公司);Allegra™ 64R 台式低温高速离心机(德国 Beckman 公司);Image Pro plus 病理图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.3 动物分组

雄性 SHR 大鼠 16 只,随机分为 SHR 干预组(卡托普利 10 mg/kg·d)和 SHR 对照组(蒸馏水)各 8 只,另取 Wistar 大鼠 8 只为正常对照组,分别给予 SHR 大鼠卡托普利(中美上海施贵宝制药有限公司)10 mg/kg·d 和蒸馏水灌服,共持续 8 周。

1.4 实验方法

1.4.1 血压测定及心脏样本获得

各组大鼠于干预前及干预 8 周后处死前测量鼠尾动脉血压,采用无创大鼠血压心率测定仪(ALC-NIBP,上海奥尔科特生物科技有限公司)按照仪器说明书的要求测定大鼠安静清醒状态下鼠尾动脉收缩压与舒张压(mmHg)。大鼠处死后立即取出心脏,分离室间隔和左心室游离壁,剪成小块,取部分左心室游离壁,常规脱水,石蜡包埋,HE 染色,待病理学检测。其余组织在 -80℃ 冰箱冷冻保存。

1.4.2 Western-Blot 检测 TGF- β 1、Ang II、Smad3、Col- I、Col- III 蛋白表达水平

提取大鼠心脏组织的总蛋白,根据测定的蛋白浓度算出上样蛋白量,保证各组总蛋白量一致,在 100℃ 加热 10 min 以使蛋白质变性。电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,加入 TGF- β 1、Ang II、Smad3、Col- I、Col- III 等一抗,4℃ 孵育过夜,选择 TGF- β 1、Ang II、Smad3、Col- I、Col- III 等酶标二抗和稀释浓度,孵育 1 h,洗膜后化学发光,得到胶片,拍照,阳性条带以 Gel-pro4.0 软件分析显影条带。

1.4.3 Real-time PCR 检测 miRNA-137 表达水平

根据其 mRNA 序列,设计引物。miRNA-137 引

物:上游:5'-AAT CAC ACT ACA ATC GGG CTC-3';下游:5'-CAT CTT CCT CCT TTC TCG ATT-3';产物长度:256 bp。扩增产物 2% , 琼脂糖凝胶电泳,凝胶分析系统测定各条带积分光密度值。采用 2 - ΔΔCt 方法对实时定量 PCR 结果进行分析,显示 miRNA-137 RNA 的表达。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数显著性检验用多个样本均数比较的方差分析及 LSD-t 检

验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干预前组间大鼠尾动脉血压比较

干预前,与 SHR 对照组比较,SHR 干预组大鼠尾动脉收缩压及舒张压差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。干预 8 周后,与 SHR 对照组相比,SHR 干预组大鼠尾动脉的收缩压与舒张压降低更明显 ($P < 0.05$),两组与正常组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,表 1)。

表 1 卡托普利干预前后组间大鼠尾动脉血压比较 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

Tab. 1 Comparison of the blood pressure of the tail artery between the two groups before and after the intervention of captopril				
分 组 Group	干预前收缩压 Systolic blood pressure before intervention	干预前舒张压 Diastolic blood pressure before intervention	干预后收缩压 Systolic blood pressure after intervention	干预后舒张压 Diastolic blood pressure after intervention
正常对照组 Normal control group	135.7 ± 8.2	82.6 ± 6.5	133.7 ± 6.2	84.2 ± 4.1
SHR 对照组 SHR control group	214.7 ± 8.6 ^a	156.7 ± 6.6 ^b	215.3 ± 8.6 ^b	157.2 ± 9.2 ^b
SHR 干预组 SHR intervention group	214.2 ± 7.9 ^a	156.7 ± 6.4 ^b	148.3 ± 6.9 ^{ac}	120.5 ± 5.7 ^{bc}

注:a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;c 为 $P < 0.01$,与 SHR 对照组比较。
Note. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with the normal control group; c: $P < 0.01$, compared with the SHR control group.

