

袁晓龙,潘金春,蒋瑶,等. miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对心肌梗塞后血管再生的作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 297-306.

Yuan XL, Pan JC, Jiang Y, et al. Effects of miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p and miR-27b-3p on angiogenesis after myocardial infarction [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 297-306.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.002

miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对心肌梗塞后血管再生的作用

袁晓龙^{1,2}, 潘金春¹, 蒋瑶², 龚宝勇¹, 高洪彬¹, 白国锋², 谭伟江¹, 梁十¹,
李加琪², 张豪^{2*}, 王希龙^{1*}

(1. 广东省实验动物重点实验室/广东省实验动物监测所, 广州 510663; 2. 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室/华南农业大学, 广州 510642)

【摘要】 目的 以五指山小型猪心肌梗塞模型为研究对象, 筛选对心肌梗塞易感且可能调控血管生成素-2 (ANGPT-2, 促血管生长和形成的重要基因) 表达的 miRNAs。以人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 为细胞模型, 探索候选 miRNAs 对人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移及细胞血管形成中的作用。方法 通过小 RNA 测序和生物信息学软件预测靶标于 ANGPT-2, 并且在心肌梗塞组和对照组中差异表达的 miRNAs, 利用 Edu 法、Transwell 法、体外实验法检测候选 miRNAs 对 HUVECs 的增殖、迁移和血管成腔的影响。结果 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 是潜在的靶标于 ANGPT-2, 并且在心肌梗塞和对照两组表达水平差异显著的 miRNAs。miR-144 不能直接影响 HUVECs 的增殖, 但能抑制细胞的迁移及血管形成; miR-21-3p 能抑制 HUVECs 增殖和迁移, 但促进 HUVECs 血管形成; miR-142-5p 和 miR-27b-3p 能抑制 HUVECs 增殖、迁移及成管; miR-142-5p 和 miR-27b-3p 能显著抑制 ANGPT-2 的转录表达。结论 心肌梗塞后, miR-142-5p 和 miR-27b-3p 可能通过靶标于 ANGPT-2 的 3'UTR 并且抑制 ANGPT-2 的转录表达, 抑制血管内皮细胞的增殖、迁移及血管形成, 进而抑制血管再生。

【关键词】 心肌梗塞; 血管再生; miRNAs; ANGPT-2

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 03-0297-10

Effects of miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p and miR-27b-3p on angiogenesis after myocardial infarction

YUAN Xiaolong^{1,2}, PAN Jinchun¹, JIANG Yao², GONG Baoyong¹, GAO Hongbin¹, BAI Guofeng²,
TAN Weijiang¹, LIANG Shi¹, LI Jiaqi², ZHANG Hao^{2*}, WANG Xilong^{1*}

(1. Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China. 2. Guangdong Provincial Key Lab of Agro-Animal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Corresponding author: ZHANG Hao. E-mail: zhanghao@scau.edu.cn; WANG Xilong. E-mail: wangxilonggd@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of microRNAs (miRNAs) on proliferation, migration and angiogenesis in a miniature pig model of myocardial infarction (MI). The miRNAs differently expressed between MI and

【基金项目】 国家自然科学基金(31572351), 广州市科技计划项目(201707010376)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31572351) and Science and Technology Program of Guangzhou (201707010376).

【作者简介】 袁晓龙(1991—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 猪表观遗传与功能基因组学。Email: yxlong032@163.com

【通信作者】 张豪(1965—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 猪遗传育种。Email: zhanghao@scau.edu.cn;

王希龙(1963—), 男, 研究员, 研究方向: 小型猪实验动物标准化及其应用研究。Email: wangxilonggd@163.com。

* 共同通信作者

control pigs were selected, in particular those potentially targeting the *ANGPT-2* gene (an important growth factor during angiogenesis), and their effects on proliferation, migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were investigated. **Methods** Bioinformatics software was used to predict the differentially expressed miRNAs targeting *ANGPT-2* in the MI and control groups. The effects of miRNAs on the proliferation, migration and angiogenesis of HUVECs were detected by EdU staining proliferation, transwell chamber and in vitro experimental method, respectively. **Results** miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p and miR-27b-3p were found to potentially target *ANGPT-2* and were significantly differently expressed between the MI and control groups. In HUVECs, miR-144 had no significant effect on proliferation, but significantly inhibited migration and vessel formation; miR-21-3p inhibited proliferation and migration, but promoted vessel formation; miR-142-5p and miR-27b-3p inhibited proliferation, migration and vessel formation. Of these four miRNAs, miR-142-5p and miR-27b-3p significantly inhibited the expression of *ANGPT-2* mRNA. **Conclusions** After MI, miR-142-5p and miR-27b-3p may inhibit angiogenesis by suppressing the proliferation, migration and vessel formation of vascular endothelial cells, by targeting the 3' UTR of *ANGPT-2* and down-regulating *ANGPT-2* mRNA expression.

【Keywords】 Myocardial infarction; angiogenesis; miRNAs; *ANGPT-2*

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心肌梗塞是指心肌因长时间缺血、缺氧导致的局部心肌细胞死亡、甚至心力衰竭,是一种高死亡率的严重心脏类疾病^[1]。从 1987 年到 2014 年,我国因心肌梗塞的死亡人数增加了 5.6 倍^[2],现在我国有大约 250 万心肌梗塞的患者^[3],2011 年我国因心肌梗塞而死亡的人数约占全年总死亡人数的 7.6%^[3],给社会和家庭带来沉重的负担,但心肌梗塞发生的详细分子机制尚不清楚,亟需开展相关的基础研究。研究表明,心肌梗塞后,心肌组织可能因缺氧引发血管内皮细胞凋亡、毛细血管密度不足,进而导致左心室功能障碍和心力衰竭^[4]。心肌梗塞后,梗塞区内是否有血管迅速再生、建立侧支循环改善梗塞区血液供应是防止病人心力衰竭的关键^[5]。大量研究表明,miRNAs 广泛参与血管生成的各个方面,是血管生成的重要调节器^[6-7],miRNAs 表达紊乱将导致心肌病变和心脏衰竭^[8-9]。与正常人相比,心肌梗塞后病人血清里 miR-1^[10]、miR-208^[11]、miR-21^[12]、miR-499^[7]和 miR-26A-1^[13]的表达量显著升高。Zhu 等^[14]研究发现 miR-486-5p 能通过激活 PI3K-Akt 信号通路抑制心肌细胞的凋亡,增强小鼠心室功能。与正常小鼠相比,miR-185-5p 在心肌梗塞小鼠心脏中的表达量显著降低,并且 miR-185-5p 能抑制血管内皮细胞的增殖、迁移和成管功能^[15]。这些证据表明,miRNAs 可能影响心肌梗塞后的血管再生、心脏功能的恢复。

