

白藜芦醇保护缺血再灌注大鼠心肌作用与 miR-21 的相关性

塔方欣, 张涛, 祝春梅

(辽宁医学院附属第一医院体检中心, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 白藜芦醇; 微小 RNA; 缺血再灌注; 心肌缺血

[摘要] **目的** 观察白藜芦醇预处理后大鼠心肌微小 RNA(miRNA)的表达变化,分析白藜芦醇介导的心肌保护作用与 miR-21 之间有无关系。**方法** 通过 miRNA 芯片微阵列方法和 qRT-PCR 检测并验证白藜芦醇灌胃预处理后的大鼠心肌 miRNA 表达谱;建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,检测各组心肌梗死面积、心肌细胞凋亡率以及 miR-21 的表达水平。**结果** 白藜芦醇预处理后,大鼠心肌的 miR-21 表达水平约为对照组的 2.5 倍;miR-21 阻遏剂对白藜芦醇预处理引起的 miR-21 高表达产生了明显的抑制作用;过表达的 miR-21 显著降低了心肌细胞凋亡率,心肌组织梗死面积明显缩小。**结论** 白藜芦醇可以调控心肌多种 miRNA 的表达水平,通过促进 miR-21 的表达,白藜芦醇能够抑制心肌细胞的凋亡,从而减轻缺血再灌注对心肌的损伤。

[中图分类号] R542.22

[文献标识码] A

Correlation Between miR-21 and the Protective Effects of Resveratrol Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

TA Fang-Xin, ZHANG Tao, and ZHU Chun-Mei

(Health Screening Center, The First Affiliated Hospital, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] Resveratrol; MicroRNA; Ischemia/Reperfusion; Ischemic Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To observe effects of resveratrol (Res) preconditioning on miRNA expression signature in rat hearts, and analyse the relationship between Res-mediated cardiac protection and miR-21. **Methods** The expression profiles of miRNAs in rat hearts after Res preconditioning were detected with a miRNAs microarray chip and the results were confirmed by qRT-PCR. After myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury model was established, myocardial infarct size, percent of myocardial apoptosis and expression of miR-21 were tested. **Results** miR-21 was one of the most up-regulated miRNAs in hearts by Res preconditioning and its expression was increased more than 2.5 fold compared with the control. The up-regulation of miR-21 was significantly inhibited by antagomiR-21. Cardiac cell apoptosis and myocardial infarct size were significantly decreased by up-regulation of miR-21. **Conclusion** miRNA signature in rat hearts with Res preconditioning has revealed that multiple miRNAs are regulated by Res. Among them, Res has a protective effect on I/R by reducing cardiac cell apoptosis via miR-21.

微小 RNA(micro RNA, miRNA)是一类内源性非编码单链小分子 RNA,近年来受到广泛研究和关注。miR-21 具有显著的心肌组织特异性,在血管平滑肌、内皮细胞、心肌细胞和心脏成纤维细胞中均呈高表达,许多心血管疾病也存在 miR-21 的异常高表达^[1]。因此,miR-21 在心血管病理生理过程中可能扮演着极其重要的角色。白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种多酚类物质,对心血管系统具有抗氧化、抗凋亡、抗炎、血管舒张活性等作用。动物体内

是否存在白藜芦醇的受体或者确切的作用靶点,仍有待于进一步的研究来证实。随着 miRNA 的研究不断深入,有必要进一步探索白藜芦醇保护机制与心肌 miRNA 之间的相关性。本实验通过复制大鼠心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型,验证白藜芦醇抑制心肌细胞凋亡、缩小心肌缺血面积等保护作用;通过 qRT-PCR、Northern blot 检

[收稿日期] 2012-11-06

[基金项目] 辽宁医学院青年基金项目(Y2011Z012);辽宁医学院附属第一医院青年基金项目(FY2011-12)

[作者简介] 塔方欣,硕士,主治医师,研究方向为冠心病的诊治。张涛,硕士,主任医师,研究方向为老年心脑血管疾病的诊治及全科医学。祝春梅,硕士,医师,研究方向为慢性非传染性疾病的健康管理。

