

# microRNA-133a 在心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌细胞中的表达及抗凋亡作用

李安莹, 杨侃, 杨琼

(中南大学湘雅三医院心内科, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] MicroRNA-133a; 心肌梗死; Transgelin-2; Caspase-9; 细胞凋亡

[摘要] 目的 观察 microRNA-133a(miR-133a)在心肌梗死后心衰大鼠心肌细胞中的表达及对细胞凋亡的影响。方法 SD 大鼠随机分为四组:①假手术组;仅开胸不结扎冠状动脉;②心肌梗死组;结扎冠状动脉前降支;③rAAV9 组;先冠状动脉转染空白病毒 rAAV9 后再结扎冠状动脉前降支;④miR-133a 组;先冠状动脉转染 rAAV9-ZsGreen-pre-miR-133a 后再结扎冠状动脉前降支。饲养 8 周后,real-time PCR 检测大鼠心肌 miR-133a、Transgelin-2 (TAGLN2)、Caspase-9、Bcl-2 mRNA 水平,免疫组织化学和 Western blot 检测 TAGLN2、Caspase-9、Bcl-2 蛋白水平。结果 心肌梗死后心衰大鼠心肌组织中 miR-133a 的表达较假手术组相比显著下降( $2.963 \pm 0.461$  比  $12.518 \pm 2.21$ ),TAGLN2 和 Caspase-9 的 mRNA 及蛋白表达升高,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平降低。冠状动脉注射 rAAV9-ZsGreen-pre-miR-133a 使大鼠心肌 miR-133a 表达明显上调,TAGLN2 和 Caspase-9 的 mRNA 及蛋白表达减少,Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平增加。结论 心肌梗死后心衰大鼠心肌 miR-133a 表达下调,可能使其对促凋亡基因 TAGLN2 和 Caspase-9 的降解和抑制作用减弱,从而促进心肌凋亡的发生;过表达 miR-133a 可减少心肌梗死后的心肌凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Anti-apoptosis Effect and Expression of microRNA-133a in Rat Myocardium of Heart Failure After Myocardial Infarction

LI An-Ying, YANG Kan, and YANG Qiong

(Department of Cardiology, The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

[KEY WORDS] MicroRNA-133a; Myocardial Infarction; Transgelin-2; Caspase-9; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the anti-apoptosis effect and expression of microRNA-133a (miR-133a) in rat myocardium of heart failure after myocardial infarction (MI). **Methods** Sprague-Dawley rats were divided into four groups randomly: ①Sham group: rats were dealt with open-chest; ②MI group: rats were operated by left anterior descending coronary artery ligation; ③rAAV9 group: rats were operated by left anterior descending coronary artery ligation after transfected with rAAV9-ZsGreen by coronary injection; ④miR-133a group: rats were operated by left anterior descending coronary artery ligation after transfected with rAAV9-ZsGreen-pre-miR-133a by coronary injection. Feeding for eight weeks, expressions of miR-133a and mRNA of transgelin-2 (TAGLN2), Caspase-9 and Bcl-2 were detect by real-time PCR, immunohistochemistry and Western blot were used to determine protein level of TAGLN2, Caspase-9 and Bcl-2.

**Results** The miR-133a expression of MI group decreased obviously compared with sham group ( $2.963 \pm 0.461$  vs.  $12.518 \pm 2.21$ ). The mRNA and protein level of TAGLN2 and Caspase-9 both increased in MI group versus sham group, while Bcl-2 expression decreased in MI group. The expression of miR-133a was up-regulated after rAAV9-ZsGreen-pre-miR-133a coronary injection, the mRNA and protein level of TAGLN2 and Caspase-9 were reduced in the same group, while Bcl-2 expression increased. **Conclusions** The down-regulation of miR-133a in failure heart after MI could decrease its degradation and inhibiting effects to TAGLN2 and Caspase-9, thus promote myocardial apoptosis. Myocardial apoptosis may be alleviated by over-expressed miR-133a.

[收稿日期] 2014-01-10

[作者简介] 李安莹, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为心肌疾病, E-mail 为 li\_anying120@sina.com。通讯作者杨侃, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病和心力衰竭, E-mail 为 yangkan@medmail.com.cn。杨琼, 博士, 主治医师, 研究方向为心力衰竭。

miRNA 是一类含有约 21 ~ 25 个核苷酸的单链小分子 RNA, 是一组不编码蛋白质的短序列 RNA。miRNA 通过与目的 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTR) 按照碱基互补配对原则结合, 抑制翻译或促进靶 mRNA 降解, 介导转录后的基因调控<sup>[1]</sup>。miRNA-133a 是一类具有横纹肌组织表达特异性的 miRNA, 在心脏中表达丰富, 参与心血管系统的生理及多种病理过程。Transgelin-2 (TAGLN2) 和 Caspase-9 均是 miR-133a 的潜在目的基因, 其中 TAGLN2 是一种肌动蛋白结合蛋白, 其功能作用尚未完全阐明, 目前的研究多集中在肿瘤方面, 在多种人类恶性肿瘤中可观察到 TAGLN2 的高表达, 与肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移等相关, 并可能调控细胞凋亡, 但在心肌细胞中尚无任何研究成果。Caspase-9 是已证实的细胞凋亡调控因子, 属于半胱氨酸蛋白酶家族, 可将核蛋白 PARP 切割为促凋亡片段。因此我们推测 miR-133a 可能通过 TAGLN2 和 Caspase-9 参与了心肌细胞凋亡的调控。本研究拟采用结扎大鼠冠状动脉前降支的方法构建心肌梗死后心力衰竭模型, 并通过冠状动脉注射腺相关病毒转染心肌的方法实现 miR-133a 的过表达, 观察心肌梗死后 miR-133a 表达水平的变化及其在心肌细胞凋亡中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验试剂