血管生成素-2(*ANGPT-2*)基因作为 ANG 家族的成员,是一种重要的促血管生长和形成因子,主要在血管内皮细胞中表达,使血管处于不稳定、可塑状态,并易感受其它促血管生成因子的刺激,是

启动血管再次重构的主要因子^[16]。现有的研究认为,在心肌梗塞后,*ANGPT-2*的表达量显著升高^[17],启动血管再生、改善心脏功能、减缓心力衰竭^[18]。所以我们猜测,miRNAs 可能通过调控 *ANGPT-2* 的转录表达,进而影响心肌梗塞后的血管再生。

本研究以五指山小型猪心肌梗塞模型为研究对象,通过筛选心肌梗塞组(实验组,Group 1)和假手术组(对照组,Group 2)组织中差异表达的 miRNAs;利用生物信息学手段,预测靶标于 *ANGPT-2* 3' UTR 潜在 miRNAs,选择 Group 1 与 Group 2 中差异表达并且靶标于 *ANGPT-2* 的潜在 miRNA 为研究对象,以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为模型,探索这些 miRNAs 对血管内皮细胞增殖、迁移以及血管腔形成的影响。本研究能为进一步解析 miRNAs 与心肌梗塞后血管再生的关系提供了一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

用于构建心肌梗塞模型的 4 头健康的普通级、雄性、8 月龄五指山小型猪,体重为 20 ~ 25 kg,由广州市饲料研究所提供【SCXK(粤)2015-0036】,在广东省实验动物监测所【SYXK(粤)2016-0122】完成模型构建,实验动物伦理审批号为 IACUC2016011。

1.1.2 主要仪器和试剂

PCR 扩增仪(BIORAD, 美国);实时荧光定量 PCR 仪(BIORAD, 美国);倒置显微镜(Leica, 德

国);miRNAs 的 mimic 和 inhibitor(广州锐博生物科技有限公司,中国);ECM 基础培养基(ScienCell,美国);胎牛血清(Hyclone,美国);内皮细胞生长添加因子(ScienCell,美国);PBS(Hyclone,美国)。

1.2 方法

1.2.1 五指山小型猪心肌梗塞动物模型的建立

因受非洲猪瘟的影响,构建小型猪心肌梗塞模型受到限制,本研究共有 4 头五指山小型猪用于研究。根据前人的研究^[19-20],建立心肌梗塞模型主要步骤为:(1)模型组:2 头健康成年五指山小型猪麻醉后固定于手术台上,取右卧位,从第四肋打开胸腔,结扎冠状动脉后缝合,术后四周进行采样;(2)对照组:2 头健康成年五指山小型猪麻醉后固定于手术台上,取右卧位,从第四肋打开胸腔,不结扎冠状动脉、直接缝合,术后四周进行采样。经心肌梗塞处理的 2 头猪分别命名为 WZS1、WZS2,对照组的 2 头猪命名为 WZS3、WZS4。分别采集模型组心肌梗塞区域以及对照组的对应区域,将梗塞组的组织样命名为 Group 1,对照组的组织样命名为 Group 2。

1.2.2 miRNA 的测序

小 RNA 测序文库的制备采用 TruSeq SmallRNA Sample Prep Kits(Illumina, San Diego, USA)试剂盒。样本提取总 RNA 后,根据 miRNA 的属性,即 5'端为磷酸基团,3'端为羟基基团。利用 T4 RNA 连接酶 2 将一个腺苷化单链 DNA3'接头和 5'接头相继连接到 small RNA 上;通过与 3'端互补的 RT 引物进行反转录反应;对反转录产生的 cDNA 序列进行 PCR 扩增,对 140 ~ 160 bp 长度范围的 PCR 产物进行胶回收,从而完成整个文库的制备。对构建好的文库使用 Illumina Hiseq 2000/2500 进行测序,测序读长为单端 50 bp,将测序所得的序列,通过去接头、去污染等过程得到干净序列(clean reads),对其进行序列长度分布的统计。将干净的序列分类注释,可获得样品中包含的各组分及其表达量信息。将所有的 sRNA 片段注释后,用剩下的未注释片段来进行新 miRNA 的预测;已知 miRNA 的碱基编辑预测,统计 siRNA 的种类和数量,并对 sRNA 做长度分布统计分析。

1.2.3 差异表达 miRNAs 的筛选

去除表达量小于 1 的 miRNAs。使用公式 $\text{Fold change} = \log_2(\text{对照组}/\text{模型组})$ 计算两组表达量差异倍数,利用 Fisher test 比较两组间差异检验。以 $\log_2(\text{对照组}/\text{模型组}) \geq 2$ 或 $\log_2(\text{对照组}/\text{模型组}) \leq -2$ 的 miRNAs,并且 P 值小于等于 0.05 为差异显著

的 miRNAs。

1.2.4 qRT-PCR

细胞 RNA 的提取参照 Takara 公司 TRizol 操作说明书,基因及 miRNA 反转录分别采用 Thermo 公司的 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 和 TOYOBO 公司 ReverTra Ace qPCR RT Kit 试剂盒,通过普通 PCR 反应体系中加入 SYBR 荧光染料,特异性地掺入 DNA 双链,发射荧光信号,以此来保证荧光信号与 PCR 产物同步增加,miRNA 内参为 U6 最后利用结果比较 Ct 值法($2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$)检测样品 miRNAs 或基因的含量。

1.2.5 生物信息学预测 miRNAs 靶基因

提取 *ANGPT-2* 3' UTR 的 DNA 序列,使用 TargetScan、MiRanda、RNAhybrid 这 3 个软件预测靶标于 *ANGPT-2* 的潜在 miRNAs,三个软件同时预测到的 miRNAs 为 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p。

1.2.6 HUVECs 细胞的接种和转染

HUVECs 原代细胞购买于 ScienCell 公司,细胞复苏、传代后接种于细胞板中,当细胞汇合度达 50%左右时,对细胞进行转染,转染方法按 Invitrogen 公司的 Lipofectamine[®] 3000 试剂盒进行;具体是由锐博公司合成的 miR-144 mimic/inhibitor、miR-21-3p mimic/inhibitor、miR-142-5p mimic/inhibitor、miR-27b-3p mimic/inhibitor 以及对照组 mimic NC、inhibitor NC,通过与 Lipofectamine[®] 3000 试剂结合转染至细胞中,本实验每组设置 3 个重复。根据转染试剂推荐,miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p mimic 和 mimic NC 转染浓度为 50 nM,转染时间为 20 h;miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p inhibitor 和 inhibitor NC 的转染浓度为分别为 150 nmol/L、150 nmol/L、100 nmol/L 和 100 nmol/L,转染时间为 20 h。

