

# miRNA-195、贝那普利与自发性高血压大鼠主动脉重构

万新红<sup>1</sup>, 罗玉梅<sup>1</sup>, 姜德谦<sup>2</sup>, 何俊峰<sup>3</sup>, 柴湘平<sup>2</sup>, 郭洪波<sup>1</sup>, 罗玉婵<sup>1</sup>

(1. 深圳市龙岗区人民医院心内科, 广东省深圳市 518172; 2 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011; 3. 南京医科大学附属无锡市人民医院心内科, 江苏省无锡市 214023)

[关键词] miRNA-195; 高血压; 贝那普利

[摘要] **目的** 观察自发性高血压大鼠(SHR)的主动脉形态结构及其表达 miRNA-195 水平的变化, 以及贝那普利干预对其影响。**方法** 8 周龄雄性 SHR 及 Wistar 大鼠, 随机分为 SHR 对照组、SHR 贝那普利组(SHR 干预组)、Wistar 对照组、Wistar 贝那普利组(Wistar 干预组), SHR 干预组和 Wistar 干预组大鼠予贝那普利 10 mg/(kg·d) 干预, 8 周后, 测定各组大鼠尾动脉血压, HE 染色检测大鼠主动脉结构形态, 实时荧光定量 PCR 检测大鼠主动脉 miRNA-195 表达, Western blot 检测大鼠主动脉转化生长因子  $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )、Smad3 蛋白、I 型胶原(COL-I)和 III 型胶原(COL-III)蛋白表达水平。**结果** 贝那普利干预 8 周后, SHR 干预组大鼠尾动脉收缩压及舒张压均显著低于 SHR 对照组( $P < 0.01$ ), 高于 Wistar 对照组( $P < 0.01$ )。SHR 干预组大鼠主动脉 miRNA-195 表达高于 SHR 对照组、Wistar 干预组及 Wistar 对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); SHR 干预组大鼠主动脉 TGF- $\beta 1$  和 Smad3 蛋白表达低于 SHR 对照组( $P < 0.05$ ), 但高于 Wistar 干预组( $P < 0.01$ ); SHR 干预组大鼠主动脉 COL-I 和 COL-III 表达低于 SHR 对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 但高于 Wistar 干预组( $P < 0.01$ ); SHR 干预组大鼠主动脉内中膜结构较 SHR 对照组改善, 但未能恢复到 Wistar 对照组水平。**结论** 贝那普利干预可改善 SHR 主动脉重构, 这一作用可能与 miRNA-195 抑制 TGF- $\beta 1$ /Smad3 信号通路有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## miRNA-195, Benazepril and Aortic Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats

WAN Xin-Hong<sup>1</sup>, LUO Yu-Mei<sup>1</sup>, JIANG De-Qian<sup>2</sup>, HE Jun-Feng<sup>3</sup>, CHAI Xiang-Ping<sup>2</sup>, GUO Hong-Bo<sup>1</sup>, and LUO Yu-Chan<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, People's Hospital of Longgang, Shenzhen, Guangdong 518172, China; 2. Department of Cardiology, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China; 3. Department of Cardiology, The Affiliated People's Hospital of Nanjing Medical University in Wuxi and People's Hospital of Wuxi City, Wuxi, Jiangsu 214023, China)

[KEY WORDS] MiRNA-195; Hypertension; Benazepril

[ABSTRACT] **Aim** To explore the changes of aortic morphology and expression of miRNA-195 in aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR), and the effect of benazepril on them. **Methods** 8-week-old male SHRs were randomly divided into SHR benazepril treatment group (SB group, benazepril 10 mg/(kg·d),  $n = 8$ ) and SHR control group (SC group,  $n = 8$ ), and Wistar rats of the same age served as control were also randomly divided into benazepril treatment group (WB group, benazepril 10 mg/(kg·d),  $n = 8$ ) and control group (WC group,  $n = 8$ ). After 8 weeks treatment, tail arterial blood pressures of rats were measured, aortic morphology were detected by hematoxylin and eosin staining, and expression level of miRNA-195 in aorta of rats were detected by qRT-PCR, and expression level of TGF- $\beta 1$ , Smad3, COL-I and COL-III proteins were detected by Western blot. **Results** After 8 weeks of medication, the tail arterial systolic blood pressure and diastolic blood pressure of rats in SB group was lower than that in SC group ( $P < 0.01$ ), but was higher than that in WB group ( $P < 0.01$ ). The expression of miRNA-195 in aorta of rats in SB group was higher than that in SC group, WB group and WC group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The expression levels of TGF- $\beta 1$  and Smad3 in aorta of rats

