

microRNA-503 在糖尿病大鼠心肌梗死后血管新生过程中的变化

陈 琴¹, 黄铭涵², 张在保¹, 郑行春¹

(1. 福建医科大学协和临床学院心内科 福建省冠心病研究所, 福建省福州市 350001;

2. 福建中医药大学附属第二人民医院, 福建省福州市 350003)

[关键词] 心肌梗死; 血管新生; microRNA-503; 糖尿病

[摘要] **目的** 通过比较自发糖尿病 GK 大鼠与 Wistar 大鼠急性心肌梗死后, 梗死边缘区心肌组织内血管新生水平、microRNA-503(miR-503)及其靶基因水平的变化, 探讨 miR-503 在糖尿病心肌缺血后血管新生中的调控作用。**方法** 选取 GK 大鼠、Wistar 大鼠各 30 只, 结扎左前降支近段建立急性心肌梗死模型, 分别于术前及术后 3 天、7 天、14 天、28 天处死动物, 留取血浆及心脏组织。免疫组织化学染色法检测梗死边缘区心肌Ⅷ因子表达计数微血管数; qRT-PCR 检测组织中 miR-503 水平; Western blot 检测梗死边缘区细胞周期素 E1 和细胞分裂周期蛋白 25A 表达水平。**结果** 在缺血后各时间点, GK 大鼠组心肌梗死边缘区微血管数量均少于 Wistar 大鼠组 ($P < 0.05$), 而心肌组织内的 miR-503 水平均高于 Wistar 大鼠组 ($P < 0.05$), 细胞分裂周期蛋白 25A 表达水平均低于 Wistar 大鼠组 ($P < 0.05$)。GK 大鼠组心肌组织细胞周期素 E1 蛋白表达水平仅在术后 14 天及 28 天时低于 Wistar 大鼠组 ($P < 0.05$)。**结论** 糖尿病可引起心肌缺血组织边缘区 miR-503 异常升高; 升高的 miR-503 可能通过抑制细胞分裂周期蛋白 25A 的表达, 参与调控糖尿病心肌梗死边缘区组织内血管新生能力的下降。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

MicroRNA-503 Contributes to Diabetes Mellitus Induced Impairment Reporative Angiogenesis After Acute Myocardial Infarction

CHEN Qin¹, HUANG Ming-Han², ZHANG Zai-Bao¹, and ZHENG Xing-Chun¹

(1. Department of Cardiology, Union Hospital, Fujian Institute of Coronary Artery Disease, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China; 2. The Second People's Hospital of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350003, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Angiogenesis; MicroRNA-503; Diabetes

[ABSTRACT] **Aim** To explore the expression of micorRNA-503 and its target genes, in process of diabetes mellitus induced impairment reparative angiogenesis after acute myocardial infarction. **Methods** GK rats and Wistar rats 30 each were made into the model of acute myocardial infarction by ligating the left anterior descending coronary artery. Capillary density around the region of infarction was detected by immunohistochemical staining with vWF, expression of micorRNA-503 was measured by qRT-PCR, and the protein expressions of cyclinE1 and cell division cycle 25A (CDC25A) were measured by Western blot. Analysis of capillaries, micorRNA-503, cyclinE1 and CDC25A were made on days 0 (pre-ligation), 3, 7, 14 and 28 days post-ligation. **Results** In each time point post-ligation, the capillary density around the region of infarction and expression of CDC25A decreased in GK rats compared with Wistar rats, the expression of micorRNA-503 increased significantly ($P < 0.05$). Decreased expression of cyclinE1 in GK rats was only observed on 14 and 28 days post-ligation ($P < 0.05$). **Conclusion** Our data suggest that micorRNA-503 contribute to diabetes mellitus induced impairment reparative angiogenesis after acute myocardial infarction, via down-regulation of CDC25A.