1.2.7 HUVECs 细胞增殖检测

检测细胞增殖参照 Cell-Light[™] EdU Apollo 567 In vitro Kit 检测试剂盒,首先使用细胞培养基按比例稀释 EdU 溶液,制备 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 工作液;细胞融合度为 50% ~ 80%时,加入工作液孵育 2 h,随后弃工作液,用 4%多聚甲醛固定细胞,甘氨酸孵育中和,随后对细胞增殖进行检测,先避光加 $1 \times$ Apollo[®] 染色反应液,弃液,加入 DAPI 或 hrotest 反应液染色,最后利用荧光显微镜镜检,每组至少三个重复。

1.2.8 Transwell 实验

细胞转染后 24 h,用胰酶消化细胞后重悬,调整细胞浓度至 2×10^5 个/mL,transwell (8 μm) 上室加入 200 μL 细胞悬液,下室加入 600 μL 条件培养基(含有 10%FBS),培养 16 h 后,取出 transwell 小室,弃液,用棉签擦净小室上层细胞,PBS 漂洗后用 4% 多聚甲醛固定 20 min;0.1%结晶紫染色;10 倍镜下观察并拍照,选取上中下 3 个视野计数,取均值作为穿透膜细胞数,每组设 3 个重复。

1.2.9 HUVECs 体外的血管成腔

Matrigel 基质胶置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜解冻,冰冷无血清的 ECM 培养基稀释,冰上操作,将稀释好的培养基加入到预冷的培养板中,待凝固后,接种转染 24 h 后的细胞,培养 8 h 后,利用倒置显微镜下观察并拍照,每组设 3 个重复。

1.3 统计学分析

实验均设置三个独立的重复实验,结果表示为平均值 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$),采用 R 软件进行 Student's *t*-test 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性, $P < 0.01$ 表示差异具有极显著性。

2 结果

2.1 五指山小型猪心肌梗塞组与正常组 miRNAs 文库差异性分析

图 1A 显示了心肌梗塞模型组(Group 1)与假手术组(Group 2)两个 miRNA 文库检出的 miRNAs 情况。两组共检出的 miRNAs 为 645 个,其中 Group 1 与 Group 2 共同检出 511 个 miRNAs,Group 1 特异检

出 109 个 miRNAs,Group 2 特异检出 25 个 miRNAs (图 1A)。两组相比较,差异表达的 miRNAs 有 109 个($P < 0.05$) (图 1B),其中差异极显著的 miRNAs 有 25 个($P < 0.01$) (图 1B)。

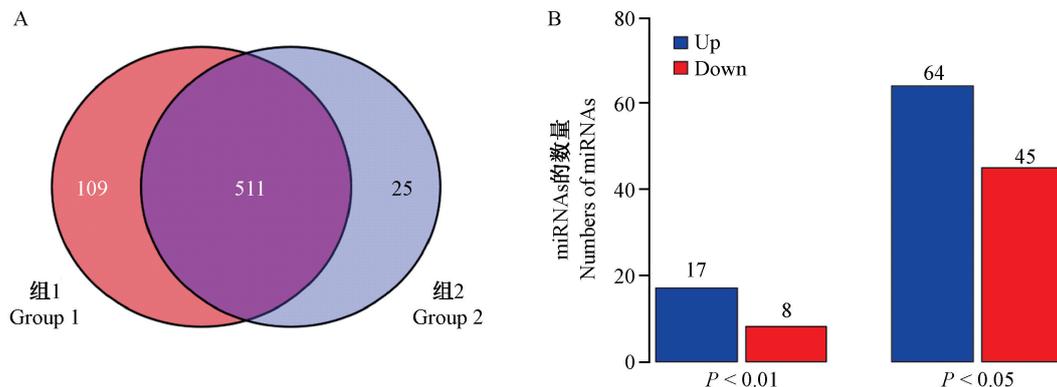
2.2 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 小片段转染 HUVECs 效率的检测

提取人的 *ANGPT-2* 3' UTR DNA 序列,使用 TargetScan、MiRanda、RNAhybrid 这 3 个软件预测靶标于 *ANGPT-2* 的潜在 miRNAs,三个软件同时预测到,并且在 2.1 中差异表达的 miRNAs 为 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p(图 2)。

我们进一步合成这 4 个 miRNAs 的 mimics 和 inhibitor,以 HUVECs 为细胞模型,探索它们在心梗塞后对血管再生的作用。经 qRT-PCR 检测,与 mimic 对照组相比,转染 miR-144(图 3A)、miR-21-3p(图 3B)、miR-142-5p(图 3C)及 miR-27b-3p(图 3D)的 mimic 后,它们在 HUVECs 中的相对表达量分别上调 2775、801、107 和 239 倍($P < 0.01$);与 inhibitor 对照组相比,在 HUVECs 中转染 miR-144(图 3E)、miR-21-3p(图 3F)、miR-142-5p(图 3G)及 miR-27b-3p(图 3H) inhibitor 后,它们的表达量分别下调了 10、4、33 和 50 倍数($P < 0.01$)。

2.3 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对 HUVECs 细胞增殖的影响

分别转染这 4 个 miRNAs 的 mimic 和 inhibitor 到 HUVECs,采用 Edu 法分别检测 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对 HUVECs 细胞增殖的影响(图 4)。结果显示,与 mimic NC 组相比,



注:A,心肌梗塞组(Group 1)与正常组(Group 2)心肌梗塞区域 miRNAs 检出情况。B,心肌梗塞组(Group 1)与正常组(Group 2) miRNAs 差异表达情况。

图 1 Group 1 与 Group 2 中 miRNAs 表达差异的情况

Note. A, Detection of Group 1 and Group 2 miRNAs. B, Differential expression of Group 1 and Group 2 miRNAs.