[收稿日期] 2013-06-24

[基金项目] 广东省科技厅项目资助(2010B031600198)

[作者简介] 万新红, 博士, 主任医师, 研究方向为高血压, E-mail 为 wxinh@21cn.com。通讯作者罗玉梅, 博士, 主任医师, 研究方向为代谢综合征与心血管疾病, E-mail 为 yumeiluo2000@163.com。姜德谦, 心内科教授, 博士生导师, 研究方向为冠心病。

in SB group were lower those that in SC group ( $P < 0.05$ ), but higher than those in WB group ( $P < 0.01$ ), and the expression of COL-I and COL-III protein showed a similar change ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Aortic morphology of rats in SB group was improved compared with SC group, but did not reach the level of that in WC group. **Conclusions** Treatment with Benazepril can ameliorate the aortic morphology of SHR, and miRNA-195 may play a role in this process, by inhibiting TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway.

高血压是一种以动脉血压持续升高为特征的进行性“心血管综合征”,常伴有其它心血管危险因素。长期血压升高导致动脉内皮损伤、炎症、平滑肌细胞增殖迁移,最终与其它危险因素共同作用导致动脉粥样硬化等病理性重构,血管的病理性重构是导致高血压靶器官功能障碍的病理基础。TGF- $\beta$ /Smads 信号转导通路是促进平滑肌细胞增殖及分泌胶原等细胞外基质,导致动脉硬化的主要调节通路,在高血压动脉重构中起了重要的作用<sup>[1]</sup>。TGF- $\beta$ 1 是 TGF- $\beta$  家族中作用最强的一种,它通过信使 Smads 蛋白家族将生物信号从细胞质传入细胞核内,与 Smads 蛋白家族共同调节它们的靶基因转录,其中 Smad3 是 TGF- $\beta$ 1 信号传导通路中所必需的中介分子。miRNA 是一种非编码 RNA,它可在基因转录后水平上调节基因的表达,进而调节机体的基本生物学过程<sup>[2,3]</sup>,与心血管的功能调节、疾病发生有着密切的关系<sup>[4-11]</sup>。有研究发现 miRNA-195 可抑制血管内皮细胞分泌炎症因子,并可抑制大鼠颈动脉平滑肌细胞增殖和迁移<sup>[12]</sup>。目前有关 miRNA-195 在高血压动脉重构中的研究尚少,本研究通过对比自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rat, SHR)和普通 Wistar 大鼠主动脉在表达 miRNA-195、TGF- $\beta$ 、Smad3、COL-I、COL-III 水平上的差异及贝那普利干预后组间大鼠主动脉在表达上述指标间的变化及其主动脉结构形态的改变,以探讨 miRNA-195 与高血压主动脉重构的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

8 周龄雄性 SHR ( $200 \pm 10$  g) 及 Wistar 大鼠 ( $260 \pm 10$  g) 各 16 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXK(京)2006-0009, SPF/VAF 级。盐酸贝那普利片(洛汀新),北京诺华制药有限公司,国药准字 H20030514; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒,碧云天生物技术研究;蛋白 marker,碧云天生物技术研究;PCR 引物合成,Invitrogen,美国;Trizol 试剂盒,Invitrogen,美国;Reverse Transcription System kit, Fermentas 公司,美国;

SYBR Premix Ex Taq™ kit, Takara, 日本; miRNA 逆转录及 qRT-PCR 试剂盒, Invitrogen, 美国; JEDA801 病理图像分析系统 江苏捷达科技公司, Image Pro plus 病理图像分析软件 Media Cybernetics 公司, 美国; ABI-7500 实时定量 PCR 仪, ABI 公司, 美国。