miRNA 提取试剂盒 E. Z. N. A. miRNA Kit (美国 Omega 公司); SYBR Green qPCR Mix (日本 Toyobo 公司); miR 逆转录试剂盒 Rn\_miR-133a\_2、反转录试剂盒 miScript II RT Kit (美国 Qiagen 公司); TAGLN2 单克隆抗体 (bs-2977R, 博奥森公司); Caspase-9 多克隆抗体 (ab63488)、Bcl-2 多克隆抗体 (ab7973) (英国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (美国 Vector 公司); miR-133a 引物 (HmiRQP0166, 上海复能生物技术有限公司); rAAV9-Zs-Green-pre-miR-133a 由深圳百思维生物公司构建, 制备方法是构建 pAAV-ZsGreen-rno-pre-133a 并导入 293AAV 细胞, 产生含高滴度含目的基因 miR-133a AAV, 每毫升病毒滴度为  $5.0 \times 10^{12}$  vg; 空白对照病毒 rAAV9-Zs-Green 由深圳百思维生物公司提供, 每毫升病毒滴度为  $5.0 \times 10^{12}$  vg。

### 1.2 实验动物和分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 体重 220 ~ 250 g, 由湘雅三医院实验动物中心提供, 许可证号: SCXX (湘)2009-0004。动物使用符合中南大学动物管理

委员会管理条例。随机分为四组: ①假手术组: 大鼠仅开胸不结扎冠状动脉; ②心肌梗死组: 结扎大鼠冠状动脉前降支后饲养 8 周; ③rAAV9 组: 先冠状动脉转染空白病毒 rAAV9 后再结扎大鼠冠状动脉前降支, 饲养 8 周; ④miR-133a 组: 先冠状动脉转染 rAAV9-ZsGreen-pre-miR-133a 后再结扎大鼠冠状动脉前降支, 饲养 8 周。

### 1.3 心肌梗死后心衰大鼠模型的构建

大鼠适应性饲养 1 周后, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 进行麻醉, 仰卧位固定四肢及头部, 先纵向剪开颈部皮肤, 钝性分离颈部肌肉, 暴露气管, 在甲状腺下 2 ~ 3 软骨环间, 横向剪开气管 2 ~ 3 mm, 插管连接小型动物呼吸机进行呼吸支持, 设定呼吸频率 70 次/分, 潮气量 10 ~ 12 mL, 吸呼比 1:1。纵向剪开左侧胸部皮肤, 钝性分离肌肉, 剪断第 3、4 肋骨开胸, 眼科镊撕开心包, 暴露心脏。在肺动脉圆锥及主动脉交界处以下 1 ~ 2 mm, 用 5-0 带针缝合线缝扎左冠状动脉前降支, 成功标志为结扎部位以下心肌颜色变苍白, 搏动减弱, 心电图 ST 段明显抬高。负压关胸, 逐层缝合肌肉、胸壁、皮肤, 撤出呼吸机, 缝合颈部皮肤。术后连续 3 天腹腔内注射青霉素预防感染。假手术组只开胸穿针, 不结扎冠状动脉。

### 1.4 冠状动脉注射转染 rAAV9-ZsGreen-pre-miR-133a

同上法麻醉大鼠, 气管插管, 呼吸机支持, 开胸后暴露心脏, 用一次性胰岛素注射器自心尖部向左心室腔内注射 200  $\mu$ L rAAV9-ZsGreen-pre-miR-133a, 同时用自制无损伤血管钳夹闭主动脉 10 s, 期间可见心脏逐渐膨大, 心率变慢, 松开血管钳后, 心脏恢复正常大小, 心率恢复正常, 观察 2 min 后继续进行冠状动脉前降支缝扎手术。

### 1.5 超声心动图检查

饲养 8 周后进行超声心动图检查。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 观察无翻正反应后, 仰卧位固定。手术剪剪去胸前毛发, 超声心动图 (探头 10 S, 图像深度 2.0 ~ 4.0 cm, 频率 11.4 MHz) 检查左心室舒张期末内径 (left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩期末内径 (left ventricular end systolic diameter, LVESD)、短轴缩短率 (fractional shortening, FS) 及左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)。

### 1.6 留取标本

饲养 8 周后留取标本。同上法麻醉大鼠, 开胸后先用冰生理盐水进行心脏灌洗, 然后取出心脏, 用冰生理盐水漂洗血液, 在冰盘上剪去大血管、心房和右心室组织, 垂直心脏左心室长轴中点, 将心

脏横切为两半。心尖部分用 4% 多聚甲醛固定 8 h 后再转 0.02% 叠氮化钠保存,留做形态学检测。心底部分梗死边缘区放入冻存管,液氮速冻后转入 -80℃ 超低温冰箱保存,留做分子生物学检测。

### 1.7 形态学实验

心肌组织脱水、石蜡包埋后切片,HE 染色观察细胞形态,免疫组织化学法检测 TAGLN2、Caspase-9 和 Bcl-2 蛋白表达。在 Nikon Eclipse 80i 显微镜下观察,Nikon DS 高分辨率数码相机经 NIS-Elements BR 3.0 软件拍照。采用 Image pro plus 6.0 程序软件进行图像分析,每张切片随机选 5 个视野(200 倍),计算阳性特异染色面积占组织切片总面积的比例为标志物阳性数值。