[收稿日期] 2014-12-01

[修回日期] 2015-01-11

[基金项目] 福建省自然科学基金青年项目(2012J015146); 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题新教师类基金(20113518120006)

[作者简介] 陈琴, 博士, 主治医师, 研究方向为糖尿病血管并发症机制、缺血性心脏病基础及临床研究, E-mail 为 ndcq@163.com。黄铭涵, 硕士, 研究方向为糖尿病并发症基础及临床研究。通讯作者郑行春, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化、糖尿病血管并发症、冠心病的介入治疗, E-mail 为 xingchunzheng@126.com。

糖尿病患者 在发生心肌梗死、缺血性脑卒中、糖尿病性足坏疽等缺血性事件时,预后往往较血糖正常人群更差,这在很大程度上与发生缺血组织的血管新生障碍有关^[1]。microRNA(miR)是一类非编码单链小分子RNA,以同源互补序列的mRNA为靶目标,通过翻译抑制、促进mRNA切割及降解等机制负调控靶基因的表达,参与细胞功能的调控^[2]。microRNA-503(miR-503)可通过调控细胞周期调节因子的表达,使细胞滞留于G1期,阻碍细胞分化^[3]。2011年,Caporali等^[4]发现高糖引起体外培养的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)以及微血管内皮细胞功能受损,在这一过程中,细胞内miR-503水平升高,进而抑制靶基因细胞周期素E1(cyclinE1,CCNE1)和细胞分裂周期蛋白25A(cell division cycle 25A,CDC25A)表达。同时,糖尿病下肢动脉闭塞患者血浆以及肌肉组织中的miR-503水平较血糖正常患者也明显升高。那么,miR-503是否也参与了糖尿病心肌梗死后血管新生的调控,目前尚未见文献报道。因此,本实验通过比较自发糖尿病GK大鼠与Wistar大鼠急性心肌梗死后,梗死边缘区心肌组织内miR-503及其靶基因水平的变化,探讨miR-503在糖尿病心肌缺血后血管新生中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型建立

雄性、SPF级自发糖尿病大鼠(GK大鼠)及Wistar大鼠各30只,12周龄,购自上海斯莱克实验动物有限公司[合格证号:SCXK(沪):0164377,2012-0002]。所有大鼠均在恒温、恒湿条件下饲养,每笼3~4只,采用人工照明,每天白天与夜间各12h(8am;8pm),允许自由取食及饮水。结扎左前降支近段建立急性心肌梗死模型,分别以术前及术后不同时间点(3天、7天、14天、28天)随机分次处死动物,每个时间点处死6只大鼠,留取血浆及心脏组织。

大鼠在2.5%戊巴比妥腹腔麻醉下,气管插管,人工通气,四肢皮下置针型电极,记录心电变化。左胸剪毛消毒后,在心脏搏动最明显处分层开胸,剪开心包,充分暴露心脏血管,用“0/5”无损伤丝线在左心耳根部下2mm处结扎左前降支,心电监护见ST段明显抬高提示造模成功,逐层缝合胸壁,关闭胸腔。用注射器抽出胸腔内气体,恢复负压状态。待动物复苏后,拔除气管插管。术后连续肌注青霉素3天,预防感染。

1.2 主要试剂

兔抗鼠VIII因子多克隆抗体和SABC试剂盒(武汉博士德),MMLV逆转录试剂盒(Promega),SYBR Premix Ex TaqTM(Perfect Real Time)试剂盒、RNase inhibitor、dNTP mix(TaKaRa),Primers(广州锐博生物科技有限公司MIMAT0003213),Trizol reagent(美国Invitrogen),兔抗大鼠CCNE1(Chemicon),小鼠抗大鼠CDC25A(Chemicon),兔抗大鼠β-actin(Santa Cruz),HRP标记的山羊抗兔IgG(北京中杉),HRP标记的山兔抗小鼠IgG(北京中杉)。

1.3 血糖测定

处死动物前给予待测大鼠12h禁食,经麻醉后处死,行心脏采血2mL,标本送我院生化室行静脉血糖测定。

1.4 心肌毛细血管密度测定

于实验时间点处死大鼠,每只大鼠在乳头肌处取0.3cm厚心脏短轴切面组织一块,4%多聚甲醛固定24h,常规石蜡包埋,连续切片,片厚4μm。石蜡切片常规脱蜡至水,0.01mol/L PBS(pH7.4),每次5min,加入0.3% H₂O₂ 甲醇溶液中15min,以消除组织的内源性过氧化物酶。PBS冲洗3次各5min,加入20mL/L正常羊血清,室温孵育30min。加VIII因子抗体(1:50)4℃冰箱中过夜。PBS冲洗3次各5min,加入二抗(1:200),室温孵育1h,经PBS冲洗,加入ABC复合物室温孵育1h,PBS水洗后加含0.05% DAB及0.01% H₂O₂的PBS中显色10min。脱水透明,中性树胶封片。阴性对照不加一抗,以正常羊血清替代,余步骤相同。每例动物选取5张切片,每张切片在心肌梗死边缘区随机取5个视野,在高倍镜下(×200)计数微血管数,其平均数代表每个高倍视野(0.2mm²)的心肌微血管数。