### 1.2 动物饲养与分组干预

SHR 及 Wistar 大鼠均饲养于中南大学湘雅二医院动物实验中心 SPF 级动物房,环境温度  $20 \sim 24^\circ\text{C}$ ,光照周期 12/12 h,湿度 55% ~ 65%,自由饮水和标准实验室饮食,实验环境设施合格证号:医动字第 20-001 号。随机将 SHR 及 Wistar 大鼠分为 Wistar 对照组、Wistar 贝那普利组(Wistar 干预组)、SHR 对照组、SHR 贝那普利组(SHR 干预组),每组各 8 只,参照文献<sup>[13]</sup>的方法进行干预:以蒸馏水为溶剂配制贝那普利混悬液;Wistar 干预组和 SHR 干预组大鼠用贝那普利混悬液灌胃,剂量为  $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ,对照组用等量蒸馏水灌胃,共干预 8 周。

### 1.3 鼠尾动脉血压测定

于干预前及干预 8 周末(处死前)测定各组大鼠安静清醒状态下尾动脉收缩压与舒张压,连测 2 次,取平均值;测量前充分烤尾,严格按照说明书的要求执行。

### 1.4 大鼠主动脉样本获得

于干预第 8 周末测定其尾动脉血压后,所有大鼠予禁食 10 h(过夜);次日测量其体重,随后腹腔注射 10% 水合氯醛( $1.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$  体重)麻醉动物,股动脉放血处死大鼠,开胸分离大鼠主动脉(从升主动脉至腹主动脉段分叉处)。取近心端约 5 mm 主动脉组织,置于相应编号装有 4% 多聚甲醛溶液玻璃瓶中固定,待病理学检测。剩余主动脉组织大致分为两等分,对应装入相应编号的组织保存管中液氮固定,随后转移至  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存,待提取 RNA 及蛋白行生物学检测。

### 1.5 qRT-PCR 检测 miRNA-195 表达水平

取 5 mg 主动脉组织,用 Trizol 试剂盒提取组织总 RNA。紫外分光光度计(Beckman, DU530, USA)中测定  $\text{OD}_{260/280} < 2.0$  值及  $\text{OD}_{260}$  值  $> 1.8$ , 计算 RNA 浓度。使用 Invitrogen 公司的 Ncode™ VILOTM miRNA cDNA Synthesis Kit 逆转录总 miRNA,合成 cDNA 文

库。取 200  $\mu\text{L}$  新 EP 管,依次加入  $5 \times \text{Reaction Mix}$  4  $\mu\text{L}$ 、 $10 \times \text{SuperScriptR Enzyme Mix}$  2  $\mu\text{L}$ 、总 RNA 1  $\mu\text{g}$ 、加 DEPC 水至 20  $\mu\text{L}$  反应体系,混匀点离后,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min 后,于 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min 变性逆转录酶,终止反应,置 4 $^{\circ}\text{C}$  冰水上骤冷。取 1  $\mu\text{L}$  进行 PCR 扩增(Invitrogen, EXPRESS SYBR PremixERTM miRNA qRT-PCR Kit,美国),miRNA195 特异引物购自德国 Qiagen 公司,常规引物为试剂盒自带,U6 为内参,序列:forward 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3' reverse 5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3';扩增条件为 50 $^{\circ}\text{C}$  2 min,95 $^{\circ}\text{C}$  2 min,95 $^{\circ}\text{C}$  15 s,60 $^{\circ}\text{C}$  1 min。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法对实时定量 PCR 结果进行分析。

## 1.6 Western blot 检测 TGF- $\beta$ 1、Smad3、COL-I、COL-III 蛋白表达水平

总蛋白提取:取 5 mg 组织碾碎,加入总蛋白提取液(细胞裂解液 RIPA:蛋白酶抑制剂 PMSF = 99:1),裂解组织,沉淀蛋白,吸出匀浆液离心,分离蛋白;测定蛋白样品浓度(南京碧云天公司 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒,产品编号:P0006),蛋白样品 -20 $^{\circ}\text{C}$  冻存。上样,10% SDS-PAGE 凝胶电泳(电压浓缩胶 80 V,分离胶 120 V)。将蛋白由凝胶转至 PVDF 膜(4 $^{\circ}\text{C}$ ,200 mA 电泳转膜约 1 h),5% 脱脂奶粉 TBST 配制)中封闭,洗膜,加入 TGF- $\beta$ 1、Smad3、COL-I、COL-III 蛋白一抗(1:400,Auragene Bioscience Corporation),加羊抗兔二抗(1:2000,Assay Biotechnology,USA)。将 PVDF 膜置于化学发光试剂中反