### 1.8 Western blot 检测 TAGLN2、Caspase-9 和 Bcl-2 蛋白表达

组织匀浆后加入蛋白裂解液,离心吸取上清为组织全蛋白溶液,BCA 法测定蛋白质含量,加上样缓冲液后煮沸 5 min 变性,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳样品蛋白,每泳道上样量 50 μg,浓缩胶 80 V 30 min,分离胶 120 V 60 min。半干法转移蛋白至 PVDF 膜,5% BSA 慢摇封闭 3~4 h,PBST 洗膜后加入一抗(TAGLN2 单克隆抗体 1:250、Caspase-9 多克隆抗体 1:1000、Bcl-2 多克隆抗体 1:100),4℃ 过夜。PBST 洗膜后加入羊抗兔二抗(1:2000),慢摇 2 h 后进行 ECL 显色,X 光胶片显影定影,将胶片进行扫描,用 Image pro plus 6.0 进行图像分析。

### 1.9 TAGLN2、Caspase-9 和 Bcl-2 mRNA 及 miR-133a 表达检测

用 E. Z. N. A. miRNA Kit 分别提取 miRNA 和大分子 RNA,按逆转录试剂盒说明反转录合成 cDNA,再以此 cDNA 为模板,实时荧光定量 PCR 检测 TAGLN2、Caspase-9、Bcl-2 mRNA 及 miR-133a 表达。引物设计采用 Primer 5.0 软件,TAGLN2 上游引物序列 5'-GCA TGT TTC TGC CTT CCT GAC-3',下游引物序列 5'-TCT CCT CCA CTC CAC CCC TTA-3',Caspase-9 上游引物序列 5'-CCT TGT GTC CTA CTC CAC CTT C-3',下游引物序列 5'-TCT GCT TAT AAA CCC CTT TCT C-3',Bcl-2 上游引物序列 5'-TTC TTT GAG TTC GGT GGG GTC-3',下游引物序列 5'-ATT TGT TTG GGG CAG GTC TGC-3',以 β-actin 为内参,95℃ 预变性 3 min,之后每一步 95℃ 变性 10 s,miR-133a、TAGLN2、Bcl-2、β-actin 引物 58℃ 退火延伸 30 s,Caspase-9 引物 60℃ 退火延伸 30 s,共进行 40 个循环,每次在延伸阶段读取荧光值。

## 1.10 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,对计量资料进行正态性检验,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心肌梗死大鼠建模及存活情况

冠状动脉前降支缝扎术后,可见缝扎部位以下心室肌局部颜色变苍白,运动减弱,心电图示 ST 段显著抬高,以 II 导联最为明显。手术大鼠共 70 只,死亡 25 只,术后存活 45 只,其中假手术组 10 只,心肌梗死组 13 只,rAAV9 组 12 只,miR-133a 组 10 只。实验末,假手术组大鼠无死亡,营养状态良好,毛发密实、顺滑,动作敏捷,活动量大;心肌梗死术后大鼠营养状态较差,毛发较稀疏且杂乱暗淡,动作缓慢,活动量较少,呼吸急促。心肌梗死组死亡 2 只,rAAV9 组死亡 3 只,miR-133a 组死亡 1 只。

### 2.2 大鼠心脏超声表现

假手术组大鼠心脏室壁厚度正常,室壁运动协调,收缩有力;心肌梗死后大鼠左室壁运动减弱或消失,部分呈矛盾运动,左室腔明显扩张,LVEDD 明显增大,LVEF 和 FS 明显下降;miR-133a 组 LVEDD 较假手术组明显增大,但比心肌梗死组缩小,LVEF 和 FS 较假手术组降低,但高于心肌梗死组( $P < 0.01$ ;表 1)。

表 1. 各组大鼠心脏超声参数比较

Table 1. Comparison of echocardiography parameters in each group

分 组	LVEDD(mm)	LVEF(%)	FS(%)
假手术组	6.527 ± 0.403	82.0 ± 4.4	46.2 ± 4.5
心肌梗死组	8.468 ± 0.217 <sup>a</sup>	51.7 ± 3.6 <sup>a</sup>	25.7 ± 3.4 <sup>a</sup>
rAAV9 组	8.350 ± 0.306 <sup>a</sup>	50.5 ± 3.8 <sup>a</sup>	26.7 ± 2.2 <sup>a</sup>
miR-133a 组	7.552 ± 0.241 <sup>ab</sup>	65.2 ± 4.2 <sup>ab</sup>	36.0 ± 2.0 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与假手术组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与心肌梗死组比较。

### 2.3 大鼠心肌 HE 染色情况

假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,肌横纹清晰,细胞间隙均匀,偶见炎症细胞浸润;心肌梗死组和 rAAV9 组大鼠梗死区心肌细胞显著减少,被大量排列紊乱的结缔组织代替,可见大量炎性粒细胞、单核细胞浸润;梗死边缘区可见心肌细胞代偿性肥大,肌横纹模糊或消失,心肌间隙增宽水肿,部分心肌纤维溶解、断裂,可见炎性细胞浸润、成纤维细胞增殖。miR-133a 组亦可见心肌细胞坏死、纤维组织



