

心血管疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000494

miR-208a 在大鼠心肌缺血再灌注损伤及缺血后处理中的表达及其作用

陈 耽, 李骊华

(重庆医科大学附属第一医院心血管内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨 miR-208a 及 α -肌球蛋白重链(α -myosin heavy chain, α -MHC)、 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)在大鼠心肌缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IR)及缺血后处理(ischemic postconditioning, IPO)中的表达变化及其作用。**方法:**取 SD 大鼠,使用改良垫扎球囊法建立 IR 模型,随机分为 3 组(每组 6 只),Sham 组、IR 组、IPO 组。检测各组血流动力学指标;real-time PCR 检测 miR-208a、 α -MHC、 β -MHC 基因表达;Western blot 检测 α -MHC、 β -MHC 蛋白含量。**结果:**与 IR 组相比,IPO 能明显降低左室舒张末期容积(left ventricular end diastolic volume, LVEDV)和左室收缩末期容积(left ventricular end systolic volume, LVESV),增加左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fraction shorting, LVFS),改善心功能。miR-208a 表达水平在 IR 组明显增加,IPO 组明显降低。 β -MHC 表达在 IR 组明显上调,IPO 组明显下调,且基因和蛋白表达水平一致。 α -MHC 基因和蛋白表达水平在 3 组无明显差异。**结论:**miR-208a 和 β -MHC 在缺血再灌注组明显增加,缺血后处理能使 miR-208a 和 β -MHC 表达下降,并在一定程度上改善心功能。

【关键词】miR-208a;缺血再灌注损伤;缺血后处理; α -肌球蛋白重链; β -肌球蛋白重链。

【中图分类号】R541.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-06-11

Expression and mechanism of miR-208a in rat myocardial ischemia reperfusion injury and ischemic postconditioning

Chen Dan, Li Lihua

(Department of Cardiovasology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the expression changes of miR-208a in rat acute myocardium ischemia reperfusion injury (IR) and ischemic postconditioning, to investigate the probable mechanism of miR-208a in the protection of ischemic postconditioning. **Methods:** Sprague-Dawley rats were randomly assigned into 3 groups: sham operation group, ischemia reperfusion group and ischemic postconditioning group. The hemodynamic values and cardiac function were analyzed by echocardiography. The gene expression of miR-208a, α -MHC, and β -MHC was detected by real-time PCR. Western blot was used to assess the protein expression of α -MHC and β -MHC in the area at risk at the end of reperfusion. **Results:** Postconditioning *in vivo* rats reduced the hemodynamic values of left ventricular end diastolic volume (LVEDV), left ventricular end systolic volume (LVESV) and improved the values of left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fraction shorting (LVFS). The expression of miR-208a was higher in ischemia reperfusion group than in sham operation group, and was lower in ischemic postconditioning group than in ischemia reperfusion group. Meanwhile, β -MHC mRNA level was higher in ischemia reperfusion group than in sham operation group, and was lower in ischemic postconditioning than in ischemia reperfusion group; the protein expression of β -MHC was consistent with the gene expression level. The expression of α -MHC was not statistically different among the three groups. **Conclusion:** The expression of miR-208a and β -MHC in ischemia reperfusion group is statistically increased. Postconditioning could depress the expression of miR-208a and β -MHC, and play a role in the protection of postconditioning.

【Key words】miR-208a; ischemia reperfusion injury; ischemic postconditioning; α -myosin heavy chain; β -myosin heavy chain

作者简介:陈 耽, Email: jianfeihan.shang@qq.com,

研究方向: 冠状动脉粥样硬化性心脏病。

通信作者:李骊华, Email: lilihua926@163.com。

基金项目:国家临床重点专科建设项目经费资助(编号:财社[2011]170号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2338.020.html>
(2015-03-08)

溶栓和经皮冠状动脉介入(percutaneous coronary intervention, PCI)等早期再灌注治疗能快速地开通闭塞冠状动脉,恢复血流,使急性心肌梗死(α -cute myocardial infarction, AMI)病死率明显下降。但存在再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IR)且影响患者心脏功能^[1]。目前 AMI 后心力衰竭的发病率仍在 45%以上^[2]。