应 1~3 min,常规方法定影显影,凝胶扫描成相,以 gel pro 4.0 软件分析,蛋白表达量用密度表示,最后经  $\beta$ -actin 及对照密度值校正,进行比较。

## 1.7 大鼠主动脉组织形态学检查

取 4% 多聚甲醛固定的大鼠主动脉组织,用无水酒精梯度脱水干燥、透明、浸蜡、包埋、切片贴片、脱蜡;苏木精染色 6 min、伊红复染 1 min、脱水透明、封片;显微镜下分析图像并摄像。

## 1.8 统计学分析

所有实验数据均使用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,并进行正态性和方差齐性检验,组间均数显著性检验用多个样本均数比较的方差分析(LSD-t 检验),双侧  $P < 0.05$  显示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 干预前后组间大鼠尾动脉血压比较

干预前,与 Wistar 对照组及 Wistar 干预组比较,SHR 干预组及 SHR 对照组大鼠尾动脉收缩压及舒张压升高( $P < 0.01$ ),SHR 干预组与 SHR 对照组间无统计学差异( $P > 0.01$ )。干预 8 周后,SHR 干预组收缩压及舒张压均显著低于 SHR 对照组( $P < 0.01$ ),但收缩压高于 Wistar 干预组( $P < 0.05$ ),舒张压则高于 Wistar 对照组及 Wistar 干预组( $P < 0.01$ ;表 1)。

表 1. 干预前后组间大鼠尾动脉血压比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Comparison of rat's tail arterial blood pressures and weight among groups before and after intervention( $\bar{x} \pm s$ )

| 分 组        | 收缩压                           |                                | 舒张压                           |                                |
|------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|            | 干预前                           | 干预后                            | 干预前                           | 干预后                            |
| Wistar 对照组 | 137.2 $\pm$ 9.0               | 130.7 $\pm$ 5.6                | 80.9 $\pm$ 6.0                | 82.4 $\pm$ 4.0                 |
| Wistar 干预组 | 135.4 $\pm$ 6.1               | 125.8 $\pm$ 5.2                | 80.88 $\pm$ 5.0               | 74.0 $\pm$ 3.5                 |
| SHR 对照组    | 212.4 $\pm$ 9.3 <sup>ab</sup> | 215.0 $\pm$ 10.1 <sup>ab</sup> | 154.5 $\pm$ 5.1 <sup>ab</sup> | 156.6 $\pm$ 6.8 <sup>ab</sup>  |
| SHR 干预组    | 212.8 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup> | 145.9 $\pm$ 9.3 <sup>cd</sup>  | 155.2 $\pm$ 5.7 <sup>ab</sup> | 120.0 $\pm$ 8.4 <sup>abd</sup> |

a 为  $P < 0.01$ ,与 Wistar 对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,c 为  $P < 0.05$ ,与 Wistar 干预组比较;d 为  $P < 0.01$ ,与 SHR 对照组比较。

### 2.2 干预后组间大鼠主动脉表达 miRNA-195 比较

各组大鼠主动脉表达的 miRNA-195 在 real time PCR 仪中检测溶解曲线均为单峰,均说明产物为纯扩增。贝那普利干预 8 周后,与 Wistar 对照组及 Wistar 干预组比较,SHR 对照组大鼠主动脉表达 miRNA-195 升高( $P$  均  $< 0.01$ );与 SHR 对照组、Wistar 对照及 Wistar 干预组比较,SHR 干预组大鼠主动脉表达 miRNA-195 升高( $P$  均  $< 0.01$ ;图 1 和表 2)。

表 2. 干预后各组大鼠主动脉表达 miRNA-195 比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Comparison of miRNA-195 expression in rat's aorta among groups after intervention ( $\bar{x} \pm s$ )

| 分 组        | miRNA-195                      |
|------------|--------------------------------|
| Wistar 对照组 | 1.00 $\pm$ 0.00                |
| Wistar 干预组 | 1.02 $\pm$ 0.25                |
| SHR 对照组    | 5.78 $\pm$ 1.32 <sup>ab</sup>  |
| SHR 干预组    | 8.46 $\pm$ 1.55 <sup>abc</sup> |

a 为  $P < 0.01$ ,与 Wistar 对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 Wistar 干预组比较;c 为  $P < 0.01$ ,与 SHR 对照组比较。