增生,程度较心肌梗死组有所减轻(图1)。

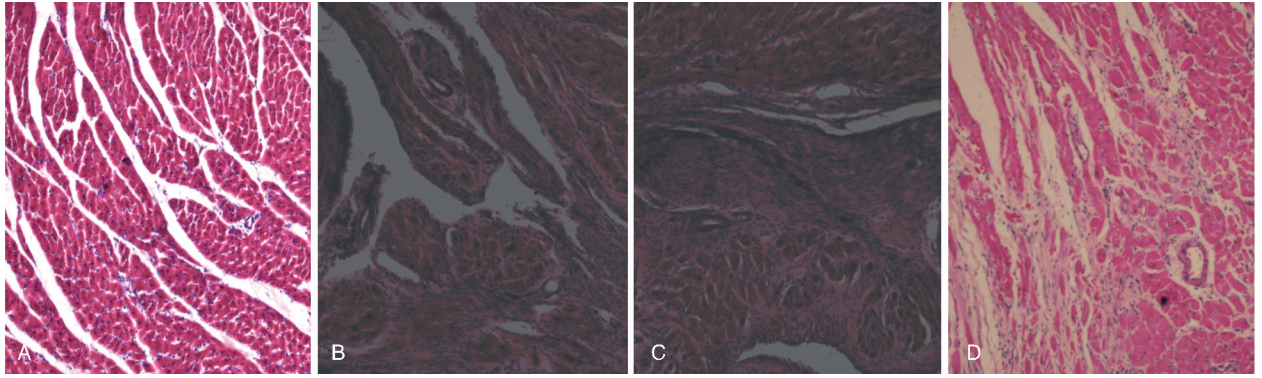


图1. 各组大鼠心肌 HE 染色( $\times 100$ ) A 为假手术组,B 为心肌梗死组,C 为 rAAV9 组,D 为 miR-133a 组。

Figure 1. HE staining of different group rats

#### 2.4 大鼠心肌 miR-133a 表达水平

与假手术组相比,心肌梗死组和 rAAV9 组大鼠心肌 miR-133a 的表达显著下降,miR-133a 组大鼠心肌 miR-133a 的表达较假手术组、心肌梗死组和 rAAV9 组增加( $P < 0.01$ ;图2)。

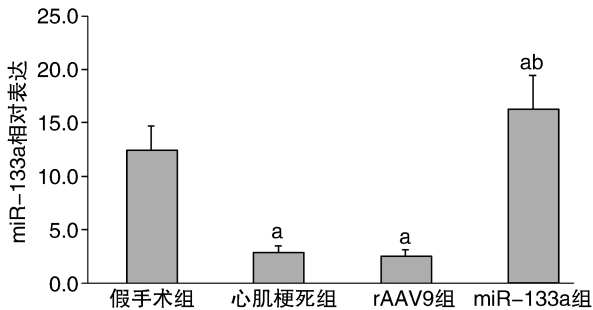


图2. 各组大鼠心肌 miR-133a 的表达 a 为  $P < 0.01$ ,与假手术组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与心肌梗死组比较。

Figure 2. Expression of miR-133a in rat cardiomyocyte

#### 2.5 大鼠心肌 TAGLN2 mRNA 和蛋白的表达

心肌梗死组、rAAV9 组、miR-133a 组 TAGLN2 mRNA 和蛋白的表达与假手术组相比升高( $P < 0.05$ ),miR-133a 组 TAGLN2 mRNA 和蛋白的表达与心肌梗死组和 rAAV9 组相比降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),心肌梗死组 TAGLN2 mRNA 和蛋白的表达与 rAAV9 组相比差异无统计学意义(图3和4)。免疫组织化学显示,假手术组心肌细胞内分布少量棕色颗粒,心肌梗死组、rAAV9 组、miR-133a 组心肌细胞内棕色颗粒显著增多。Western blot 检测显示,TAGLN2 蛋白表达与假手术组相比明显增加( $P < 0.01$ ),miR-133a 组 TAGLN2 蛋白表达与心肌梗死组及 rAAV9 组相比明显降低( $P < 0.01$ ),心肌梗死

组 TAGLN2 蛋白表达与 rAAV9 组相比差异无显著性(图5)。

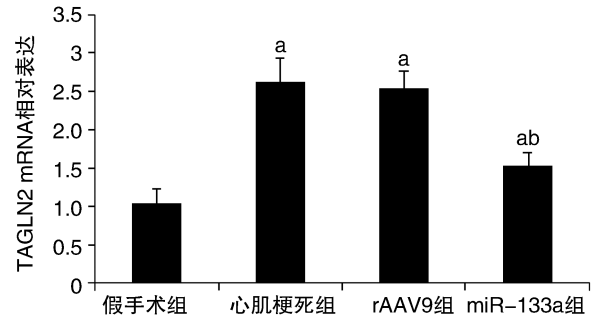


图3. 各组大鼠心肌 TAGLN2 mRNA 表达 a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与心肌梗死组比较。

Figure 3. TAGLN2 mRNA expression of rat cardiomyocyte

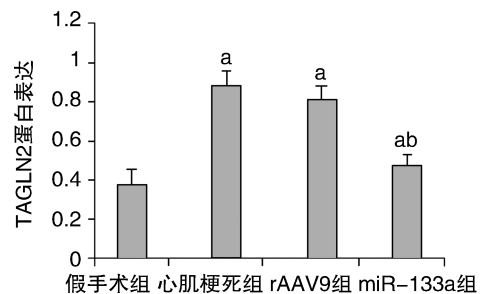
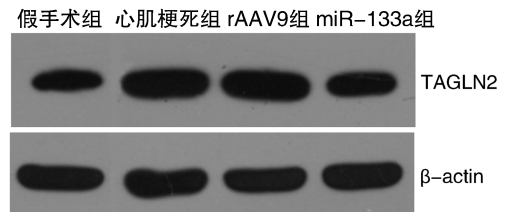