测各组 miR-21 的差异表达,分析白藜芦醇与缺血心肌细胞内 miR-21 表达的相关性;使用反义寡核苷酸抑制心肌 miR-21,进一步明确二者关系。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

实验采用雄性 SD 大鼠,体重在 250 ~ 300 g,由辽宁医学院动物中心提供。大鼠 miRNA 芯片微阵列检测及 qRT-PCR 检测服务由联川生物公司提供。antagomiR-21 (miR-21 阻遏剂)购自锐博生物。流式细胞仪采用美国 BD 公司产品。

1.2 动物分组与处理

将 98 只大鼠随机分为 4 组:白藜芦醇组 [28 只,白藜芦醇 20 mg/(kg · d)连续灌胃 7 天]、对照组 (28 只,生理盐水连续灌胃 7 天)、miR-21 阻遏剂组 [21 只,颈静脉留置导管, antagomiR-21 80 mg/(kg · d)连续注射 3 天,从第 4 天开始,使用白藜芦醇 20 mg/(kg · d)连续灌胃 7 天]、Scramble 组 [21 只,颈静脉留置导管,无意义寡核苷酸 80 mg/(kg · d)连续注射 3 天。从第 4 天开始,使用白藜芦醇 20 mg/(kg · d)连续灌胃 7 天]。

1.3 miRNA 芯片检测及验证

白藜芦醇组与对照组每组取 7 只大鼠,取出心脏并分离左心室心肌,Trizol 法抽提总 RNA,使用 miRNA 芯片进行微阵列分析。为保证结果的重复性和可靠性,每组用三张芯片进行检测,每张芯片重复 1 次。数据分析时减除背景信号并通过局部加权回归分析进行数据标准化处理。计算双色实验中样本信号与参照信号的比值(取 2 的对数)以及 P 值, $P < 0.01$ 视为有显著差异。实验过程使用 Spikein 探针进行质量控制。对结果中有显著差异表达的 miRNA 再通过 qRT-PCR 进行验证。

1.4 qRT-PCR 和 Northern blot 检测心肌细胞 miR-21 的表达水平

在缺血再灌注处理前,每组取 7 只大鼠,通过 qRT-PCR 和 Northern blot 方法来检测心肌细胞 miR-21 的表达水平。按照 mirVana qRT-PCR 检测试剂盒说明书,提取总 RNA 约 50 ng,逆转录为 cDNA,使用 Light Cycler 480 系统完成 PCR 扩增和检测,U6 作为检测内参,引物由 Ambion 公司提供。利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,在其进入指数增长长期时设为循环阈值 (Ct 值)。通过比较 PCR 循环时间,计算出基因相对表达量,计算公式为:基因相对表达量 = $2^{-(\Delta Ct_{\text{样本}} - \Delta Ct_{\text{对照}})}$ 。按照文献 [2] 进行

Northern blot 检测,miR-21 探针序列为 5'-TCAA-CATCAGTCTGATAAGCTA-3'。

1.5 心肌缺血再灌注模型的制作

完成 miR-21 表达水平检测后,将每组剩余的 14 只大鼠进行缺血再灌注造模。大鼠腹腔注射氯胺酮 (80 mg/kg)、甲苯噻嗪 (5 mg/kg) 和阿托品 (0.6 mg/kg) 混合液。麻醉生效后行气管插管,用小动物呼吸机控制呼吸。无菌条件下,于左侧第 4 肋间行开胸术,显露心脏,夹闭冠状动脉左前降支 5 min,再恢复灌流 5 min,如此反复 4 次。上述缺血处理完成后,恢复血流 3 h,诱发缺血再灌注损伤。