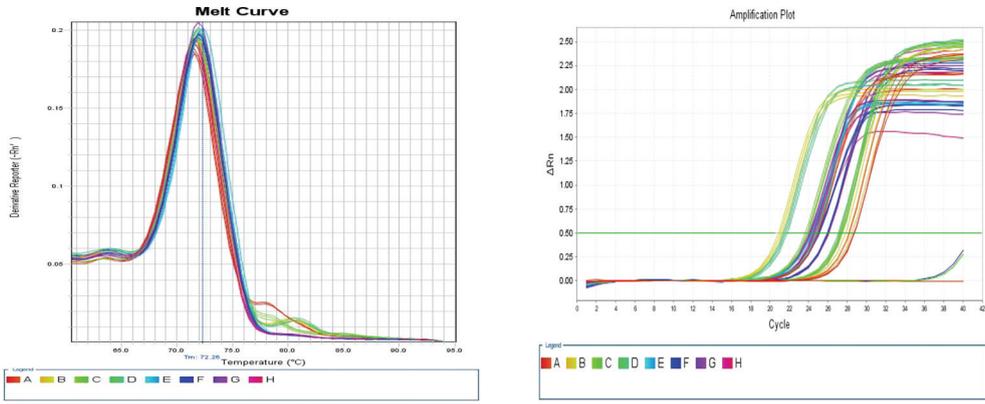


图 1. 干预后各组大鼠主动脉 miRNA-195 real time PCR 溶解曲线及扩增曲线  
 Figure 1. MiRNA-195 realtime PCR amplification curve and melting curve after treatment

2.3 干预后组间大鼠主动脉表达 TGF-β1、Smad3 蛋白表达比较

贝那普利干预 8 周后,与 SHR 对照组比较,SHR 干预组大鼠主动脉表达 TGF-β1 和 Smad3 蛋白下降( $P < 0.05$ );与 Wistar 干预组比较,SHR 干预组大鼠主动脉表达 TGF-β1 和 Smad3 蛋白升高( $P < 0.01$ );与 Wistar 对照组及 Wistar 干预组比较,SHR 对照组大鼠主动脉表达 TGF-β1 和 Smad3 蛋白升高( $P$  均  $< 0.01$ );与 Wistar 对照组比较,Wistar 干预组大鼠主动脉表达 TGF-β1 和 Smad3 蛋白降低( $P$  均  $< 0.01$ ;图 2 和表 3)。

后,与 SHR 对照组比较,SHR 干预组大鼠主动脉表达 COL-III 蛋白降低( $P < 0.01$ );与 Wistar 干预组比较,SHR 干预组大鼠主动脉表达 COL-III 蛋白升高( $P < 0.01$ );与 Wistar 对照组及 Wistar 干预组比较,SHR 对照组大鼠主动脉表达 COL-III 蛋白升高( $P < 0.01$ );与 Wistar 对照组比较,Wistar 干预组大鼠主动脉表达 COL-III 蛋白降低( $P < 0.01$ ),SHR 干预组大鼠主动脉表达 COL-III 蛋白升高( $P < 0.01$ ;图 3 和表 4)。

表 3. 干预后组间大鼠主动脉表达 TGF-β1 和 Smad3 蛋白比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. Comparison of TGF-β1 and Smad3 protein expression between groups after intervention ( $\bar{x} \pm s$ )

| 分 组        | TGF-β1                    | Smad3                     |
|------------|---------------------------|---------------------------|
| Wistar 对照组 | 0.28 ± 0.02               | 0.43 ± 0.10               |
| Wistar 干预组 | 0.12 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.22 ± 0.06 <sup>a</sup>  |
| SHR 对照组    | 0.44 ± 0.15 <sup>ab</sup> | 0.78 ± 0.19 <sup>ab</sup> |
| SHR 干预组    | 0.26 ± 0.07 <sup>bc</sup> | 0.41 ± 0.02 <sup>bc</sup> |

a 为  $P < 0.01$ ,与 Wistar 对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 Wistar 干预组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 SHR 对照组比较。



