



自发性高血压大鼠心肌组织 microRNA-97a 与 TGF- β 1 蛋白表达的改变及意义

郑 婧

(贵州医科大学附属医院, 贵阳 550001)

【摘要】 目的 观察 Micro RNA-97a(miRNA-97a)与 TGF- β 1 蛋白在自发性高血压大鼠(SHR)心肌组织中的表达改变和关系。方法 取 8 只 8 周龄雄性自发性高血压大鼠为 SHR 组,8 只 8 周龄雄性 Wistar 大鼠为对照组,通过无创血压测量分析系统测大鼠尾动脉血压,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,PCR 法检测大鼠心脏中 miRNA-97a 的表达,Western blot 检测 TGF- β 1、血管紧张素 II(Ang II)蛋白和 I 型胶原(Col-I)和 III 型胶原(Col-III)蛋白的表达水平。结果 SHR 组的收缩压和舒张压明显升高,心肌 CVF 和 PVCA 明显升高,TGF- β 1 蛋白,Col-I 和 Col-III 蛋白的表达水平明显升高,miRNA-97a 表达水平明显降低,与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。PCR 结果显示,SHR 组心肌 miRNA-97a 表达水平为对照组的(24.6 \pm 4.7)%,SHR 组心肌组织 miRNA-97a 与 TGF- β 1 蛋白表达水平呈负相关($r = -0.785, P < 0.01$)。结论 SHR 心肌组织 miRNA-97a 表达下调,伴随 TGF- β 1 蛋白表达升高和胶原合成增加。miRNA-97a 与 TGF- β 1 可能参与 SHR 大鼠的心肌纤维化。

【关键词】 Micro RNA-97a; 转化生长因子 β 1; 自发性高血压大鼠; 心肌纤维化

【中图分类号】 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016)11-0072-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.013

Expression of microRNA-97a and TGF- β 1 protein in myocardium of spontaneously hypertensive rats and its significance

ZHENG Jing

(Affiliated hospital of Guizhou medical university, Guiyang 550001, China)

【Abstract】 Objective To observe the changes of microRNA-97a and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) protein in the myocardium of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** 8 male spontaneously hypertensive (SHR) rats as SHR group, 8 male Wistar rats for control group, Arterial blood pressure was detected by a noninvasive blood pressure measurement and analysis system. 8 weeks after femoral artery, HE staining was used to observe the changes of morphology of the rat heart, the expression of miRNA-97a was checked by Real-time PCR method for detection of rat heart. Western blot was used to detect the TGF- β 1, angiotensin II (Ang II) protein and type I collagen (Col I) and type III collagen (Col III) protein expression level. **Results** In SHR group, systolic blood pressure and diastolic blood pressure increased significantly, TGF- β 1 protein and Col I and Col III protein expression levels increased significantly, miRNA-97a expression levels were significantly lower than that of control group ($P < 0.01$). Real-time PCR results

[基金项目] 贵州省科技合作计划项目支助(黔科合 LH 字(2015)7423)。

[作者简介] 郑婧, 博士, 讲师, E-mail: 843165396@qq.com。

[通讯作者] 郑婧。

showed that the level of miRNA-97a expression in SHR group was (24.6 + 4.7)% in control group, the expression level of miRNA-97a in SHR group was negatively correlated with the expression of TGF-β1 (r = 0.785, P < 0.01) in group.

Conclusion The level of miRNA-97a is down-regulated along with the up-regulation of TGF-β 1 protein expression and collagen synthesis in the myocardial tissues of SHR. miRNA-97a and TGF-β 1 may be involved in myocardial fibrosis in SHR.