2.2 大鼠心脏形态结构比较

SHR 对照组大鼠心肌细胞数量减少,排列疏松、紊乱,细胞肥大,胞核变圆畸形,SHR 干预组大鼠心肌细胞体积变小,数量增加,细胞排列较紧密有序,而正常对照组大鼠心肌细胞形态正常,排列紧密有序,细胞核无畸形(图 1)。

2.3 心脏 miRNA-137 表达比较

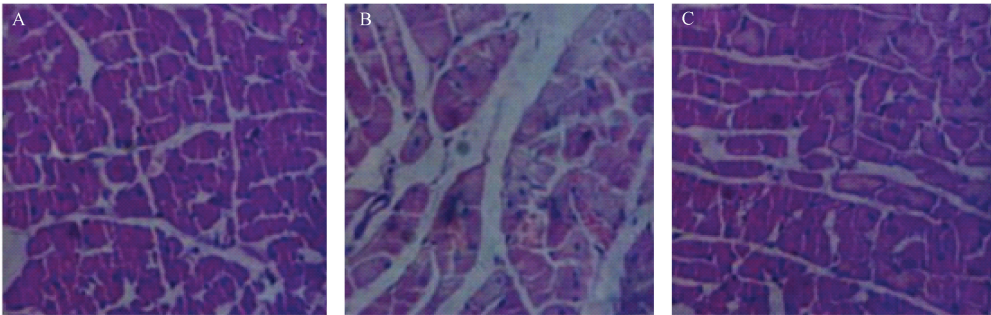
和 SHR 对照组相比,SHR 干预组大鼠心脏表达 miRNA-137 升高幅度较低 ($P < 0.01$,见图 2),两组 miRNA-137 表达都较正常对照组升高 ($P < 0.01$)。

2.4 Ang II 蛋白表达比较

和 SHR 对照组相比,SHR 干预组大鼠心脏表达 Ang II 蛋白表达升高幅度较低,两组 Ang II 蛋白表达都较正常对照组升高 ($P < 0.01$,图 3)。

2.5 TGF-β1/Smad3 蛋白表达比较

和 SHR 对照组相比,SHR 干预组大鼠心脏表达 TGF-β1/Smad3 蛋白和 Col- I / Col-Ⅲ 蛋白表达升高幅度较低,两组 TGF-β1/Smad3 蛋白和 Col- I / Col-Ⅲ 蛋白表达都较正常对照组升高 ($P < 0.01$,图 4)。

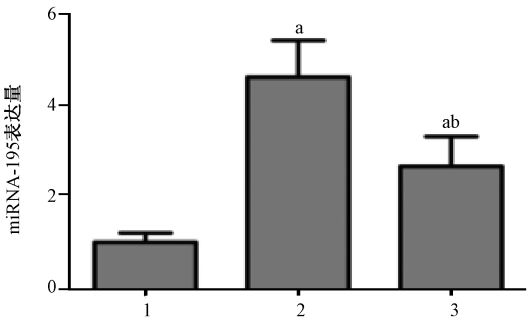


注:(A)正常对照组;(B)为 SHR 对照组;(C)为 SHR 干预组。

图 1 各组心脏组织形态学比较 (×40)

Note. (A) normal control group; (B) SHR control group; (C) SHR intervention group.

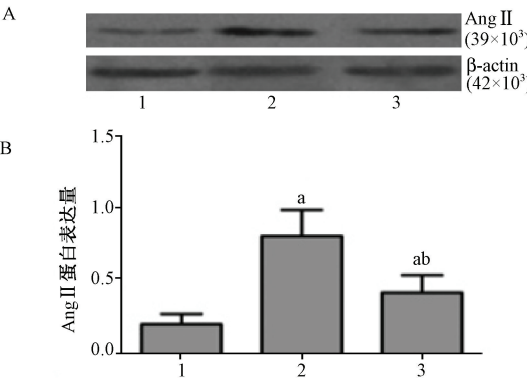
Fig. 1 Comparison of cardiac tissue morphology



注：(1)正常对照组；(2)SHR 对照组；(3)SHR 干预组。
a： $P < 0.01$ ，与正常对照组比较；
b： $P < 0.01$ ，与 SHR 对照组比较。

图 2 干预后组间大鼠心脏 miRNA-137 表达量
Note. (1) normal control group; (2) SHR control group; (3) SHR intervention group. a: $P < 0.01$, compared with the normal control group; b: $P < 0.01$, compared with the SHR control group.