Figure 1 Differential expression of miRNAs between Group 1 and Group 2

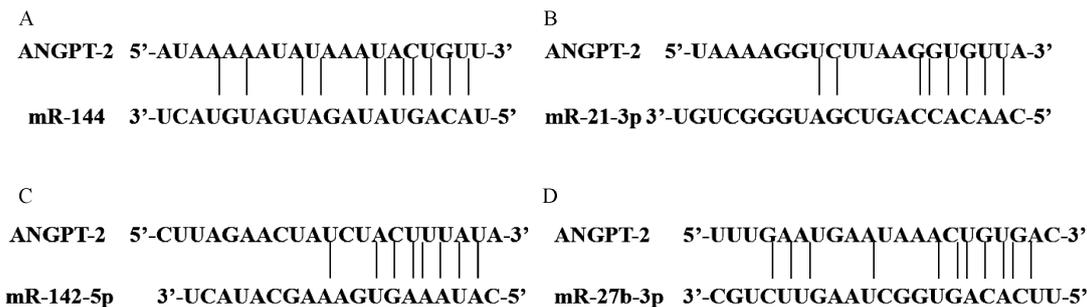
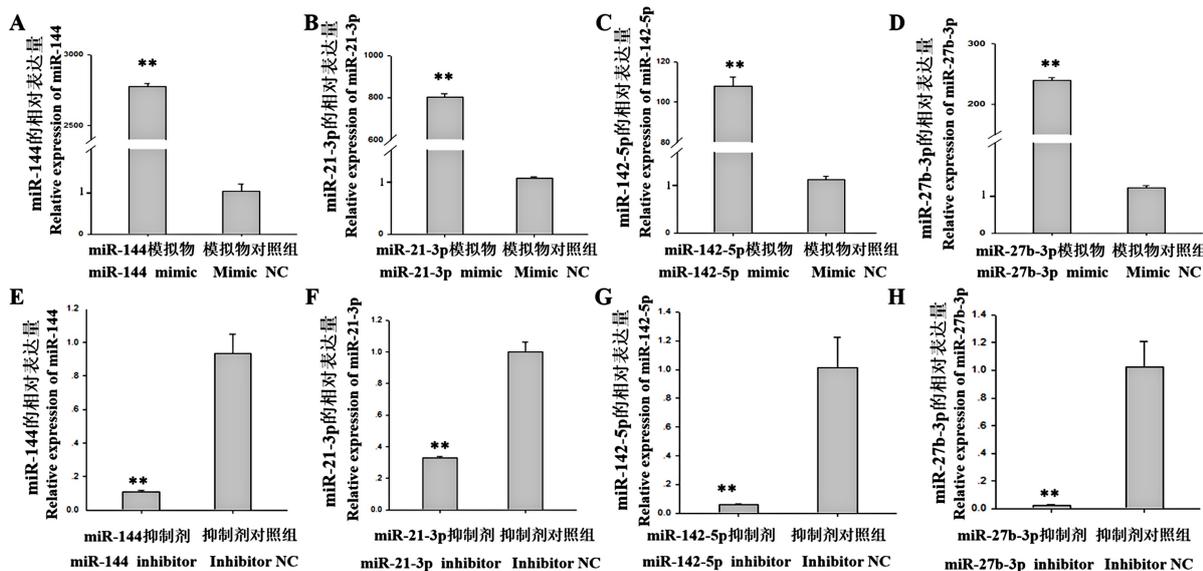


图 2 ANGPT-2 预测潜在 miRNAs 的结合位点示意图

Figure 2 Schematic diagram of binding sites predicted by ANGPT-2 for potential miRNAs



注: ** $P < 0.01$; 标尺为 $100 \mu\text{m}$ 。(下图同)

图 3 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p mimic 和 inhibitor 转染效果

Note: ** $P < 0.01$. Scale bars = $100 \mu\text{m}$. (The same in the following Figures)

Figure 3 Transfection effect of miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p, miR-27b-3p mimic and inhibitor

miR-144 mimic 促进 HUVECs 的细胞增殖 (图 4A, $P < 0.01$), 而 miR-21-3p mimic (图 4A, $P < 0.01$)、miR-142-5p mimic (图 4A, $P < 0.01$) 和 miR-27b-3p mimic (图 4A, $P < 0.01$) 显著抑制 HUVECs 细胞增殖; 与 inhibitor NC 组相比, miR-144 inhibitor 对 HUVECs 的细胞增殖无显著影响 (图 4B, $P > 0.05$), miR-21-3p inhibitor (图 4B, $P < 0.05$)、miR-142-5p inhibitor (图 4B, $P < 0.05$) 和 miR-27b-3p inhibitor (图 4B, $P < 0.05$) 能显著促进 HUVECs 的细胞增殖。

2.4 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对 HUVECs 细胞迁移的影响

为进一步探索 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对 HUVECs 细胞迁移的影响, 我们利用 Transwell 小室检测细胞迁移情况。结果显示: 与

mimic NC 相比, miR-144 mimic、miR-21-3p mimic、miR-142-5p mimic 和 miR-27b-3p mimic 能分别抑制 HUVECs 的迁移 (图 5A, $P < 0.01$); 与 inhibitor NC 相比, miR-144 inhibitor、miR-21-3p inhibitor、miR-142-5p inhibitor 和 miR-27b-3p inhibitor 能分别促进 HUVECs 的迁移 (图 5B, $P < 0.01$)。

2.5 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对 HUVECs 血管形成的影响

我们进一步探索了 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对 HUVECs 细胞血管形成的影响。结果显示: 与 mimic NC 相比, miR-144 mimic ($P < 0.01$)、miR-142-5p mimic ($P < 0.01$) 和 miR-27b-3p mimic ($P < 0.01$) 能分别显著抑制 HUVECs 的血管形成 (图 6A), miR-21-3p mimic 对血管形成无显著影响 ($P > 0.05$) (图 6A); 与 inhibitor NC 相