图4. Western blot 检测大鼠心肌 TAGLN2 蛋白表达 a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与心肌梗死组比较。

Figure 4. TAGLN2 protein expression of rat cardiomyocyte detected by Western blot

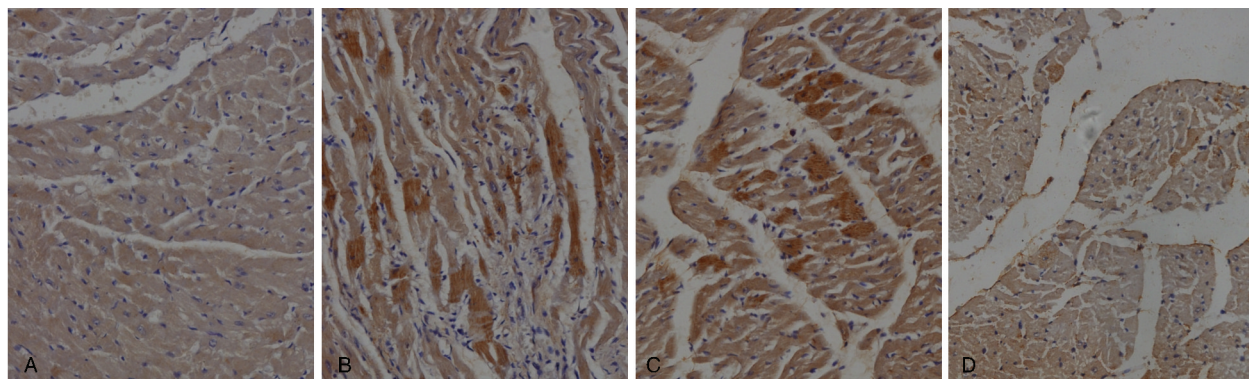


图 5. 免疫组织化学染色检测大鼠心肌 TAGLN2 蛋白表达 (×200) A 为假手术组, B 为心肌梗死组, C 为 rAAV9 组, D 为 miR-133a 组。

Figure 5. TAGLN2 protein expression of rat myocardial detected by immunohistochemistry

2.6 大鼠心肌 Caspase-9 mRNA 和蛋白的表达

心肌梗死组、rAAV9 组、miR-133a 组 Caspase-9 mRNA 和蛋白的表达较假手术组升高 ( $P < 0.05$ ), miR-133a 组 Caspase-9 mRNA 和蛋白的表达较心肌梗死组和 rAAV9 组降低 ( $P < 0.05$ ), 心肌梗死组 Caspase-9 mRNA 和蛋白的表达与 rAAV9 组相比差异无统计学意义(图 6 和 7)。免疫组织化学染色显示,假手术组心肌细胞内分布少量棕色颗粒,心肌梗死组、rAAV9 组、miR-133a 组心肌细胞内棕色颗粒明显增加。Western blot 检测显示,Caspase-9 蛋白表达与假手术组相比明显增加 ( $P < 0.01$ ), miR-133a 组 Caspase-9 蛋白表达较心肌梗死组和 rAAV9 组降低 ( $P < 0.01$ ), 心肌梗死组 Caspase-9 蛋白表达与 rAAV9 组相比差异无显著性(图 8)。

2.7 大鼠心肌 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达

心肌梗死组和 rAAV9 组 Bcl-2 mRNA 的表达较假手术组降低 ( $P < 0.01$ ), miR-133a 组 Bcl-2 mRNA 的表达升高 ( $P < 0.05$ ); miR-133a 组 Bcl-2 mRNA 的表达较心肌梗死组和 rAAV9 组增加 ( $P < 0.01$ ), 心肌梗死组 Bcl-2 mRNA 的表达与 rAAV9 组相比差异无统计学意义(图 9)。心肌梗死组、rAAV9 组、miR-133a 组 Bcl-2 的蛋白表达较假手术组下降 ( $P < 0.05$ ), miR-133a 组 Bcl-2 的蛋白表达较心肌梗死组和 rAAV9 组增加 ( $P < 0.05$ ), 心肌梗死组 Bcl-2 的蛋白表达与 rAAV9 组相比差异无显著性(图 10)。免疫组织化学染色显示,假手术组心肌细胞内可见棕色颗粒分布,心肌梗死组、rAAV9 组和 miR-133a 组心肌细胞内棕色颗粒明显减少。Western blot 检测显示,心肌梗死组和 rAAV9 组 Bcl-2 蛋白的表达明显下降 ( $P < 0.01$ ), miR-133a 组 Bcl-2 蛋白的表达较心肌梗死组和 rAAV9 组增加 ( $P < 0.01$ ), 但低

于假手术组 ( $P < 0.05$ )。心肌梗死组 Bcl-2 蛋白的表达与 rAAV9 组相比差异无显著性(图 11)。

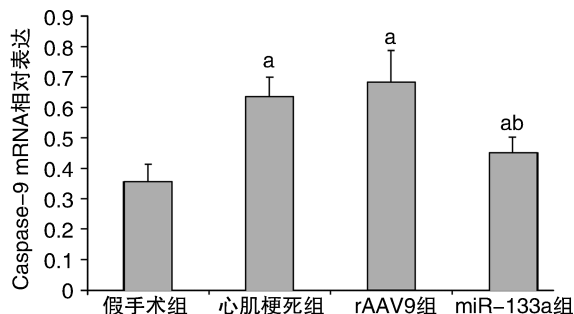


图 6. 各组心肌 Caspase-9 mRNA 的表达 a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与心肌梗死组比较。

