

杨赟,王智强,王蕴红. 急性运动对大鼠心肌 miRNA-30a 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 76-79.  
Yang Y, Wang ZQ, Wang YH. Expression of miRNA-30a in rat myocardium induced by acute exercise [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 76-79.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.07.012

# 急性运动对大鼠心肌 miRNA-30a 表达的影响

杨 赟<sup>1</sup>,王智强<sup>2\*</sup>,王蕴红<sup>2</sup>

(1.首都体育学院 研究生部,北京 100191; 2.首都体育学院 运动科学与健康学院,北京 100191)

**【摘要】 目的** 研究急性运动对大鼠心肌 miRNA-30a 及其对自噬相关基因表达的影响,探讨 miRNA-30a 对运动后不同恢复时期心肌自噬活性的调控机制。**方法** SD 大鼠随机分为安静对照组(Con),运动后 0 h 组(E0),运动后 3 h 组(E3)和运动后 12 h 组(E12)。急性运动后按不同时间点取材。使用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测左心室肌中 ACE mRNA、miRNA-30a、Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达量。**结果** 与安静对照组相比,运动后 0 h 组左心室肌中 ACE mRNA 和 miRNA-30a 表达显著性升高( $P<0.05$ ),Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达也显著提高( $P<0.05$ ),在运动后 3 h 均恢复到安静水平。**结论** 急性运动可以显著提高心肌 ACE mRNA、miRNA-30a、Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达,这种一过性升高可能是由运动应激导致的。

**【关键词】** 运动;心肌;自噬;miRNA-30a;SD 大鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 07-0076-04

## Expression of miRNA-30a in rat myocardium induced by acute exercise

YANG Yun<sup>1</sup>, WANG Zhiqiang<sup>2\*</sup>, WANG Yunhong<sup>2</sup>

(1. Department of Postgraduates, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191, China.

2. School of Sport Science and Health, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191)

**【Abstract】 Objective** To study the influence of acute exercise on rat myocardial microRNA-30a and autophagy-related gene expression, and investigate the possible mechanism through which microRNA-30a regulates myocardial autophagy during different recovery periods after exercise. **Methods** SD rats were randomly divided into a control group (Con), a 0 h after exercise group (E0), a 3 h after exercise group (E3), and a 12 h after exercise group (E12). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of ACE mRNA, microRNA-30a, Beclin-1 mRNA, and LC3 mRNA in the left ventricular myocardium. **Results** Compared with the control group, in the E0 group, ACE mRNA and microRNA-30a gene expression in the left ventricular muscle was significantly increased ( $P<0.05$ ), and Beclin-1 mRNA and LC3 mRNA expression also significantly increased ( $P<0.05$ ). This was recovered to resting state approximately 3 h after exercise. **Conclusions** Acute exercise can significantly improve myocardial ACE mRNA, microRNA-30a, Beclin-1 mRNA and LC3 mRNA expression. This transient increase may be caused by exercise-induced stress.

**【Keywords】** exercise; myocardial; autophagy; microRNA-30a; SD rat

miRNAs 是内源性非编码单链 RNA,它通过降解目的 mRNA 或抑制其翻译,调节目的基因表达,进而影响细胞的功能<sup>[1]</sup>。研究显示,miRNAs 参与了心脏发育、血管生成、心肌肥大、心力衰竭、再灌注损伤等生理病理过程的调节,且可能是关键性的

调控因子之一<sup>[2-3]</sup>。miRNA-30 是 miRNAs 中的一种,包含 miRNA-30a、b、c、d、e。在心肌组织中 miRNA-30a 有较高表达<sup>[4]</sup>,它对自噬相关基因的表达起重要的调控作用。有研究表明,IncRNA AK088388 是长链非编码 RNA 的一种,它作为内源

**【基金项目】**北京市学科建设项目分子生物学研究平台(15516014)。  
**【作者简介】**杨赟(1990—),男,硕士生,研究方向:心脏功能和能量代谢。E-mail: 674886563@qq.com  
**【通信作者】**王智强(1976—),男,实验师,研究方向:运动分子生物学。E-mail: wangzhiqiang7020@cupes.edu.cn