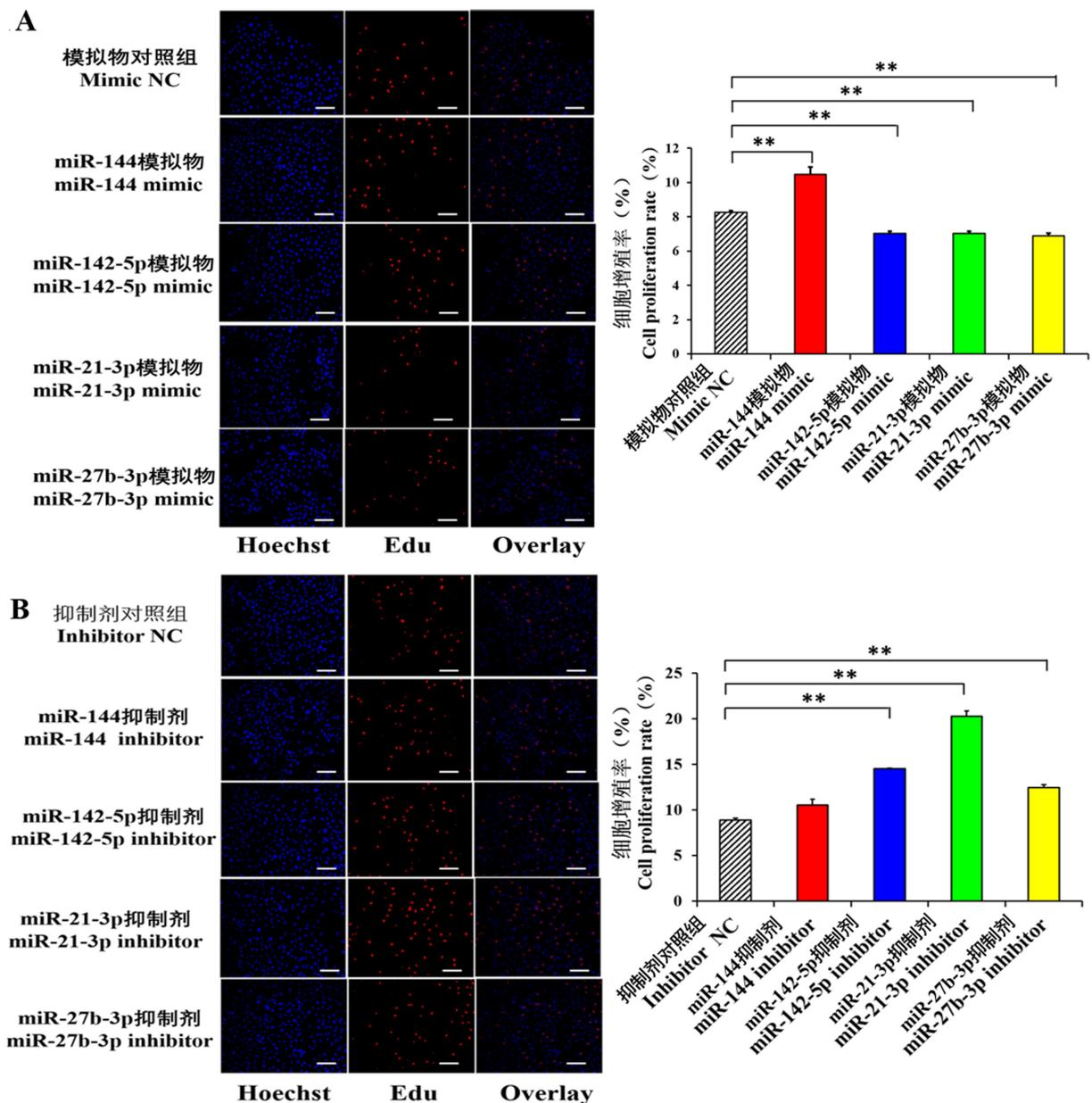


图4 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p及miR-27b-3p mimic(A)和inhibitor(B)对HUVECs细胞增殖的影响

Figure 4 Effects of miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p and miR-27b-3p mimic (A) and inhibitor (B) on the proliferation of HUVECs

比, miR-144 inhibitor ($P < 0.01$)、miR-21-3p inhibitor ($P < 0.01$)、miR-142-5p inhibitor ($P < 0.01$)和miR-27b-3p inhibitor ($P < 0.01$)能分别显著促进HUVECs的血管形成(图6B)。

2.6 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p及miR-27b-3p对ANGPT-2转录表达的影响

为了探究miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p及miR-27b-3p对潜在靶基因ANGPT-2转录表达的影响,在HUVECs中转染miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p和miR-27b-3p mimic及inhibitor 24 h后,我

们检测了ANGPT-2 mRNA表达量。结果显示:与mimic NC组相比,转染miR-144 mimic(图7A, $P < 0.01$)、miR-21-3p mimic(图7B, $P < 0.01$)、miR-142-5p mimic(图7C, $P < 0.01$),和miR-27b-3p mimic(图7D, $P < 0.01$)均能显著下调ANGPT-2 mRNA的水平;与inhibitor NC组相比,转染miR-144 inhibitor(图7E, $P < 0.01$)和miR-21-3p inhibitor(图7F, $P < 0.01$)能显著下调ANGPT-2 mRNA的水平,但是miR-142-5p inhibitor(图7G, $P < 0.01$)和miR-27b-3p inhibitor(图7H, $P < 0.01$)能显著上调