Figure 6. Caspase-9 mRNA expression of rat cardiomyocyte

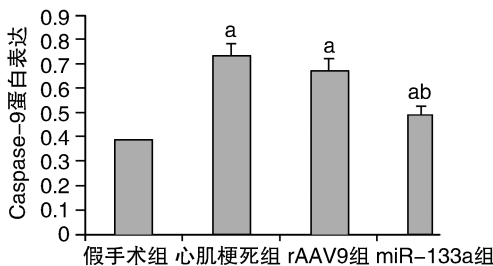
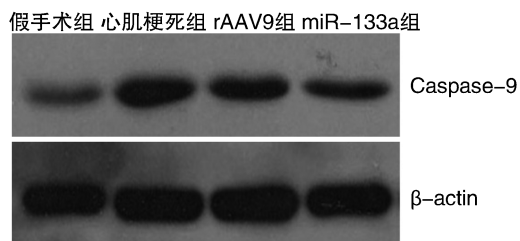


图 7. Western blot 检测大鼠心肌 Caspase-9 蛋白表达 a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与心肌梗死组比较。

Figure 7. Caspase-9 protein expression of rat cardiomyocyte detected by Western blot



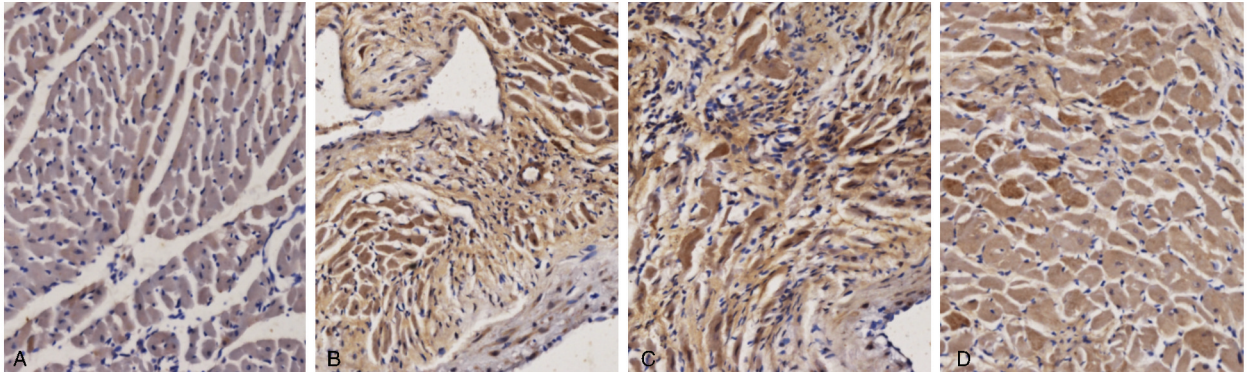


图 8. 免疫组织化学染色检测大鼠心肌 Caspase-9 蛋白表达 (×200) A 为假手术组, B 为心肌梗死组, C 为 rAAV9 组, D 为 miR-133a 组。

Figure 8. Caspase-9 protein expression of rat myocardial detected by immunohistochemistry

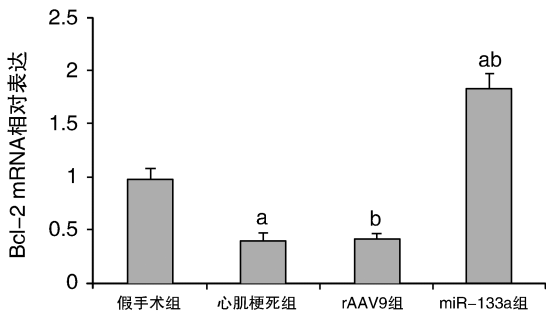


图 9. 各组心肌 Bcl-2 mRNA 的表达 a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与心肌梗死组比较。

Figure 9. Bcl-2 mRNA expression of rat cardiomyocyte

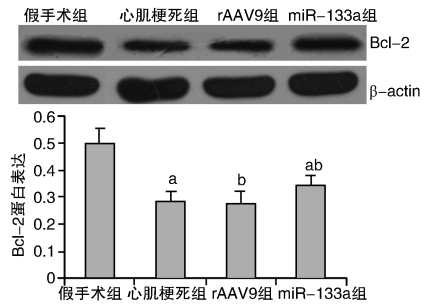


图 10. Western blot 检测各组大鼠心肌 Bcl-2 蛋白表达

a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与心肌梗死组比较。

Figure 10. Bcl-2 protein expression of rats cardiomyocyte by detected Western blot