缺血后处理(ischemic postconditioning, IPO),即在心肌缺血后予以短暂的再灌注缺血循环,而后恢复灌注。实验证明 IPO 能减轻缺血再灌注损伤^[3]。 α -肌球蛋白重链(α -myosin heavy chain, α -MHC)、 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)是机体心肌细胞主要的收缩蛋白^[4]。大鼠的 β -MHC 主要表达于胚胎期,出生后几乎被 α -MHC 所代替,但在心力衰竭、血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 增加等病理条件下会表达增加,因此 α -MHC 向 β -MHC 的转换也被视为心力衰竭的重要标志^[5]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内源性小分子单链非编码 RNA^[6]。miR-208a 属 MyomiRs 家族,即肌球蛋白基因内含子编码的 miRNA 家族^[7]。有研究发现, miR-208a 上调可间接使 β -MHC 表达增加^[7-9]。关于 miR-208a 和 α -MHC、 β -MHC 在缺血再灌注损伤及缺血后处理中表达国内外暂无报道。因此,本实验拟构建缺血再灌注,缺血后处理模型,并初步探讨 miR-208a 及 α -MHC、 β -MHC 在缺血再灌注损伤及缺血后处理中的表达变化,及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Real-time PCR 所用提取分离试剂盒,逆转录试剂盒及荧光定量检测试剂盒购于日本 Takara 公司;引物均由宝生物工程(大连)有限公司设计合成。兔抗鼠 α -MHC、 β -MHC 一抗,内参 GAPDH 一抗及羊抗兔二抗均购于美国 Proteintech 公司。蛋白裂解液 RIPA、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光试剂盒等,均购自碧云天生物技术公司;PVDF 膜 (0.45 μ m) 购自美国 Millipore 公司。冠脉介入用球囊,购自美国美敦力公司。

1.2 实验动物及分组

清洁级 SD 雄性大鼠 18 只,体质量 220~270 g,购自重庆医科大学实验动物中心。随机分为假手术组(Sham 组,6 只),缺血再灌注组(IR 组,6 只),缺血后处理组(IPO 组,6 只)。饲养于重庆医科大学附属第一医院实验研究中心动物房内,恒温恒湿,常规喂养。

1.3 动物模型的制备

参照孙胜等^[10]使用改良垫扎球囊法建立 IR 模型,腹腔注射 3.5%水合氯醛(0.35 mg/g)麻醉动物,仰卧位固定,气管插管后连接动物呼吸机辅助呼吸(呼吸参数:潮气量 2~3 ml/100 g,频率 80 次/min,呼吸比 1:1),连接 II 导联记录心电图变化。手术消毒铺巾,快速开胸暴露心脏。撕开心包轻轻挤出心脏,于左心耳下缘,肺动脉圆锥旁以 6-0 线缝针穿过左冠状动脉前降支深部,连同心大静脉、注水球囊(垫于血管与结扎线之间)一齐结扎。收紧结扎线使球囊压迫左冠状动脉前降支造成心肌前壁缺血,结扎后缺血左室壁发绀或呈浅红色,且室壁运动减弱,心电图出现 ST 段抬高。30 min 后,迅速将球囊中的水吸出解除对血管的压迫,缺血区发绀消失,抬高的 ST 段恢复正常或下降超过 50%以上,视为制作大鼠在体急性心肌缺血再灌注模型成功建立,恢复再灌 2 h。IPO 组在再灌注开始瞬间予再灌注缺血循环(再灌注 30 s/缺血 30 s)3 次,余处理同缺血再灌注组;Sham 组除缝线不结扎外,余处理同缺血再灌注组。

1.4 血流动力学检测

分别于术前及再灌注 2 h 后对各组大鼠行经胸超声心动图检查。取二尖瓣前乳头肌水平,通过左室短轴切面检测左室舒张末期容积(left ventricular end diastolic volume, LVEDV)、左室收缩末期容积(left ventricular end systolic volume, LVESV)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fraction shorting, LVFS)等指标评价大鼠心脏功能。