图 2. 干预后各组大鼠主动脉表达 TGF-β1 和 Smad3 蛋白凝胶电泳图片 1 为 Wistar 对照组;2 为 Wistar 干预组;3 为 SHR 对照组;4 为 SHR 干预组。

Figure 2. Gel electrophoresis images of TGF-β1 and Smad3 protein in rat's aorta of different groups

2.4 干预后组间大鼠主动脉表达 COL- I 和 COL- III 蛋白表达比较

贝那普利干预 8 周后,与 SHR 对照组比较,SHR 干预组大鼠主动脉表达 COL-I 蛋白降低( $P < 0.05$ );与 Wistar 干预组比较,SHR 干预组大鼠主动脉表达 COL-I 蛋白升高( $P < 0.01$ );与 Wistar 对照组及 Wistar 干预组比较,SHR 对照组大鼠主动脉表达 COL-I 蛋白升高( $P < 0.01$ );与 Wistar 对照组比较,Wistar 干预组大鼠主动脉表达 COL-I 蛋白降低( $P < 0.01$ )。贝那普利干预 8 周

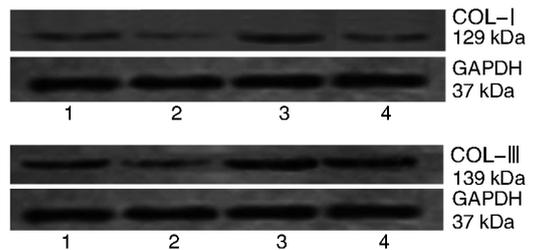


图 3. 干预后各组大鼠主动脉表达 COL- I 和 COL- III 蛋白凝胶电泳图片 1 为 Wistar 对照组,2 为 Wistar 干预组,3 为 SHR 对照组,4 为 SHR 干预组。

Figure 3. Gel electrophoresis images of COL- I and COL- III protein expression in rat's aorta of different groups after intervention

## 2.5 组间大鼠主动脉形态结构比较

HE 染色显示:Wistar 对照组及 Wistar 干预组大鼠主动脉内膜均一,无增生,中膜层弹力纤维无增厚,排列有序,平滑肌细胞无增殖,血管管壁无增厚;SHR 对照组大鼠主动脉内膜呈不均一增厚、结构紊乱,血管中膜平滑肌细胞增殖肥厚,弹力纤维增厚,血管壁增厚;与 SHR 对照组大鼠比较,SHR 干预组大鼠主动脉内膜更为完整、平滑、均匀,内弹力膜结构较完整,中层平滑肌细胞及中层弹力膜排列有序,平滑肌细胞增殖被抑制,但未能恢复到 Wistar 对照组水平(图 4)。