1.5 qRT-PCR检测组织中miR-503表达水平

取各组大鼠心肌梗死边缘区(2mm)组织,按Trizol试剂盒操作提取总RNA,根据MMLV逆转录试剂盒(Promega)使用说明逆转录RNA,以U6作为内参基因,采用SYBR GreenI qPCR方法检测miR-503水平。Primers购自广州锐博生物有限公司(产品编号MIMAT0003213);PCR扩增条件为95℃ 20s,95℃ 10s,60℃ 20s,70℃ 1s,共进行40个循环,在70℃至95℃绘制溶解曲线,琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增情况,以Ct值来表示目标基因表达量,取三次的平均值,计算miR-503与内参基因U6的比值作为相对量,用2^{-ΔΔCt}法计算miR-503的表达量。

1.6 Western blot 检测大鼠心肌缺血区组织 CCNE1 和 CDC25A 蛋白表达

取 150 mg 心肌梗死边缘区(2 mm)心肌组织,取 30 μg 蛋白上样,PAGE 电泳,然后转至硝酸纤维素膜上,膜用 TBST 封闭 1 h,分别用抗 CCNE1(1:1000)、CDC25A(1:400)、β-actin(1:1000)的一抗 4℃ 过夜,TBST 洗 3 次;二抗室温孵育 1 h。增强的化学荧光素显像并摄片,以 Quantity One software(Bio-Rad)进行图像分析,计算目标条带与内参(β-actin)灰度的比值。

1.7 统计学方法

使用 SPSS17.0 统计软件包进行统计学处理,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验比较两组均数间统计学差异;多组样本均值比较,先采用单因素方差分析(One-way ANOVA)证实存在组间差异后,行 Dunnett's t 检验进行各组均值之间的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物基本情况

术前及急性心肌梗死造模成功后各个时间点中,GK 大鼠血糖水平均明显高于 Wistar 大鼠(表 1)。两组大鼠在各个观察时间点处死时体重无明显差异(表 2)。

表 1. 两组大鼠不同时间点空腹血糖水平 (mmol/L, $n = 6$)
Table 1. Serum glucose levels in different time points (mmol/L, $n = 6$)

时间点	Wistar 大鼠	GK 大鼠
术前	6.38 ± 0.22	12.19 ± 0.25 ^a
术后 3 天	6.43 ± 0.15	12.28 ± 0.28 ^a
术后 7 天	6.42 ± 0.15	12.60 ± 0.30 ^a
术后 14 天	6.40 ± 0.20	12.55 ± 0.29 ^a
术后 28 天	6.46 ± 0.14	12.63 ± 0.27 ^a

a 为 $P < 0.05$,与 Wistar 大鼠同一时间点比较。

表 2. 两组大鼠不同时间点体重水平 (g, $n = 6$)
Table 2. Weight of rats in different time points (g, $n = 6$)

时间点	Wistar 大鼠	GK 大鼠
术前	237 ± 9	238 ± 10
术后 3 天	240 ± 10	237 ± 8
术后 7 天	243 ± 13	245 ± 12
术后 14 天	250 ± 10	247 ± 13
术后 28 天	260 ± 15	250 ± 13

2.2 心肌梗死边缘区微血管数

VIII 因子表达于血管内皮细胞,基础水平下,GK 大鼠心肌微血管数略低于 Wistar 大鼠,但差异无统计学意义。在 GK 大鼠和 Wistar 大鼠中,心肌梗死边缘区微血管数量从急性心肌梗死后 3 天开始增多,7 天达到最高峰(图 1),14 天以后逐渐减少,28 天时与基础水平相当。在各个观察时间点,GK 大鼠心肌梗死边缘区微血管数量均少于同时期 Wistar 大鼠($P < 0.05$;表 3)。