【Key words】 MicroRNA-97a; Transforming growth factor β 1 (TGF -β1); Spontaneously hypertensive rats; Myocardial fibrosis

高血压,冠心病等疾病在心内科最常见^[1-2]。这两年有报道,微小核糖核酸(microRNA)可以通过对基因转录后控制基因表达调控方式^[3]。也有研究说明 miRNA 参与心肌纤维化和动脉硬化等病理过程^[4]。最近一段时间,有不少的医务工作者称 microRNA 的重要成员之一 miRNA-97a 与心肌重构关系密切,很有可能成为高血压、冠心病等疾病的

一个新的治疗靶点^[5-6]。目前为止,我们对于 miRNA-97a 在心血管重构中的作用及机制没有完全清楚。本次研究探讨了 SHR 大鼠心肌组织 microRNA-97a 与 TGF-β1 蛋白表达的改变及意义。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

表 1 试剂和仪器

Tab.1 Reagent and instrument

试剂和仪器 Reagent and instrument	来源 Brand
RM2155 型超薄石蜡切片机	德国 LEICA 公司
miR-378inhibitor 和其分别对照剂	上海 GenePharma 有限公司
Image Pro plus 病理图像分析软件	美国 Media Cybernetics 公司
TGF-β1 一抗、二抗(羊抗兔)	美国 Assay Biotechnology 公司
AllegraTM 64R 台式低温高速离心机	德国 Beckman 公司
10 × Annealing Buffer、蛋白裂解液和 SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒	碧云天生物技术公司
ABI-7500 实时定量 PCR 仪	美国 ABI 公司
Trizol 和 Lipofectamine2000 转染试剂	Invitrogen 公司
PVDF 膜和蛋白发光液	Millipore 公司
无创大鼠血压心率测定仪(型号:ALC-NIBP)	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
DMEM 培养基和胎牛血清	Hyclone 公司

1.2 实验动物及血压测定

8 周龄雄性 SHR16 只和 Wistar 大鼠 8 只,均购自中山大学动物实验中心【SCXK(粤)2011-0034】,体质量 230 ± 15 g,所有大鼠均在贵州医科大学附属医院动物实验室【SYXK(黔)2012-0001】的清洁环境下饲养观察。将 SHR 大鼠随机分为 SHR 卡托普利组(SHR 干预组, n = 8)、SHR 对照组(n = 8),Wistar 大鼠为正常对照组;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。成功制作 SHR 干预组和 SHR 对照组大鼠模型。

1.3 大鼠心肌组织 Masson 染色和 SP 法观察 TGF-β 1 蛋白表达

采用免疫组织化学 SP 法,取出盖玻片上用于免疫组化的大鼠心肌组织,0.01molPL PBS 漂洗 2 次,并予 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,并行脱蜡、水化,对部分切片进行 PBS 冲洗并加聚合物增

强剂和大鼠抗人 TGF-β1 多克隆抗体等试剂,在室温下孵化,最后加入 DAB 显色液,用苏木素复染色,并用中性树脂封片。封片完毕后将切片放置显微镜下观察 TGF-β1 在两组大鼠心肌细胞中的表达情况,阳性显色为棕黄色。另一部分石蜡切片常规脱蜡后行 Masson 胶原染色。每张切片任选 3 支小动脉,测量血管周围胶原面积比率(PVCA)。

1.4 Western Blot 检测 TGF-β1、Col-I、Col-III 蛋白表达水平

提取大鼠心脏组织的总蛋白,在 100℃加热 10 min 以使蛋白质变性。电泳,蛋白转移至 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,加入 TGF-β1、Col-I、Col-III 等一抗,4℃孵育过夜,选择 TGF-β1、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,拍照,分析显影条带。

1.5 Real-time PCR 检测 miRNA-97a 表达水平

根据其 mRNA 序列,设计引物。miRNA-97a 引

物:上游:5' -TAC CCT ACT ACC AAT ATT-3';下游:5' -CCT TTC CAT CTT CCT TCG ATT-3';产物长度:327 bp。Ang II 引物:上游:5' -ATCGGGACC AAT CAC ACT ACA -3';下游:5' -CGT CTC TTCCGG CTG CTT CAA-3';产物长度:216 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对实时定量 PCR 结果进行分析,显示 miRNA-137、Ang II RNA 的表达。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 17.0 统计学软件行统计学分析,计

表 2 两组大鼠的资料与心肌胶原含量的变化(mean \pm SD. $n = 10$)

Tab.2 Information and myocardial collagen changes of two groups

Group	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	LVWI(mg/g)	CVF(%)	PVCA
对照组	119.2 \pm 8.5	77.4 \pm 7.2	2.46 \pm 0.36	2.94 \pm 0.41	0.89 \pm 0.15
SHR 组	194.5 \pm 15.7**	104.6 \pm 9.5**	3.16 \pm 0.52*	5.64 \pm 0.66**	1.41 \pm 0.32**