1.6 心肌梗死区面积测定

缺血再灌注造模成功后,每组取半数大鼠追加麻醉,再次暴露心脏并结扎左冠状动脉,向左心室内注入 6 mL 10% 的 Evans blue 试剂。待大鼠心脏蓝染后,取下心脏,冰冻左心室心肌组织,垂直其长轴水平切片,每片厚 1 ~ 2 mm,置入 1% 的 TTC 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中 37℃ 孵育 20 min。此时梗死区呈灰白色,非梗死区呈深红色,用图像采集系统拍照后采用图像分析软件 (Imagetool 3.0) 计算各部分的面积百分比。

1.7 心肌细胞凋亡检测

取剩余每组 7 只大鼠左心室心肌组织,经冲洗、剪碎、研磨、过滤、离心等步骤制成细胞悬液,加入 Annexin V 和 PI 避光反应 15 min 后,1 h 内送流式细胞仪检测凋亡细胞数,用 CELL Quest 软件对结果进行分析。以上实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 miRNA 的表达调控作用

miRNA 芯片微阵列方法共检测出 271 种 miRNA。与对照组相比,有 27 种 miRNA 的表达水平受白藜芦醇作用而出现显著变化,其中 16 种表达增加,11 种表达减少。变化幅度超过 50% 的如表 1 所示,而 miR-21 表达水平则是对照组的 2.5 倍。通过 qRT-PCR 进一步验证了 miR-21 表达水平显著增高,与 miRNA 芯片微阵列检测结果一致。

2.2 antagomiR-21 的阻遏作用

通过静脉给药途径将 antagomiR-21 注射到大鼠体内后,白藜芦醇产生的 miR-21 表达增强效果受到了明显抑制,而 Scramble 组中 miR-21 的表达水平未

受到影响(图1)。进一步通过 Northern blot 验证,结果可靠(图2)。

表 1. 白藜芦醇预处理后表达程度改变超过 50% 的 miRNA
Table 1. Cardiac miRNA that are highly expressed and up-regulated over 50% after Res preconditioning

miRNA	对照组	白藜芦醇组	变化程度
miR-21	1145	2922	255.20%
miR-320	1087	1941	178.56%
let-7e	2040	3328	163.14%
miR-16	2439	3694	151.46%
let-7b	11726	16205	138.20%
miR-195	1947	2669	137.08%
let-7c	15663	18744	119.67%
miR-126	28942	23310	80.54%
miR-27b	3297	2551	77.37%
miR-26a	23559	12745	54.10%

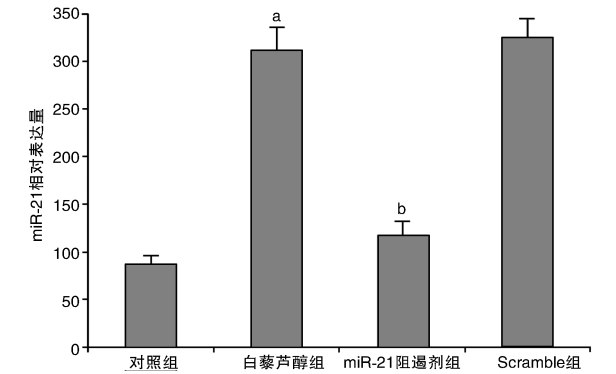


图 1. 缺血再灌注造模后各组大鼠心肌 miR-21 的相对表达量
a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与白藜芦醇组比较。

Figure 1. Relative miR-21 expression in rat heart after I/R

2.3 缺血再灌注后心肌的受损情况

梗死面积测定结果显示,白藜芦醇组梗死面积

比对照组显著减少,差异有显著性($P < 0.01$);Scramble 组心肌梗死面积与白藜芦醇组比较差异无显著性($P > 0.05$);使用 miR-21 阻遏剂组心肌梗死面积明显大于 Scramble 组及白藜芦醇组($P < 0.01$;表2)。