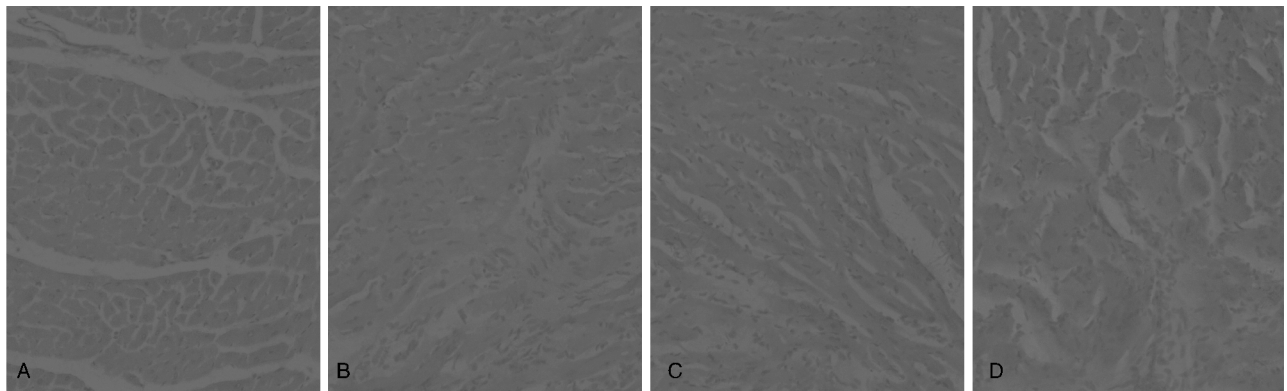


图 11. 免疫组织化学染色检测大鼠心肌 Bcl-2 蛋白表达 (×200) A 为假手术组, B 为心肌梗死组, C 为 rAAV9 组, D 为 miR-133a 组。

Figure 11. Bcl-2 protein expression of rat myocardial detected by immunohistochemistry

### 3 讨论

miR-133 是最早确认的具有横纹肌组织表达特异性的 miRNA 之一, 其家族包括 miR-133a-1、miR-133a-2 以及 miR-133b, 其中 miR-133a 在心肌和骨

骼肌中表达, miR-133b 主要在骨骼肌中表达, 广泛参与了心脏发育、心肌肥厚和心律失常等心脏生理和病理生理过程<sup>[2-8]</sup>, 研究发现 miR-133a 可能是心肌缺血应激后心脏适应过程的重要调节因子<sup>[9-11]</sup>。近来的研究发现 miR-133a 对心肌细胞凋亡也有调

节作用。Zhang 等<sup>[12]</sup>报道丹参酮 II A 可通过激活 MAPK ERK1/2 上调 miR-133 表达来增强心肌细胞对低氧损害的抵抗力,减少低氧心肌细胞的凋亡水平。Feng 等<sup>[13]</sup>研究显示丹参酮 II A 可能通过上调 miR-133 水平降低心力衰竭大鼠的心肌凋亡水平。Xu 等<sup>[14]</sup>研究发现 miR-1 和 miR-133 在氧化应激诱导的 H9c2 大鼠心肌细胞凋亡中产生相反的效应,其中 miR-1 为促凋亡效应,miR-133 为抗凋亡效应;miR-133 在蛋白和 mRNA 水平均抑制 Caspase-9 表达,氧化应激后 miR-133 水平显著降低,减少了对 Caspase-9 的抑制作用,从而促进凋亡,增加 miR-133 水平有利于细胞生存。Caspase 是一组存在于细胞质中具有类似结构的蛋白酶,能选择性的切割某些蛋白质,从而造成细胞凋亡。Caspase-9 属于 ICE/CED-3 家族,其底物是核蛋白 PARP,可将其剪切为凋亡片段。miR-133 的多个假定靶点贯穿 Caspase-9 基因序列始终,在蛋白和 mRNA 水平均抑制 Caspase-9 表达,荧光素酶报告实验进一步证实了 miR-133 对 Caspase-9 的转录后抑制作用<sup>[14]</sup>。TAGLN 是一种肌动蛋白结合蛋白,属于钙调蛋白家族成员,主要存在于平滑肌细胞中,可通过与肌动蛋白纤维相互作用而参与肌动蛋白纤维的聚合与解聚过程,在稳定和调节细胞骨架、维持细胞运动等生理过程中发挥着重要作用。TAGLN2 是 miR-133a 的潜在目的基因之一,它是 TAGLN 的同系物,与 TAGLN 有 65% 的同源性和 87% 的相似性,具有更广泛的组织分布<sup>[15,16]</sup>。近年来对 TAGLN2 的研究多集中在肿瘤方面,证实在多种恶性肿瘤如胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌、结肠直肠癌、头颈部鳞癌、上颌窦鳞癌中 TAGLN2 表达明显增加,介导癌细胞的增殖、侵袭和迁移<sup>[17-21]</sup>,这些研究也证实了 TAGLN2 是 miR-133a 的目的基因。也有研究发现 TAGLN2 可能对细胞凋亡具有调节作用<sup>[23]</sup>,但 TAGLN2 在心肌细胞病理生理中的作用尚未见研究报道。Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 原癌基因的编码产物,是细胞存活促进因子,能够阻止细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质,从而抑制细胞凋亡。本实验在动物水平研究 miR-133a 对心肌细胞凋亡的影响,建立心肌梗死后心衰大鼠模型,在前降支结扎术后 8 周可观察到大鼠心室腔扩大,射血分数降低,梗死区心肌细胞显著减少,被大量排列紊乱的结缔组织代替,可见炎性粒细胞、单核细胞浸润,梗死边缘区可见部分心肌纤维溶解、断裂。心肌组织中 miR-133a 表达显著下降。假手术组心肌细胞中可见 TAGLN2 和 Caspase-9 少量表达,在心肌梗死后其 mRNA 和