1.5 Real-time PCR 检测缺血心肌 miR-208a 表达

再灌注 2 h 后取缺血区心肌,立即置于液氮罐中冻存后转至 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱存放。按 miRNA 提取试剂盒(RNAiso for Small RNA Code No.:9753A)说明书提取缺血心肌组织中总 miRNA。应用 ND-2000 超微量分光光度计测定样品浓度及吸光度 $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值范围在 1.8~2.2 为纯度合格。使用 SYBR[®] PrimeScript[™] miRNA RT-PCR 试剂盒对 miR-208a 3'末端加多聚 A 尾 poly(A),并对 Poly(A)修饰的 miR-208a 进行逆转录反应生成 1st Strand cDNA,再进行 real-time PCR 反应,操作参照 SYBR[®] PrimeScript[™] miRNA RT-PCR(Code No.:RR716)试剂盒说明书。以 U6 为内参,标准化 miRNA 含量。miR-208a 含量由 delta-delta Ct 公式计算得出,每个样品重复 3 次。

1.6 Real-time PCR 检测缺血心肌 α -MHC、 β -MHC mRNA 表达

按 mRNA 提取试剂盒(RNAiso Plus Code No.:9018)说明书提取缺血心肌组织中总 mRNA,测定浓度及纯度。使用 mRNA 逆转录试剂盒(PrimeScript[™] RT reagent Kit Code No.:RR037A)对总 mRNA 进行逆转录反应生成相应的 cDNA,再进行 real-time PCR 反应,操作参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] mRNA real-time PCR(Code No.:RR420A)试剂盒说明书。并以 β -actin 为内参,标准化 mRNA 含量。目的基因含量由 delta-delta Ct 公式计算得出,每个样品重复 3 次。

表 1 Real-time PCR 引物
Tab.1 Real-time PCR primer

引物		引物序列 5'-3'
miR-208a	Forward Primer	CGCGGCATAAGACGAGCAAAAAGC
U6	Forward Primer	CTCGCTTCGGCAGCACA
a-MHC	Forward Primer	GACTTTGACGGTGACGA
	Reverse Primer	TGGAGTGTGTGTGGAGC
β-MHC	Forward Primer	GAGACGGACGCCATACA
	Reverse Primer	CGCTCCACATCCACCA
β-actin	Forward Primer	CGTGGGTGACATTAAGAG
	Reverse Primer	TTGCCGATAGTGATGACCT

1.7 Western blot 检测缺血心肌 α-MHC、β-MHC 蛋白表达

取缺血心肌组织 100 mg 加入蛋白裂解液,匀浆(冰上操作),离心后取上清。BCA 法检测蛋白浓度,每组取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,半干法转移凝胶至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h;一抗(1:1 000 稀释)4 ℃摇床孵育过夜;TBST 洗膜 3 次后,辣根过氧化物酶标记二抗(1:1 000 稀释)37 ℃摇床孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,ECL 化学发光显色。使用 Fusion FX7 图像分析软件对光密度进行分析,最终结果以 α-MHC、β-MHC 和内参 GAPDH 的光密度比值表示。

1.8 统计学方法

实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。符合状态分布计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较应用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t*、Tamhane's T2 检验。相关性采用直线相关(Pearson 相关)分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

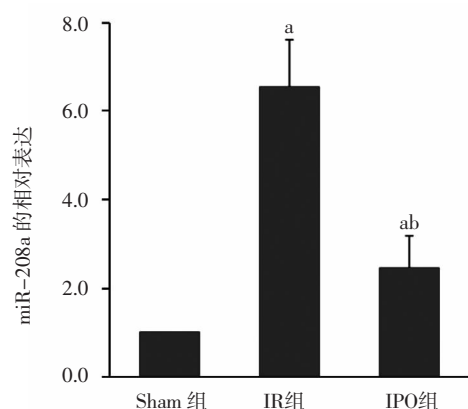
2.1 血流动力学检测

术前各组大鼠 LVEDV、LVESV、LVEF 与 LVFS 差异无统计学意义。再灌注 2 h 后,IR 组与 Sham 组相比 LVEDV、LVESV 明显增加($P=0.016$ 、 $P=0.000$),LVEF 与 LVFS 明显降