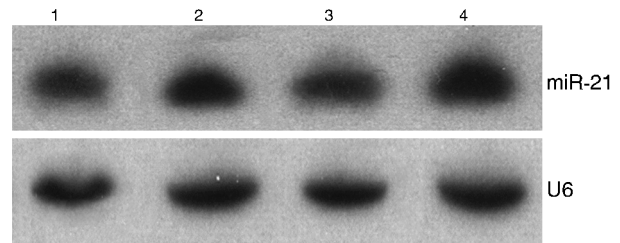


图 2. Northern blot 检测缺血再灌注造模后各组大鼠心肌 miR-21 表达
1 为对照组,2 为白藜芦醇组,3 为 miR-21 阻遏剂组,4 为 Scramble 组。

Figure 2. Representative results of Northern blotting of cardiac miR-21 after I/R

2.4 阻遏 miR-21 表达对缺血再灌注导致心肌细胞凋亡的影响

从各组凋亡散点图(左下象限为活细胞,右下象限为凋亡细胞,右上象限为死亡细胞)可见,白藜芦醇能够显著减轻缺血再灌注后心肌细胞的凋亡,Scramble 组与之相比差异无显著性($P > 0.05$)。但使用了 miR-21 阻遏剂组,其心肌细胞凋亡率明显增高($P < 0.05$;图3 和表2)。

表 2. 各组梗死面积和心肌细胞凋亡率

Table 2. Myocardial infarct size, percent of myocardial apoptosis in different groups

分 组	梗死面积	凋亡率
对照组	36.07% \pm 0.22%	29.41% \pm 0.39%
白藜芦醇组	9.21% \pm 0.63% ^a	21.54% \pm 0.25% ^a
miR-21 阻遏剂组	40.29% \pm 0.95% ^b	32.06% \pm 0.17% ^b
Scramble 组	10.42% \pm 0.34% ^a	20.42% \pm 0.32% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与白藜芦醇组比较。

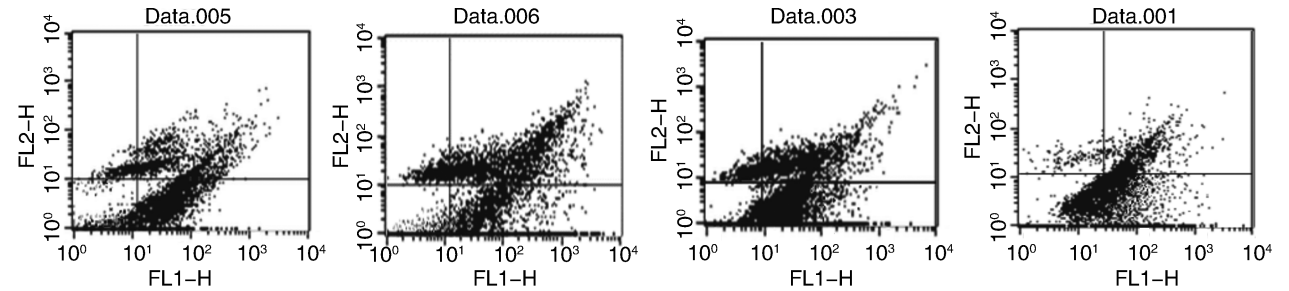


图 3. 流式细胞仪 Annexin V-PI 双染色法检测各组凋亡率散点图
Figure 3. Dot-plots with Annexin V-PI in each group

从左到右依次为对照组、白藜芦醇组、miR-21 阻遏剂组和 Scramble 组。

3 讨论

目前常用的治疗心肌梗死技术如冠状动脉成形术、冠状动脉搭桥术等能够迅速改善局部血供,挽救未坏死的心肌细胞,但再灌注同时也能导致严重的缺血再灌注损伤,心肌细胞发生凋亡是造成这种损伤的主要机制之一。