蛋白表达均显著上调,与 miR-133a 的表达趋势相反;相反的,心肌梗死组 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达显著降低,这些改变均可能促进心肌梗死后的心肌细胞凋亡。以上结果提示心肌梗死后大鼠心肌 miR-133a 的表达下调,对 Caspase-9 和 TAGLN2 的降解和抑制作用减弱,使两者表达上调,从而促进心肌凋亡发生。

miRNA 的功能研究包括过表达和表达抑制研究。过表达目前有两种策略:基于载体或病毒的 miRNA 前体的转染或者使用 miRNA 模拟物。本研究小组前期已报导通过尾静脉注射、心肌注射和冠状动脉注射三种不同方法转染 rAAV9-Zs-Green 后在大鼠心脏转染效率的比较,发现使用冠状动脉注射方法转染效率较高,安全性好,心肌均匀表达<sup>[17]</sup>。因此本研究选择冠状动脉注射的方法作为转染途径对 SD 大鼠进行 miR-133a 过表达干预,发现大鼠心肌组织中的 miR-133a 表达明显上调,证实冠状动脉注射途径转染有效。miR-133a 过表达的心肌梗死后大鼠心肌组织中 Caspase-9 和 TAGLN2 的 mRNA 及蛋白表达均有减少,Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达增加,进一步说明 miR-133a 在大鼠心肌细胞中可能通过降解 Caspase-9 和 TAGLN2 的 mRNA 以及抑制其转录来调控心肌细胞凋亡,这种机制可能有 Bcl-2 参与其中。

综上所述,本研究发现 TAGLN2 在心肌细胞凋亡中可能起着调节作用,miR-133a 对心肌细胞凋亡的调控作用可能是通过降解 Caspase-9 和 TAGLN2 的 mRNA 以及抑制其转录来实现的。miRNA 干预作为基因治疗的方法之一可能是将来心血管疾病治疗的新方向,但如何安全、高效地实现 miRNA 在体内的高表达或者表达抑制是其中的难点;本实验对 miRNA 在动物体内过表达的转染方法进行了初步探讨,证实冠状动脉注射法对于 miRNA 的心肌转染是有效的。过表达 miR-133a 可能减少心肌梗死后的心肌凋亡程度。

#### [参考文献]

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-297.
- [2] Meder B, Katus HA, Rottbauer W. Right into the heart of microRNA-133a[J]. Genes Dev, 2008, 22 (23): 3 227-231.
- [3] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nat Genet, 2006, 38 (2):

228-233.

- [4] Malizia AP, Wang DZ. MicroRNAs in cardiomyocyte development [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2011, 3 (2): 183-190.
- [5] Zorio E, Medina P, Rueda J, et al. Insights into the role of microRNAs in cardiac diseases; from biological signaling to therapeutic targets [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2009, 7 (1): 82-90.
- [6] Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart [J]. *Genes Dev*, 2008, 22 (23): 3 242-254.
- [7] Carè A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy [J]. *Nat Med*, 2007, 13 (5): 613-618.
- [8] Luo X, Lin H, Pan Z, et al. Downregulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (29): 20 045-052.
- [9] Salloum FN, Yin C, Kukreja RC. Role of miRs in cardiac preconditioning [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56 (6): 581-588.
- [10] Bostjancic E, Zidar N, Stajner D, et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction [J]. *Cardiology*, 2010, 115 (3): 163-169.
- [11] Bostjancic E, Zidar N, Stajner D, et al. MicroRNA miR-1 is up-regulated in remote myocardium in patients with myocardial infarction [J]. *Folia Biol (Praha)*, 2010, 56 (1): 27-31.
- [12] Zhang L, Wu Y, Li Y, et al. Tanshinone II A improves miR-133 expression through MAPK ERK1/2 pathway in hypoxic cardiac myocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30 (4): 843-852.
- [13] Feng J, Li SS, Liang QS. Effects of Tanshinone II A on the myocardial apoptosis and the miR-133 levels in rats with heart failure [J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2012, 32 (7): 930-933.
- [14] Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and Caspase-9 in cardiomyocytes [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120 (Pt 17): 3 045-052.
- [15] Zhang JCL, Helmke BP, Shum A, et al. SM22[beta] encodes a lineage-restricted cytoskeletal protein with a unique developmentally regulated pattern of expression [J]. *Mech Dev*, 2002, 115 (1-2): 161-166.
- [16] Rho JH, Roehrl MH, Wang JY. Tissue proteomics reveals differential and compartment-specific expression of the homologs transgelin and transgelin-2 in lung adenocarcinoma and its stroma [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8 (12): 5 610-618.
- [17] Lin H, Chen QL, Wang XY, et al. Clinical significance of pituitary tumor transforming gene 1 and transgelin-2 in pancreatic cancer [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2013, 26 (1): 147-156.
- [18] Zhuo HQ, Zhang YB, Zhang H, et al. Expression of transgelin-2 and clinical significance in colorectal cancer [J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2012, 50 (6): 551-554.
- [19] Moriya Y, Nohata N, Kinoshita T, et al. Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel molecular networks in lung squamous cell carcinoma [J]. *J Hum Genet*, 2012, 57 (1): 38-45.
- [20] Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39 (5): 1 099-107.
- [21] Nohata N, Sone Y, Hanazawa T, et al. miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2011, 2 (1-2): 29-42.
- [22] Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, et al. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104 (5): 808-818.
- [23] 谭文鹏, 杨侃, 李安莹, 等. 腺相关病毒载体介导 Zs-Green 基因通过 3 种转染途径在心肌组织转染效果的比较 [J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37 (6): 522-524.

(此文编辑 文玉珊)