低($P=0.000$ 、 $P=0.000$);IPO 组与 Sham 组相比 LVEDV 无统计学差异($P=0.791$),LVESV 明显增加($P=0.002$),LVEF 与 LVFS 明显降低($P=0.001$ 、 $P=0.000$);IPO 组与 IR 组相比 LVEDV、LVESV 明显降低($P=0.028$ 、 $P=0.001$),LVEF、LVFS 明显增加($P=0.011$ 、 $P=0.036$)(表 2)。

2.2 miR-208a 表达变化

miR-208a 表达水平在 IR、IPO 组较 Sham 组明显增加($P=0.000$ 、 $P=0.013$);IPO 组较 IR 组明显降低($P=0.000$)(图 1)。



注:a. 与 Sham 比较有统计学意义($P<0.05$);
b. 与 IR 组比较有统计学意义($P<0.05$)

图 1 缺血心肌 miR-208a 表达变化

Fig.1 Changes in expression of miR-208a detected by real-time PCR

2.3 α-MHC、β-MHC mRNA 表达变化

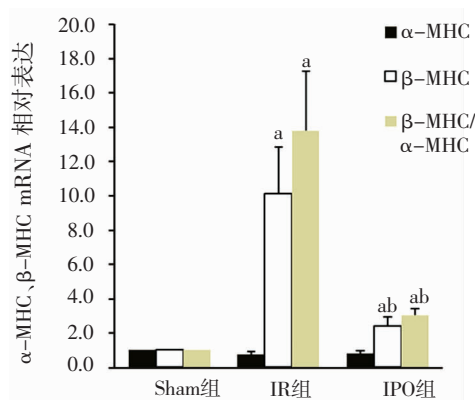
α-MHC mRNA 表达水平在 IR、IPO 组较 Sham 组降低,但无明显统计学意义($P=0.075$ 、 $P=0.109$)。β-MHC mRNA 表达水平在 IR、IPO 组较 Sham 组明显增加($P=0.001$ 、 $P=0.004$);IPO 组较 IR 组明显降低($P=0.002$)。β-MHC/α-MHC mRNA 相对表达比值在 IR、IPO 组较 Sham 组明显增加($P=0.001$ 、 $P=0.000$);IPO 组较 IR 组明显降低($P=0.002$)(图 2)。

表 2 各组血流动力学结果比较

Tab.2 Comparison on cardiac function parameters

组别		LVEDV (ml)	LVESV (ml)	LVEF (%)	LVFS (%)
术前	sham组	0.21 ± 0.02	0.04 ± 0.01	83.30 ± 3.69	45.10 ± 4.35
	IR组	0.20 ± 0.02	0.03 ± 0.01	83.56 ± 4.17	45.47 ± 5.03
	IPO组	0.20 ± 0.02	0.03 ± 0.01	84.04 ± 4.66	46.18 ± 5.23
	F 值	0.103	0.046	0.048	0.075
	P 值	0.903	0.955	0.954	0.928
再灌后	sham组	0.22 ± 0.02	0.04 ± 0.01	82.60 ± 4.53	44.53 ± 5.28
	IR组	0.25 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	61.56 ± 6.19 ^a	27.61 ± 3.89 ^a
	IPO组	0.22 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.01 ^{ab}	69.96 ± 3.96 ^{ab}	33.14 ± 2.99 ^{ab}
	F 值	4.428	30.033	27.119	25.769
	P 值	0.031	0.000	0.000	0.000

注:a,与 Sham 比较差异有统计学意义($P<0.05$);b,与 IR 比较差异有统计学意义($P<0.05$)