性 RNA 能够通过竞争性结合 miRNA-30a 提高 Beclin-1 和 LC3 的表达,进而调控心肌细胞自噬水平<sup>[5]</sup>。也有研究表明当 miRNA-30a 表达升高时, Beclin-1 mRNA 表达受到抑制。进一步研究发现,在 Ang II 诱导的心肌肥大模型中,miRNA-30a 的表达受到抑制,而 Beclin-1 mRNA 表达提高,自噬加强<sup>[6]</sup>。提示在心肌存在着 Ang II 对 miRNA-30a 表达的调控,进而对心肌自噬产生调控的机制。而在运动模型的研究中发现,运动应激也可诱发心肌 Ang II 表达升高<sup>[7]</sup>和心肌自噬水平的变化。因此我们推测,在急性运动中,伴随运动心肌的适应性变化,运动心肌 miRNA-30a 的表达也可能发生变化,且可能通过 AngII 对 miRNA-30a 的作用,影响心肌的自噬过程。所以我们通过建立大鼠一次急性运动模型,测定急性运动后不同时间心肌 miRNA-30a 以及自噬相关指标的表达变化,探讨在急性运动应激状态下运动心肌 miRNA-30a 的表达规律及其对自噬的调控机制,为进一步研究运动应激对该信号通路的调控作用进行初步探究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 24 只,体重 240~270 g,由维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2016-0011]。所有大鼠在北京体育大学动物房内饲养和训练[SYXK(京)2016-0033],所有大鼠自由饮食,室温为(22±20℃,空气湿度为45%~55%,昼夜明暗交替时间12 h,分笼饲养,每笼5只。本研究所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:IACUC2016033),并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

miRNA-30a-3p 和 miRNA-30a-5p 引物试剂盒由 Thermo Fisher 提供,试剂和引物货号如下:MirVana™ RNA 抽提试剂盒,REF:AM1556、TaqMan™ MicroRNA 反转录试剂盒,REF:4366596(has-miR-30a-3p, Assay ID: 000416、has-miR-30a-5p, Assay ID: 000417、U6 snRNA, Assay ID:001973)、TaqMan™ Universal Master Mix II 预混液,REF: 4440038、SuperScript™ III 第一链合成系统,REF:18080051、SYBR™ Select Master Mix 预混液,REF:4472908。

六跑道动物实验跑台(ZS-PT-Ⅲ型,中国);梯度 PCR 仪(Mastecycler Nexus,德国 Eppendorf);实时荧

光定量 PCR 系统(7500Fast,美国 ABI)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

所有大鼠适应性饲养 7 d 后随机分为安静对照组(Con),运动后 0 h 组(E0),运动后 3 h 组(E3)和运动后 12 h 组(E12),每组 6 只。急性运动方案:跑台坡度为 16°,速度 16 m/min,运动时间为 1 h。运动组运动后按时间点取材,安静组同时取材。左心室肌组织用预冷的 DEPC 水处理后投入液氮速冻,-80℃保存。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应

Ambion 试剂盒抽提心肌细胞总 RNA,通过 Bulge-Loop™ RT Primer 反转录,采用 TaqMan 荧光探针法进行 qRT-PCR 检测 miRNA-30a-3p、miRNA-30a-5p,U6 为内参照。20 μL 反应体系包括:2× PCR mix10 μL、20×引物 1 μL、cDNA 1.5 μL 和 7.5 μL DEPC 水。实时定量反应:预变性 50℃ 2min,95℃ 10 min。95℃ 15 s,60℃ 60 s,45 个循环。常规 Trizol 方法抽提心肌细胞总 RNA,通 Bulge-Loop™ RT Primer 反转录,采用 SYBR Green 进行常规 qRT-PCR,检测心肌血管转化酶(ACE)、Beclin-1 和 LC3,GAPDH 为内参照,各引物序列见表 1。反应体系包括 2× SYBR 6 μL、Rox 0.2 μL、cDNA 1.5 μL、10μmol/L P1+P2 1 μL、DEPC 水 6 μL。反应参数:95℃ 30 s,95℃ 3 s、60℃ 30 s,45 个循环,95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s。实验重复三次,3p、5p、U6、Beclin-1、LC3 和 GAPDH 产物倍数按 2<sup>-ΔΔCt</sup>计算。