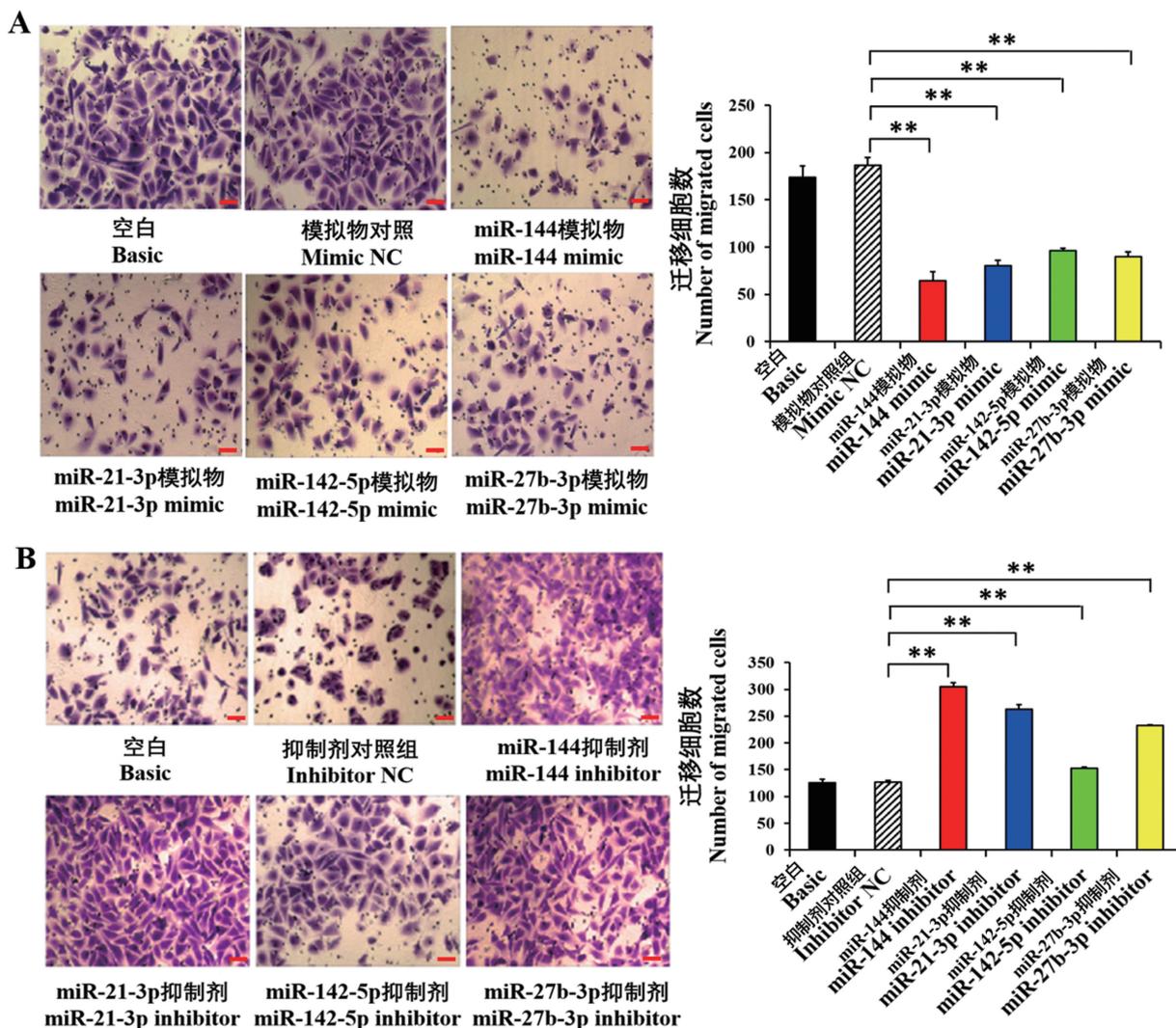


图 5 miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p 及 miR-27b-3p mimic (A) 和 inhibitor (B) 对 HUVECs 迁移的影响
 Figure 5 Effects of miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p and miR-27b-3p mimic (A) and inhibitor (B) on the migration of HUVECs migration

ANGPT-2 mRNA 的水平。

3 讨论

与大鼠、小鼠等模型动物相比,猪冠状动脉血液供应分布几乎与人相同,心脏和血管尺寸更接近人;五指山小型猪由于体型小、便于操作是研究心肌梗塞的合适模型^[21-22]。目前,人们利用五指山小型猪成功的构建了多种疾病模型,对于构建不同疾病模型,方法上也有所不同,但技术已经相当成熟。顾晓龙等^[23]利用介入封堵法构建了五指山小型猪的急性心肌梗塞合并急性心力衰竭模型,苏强等^[24]应用微导管介入技术建立小型猪急性冠状动脉微栓塞模型。这些证据表明,五指山小型猪疾病模型

已广泛应用于人类疾病的病理研究。研究表明,miR-21^[25]、miR-1^[26]、miR-186-5p^[27]、miR-208^[28]、miR-499^[28]等由于在心肌梗塞早期高表达量,并推荐这些 miRNAs 可以作为心肌梗塞疾病的标记物。这些研究表明,miRNAs 可能在心肌梗塞后血管再生中起着重要作用。

提取 ANGPT-2 3' UTR 的 DNA 序列,使用 TargetScan、MiRanda、RNAhybrid3 个预测软件,预测 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 可能靶标于 ANGPT-2 (图 2)。心肌梗塞的小鼠与对照组的小鼠相比,敲除 miR-144 能显著抑制细胞外基质的重塑,增加心肌梗塞区域,阻碍心脏的重塑和心脏功能的恢复^[29]。miR-21 在心脏结构重构、冠

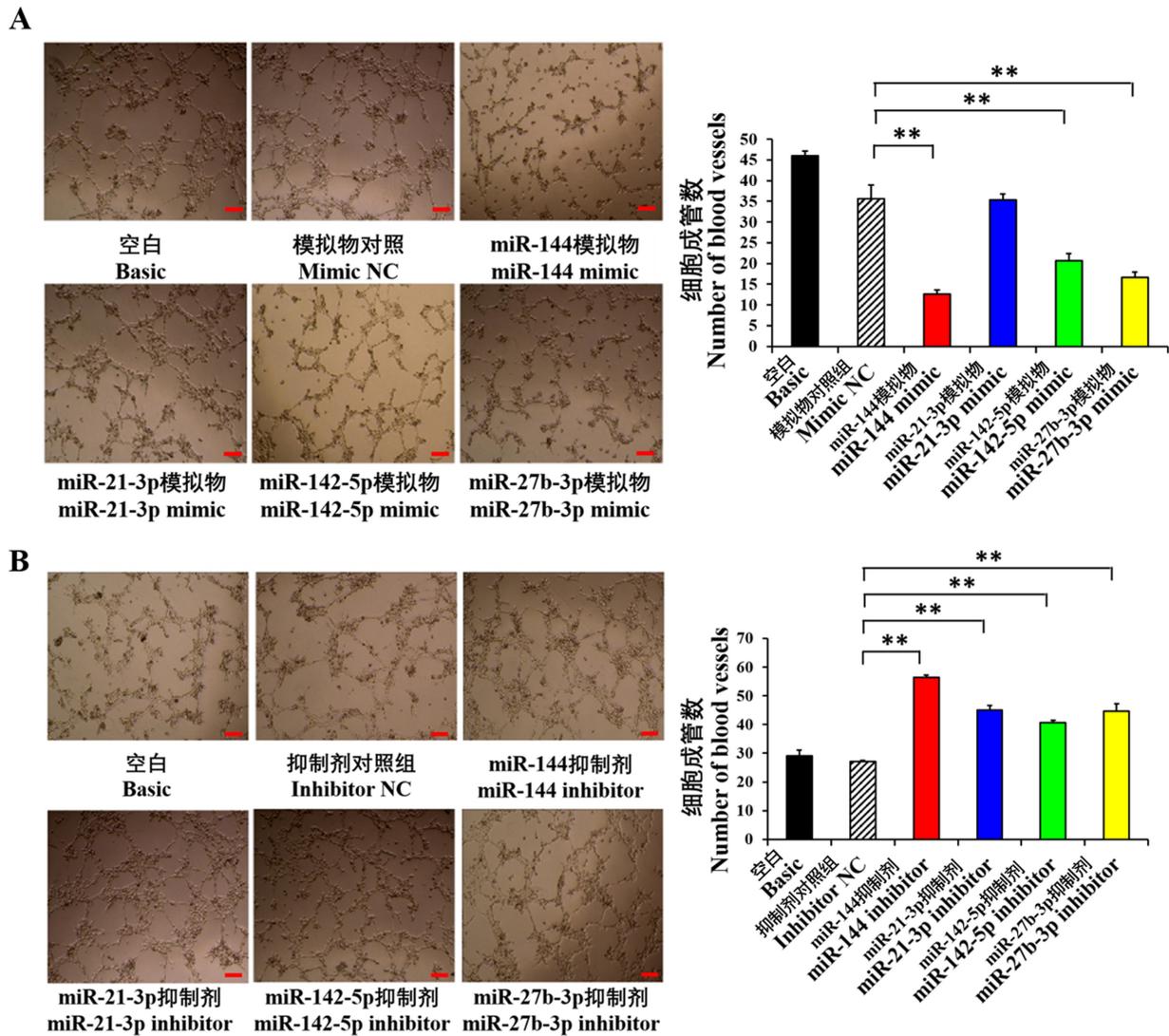


图 6 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p mimic (A) 和 inhibitor (B) 对 HUVECs 血管形成的影响