注: a. 与 Sham 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

b. 与 IR 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

图2 缺血心肌 α-MHC、β-MHC mRNA 表达变化

Fig.2 Changes in gene expression of α-MHC and β-MHC

2.4 α-MHC、β-MHC 蛋白表达变化

α-MHC 蛋白表达水平在 IR、IPO 组较 Sham 组降低,但无明显统计学意义 ($P=0.236$, $P=0.178$)。β-MHC 蛋白表达水平在 IR、IPO 组较 Sham 组明显增加 ($P=0.000$, $P=0.007$); IPO 组较 IR 组明显降低 ($P=0.000$)。β-MHC/α-MHC 蛋白相对表达比值在 IR、IPO 组较 Sham 组明显增加 ($P=0.001$, $P=0.001$); IPO 组较 IR 组明显降低 ($P=0.002$) (图 3、4)。

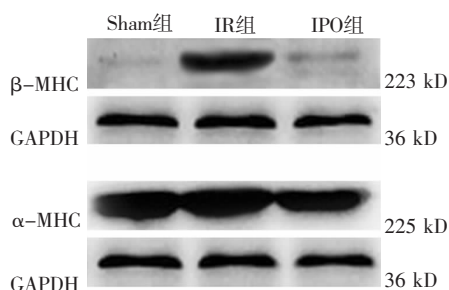
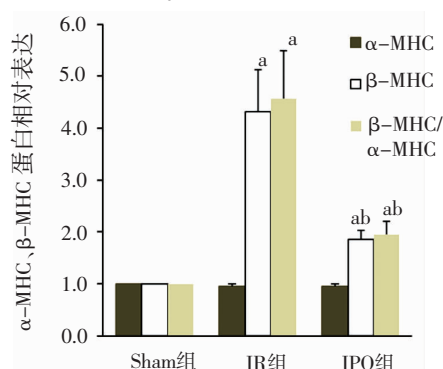


图3 Western blot 检测 α-MHC、β-MHC 蛋白表达

Fig.3 Protein expression of α-MHC and β-MHC detected by Western blot



注: a. 与 Sham 组比较有统计学意义 ($P < 0.05$);

b. 与 IR 组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)

图4 缺血心肌 α-MHC、β-MHC 蛋白表达变化

Fig.4 Changes in protein expression of α-MHC and β-MHC

2.5 α-MHC、β-MHC 与 miR-208a 表达相关性分析

IR、IPO 组 Pearson 相关性分析结果显示: β-MHC mRNA 及蛋白表达水平与 miR-208a 表达水平呈正相关 ($r=0.816$, $P=0.001$; $r=0.846$, $P=0.001$); α-MHC mRNA 及蛋白表达水平与 miR-208a 表达水平无明显相关 ($r=-0.181$, $P=0.574$; $r=-0.008$, $P=0.981$)。

3 讨论

缺血后处理,即在心肌缺血后予以短暂的再灌注缺血循环,而后恢复灌注。众多研究证实 IPO 能减少 IR 复灌后 50%左右的心肌梗死面积,并保护心肌,减轻缺血再灌注损伤^[3]。本实验结果显示,与 IR 组相比, IPO 组 LVEDV、LVESV 均明显降低, LVEF 和 LVFS 均明显增加。提示经缺血后处理后,大鼠心功能得到明显改善,实验结果与国内外其他研究结果一致^[11]。其可能与以下机制有关:如再灌注损伤保护激酶,蛋白激酶 C 的激活以及其他内源性保护蛋白 eNOs、iNOs 等释放,继而抑制线粒体膜通透性转换孔开放,降低活性氧产生,减少中性粒细胞聚集,从而减轻缺血再灌注损伤^[12]。

肌球蛋白重链是心肌收缩效率的主要决定因素。其中 α-MHC 有很强的 ATP 酶活性,能催化 ATP 水解为 ADP,引起心肌收缩,而 β-MHC 的催化能力较弱^[4]。β-MHC/α-MHC 的比值增加可使心输出量减低、心肌收缩功能下降,是心力衰竭的重要标志^[13]。本实验结果显示 β-MHC 在 IR 组表达明显增加,而在 IPO 组表达下降,且基因、蛋白水平表达一致;而 α-MHC 无论基因水平还是蛋白水平,在 3 组均无明显变化;β-MHC/α-MHC 的比值在 IR 组明显增加,而在 IPO 组下降。提示缺血后处理改善心功能可能与 β-MHC 及 β-MHC/α-MHC 比值下降有关。