表 1 引物和内参序列

| Table 1 Primer and internal reference sequences |                        |
|-------------------------------------------------|------------------------|
| 引物名称<br>Primer name                             | 序列(5'→3')<br>Sequences |
| Acef                                            | CCATATGCCGACCAAAGCAT   |
| Acer                                            | TTTCGTTGTCGGTCCATTCA   |
| Beclin-1f                                       | CCCACGTGTGAGGAATGCA    |
| Beclin-1r                                       | GTCGCCCTCATTCATTGCT    |
| Lc3f                                            | TGCCGTCGAGAAAGACCTT    |
| Lc3r                                            | GATGAGCCGGACATCTTCCA   |
| GAPDHr                                          | ACTCCCACTCTTCCACCTTC   |
| GAPDHF                                          | TCTTGCTCAGTGTCTTGC     |

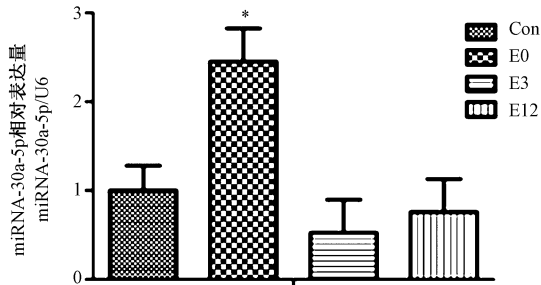
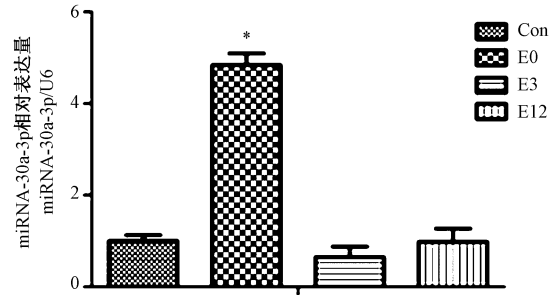
1.4 统计学方法

数据输入 SPSS 23.0 统计软件,采用双因素方差分析统计方法分析数据,所有数据以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 LSD 进行 post-hoc test, $P < 0.05$  表示差异有显著性。

2 结果

2.1 运动后不同时间大鼠心肌 miR-30a 表达

与安静对照组相比,运动后 0 h 组心肌 miRNA-30a-3p 和 miRNA-30a-5p 表达都显著性增高 ( $P < 0.05$ ),运动后 3 h 组和 12 h 组与安静组相比没有显著性差异(见图 1)。



注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ 。

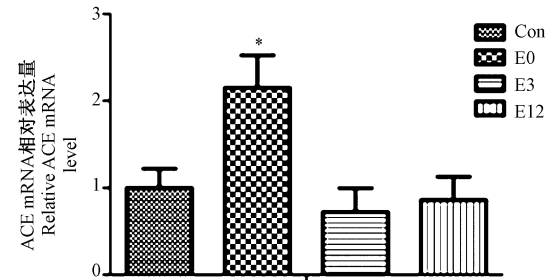
图 1 运动后大鼠心肌 miRNA-30a 表达

Note. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 1 Post-exercise myocardial miRNA-30a-3p and miRNA-30a-5p expression in the rats

2.2 运动后不同时间大鼠心肌 ACE mRNA 表达

与安静对照组相比,运动后 0 h 组心肌 ACE mRNA 表达显著性增高 ( $P < 0.05$ ),运动后 3 h 组和 12 h 组与安静组相比没有显著性差异(见图 2)。



注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ 。

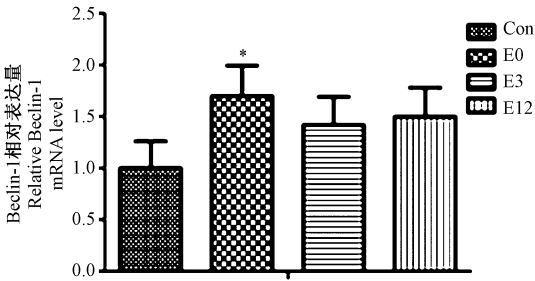
图 2 运动后大鼠心肌 ACE mRNA 表达

Note. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 2 Post-exercise myocardial ACE mRNA expression in the rats