Figure 6 Effects of miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p and miR-27b-3p mimic (A) and inhibitor (B) on the formation of blood vessels in HUVECs

心病等方面都发挥着重要的生物学作用,是心肌梗塞疾病发生前期的标志物^[30]。miR-142-5p 被认为是心力衰竭标志 miRNAs 之一,miR-142-5p 可以通过靶标 *TP53INP1* 基因调控心肌细胞的损伤修复^[31]。在心肌细胞中,miR-27b 的高表达能引发心肌肥大和心脏功能障碍^[32]。这些证据表明,miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 在心脏类疾病中扮演着重要角色。在本研究中,分别转染了 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 的 mimics 和 inhibitor 后,检测了 *ANGPT-2* 的相对表达量变化(图 7)。我们发现,miR-144 和 miR-21-3p 的 mimic 及 inhibitor 均显著上调 *ANGPT-2* mRNA 的表达水平(图 7A, B, E, F),可能是 miR-144 和 miR-

21-3p 不直接靶标并调控 *ANGPT-2* 的表达,而 miR-144 和 miR-21-3p 的真实靶基因可能间接影响 *ANGPT-2* 的转录表达;另外,miR-142-5p 和 miR-27b-3p mimics 能显著下调 *ANGPT-2* 的表达量(图 7C, D),而 miR-142-5p 和 miR-27b-3p inhibitor 能显著上调 *ANGPT-2* 的表达量(图 7G, H)。这些结果表明,miR-142-5p 和 miR-27b-3p 可能通过靶标于 *ANGPT-2* 3'UTR 并且抑制 *ANGPT-2* 的转录表达。

心肌梗塞后,修复心脏功能的关键是毛细血管网能否重建即血管再生。在本研究中,利用 EDU(图 4)、transwell(图 5)以及体外成腔(图 6)实验方法,检测超表达或抑制 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p 后, HUVECs 细胞的增殖、迁

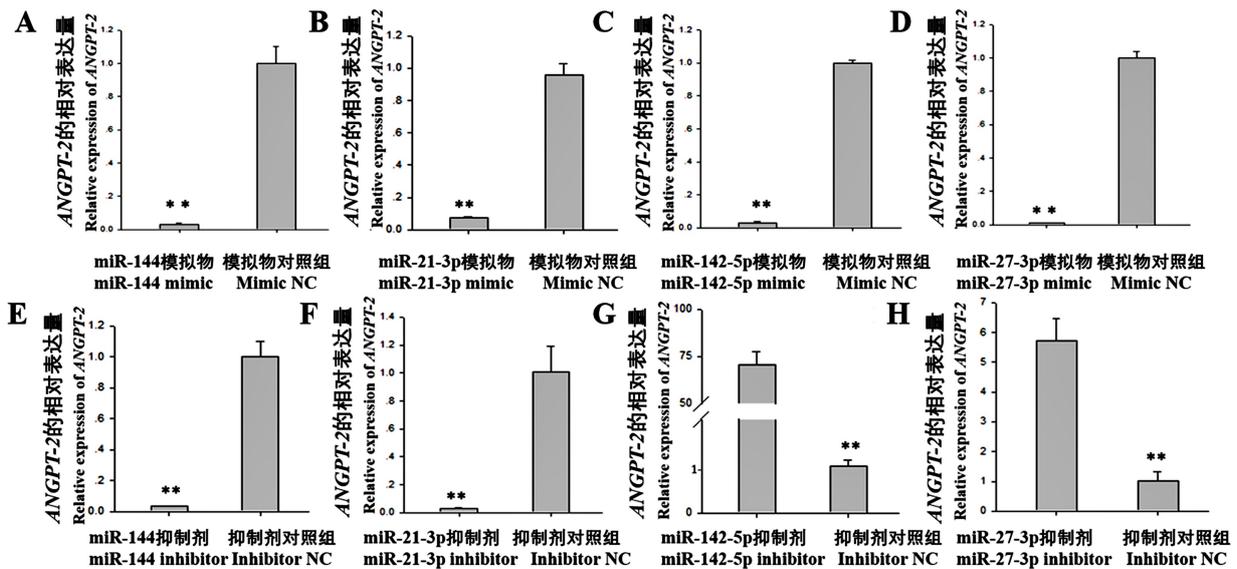


图 7 miR-144、miR-21-3p、miR-142-5p 及 miR-27b-3p mimic 和 inhibitor 对 ANGPT-2 转录表达的影响

Figure 7 Effects of miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p and miR-27b-3p mimic and inhibitor on the mRNA expression of ANGPT-2

移及血管形成情况。从 Edu 结果来看,转染 miR-144 mimic/inhibitor 后,细胞增殖的趋势是一致的(图 4A,B),推测 miR-144 并不能直接影响 HUVECs 的增殖,但 transwell 以及体外成腔实验结果表明,miR-144 能抑制细胞的迁移及成管(图 5 和图 6)。miR-21-3p 能抑制 HUVECs 细胞增殖和迁移(图 4); miR-21-3p mimic 对 HUVECs 成管无显著影响(图 6A),但 miR-21-3p inhibitor 能显著促进 HUVECs 成管(图 6B),猜测 miR-21-3p 不能直接影响 HUVECs 的成管,可能是 miR-21-3p 调控的靶基因对血管形成有间接作用。miR-142-5p 和 miR-27b-3p 能抑制 HUVECs 细胞增殖、迁移及成管(图 4-6)。这些结果表明,心肌梗塞后,miR-142-5p 和 miR-27b-3p 可能通过靶标于 ANGPT-2 的 3'UTR 并且抑制 ANGPT-2 的转录表达,抑制血管内皮细胞的增殖、迁移及血管形成,进而抑制血管再生、阻碍心脏功能的恢复。这些结果为深入探索 miRNAs 调控心肌梗塞后的血管再生提供一定的参考。