miRNA 作为一类内源性小分子单链非编码 RNA,可通过与靶基因的 3' 端非编码区互补配对进而转录后抑制调控基因的表达^[4-5]。miR-208a 属 MyomiRs 家族,其编码基因位于 Myh6/αMHC 的内含子内,并反过来调节肌球蛋白基因表达和肌肉对生理和病理信号的反应^[8]。且 miR-208a 具有心脏特异性,几乎只在心脏表达^[14]。van Rooij 等^[7]研究发现 miR-208 在病理性心肌重塑中起重要作用。在应激和甲状腺机能减退的情况下,miR-208a 可通过抑制甲状腺素受体相关蛋白 1 (thrap1),肌肉生长抑制因

子(myostatin)等表达,使 β -MHC 表达增加,进而促进心肌肥厚和心肌纤维化^[7-8]。Montgomery 等^[9]也发现使用 miR-208a 抑制剂可下调 β -MHC 表达,延缓高血压大鼠心功能障碍的进程。本实验结果显示 miR-208a 在 IR 组表达上调,而在 IPO 组表达下调,且 β -MHC 基因及蛋白表达水平与 miR-208a 表达呈正相关。因此推测 miR-208a 可能参与大鼠心肌缺血再灌注损伤和缺血后处理过程中 β -MHC 表达的调控。即大鼠心肌缺血再灌注损伤过程中 miR-208a 表达上调,使 β -MHC 及 β -MHC/ α -MHC 比值增加;而缺血后处理可使 miR-208a 表达下调, β -MHC 及 β -MHC/ α -MHC 比值降低,进而改善心功能。

本研究通过在体大鼠心肌缺血再灌注模型,观察了 miR-208a 及 α -MHC、 β -MHC 在缺血再灌注损伤及缺血后处理中的表达变化。结果提示 miR-208a 可能参与大鼠心肌缺血再灌注损伤和缺血后处理过程中 β -MHC 表达的调控。同时也提示抑制 miR-208a 进而使 β -MHC 及 β -MHC/ α -MHC 比值下降,可能为心梗后心衰提供一种新的治疗策略。但还需进一步更严谨的实验证实。

参 考 文 献

- [1] Vinten-Johansen J, Yellon DM, Opie LH. Postconditioning: A simple, clinically applicable procedure to improve revascularization in acute myocardial infarction. *Circulation* [J]. 2005, 112(14): 2085-2088.
- [2] Weir RA, McMurray JJ. Epidemiology of heart failure and left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2006, 3(4): 175-180.
- [3] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): H579-H588.
- [4] Huang Y, Liu H, Li Y. Alterations in myosin heavy chain isoform gene expression during the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in rats [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2001, 114(2): 183-185.
- [5] Frey N, Katus HA, Olson EN, et al. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? [J]. *Circulation*, 2004, 109(13): 1580-1589.
- [6] Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology [J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 336-342.
- [7] van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(5): 662-673.
- [8] Callis TE, Pandya K, Seok HY, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(9): 2772-2786.
- [9] Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, et al. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure [J]. *Circulation*, 2011, 124(14): 1537-1547.
- [10] 孙 胜, 赵秀梅, 刘秀华. 大鼠在体心脏缺血后处理模型的建立与优化 [J]. *中国微循环*, 2007, 11(6): 401-403.
- [11] Duan X, Ji B, Wang X, et al. Expression of microRNA-1 and microRNA-21 in different protocols of ischemic conditioning in an isolated rat heart model [J]. *Cardiology*, 2012, 122(1): 36-43.
- [12] van Vuuren D, Lochner A. Ischaemic postconditioning: from bench to bedside [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2008, 19(6): 311-320.
- [13] Korte FS, Herron TJ, Rovetto MJ, et al. Power output is linearly related to MyHC content in rat skinned myocytes and isolated working hearts [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(2): H801-H812.
- [14] 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.

(责任编辑: 冉明会)

《重庆医科大学学报》

在线投稿网址: cyxb.alljournals.ac.cn