注:和对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

2.2 两组大鼠心肌组织 Masson 染色结果

SHR 组大鼠心肌细胞间可见大量蓝色胶原纤维沉积,细胞数量减少,体积增大,细胞排列紊乱,对照组大鼠可见红色心肌细胞间隙散在少量蓝色胶原纤维,细胞排列整齐紧密,数量,体积大致正常(图 1)。

2.3 免疫组织化学法检测大鼠心肌组织 TGF- β 1 蛋白表达

TGF- β 1 主要在成纤维细胞表达,分布在细胞膜、细胞质及细胞间隙,SHR 组心肌可见 TGF- β 1 大量表达,对照组心肌有仅有少量 TGF- β 1 表达(图 2)。SHR 组心肌 TGF- β 1 蛋白表达水平显著高于对照组(1.29 \pm 0.22vs 0.70 \pm 0.11, $P < 0.01$)。

2.4 Real-time PCR 检测大鼠心肌组织 miRNA-97a 表达

量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数显著性检验用方差分析及 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠血压和心肌胶原含量的变化

与对照组比较,SHR 组大鼠的收缩压和舒张压明显升高,TGF- β 1 蛋白,Col- I 和 Col-III 蛋白的表达水平明显升高,miRNA-97a 表达水平明显降低($P < 0.01$)(表 2)。

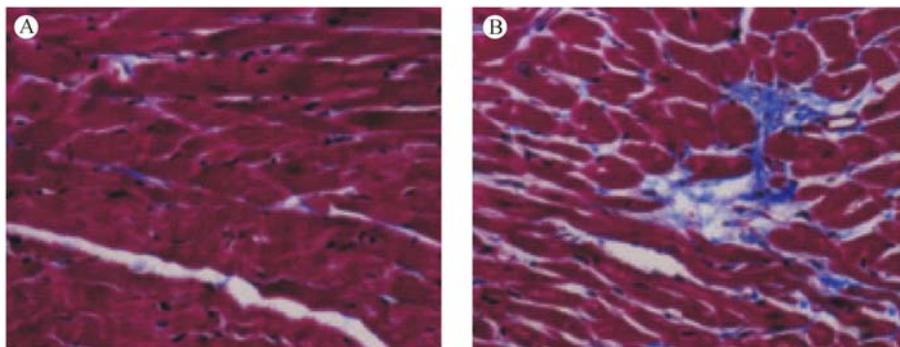
SSHR 组心肌 miRNA-97a 表达水平为对照组的(24.6 \pm 4.7)%,其 miRNA-97a 表达水平较对照组明显降低($P < 0.01$),

2.5 组间 TGF- β 1, Smad3 蛋白和 Col- I / Col-III 蛋白表达比较

SHR 对照组大鼠心脏表达 TGF- β 1/Smad3 蛋白和 Col- I / Col-III 蛋白均较正常对照组明显升高($P < 0.01$)(图 4)。

2.6 大鼠心肌组织 miRNA-97a 与 TGF- β 1 蛋白表达

水平相关性分析 Pearson 直线相关分析显示,SHR 组心肌组织 miRNA-97a 表达水平与 TGF- β 1 蛋白表达水平呈显著负相关($r = -0.785$, $P < 0.01$)。

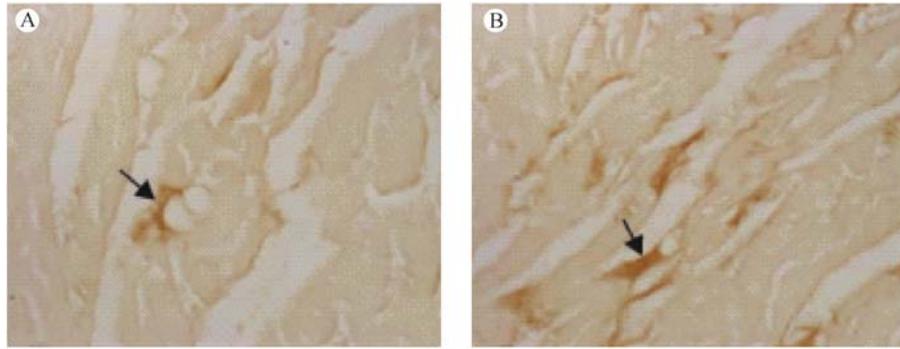


注:A:对照组;B:SHR 组。

图 1 大鼠心肌组织 Masson 染色结果($\times 40$)

Note:A. Control group; B. SHR group.