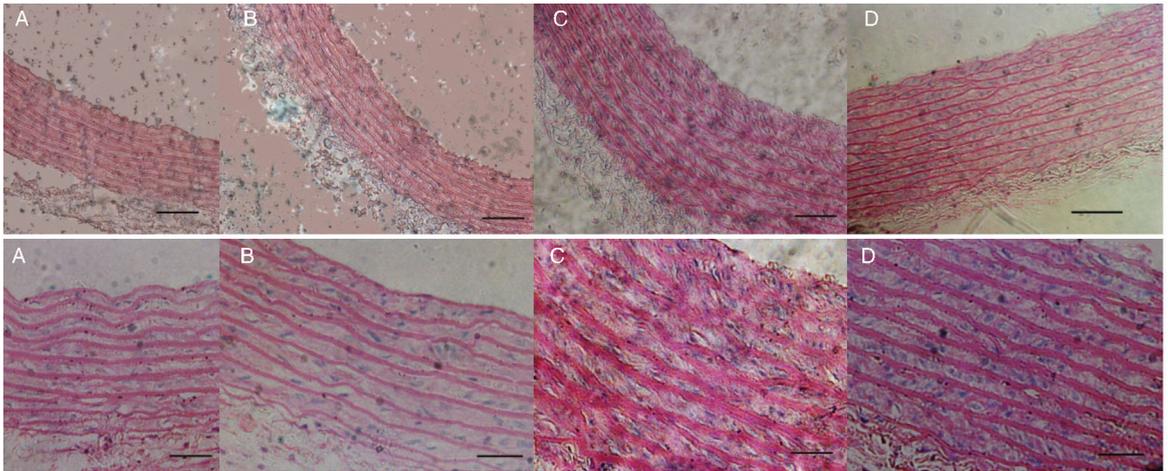


图 4. 干预后组间大鼠主动脉组织形态学对比 A 为 Wistar 对照组, B 为 Wistar 干预组, C 为 SHR 对照组, D 为 SHR 干预组;上图( $\times 200$ ),图中标尺为  $50\ \mu\text{m}$ ;下图( $\times 400$ ),图中标尺为  $25\ \mu\text{m}$ 。

Figure 4. Comparison of rat's aorta tissue morphology among groups after intervention

## 3 讨论

SHR 是遗传性高血压大鼠模型,在其生长过程中,血管阻力持续增加、血压升高、肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 激活,最终出现心、脑、肾、大动脉等器官损害,与人类原发性高血压形成机制相似,是目前国际公认最接近于人类原发性高血压的动物模型<sup>[14]</sup>。本研究结果显示:SHR 血压明显高于用于对照的 Wistar 大鼠,贝那普利干预使 SHR 血压明显降低,尤其是收缩压。SHR 主动脉内中膜较对照的 Wistar 大鼠明显增厚,中层平滑肌细胞增殖肥大,细胞外基质增多,结构紊乱,证实 SHR 主动脉存在典型的高血压患者大动脉重构的特征。贝那普利干预显著改善了 SHR 的主动脉重构:内中膜变薄、中层平滑肌细胞体积变小、结构整齐,证实贝那普利干预,对于 SHR 的主动脉重构也呈现出与血管紧张素转

表 4. 干预后各组大鼠主动脉表达 COL-I 和 COL-III 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4. Comparison of COL-I and COL-III protein expression between groups after intervention( $\bar{x} \pm s$ )

| 分 组        | COL-I                | COL-III               |
|------------|----------------------|-----------------------|
| Wistar 对照组 | $0.17 \pm 0.03$      | $0.35 \pm 0.08$       |
| Wistar 干预组 | $0.08 \pm 0.02^a$    | $0.19 \pm 0.05^a$     |
| SHR 对照组    | $0.32 \pm 0.06^{ab}$ | $0.88 \pm 0.13^{ab}$  |
| SHR 干预组    | $0.20 \pm 0.04^{bd}$ | $0.52 \pm 0.12^{abc}$ |

a 为  $P < 0.01$  与 Wistar 对照组比较; b 为  $P < 0.01$  与 Wistar 干预组比较; c 为  $P < 0.01$ , d  $P < 0.05$ , 与 SHR 对照组比较。

化酶抑制剂 (angiotensin-converting enzyme inhibition, ACEI) 类药物干预人类高血压患者类似的作用。其机制主要与抑制全身性 RAAS 系统而降低血压,抑制主动脉局部 RAAS 活性,抑制其平滑肌细胞肥大增殖、细胞外基质增生相关。

本研究发现 SHR 主动脉组织中, miRNA-195 表达水平较 Wistar 大鼠显著升高,同时 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、COL-I、COL-III 蛋白表达水平也明显升高。高血压状态下, TGF- $\beta 1$ 、Smad3、COL-I、COL-III 蛋白表达水平升高正是大鼠主动脉对长期高血压状态的反应,最终的结果导致其动脉形态结构的改变-动脉内中膜增厚,平滑肌细胞增殖肥大、弹力膜结构紊乱<sup>[15]</sup>。而 miRNA-195 做为一种负反馈调节的因子,在 SHR 大鼠主动脉中表达升高,说明 miRNA-195 可能参与了调节高血压导致的主动脉中层平滑肌细胞肥大、增殖,细胞外基质过度增生等重构的生物学过程。与本研究结果相似, Van Rooij 等<sup>[16]</sup> 的研究表明在压力诱导的