Fig. 2 miRNA-137 expression levels of cardiac in the rats after intervention



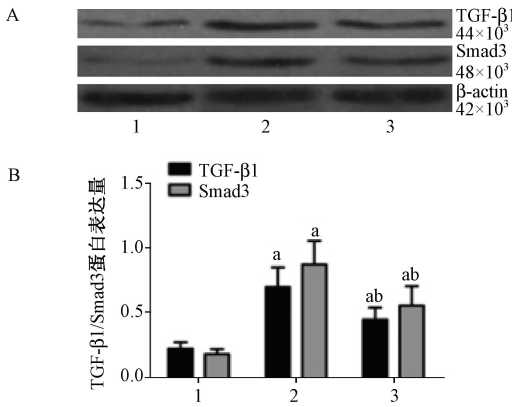
注：(A) Western-blot 检测 Ang II 蛋白表达情况；
(B) 干预后组间大鼠心脏 Ang II 蛋白表达分析图。
(1) 正常对照组，(2) SHR 对照组，(3) SHR 干预组。
a： $P < 0.01$ ，与正常对照组比较；
b： $P < 0.01$ ，与 SHR 对照组比较。

图 3 干预后组间大鼠心脏 Ang II 蛋白表达量
Note. (A) The expression of proteins Ang II determined by Western-blot analysis; (B) Ang II protein expression levels of Expression analysis. (1) normal control group; (2) SHR control group; (3) SHR intervention group. a: $P < 0.01$, compared with the normal control group; b: $P < 0.01$, compared with the SHR control group.

Fig. 3 Ang II protein expression profiles levels of cardiac in the rats after intervention

3 讨论

高血压是冠心病的主要危险因素之一 长期的高血压，心肌缺血会引起动脉硬化和心肌纤维化，



注：(A) Western-blot 检测 TGF-β1/Smad3 蛋白表达情况；(B) 干预后组间大鼠心脏 TGF-β1/Smad3 蛋白分析图。(1)正常对照组，(2)SHR 对照组，(3) SHR 干预组。
a： $P < 0.01$ ，与正常对照组比较；
b： $P < 0.05$ ，与 SHR 对照组比较。

图 4 干预后组间大鼠心脏 TGF-β1/Smad3 蛋白表达量。
Note: (A) The expression of proteins TGF-β1/Smad3 determined by Western-blot analysis; (B) ATGF-β1/Smad3 protein expression levels of Expression analysis. (1) normal control group; (2) SHR control group; (3) SHR intervention group. a: $P < 0.01$, compared with the normal control group; b: $P < 0.01$, compared with the SHR control group.

Fig. 4 TGF-β1/Smad3 protein expression levels of cardiac in the rats after intervention

严重的影响了患者的生活质量^[6]。miRNA 为非编码 RNA,通过调节相关基因的表达,参与体内一系列生理病理过程^[7]。已有研究证明,miRNA 与心肌细胞的增殖分化密切相关^[8]。近年来,miRNA 在心肌缺血和心肌重构发生中的作用引起高度重视。

Liu 等^[9]科学家研究结果表明,miR-195 与甲基化的 CpG 结合蛋白-1 结合,负反馈调节心肌细胞的纤维化过程。此外,Zhao 等^[10]研究者报道 miR-9 亦能影响心肌细胞的增殖与分化,其作用靶点与 TLX 密切相关。研究新发现 miR-97a 通过 TLX 和周期蛋白 D1 调控心肌细胞增殖和分化^[11]。然而,miRNA 在心肌重构中的调节作用有待进一步研究。本实验的设计是为了探讨 miRNA-137 在心肌重构中的影响,使之成为高血压、缺血性心脏病等疾病的一个新的治疗靶点。

RAAS 在高血压致心肌纤维化的发病机制中倍受关注。研究显示,TGF-β 是重要的致纤维化的细胞因子,其中 TGF-β1 是作用最强的一种^[12]。研究显示,TGF-β1 在体内可明显减轻全身及局部炎症反应。其表达上调可促进心肌重构。血管紧张素 II (Ang II) 是生物活性最强的效应肽,Ang II 发挥作用

的一个重要途径就是通过调节 TGF- β 1 的表达^[13]。Ang II 通过激活细胞内的 MAPK 家族而引起 TGF- β 1 等细胞因子分泌和细胞外基质(如 Col-I 和 Col-III)的表达增加^[14]。本研究发现,卡托普利能有效减轻心室肥大,抑制成纤维细胞增殖及细胞外基质分泌增加,降低血压,逆转高血压所致的心血管重构。在本研究中,造模成功后的 SHR 干预组,其血压明显降低,HE 染色可见其心肌细胞数量增加,细胞体积变小,细胞排列较有序,证实卡托普利干预可以逆转高血压所致的心脏结构重构。