2.3 运动后不同时间大鼠心肌 Beclin-1 mRNA 的表达

与安静对照组相比,运动后 0 h 组心肌 Beclin-1 mRNA 的表达显著性提高 ( $P < 0.05$ ),在运动后 3 h 逐渐恢复到安静状态(见图 3)。



注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ 。

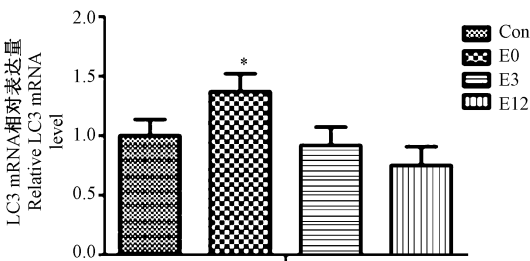
图 3 运动后不同时间大鼠心肌 Beclin-1 mRNA 表达

Note. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 3 Post-exercise myocardial Beclin-1 mRNA expression in the rats

2.4 运动后不同时间大鼠心肌 LC3 mRNA 的表达

与安静对照组相比,运动后 0 h 组心肌 LC3 mRNA 的表达均显著性提高 ( $P < 0.05$ ),在运动后 3 h 逐渐恢复到安静状态(见图 4)。



注:与对照组相比, \*  $P < 0.05$ 。

图 4 运动后大鼠心肌 LC3 mRNA 的表达

Note. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 4 Post-exercise myocardial LC3 mRNA expression in the rats

3 讨论

成熟的心肌细胞是终末分化的细胞,因此,其细胞器和蛋白质质量的维持,对实现心肌细胞的正常功能起重要的作用。自噬是细胞溶酶体降解受损、衰老细胞器和蛋白质等内源性底物的重要过程。在心肌重塑过程中,适宜的自噬是对刺激因素适应和自我保护的反应,但过度自噬则可能导致心肌细胞凋亡<sup>[8]</sup>。

研究显示,血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)参与了心肌重塑过程,而用黄芪多糖可有效抑制血管紧张素Ⅱ诱导的心肌细胞肥大<sup>[9]</sup>。在血管紧张素Ⅱ诱导的心肌肥厚模型中,Beclin-1 和 LC3 在基因和蛋白水平表达均明显

提高,并且当 Beclin-1 mRNA 过度表达时,与心肌肥厚有关基因表达也增强;而缄默 Beclin-1 基因,则引起与心肌肥厚有关基因表达下调,提示血管紧张素Ⅱ参与了 Beclin-1 mRNA 表达的调控过程<sup>[6]</sup>。在大鼠急性力竭运动模型中发现运动后心肌局部 AngⅡ的含量降低了 43%,血浆 AngⅡ的含量增加了 83%<sup>[10]</sup>。也有研究发现,长期游泳训练造成的心肌肥大大鼠,心肌局部 AngⅡ含量显著升高<sup>[7]</sup>。提示运动诱发心肌 AngⅡ释放可能与心肌 Beclin-1 mRNA 表达升高有密切关系。本研究进一步显示,急性运动后心肌 ACE mRNA 显著性升高,由于 ACE 是血管紧张素转化酶,编码的蛋白可以将血管紧张素 I 转化为具有调节血管张力和血管平滑肌增生的血管紧张素 Ⅱ<sup>[11]</sup>。推测运动后心肌 ACE mRNA 表达升高与运动心肌 AngⅡ的更新变化有关。

已有研究表明,急性运动也可提高心肌自噬水平,使 Beclin-1 和 LC3 蛋白表达升高<sup>[12]</sup>。本研究发现,一次力竭运动后即刻心肌 Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 的表达显著升高,进一步表明急性运动可以促进心肌自噬相关基因表达提高,导致了 Beclin-1 和 LC3 II 蛋白表达的提高。