白藜芦醇是红葡萄酒中发挥心血管保护作用的有效成分,例如红葡萄酒中所含的白藜芦醇已证实可以部分对抗大量酒精诱导的心肌纤维化^[3]。一般认为,白藜芦醇的心血管保护作用主要包括降血脂、抗氧化、抗凋亡等^[4]。通过复制大鼠缺血再灌注模型,我们验证了白藜芦醇具有抑制心肌细胞凋亡的作用。

miRNA 在心血管病理生理中发挥着重要的调控作用,越来越多的实验表明 miRNA 具有重要的心肌保护作用。心肌 miRNA-499 转基因小鼠缺血再灌注后,凋亡的心肌细胞、心肌梗死面积明显减少,心功能各项指标也显著改善^[5];敲除 miR-126 基因的小鼠,急性心肌梗死造模后的死亡率明显高于野生型小鼠^[6]。

本实验通过 miRNA 芯片微阵列检测,成功获得白藜芦醇作用于心肌的 miRNA 表达谱,证实白藜芦醇可以调控心肌细胞多种 miRNA 的表达水平,miR-21、miR-320、let-7e 等十种 miRNA 的表达变化超过了 50%,尤以 miR-21 表达水平增高现象最为明显。在 miR-21 过表达的同时,心肌细胞的凋亡率受到显著抑制,心肌组织梗死面积缩小,缺血再灌注对心肌的损伤也获得减轻。

有研究证实,血管平滑肌等正常组织细胞中的 miR-21 具有抗凋亡作用^[7]。H₂O₂ 诱导心肌损伤的实验也证实,过表达的 miR-21 可通过调节其靶基因 PDCD4 的转录,能够明显抑制心肌细胞的凋亡^[8]。白藜芦醇和 miR-21 都具有抑制心肌细胞凋亡的作用,两者之间是否有所关联? 为了进一步验证白藜芦醇与 miR-21 之间的关系,我们在白藜芦醇预处理组中加用了一种可抑制心肌 miR-21 表达的反义寡核苷酸 antagomiR-21。该反义寡核苷酸经过胆固醇和 2'-氧甲基亚林酰胺修饰,在体内不易被核酶降解,脂溶性强,可通过静脉大剂量给药到达目的部位,抑制 miR-21 表达的作用时间可持续一个月以上^[9]。再次检测心肌细胞凋亡率,结果发现不降反升,提示白藜芦醇抑制心肌细胞凋亡的作用是通过

miR-21 的表达调控来实现的。

Sirt1 在心肌缺血再灌注损伤中起着重要的保护作用,通过促凋亡因子 p53 蛋白的第 373、320 和 382 位赖氨酸残基去乙酰化,抑制 p53 与靶 DNA 顺式原件结合,从而抑制 p53 促凋亡活性。白藜芦醇是目前为止发现的最好的 Sirt1 激活剂,有研究表明其保护心肌作用与激活 Sirt1-p53 通路密切相关^[10]。Sirt1 是否是 miR-21 的潜在靶基因,白藜芦醇是否通过 miR-21 激活该通路从而起到降低缺血再灌注对心肌的损伤作用,这还有待于我们在今后的实验中作进一步研究与探索。

[参考文献]

[1] Salloum FN, Yin C, Kukreja RC. Role of microRNAs in cardiac preconditioning [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 56(6): 581-588.

[2] Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy [J]. Am J Pathol, 2007, 170: 1 831-840.

[3] 马双陶, 杨大春, 唐兵, 等. 白藜芦醇抑制基质金属蛋白酶抗酒精性心肌纤维化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(1): 21-24.

[4] 季华. 白藜芦醇的生理功能及其应用前景[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(14): 1 625-629.

[5] Wang JX, Jiao JQ, Li Q. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1 [J]. Nat Med, 2011, 17(1): 71-78.

[6] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. Dev Cell, 2008, 15: 261-271.

[7] Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation [J]. Circ Res, 2007, 100: 1 579-588.

[8] Cheng Y, Liu X, Zhang S, et al. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4 [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47: 5-14.

[9] Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy [J]. Nat Med, 2007, 13: 613-618.

[10] 郭云斌, 刘新伟, 何东伟, 等. 白藜芦醇对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其与 sirt1-p53 通路的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(24): 4 822-825.

(此文编辑 许雪梅)