本研究结果显示,SHR 在未进行干预的情况下,其收缩压和舒张压显著升高,心肌细胞数量减少,排列紊乱,细胞肥大,胞核变圆畸形,证实 SHR 心脏存在典型的高血压心脏重构的特征性改变。在本研究中,SHR 对照组表达 Col-I/Col-III 等蛋白表达均升高,与正常对照组大鼠相比,差异具有统计学意义。说明 Ang II、TGF- β 1、Smad3 在 Col-I 和 Col-III 表达中起着正性的调节作用。与 Duisters 等^[14]研究结果相类似。

此外,本研究中未用药物干预的 SHR 大鼠心脏表达 miRNA-137 也显著升高,并且达到了血压正常的正常对照组大鼠心脏表达量的 4 倍以上,并显示出与 Ang II、TGF- β 1、Smad3、Col-I 和 Col-III 蛋白表达同向性的特征,且 Kawano^[15]的研究显示,特异高表达心脏 miRNA-137 可诱发心肌细胞肥大,结合 SHR 大鼠与人类同样的高血压发生机制,我们可以推测在高血压状态下,由于肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活,激活一系列细胞因子,通过 TGF- β 1/Smad 通路转导,使细胞外基质 Col-I 和 Col-III 大量增生和过度积聚,最终造成心肌顺应性下降,发生病理性重构^[6]。

综上所述,本研究提示,卡托普利通过抑制 miRNA-137 的表达而下调了 TGF- β 1/Smad 通路的转导,最终抑制了 Col-I 和 Col-III 蛋白的表达,进而抑制了成纤维细胞增殖,抑制了 SHR 大鼠的心脏重构。本研究将对高血压引起的心脏重构的发生机制和治疗策略上提供新的研究方向,为 miRNA-137 作为心脏重构的治疗靶点提供实验基础和理论依据,具有重要的临床意义^[17-18]。

参考文献:

[1] Latronico MV, Condorelli G. microRNAs in hypertrophy and heart failure[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2011, 236(2):125-131.

[2] Bauersachs J. Regulation of myocardial fibrosis by microRNAs[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 56(5):454-459.

[3] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs; are the answers in sight? [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(2):102-114.

[4] Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs[J]. J Cell Physiol, 2010, 222(3):540-545.

[5] Van RE, Olson EN. Searching for miRNAs in cardiac fibrosis[J]. Circ Res, 2009, 104(2):138-140.

[6] 魏聪, 胡兵, 申愕. MicroRNAs 在心脏发育和疾病中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(3):611-615.

[7] Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(4):600-606.

[8] Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(2):265-272.

[9] Liu, Z. Q. Teng, A. L. McQuate, et al. An epigenetic feedback regulatory loop involving microRNA-195 and MBD1 governs neural stem cell differentiation [J]. PLoS One, 2013, 22(8):e51436.

[10] C. Zhao, G. Sun, S. Li, et al. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination[J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(5):365-371.

[11] C. Zhao, G. Sun, S. Li, et al. MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(5):1876-1881.

[12] Shan H, Zhang Y, Lu Y, et al. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodeling in canines[J]. Cardiovasc Res, 2009, 83(3):465-472.

[13] Small EM, Thatcher JE, Sutherland LB, et al. Myocardium-related transcription factor- α controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction[J]. Circ Res, 2010, 107(2):294-304.

[14] 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.

[15] Kawano H, Do YS, Kawano Y, et al. Angiotensin II has multipotential effects in human cardiac fibroblasts[J]. Circulation, 2000, 102(1):1130-1137.

[16] Castro-Chaves P, Cerqueira R, Pinalhao M, et al. New pathways of the renin-angiotensin system: the role of ACE2 in cardiovascular pathophysiology and therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(5):485-496.

[17] 张振辉, 黎佼, 刘本荣, 等. 过表达 miR-29a 对大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(12):1079-1082.

[18] 陆细红, 邓敏, 贺洪辉, 等. miR-125b 通过靶向抑制 Smad4 调控骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(4):341-346.