参 考 文 献(References)

[1] Clement C, Channon KM, Jean-Sébastien S. Angiogenesis in the infarcted myocardium[J]. Antioxid Redox Signal, 2013,18(9): 1100-1113.
 [2] Chang J, Liu X, Sun Y. Mortality due to acute myocardial infarction in China from 1987 to 2014: Secular trends and age-period-cohort effects[J]. Int J Cardiol, 2017, 227: 229-238.
 [3] Acharya D. Predictors of outcomes in myocardial infarction and cardiogenic shock[J]. Cardiol Rev, 2018,26(5):255-266.
 [4] Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, et al. MicroRNA-24

regulates vascularity after myocardial infarction[J]. Circulation, 2011,124(6):720-730.
 [5] Fish JE, Srivastava D. MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research[J]. Sci Signal, 2009,2(52):pe1.
 [6] Tiwari A, Mukherjee B, Dixit M. MicroRNA key to angiogenesis regulation: MiRNA biology and therapy. Curr Cancer Drug Targets, 2018, 18(3):266-277.
 [7] Liu X, Fan Z, Zhao T, et al. Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population [J]. Exp Gerontol, 2015, 72:230-238.
 [8] Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, et al. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure[J]. Circ Res, 2009,105(6):585-594.
 [9] Liu X, Cheng Y, Zhang S, et al. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia[J]. Circ Res, 2009,104(4):476-487.
 [10] Ai J, Zhang R, Li Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,391(1):73-77.
 [11] Han Z, Zhang L, Yuan L, et al. Change of plasma microRNA-208 level in acute myocardial infarction patients and its clinical significance[J]. Ann Transl Med, 2015,3(20):307.
 [12] Zhang Y, Liu YJ, Liu T, et al. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016,20(2):323-329.
 [13] Xue S, Zhu W, Liu D, et al. Circulating miR-26A-1, miR-146a and miR-199A-1 are potential candidate biomarkers for acute myocardial infarction[J]. Mol Med, 2019,25(1):18.
 [14] Zhu HH, Wang XT, Sun YH, et al. MicroRNA-486-5p targeting PTEN protects against coronary microembolization-induced cardiomyocyte apoptosis in rats by activating the PI3K/

- AKT pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 855:244–251.
- [15] Li CC, Qiu XT, Sun Q, et al. Endogenous reduction of miR-185 accelerates cardiac function recovery in mice following myocardial infarction via targeting of cathepsin K [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2):1164–1173.
- [16] 黄颂敏, 陈泽君, 杨亦彬, 等. 血管生成素及其受体、血管内皮生长因子与糖尿病肾脏微血管病变的关系[J]. *中华肾脏病杂志*, 2006, 22(9):521–527.
- Huang SM, Chen ZJ, Yang YB, et al. The correlation of angiopoietins/Tie-2 axis and VEGF with renal microvascular disease in diabetic rats [J]. *Chin J Nephrol*, 2006, 22(9):521–527.
- [17] 蔡大伟, 陈晓楠, 刘学峰, 等. 血管生成素-2 及其受体 Tie2 在肾癌中的表达及与微血管密度的关系[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2010, 24(1):26–28.
- Cai DW, Chen XN, Liu XF, et al. Expressions of angiopoietin-2 and Tie-2 in clear cell renal carcinoma and the relationship with microvascular density [J]. *J Chin Pract Diagn Ther*, 2010, 24(1):26–28.
- [18] 颜芳, 欧希龙. 血管生成素-1 和 2 在肿瘤血管生成中的作用[J]. *现代医学*, 2007, 35(1):75–78.
- Yan F, Ou XL. The role of angiogenin-1 and 2 in tumor angiogenesis [J]. *Modern Med J*, 2007, 35(1):75–78.
- [19] Lopez E, Miguel Sanchez-Margallo F, Alvarez V, et al. Identification of very early inflammatory markers in a porcine myocardial infarction model [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1):91.
- [20] Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs [J]. *Nature*, 2019, 569(7756):418–422.
- [21] Qiong H, Haibin X, Zhou Y, et al. Inbred Chinese Wuzhishan (WZS) minipig model for soybean glycinin and beta-conglycinin allergy [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(8):5194–5198.
- [22] 张晶, 傅向华, 贾辛未, 等. 小型猪急性心肌梗死后心力衰竭模型的构建[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(1):33–36.
- Zhang J, Fu XF, Jia XM, et al. Establishment of a mini pig model of ischemic heart failure with acute myocardial infarction by coronary balloon occlusion and injection of in termixture of microthrombi and plastic microspheres [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2010, 18(1):33–36.
- [23] 顾晓龙, 黄军, 董正华, 等. 五指山小型猪急性心肌梗死合并急性心力衰竭模型的建立及评价[J]. *中国老年学*, 2013, 33(23):5932–5934.
- Gu XL, Huang J, Dong ZH, et al. Establishment and evaluation of acute myocardial infarction combined with acute heart failure in wuzhishan miniature pig [J]. *Chin J Gerontol*, 2013, 33(23):5932–5934.
- [24] 苏强, 李浪, 马国添, 等. 猪急性冠状动脉微栓塞模型的建立[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(4):335–339.
- Su Q, Li L, Ma GT, et al. Establishment of acute coronary artery microembolization model in pigs [J]. *Chin J Arterioscler*, 2014, 22(4):335–339.
- [25] Eva VR, Lillian BS, Jeffrey ET, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35):13027–13032.
- [26] Ai J, Zhang R, Li Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1):73–77.
- [27] Wang KJ, Zhao X, Liu YZ, et al. Circulating MiR-19b-3p, MiR-134-5p and MiR-186-5p are promising novel biomarkers for early diagnosis of acute myocardial infarction [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(3):1015–1029.
- [28] Xi C, Zhang L, Tong S, et al. Kinetics of plasma microRNA-499 expression in acute myocardial infarction [J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(5):890–896.
- [29] He Q, Wang F, Honda TQ, et al. Loss of miR-144 signaling interrupts extracellular matrix remodeling after myocardial infarction leading to worsened cardiac function [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):16886.
- [30] 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 U S A*, 2008, 105(35):13027–13032.
- [31] Du J, Yang ST, Liu J, et al. Silence of lncRNA GAS5 protects cardiomyocytes H9c2 against hypoxic injury via sponging miR-142-5p [J]. *Mol Cells*, 2019, 42(5):397–405.
- [32] Wang J, Zhan D, Zha L, et al. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice [J]. *Cell Res*, 2012, 22(3):516–527.

[收稿日期] 2019-11-01