Fig.1 Masson staining of myocardium ($\times 40$)



注:A:对照组;B:SHR组。

图2 大鼠心肌 TGF-β1 免疫组化染色(×40)

Note:A. Control group; B. SHR group.

Fig. 2 TGF-β1 immunohistochemical of myocardium

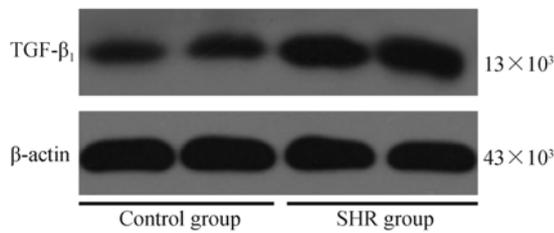
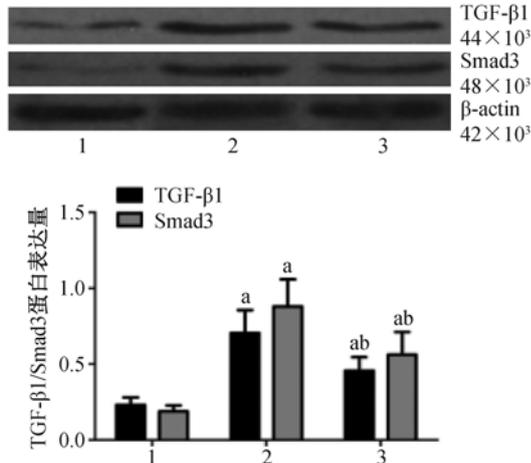


图3 大鼠心肌组织 TGF-β1 蛋白表达改变

Fig. 3 TGF-β1 expression changes of myocardium



注: 1. 正常对照组, 2. SHR 对照组, 3. SHR 干预组, SHR 对照组与正常对照组比较 $P < 0.05$ 。

图4 组间大鼠心脏 TGF-β1/Smad3 蛋白表达量

Note: 1. Control group, 2. SHR control group, 3. SHR group. Compared with control group $P < 0.05$.

Fig. 4 TGF-β1/Smad3 expression of myocardium in different groups

3 讨论

高血压是冠心病的一个独立危险因素^[7], 冠心病症状为胸腔中央发出疼痛, 而且可蔓延到手臂、

颌、颈、后背及胃部。冠心病发作的其他症状有气促、眩晕、寒颤、出汗、恶心及昏厥。严重的一些患者会因为心力衰竭而导致死亡^[8-9]。

据报道结果^[11-13]表明, miRNA-9 和 miRNA-97a 能影响心肌细胞的增殖与分化并且可以通过 TLX 和周期蛋白 D1 调控心肌细胞分化。这次实验是为了研究 miRNA-97a 在心肌重构中的影响, 让 miRNA-97a 成为高血压、冠心病等疾病的一个新的治疗靶点。

本研究发现, 大鼠心肌组织 miRNA-97a 表达: Real-time qPCR 结果显示, SHR 组心肌 miRNA-97a 表达水平较对照组明显降低 ($P < 0.01$), SHR 组心肌 miRNA-97a 表达水平为对照组的 $(24.6 \pm 4.7)\%$ 。大鼠心肌组织 miRNA-97a 与 TGF-β1 蛋白表达呈显著负相关 ($r = -0.785, P < 0.01$)。