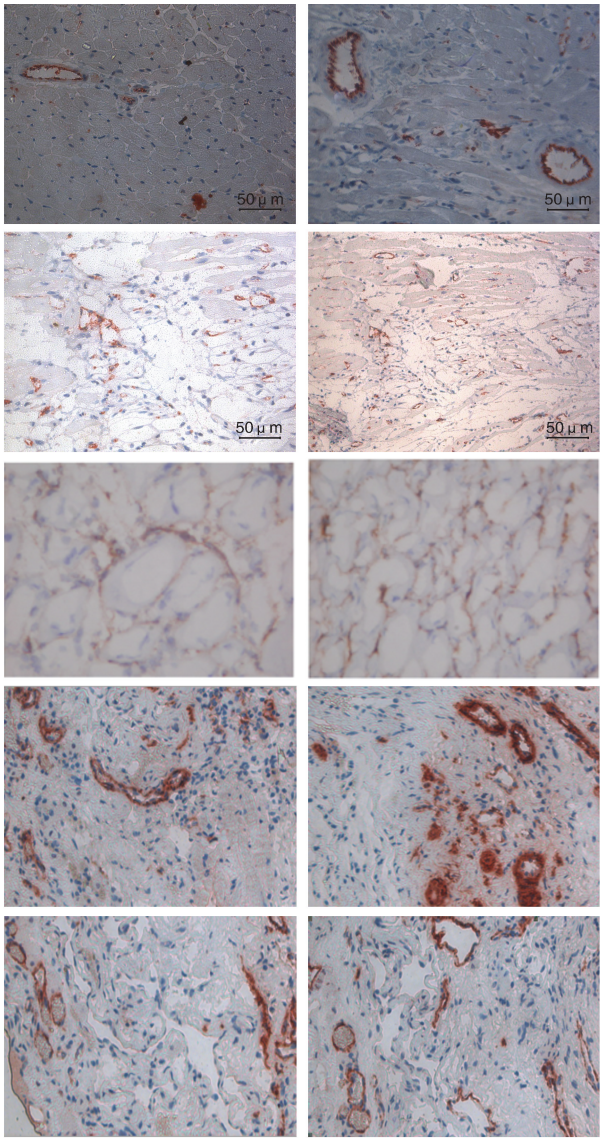


图 1. GK 大鼠(左图)与 Wistar 大鼠(右图)不同时间点心肌梗死边缘区血管新生水平 从上到下依次为术前、术后 3 天、术后 7 天、术后 14 天和术后 28 天。

Figure 1. Post-ischemia neovascularization around the region of myocardial infarction in GK rats and Wistar rats

2.3 心肌梗死边缘区 miR-503 表达水平

在急性心肌梗死后 3 天,梗死边缘区心肌组织

内 miR-503 水平开始升高,14 天时达到最高峰,28 天下降至接近术前基础水平。不论术前还是急性心肌梗死后各个时间点,GK 大鼠心肌组织内的 miR-503 水平均高于 Wistar 大鼠($P < 0.05$;图 2)。

表 3. 两组大鼠不同时间点心肌梗死边缘区微血管计数(个/0.2 mm², $n = 6$)

Table 3. The density of capillaries around the region of myocardial infarction (Capillaries/0.2 mm², $n = 6$)

时间点	Wistar 大鼠	GK 大鼠
术前	19.43 ± 5.25	18.11 ± 3.45
术后 3 天	40.26 ± 8.17 ^a	33.23 ± 6.11 ^{ab}
术后 7 天	58.06 ± 8.03 ^a	42.01 ± 7.05 ^{ab}
术后 14 天	30.63 ± 7.05 ^a	24.24 ± 4.28 ^{ab}
术后 28 天	22.21 ± 4.25	19.06 ± 4.18 ^b

a 为 $P < 0.05$,与术前比较;b 为 $P < 0.05$,与 Wistar 大鼠同一时间点比较。

2.4 大鼠心肌梗死边缘区 CDC25A 和 CCNE1 蛋白表达

基础无缺血状态下,两组大鼠心肌组织中 CDC25A 表达水平未见明显差异。在急性心肌梗死造模成功后,GK 大鼠组,术后 3 天时梗死边缘区心肌内 CDC25A 表达水平开始下降($P < 0.05$),持续至 14 天最低($P < 0.05$),28 天时又回升至接近基础水平($P > 0.05$);Wistar 大鼠组,术后 3 天至 14 天时梗死边缘区心肌内 CDC25A 表达稍减少,但与基础

水平相比尚未达到统计学差异($P > 0.05$),28 天时 CDC25A 表达水平与术前类似;术后 3 天至 28 天期间 GK 大鼠组梗死边缘区心肌内 CDC25A 表达水平均较同时间点 Wistar 大鼠组低($P < 0.05$;图 3)。