miRNA-30a 由 Drosha 和 Dicer 两种 RNA 酶加工形成。Drosha 酶将原始长链转录本加工成含有 60~70 个碱基的颈环结构前体(包括相反的两个臂“-3p”和“-5p”)然后由 Dicer 酶将其剪切为成熟的 miRNAs<sup>[13-14]</sup>。由于 Beclin-1 是 miRNA-30a 的靶基因,miRNA-30a 可以与 Beclin-1 的 3' UTR 结合来调控该基因<sup>[13]</sup>。miRNA-30a 模拟剂处理心肌细胞后,Beclin-1 mRNA 的表达下调,而用 miRNA-30a 抑制剂处理时,Beclin-1 mRNA 表达上调。进一步研究发现,心肌细胞转入 miRNA-30a 抑制剂损害 miRNA-30a 的功能时,能够引起心肌肥厚相关的基因表达上调<sup>[7]</sup>,这些结果提示,miRNA-30a 介导了 Ang Ⅱ诱导的心肌肥厚和自噬的过程。为此,我们测定了运动心肌 miR-30a “-3p”和“-5p”表达的变化。结果进一步显示,运动应激也能够诱发 miRNA-30a、Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达,同时诱发 ACE mRNA 表达的同步升高,提示在运动心肌中,Ang Ⅱ对 Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达发挥调控作用。在急性运动中能够同时诱发正、负调控自噬相关基因的表达提高,而且这种暂时转录水平的升高只发生在运动后即刻,而我们和其他研究者研究显示,急性运动可引起 Beclin-1 蛋白表达的升高,提示这种运动应激引起 miRNA-30a 表达的升高,对

于翻译水平的调控不起决定性的作用。

综上所述,本实验结果表明急性运动应激可以一过性的提高心肌 ACE mRNA、miRNA-30a、Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达,推测运动应激诱发 miRNA-30a 对心肌 Beclin-1 mRNA 表达的调控作用可能是一过性的,具体调控情况还需要通过药物干预或基因阻断模型进一步证实。

#### 参考文献:

- [1] Chen Y, Fu LL, Wen X, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy [J]. Apoptosis, 2014, 19(8): 1177-1189.
- [2] Small EM, Frost RJ, Olson EN. microRNAs add a new dimension to cardiovascular disease [J]. Circulation, 2010, 121(8): 1022-1032.
- [3] Condorelli G, Latronico MV, Dorn GW, et al. microRNAs in heart disease: Putative novel therapeutic targets? [J]. Eur Heart, 2010, 31(6): 649-658.
- [4] Ikeda S, Kong SW, Lu J, et al. Altered microRNA expression in human heart disease [J]. Physiol Genomics, 2007, 9(31): 367-373.
- [5] 王竞靖,何儒华,王学忠,等. lncRNA AK088388 通过 miR-30a 调控细胞自噬促进心肌细胞损伤 [J]. 宁夏医科大学学报, 2018, 40(11): 1274-1278, 1283.
- [6] Pan W, Zhong Y. miRNA-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53950.
- [7] 李维根,高云秋,张继峰,等. 血管紧张素Ⅱ在运动性心肌肥大中的作用 [J]. 中国运动医学杂志, 1994(3): 133-135.
- [8] 马晓雯,常芸,王世强,等. 不同强度不同时间耐力训练对大鼠心肌细胞自噬发生程度的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2016, 1(1): 237-239.
- [9] 李琴,李言,高珊珊,等. 黄芪多糖抑制血管紧张素Ⅱ诱导心肌肥大的作用途径 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(19): 3086-3091.
- [10] 李维根,刘晓明,高云秋,等. 大鼠极量运动后心肌血管紧张素Ⅱ的变化 [J]. 中国运动医学杂志, 1994(1): 11-12, 63-64.
- [11] 李欣,潘珊珊. 局部血管紧张素Ⅱ及其受体对运动心脏的影响 [J]. 上海体育学院学报, 2005(2): 39-43.
- [12] Li H, Miao W, Ma J, et al. Acute excise-induce mitochondrial stress triggers an inflammatory response in the myocardium via NLRP3 inflammasome activation with mitophagy [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016: 1987149.
- [13] Neerinx M, Sie DL, Dekker H, et al. miRNA expression profiles of paired primary colorectal cancer and metastases by next-generation sequencing [J]. Oncogenesis, 2015, 4(10): e170.
- [14] Kroesen BJ, Teteloshvili N, Brouwer E, et al. Immuno-miRNAs: Critical regulators of T-cell development, function and ageing [J]. Immunology, 2015, 144(1): 1-10.