同时, 在本研究中, 两组大鼠心肌组织 Masson 染色结果显示: SHR 组大鼠心肌细胞数量减少, 细胞排列紊乱, 体积增大, 可见大量蓝色胶原纤维。SHR 组大鼠收缩压和舒张压显著升高, 细胞肥大, 体积增大, 心肌细胞数量减少, 排列紊乱, 胞核变圆畸形。同时, SHR 对照组表达 TGF-β1 蛋白表达均上调, 表明 TGF-β1 在 Col-I 和 Col-III 表达中有了正性的调节作用。本研究两组大鼠血压和心肌胶原含量的变化显示, 和正常组相比, SHR 组的收缩压和舒张压明显升高, TGF-β1 蛋白, Col-I 和 Col-III 蛋白的表达水平明显升高, miRNA-97a 表达水平明显降低。

TGF-β1 是公认的促纤维化细胞因子, 能促进心肌纤维化^[14], 本研究显示, 特异低表达心脏 miRNA-97a 可促进 TGF-β1 蛋白合成, 导致细胞外基质 Col-I 和 Col-III 大量增生和过度积聚, 最终导

致心肌细胞肥大,纤维化,出现心肌病理性重构^[17]。由于在心肌重构过程中参与调控 TGF- β 1、AngII 表达的机制非常复杂, miRNA-97a 具体通过下调哪一种信号通路来抑制细胞的增殖,还需要我们进一步研究。

参考文献:

- [1] Pinto YM, Philipp T, Engler S, *et al.* Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor β 1 attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR (mRen2) 27 rat [J]. *Hypertension*, 2000, **36**(5) : 747 - 754.
- [2] Ziada AM. Additional salutary effects of the combination of exercise training and an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the left ventricular function of spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertens*, 2009, **27**(6) : 1 309 - 316.
- [3] He JF, Luo YM, Wan XH, *et al.* Biogenesis of miRNA - 137 and Its Role in Biogenesis, the Cell Cycle, and Apoptosis [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011, **25**(6) : 404 - 408.
- [4] Weber KT, Brilla CG. Signals for the remodeling of the cardiac interstitium in systemic hypertension [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 1991, **17**(Suppl 1) : 14 - 19.
- [5] Weber KT, Brilla CG. Myocardial fibrosis and the rennin-angiotensin-aldosterone system [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 1992, **20**(Sup-pl 1) : 14 - 19.
- [6] 刁雪红, 申锴, 等. 糖尿病小鼠心肌组织 microRNA 表达谱分析 [J]. *上海交通大学学报*, 2010, **10**(2) : 1194 - 198.
- [7] Wang YS, Wang HY, Liao YC, *et al.* MicroRNA - 137 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation [J]. *Cardiovascular Res*, 2012, **95**(4) : 517 - 526.
- [8] Akiyama - Uchida Y, Ashizaua N, Chtwuyu A, *et al.* Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts [J]. *Hypertension*, 2002, **40**(2) : 148 - 154.
- [9] Li JZ, Peng J, Wang CJ, *et al.* Calcitonin gene-related peptide suppresses isoprenaline-induced cardiomyocyte apoptosis through regulation of microRNA - 1 and microRNA - 133a expression [J]. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2011, **36**(10) : 964 - 971.
- [10] 王泽慧, 边云飞, 卫娜, 等. 大鼠 microRNA - 145 慢病毒表达载体的构建及其对血管平滑肌细胞表型转化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, **20**(5) : 424 - 428.
- [11] Liu, Z. Q. Teng, A. L. McQuate, *et al.* An epigenetic feedback regulatory loop involving microRNA - 195 and MBD1 governs neural stem cell differentiation, *PLoS One*, 2013, **22**(8) : e51436.
- [12] 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, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009, **16**(5) 365 - 371.
- [13] C. Zhao, G. Sun, S. Li, *et al.* MicroRNA let - 7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 1876 - 1881.
- [14] Van Rooij E, Sutherland LB. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **10**(3) : 18 255 - 260.
- [15] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF - β signaling from cell membrane to the nucleus [J]. *Cell*, 2003, **113**(6) : 685 - 700.
- [16] Van Rooij E, Sutherland LB. Qi X, *et al.* Control of stress dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. *Science*, 2007, **316**(5 824) : 575 - 579.
- [17] Zhu H, Yang Y, Wang Y, *et al.* MicroRNA - 137 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1 [J]. *Cardiovascular Res*, 2011, **92**(1) : 75 - 84.

[修回日期] 2016 - 07 - 20