基础无缺血状态下,两组大鼠心肌组织中 CCNE1 表达水平未见明显差异。在急性心肌梗死造模成功后,GK 大鼠组,术后 14 天及 28 天时梗死边缘区心肌内 CCNE1 较基础水平下降($P < 0.05$);Wistar 大鼠组,各个时间点梗死边缘区心肌内 CCNE1 表达水平与基础水平相比尚未达到统计学差异($P > 0.05$);在术后 14 天和 28 天时,GK 大鼠组梗死边缘区心肌内 CCNE1 表达水平均较同时间点 Wistar 大鼠组低($P < 0.05$;图 3)。

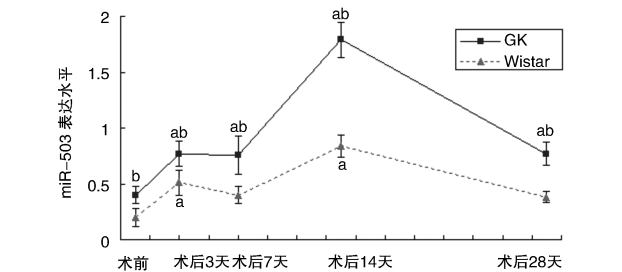


图 2. 两组大鼠不同时间点心肌梗死边缘区 miR-503 表达水平($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) a 为 $P < 0.05$,与术前比较;b 为 $P < 0.05$,与 Wistar 大鼠同一时间点比较。

Figure 2. miR-503 expression around the region of myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

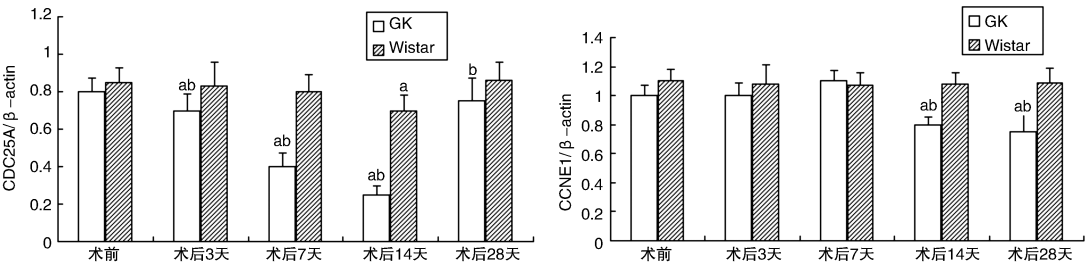
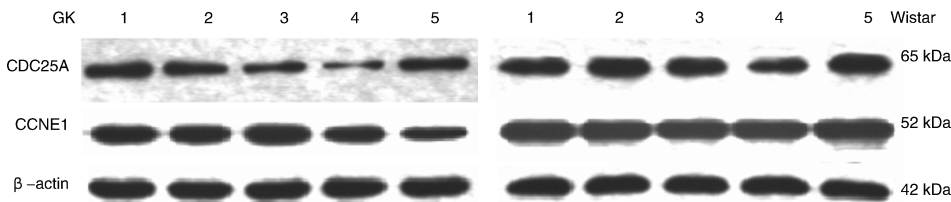


图 3. 两组大鼠不同时间点 CDC25A 及 CCNE1 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$, $n = 6$) 1 为术前,2,3,4,5 依次为术后 3 天、7 天、14 天和 28 天。a 为 $P < 0.05$,与术前比较;b 为 $P < 0.05$,与 Wistar 大鼠同一时间点比较。

Figure 3. Expression of CDC25A and CCNE1 around the region of myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3 讨论

miRNA 作为一种转录后调控因子,能够同时靶向作用于多个不同通路中相关蛋白质 mRNA,从转录水平或转录后水平调节基因表达,进而实现对细胞内多种因子的表达乃至多条信号通路的调控^[2]。miRNA 参与心肌梗死后的组织修复过程也陆续被证实^[5]。miR-503 位于染色体 Xq26.3,由 Zhao 等^[6]利用 miRNA 芯片技术由视网膜母细胞瘤组织中发现。细胞中的 miR-503 水平可因暴露在高糖、低氧环境中升高,升高的 miR-503 可通过抑制靶基因 CCNE1 以及 CDC25A 的表达阻碍细胞分化以及血管新生的能力^[4,7,8]。本课题组既往研究表明在糖尿病状态下,缺血后组织血管新生能力下降很大程度上与内皮细胞、内皮祖细胞的增殖、分化以及血管新生能力受损有关^[9]。因此,本研究进一步动态观察了大鼠发生心肌梗死后 28 天内梗死边缘区心肌组织内微血管的密度,发现糖尿病组大鼠(即 GK 大鼠)微血管密度始终低于血糖正常组(Wistar 大鼠),而 miR-503 水平却始终高于血糖正常组(Wistar 大鼠),这与王新红等^[10]报道的体外培养 GK 大鼠来源的心肌微血管内皮细胞中 miR-503 水平较 Wistar 大鼠明显升高的结果一致。提示糖尿病缺血心肌组织边缘区异常升高的 miR-503 可能参与调控了新生血管能力的下降。