动物心肌肥厚过程中,miRNA-195 过度表达。另外一些研究发现,用 miRNA-195 干预可抑制血管内皮细胞增殖迁移和分泌炎症因子,抑制在球囊损伤的大鼠颈动脉内膜及中膜中平滑肌细胞增殖<sup>[12]</sup>。以上研究表明,在高血压状态下 miRNA-195 表达上调,可能是继发于 TGF- $\beta$ 1、Smad3、COL-I、COL-III 等促动脉硬化因子表达上调后,做为一种负反馈调节的因子抑制上述因子蛋白的过度表达。

在本研究中:贝那普利干预 SHR,显著降低其血压,上调其主动脉表达 miRNA-195 水平,同时降低了 TGF- $\beta$ 1、Smad3、COL-I、COL-III 等促动脉硬化因子的表达,改善了 SHR 大鼠的主动脉结构。推测贝那普利干预改善 SHR 主动脉重构的机制如下:①降低 SHR 大鼠血压,减轻主动脉壁所承受的张力,从而降低 TGF- $\beta$ 1、Ang II、Smad3、COL-I、COL-III 的表达水平,抑制主动脉平滑肌细胞增殖、迁移及细胞外基质合成。②结合 miRNA 的作用机制可推测:贝那普利同时促进了 miRNA-195 表达,而大量表达的 miRNA-195 通过与 TGF- $\beta$ 1、Smad3 等促进动脉发生病理性重构的靶基因表达的 mRNA 的非编码区结合,抑制其翻译成相应蛋白,从而降低了大鼠主动脉中 TGF- $\beta$ 1、Smad3、COL-I、COL-III 的表达水平,抑制其生物活性,最终抑制了主动脉的病理性重构。但目前尚未见 miRNA-195 与 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路转导相互作用的研究,有待进一步研究明确其间的关系。综上所述:ACEI 类药物贝那普利干预,可能抑制 miRNA-195 表达,信号通过 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路转导,抑制了 Col-I 和 Col-III 基因表达及成纤维细胞增殖,最终抑制了 SHR 的心脏重构。

SHR 主动脉表达 miRNA-195 上调可能继发于压力诱导的主动脉重构,贝那普利干预可改善 SHR 主动脉重构,这一作用可能与 miRNA-195 抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号转导通路有关。

#### [参考文献]

[1] 王文东, 齐若梅. 转化生长因子  $\beta$ /Smad3 信号通路与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(10): 875-877.

- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431 (7 006): 350-355.
- [3] Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis [J]. Br J Cancer, 2006, 94 (6): 776-780.
- [4] Chen LJ,  $\mu$ Lim SH, Yeh YT, et al. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis [J]. J Biomed Sci, 2012, 19(1): 79.
- [5] Han M, Toli J, Abdellatif M. MicroRNAs in the cardiovascular system[J]. Curr Opin Cardiol, 2011, 26 (3): 181-189.
- [6] Chen KC, Juo SH. MicroRNAs in atherosclerosis [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2012, 28(12): 631-640.
- [7] 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.
- [8] Liu L, Chen L, Xu Y, et al. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 400(2): 236-240.
- [9] 李健哲, 彭军, 王晨静, 等. 降钙素基因相关肽通过调节 miRNA-1 和 miRNA-133a 的表达抑制异丙肾上腺素诱导的心肌细胞凋亡(英文) [J]. 中南大学学报(医学版), 2011, 36 (10): 946-971.
- [10] 杨琼, 杨侃, 李安莹, 等. MicroRNA-21 在缺血再灌注损伤早期大鼠心肌的表达及抗细胞凋亡作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38 (5): 483-489.
- [11] 杨蕾, 张国兵. MicroRNA 和动脉粥样硬化的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(11): 916-918.
- [12] Wang YS, Wang HY, Liao YC, et al. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation [J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(4): 517-526.
- [13] 薛瑞凤, 孙东梅, 孙绍贤, 等. 贝那普利联合螺内酯对自发性高血压大鼠心肌纤维化的干预作用及超声背向散射积分评价[J]. 中国高血压杂志, 2010, 18(2): 171-176.
- [14] 王文, 刘力生. 原发性高血压的实验模型[J]. 高血压杂志, 1997, 5(4): 266.
- [15] 罗玉梅, 姜德谦, 万新红, 等. 吡格列酮和非诺贝特在调节代谢综合征大鼠主动脉重构中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 109(12): 966-970.
- [16] Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (48): 18 255-260.

(此文编辑 李小玲)