CCNE1 属于细胞周期素家族,在细胞周期中的 G1~S 期表达,通过结合并激活细胞周期素依赖性激酶 2(cyclin-dependent kinases2, CDK2)从而调节哺乳动物细胞分裂期 G1~S 期的过渡,促进细胞增殖^[11]。CDC25A 是一个双重特异性的磷酸酶,能激活 CDK,推动细胞 G1/S 期转换及进入 S 期,亦有文献报道 CDC25A 可能具有抗凋亡的作用^[12]。因此,当内皮细胞中 CCNE1 及 CDC25A 表达受抑制后,细胞的增殖能力下降,相应的迁移以及形成新生血管的能力也受到影响。经过数据库 miRanda 和 TargetScan 中检索查询以及既往文献中关于 miR-503 对 CCNE1 及 CDC25A 调控的报道^[4,6],本研究观察到糖尿病组 CDC25A 在心肌梗死后 3 天~14 天呈进行性减少趋势,这与 miR-503 水平在组织中的变化趋势相反,即 miR-503 水平升高时, CDC25A 表达水平下降,而这样的变化在血糖正常组并未出现。CCNE1 的表达水平下降也仅在糖尿病组心肌梗死后 14 天及 28 天时观察到,其余各时间点不论糖尿病组亦或血糖正常组均未见组织中 CCNE1 表达水平的显著变化。提示糖尿病大鼠心肌缺血组织边缘区异常升高的 miR-503 可能通过抑制 CDC25A 的表达,参与心肌梗死边缘区组

织内血管新生能力的下降。

本研究初步证实糖尿病可引起心肌缺血组织边缘区 miR-503 异常升高,进而可能通过抑制 CDC25A 蛋白的表达参与调控心肌梗死边缘区血管新生。在急性心肌梗死动物的血浆内 miR-503 是否存在动态变化,糖尿病是否影响血浆中 miR-503 水平,糖尿病缺血组织局部升高的 miR-503 是否为主要来源并影响心肌微血管内皮细胞,亦或其他活化的细胞如成纤维细胞、单核巨噬细胞,这些都有待于进一步的研究证实。

[参考文献]

- [1] Howangyin KY, Silvestre JS. Diabetes mellitus and ischemic diseases: molecular mechanisms of vascular repair dysfunction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(6): 1 126-135.
- [2] Ajay SS, Athey BD, Lee I. Unified translation repression mechanism for microRNAs and upstream AUGs[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 155-165.
- [3] Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA-503 and the extended microRNA-16 family in angiogenesis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2011, 21(6): 162-166.
- [4] Caporali A, Meloni M, Völlenkle C, et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after Limb Ischemia[J]. *Circulation*, 2011, 123(3): 282-291.
- [5] 王海华, 姜玉新, 高欣, 等. 急性心肌梗死大鼠缺血心肌中差异 microRNA 的表达谱分析[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(9): 1 546-553.
- [6] Zhao JJ, Yang J, Lin J, et al. Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis[J]. *Childs Nerv Syst*, 2009, 25(1): 13-20.
- [7] Forrest AR, Kanamori-Katayama M, Tomaru Y, et al. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation[J]. *Leukemia*, 2010, 24(2): 460-466.
- [8] Sarkar S, Dey BK, Dutta A. MiR-322/424 and -503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A[J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(13): 2 138-149.
- [9] 陈琴, 黄铭涵, 康丽娜, 等. 糖基化终产物引起晚期内皮祖细胞功能障碍[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(1): 1-6.
- [10] Wang XH, Qian RZ, Zhang W, et al. MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(2): 181-188.
- [11] Nakashima T, Jinnin M, Etoh T, et al. Down-regulation of mir-424 contributes to the abnormal angiogenesis via MEK1 and cyclin E1 in senile hemangioma: its implications to therapy[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14 334.
- [12] Shen T, Huang S. The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(6): 631-639.

(此文编辑 许雪梅)