

高表达 microRNA-22 改善小鼠心肌梗死后心功能

凌琳¹, 凌子成², 顾少华³

(1. 苏州大学附属第一医院心血管内科, 江苏省苏州市 215006; 2. 扬州大学医学院, 江苏省扬州市 225000;

3. 昆山市第三人民医院, 江苏省昆山市 215300)

[关键词] microRNA-22; 心肌梗死; 心功能; 心室重构

[摘要] **目的** 观察高表达 microRNA-22 对小鼠心肌梗死后心功能的保护作用及机制。**方法** 构建小鼠心肌梗死模型, 用携带 microRNA-22 的腺病毒载体转染至心肌梗死周围区域, 观察高表达 microRNA-22 对小鼠心肌梗死后心功能的保护作用。采用超声心动图检测心功能, 力竭游泳检测运动能力, HE 及 Masson 染色检测心肌微结构及纤维化, Western blot 检测 PTEN 蛋白表达情况。**结果** 高表达 microRNA-22 组小鼠左心室射血分数 (LVEF) ($49.38\% \pm 2.51\%$ 比 $42.29\% \pm 2.74\%$, $P < 0.05$) 及短轴缩短率 (FS) ($24.24\% \pm 0.64\%$ 比 $22.59\% \pm 0.73\%$, $P < 0.05$) 较空载腺病毒组升高, 心脏收缩功能维持较好; 高表达 microRNA-22 组力竭运动时间较空载腺病毒组延长 (8.13 ± 1.01 min 比 7.02 ± 1.32 min, $P < 0.05$), 小鼠整体运动能力改善; 高表达 microRNA-22 组小鼠 HE 染色示心肌结构维持较好, Masson 染色示心肌纤维化程度较轻; 高表达 microRNA-22 组心肌梗死周围区域内 microRNA-22 表达增加 (6.66 ± 2.01 比 1.22 ± 0.07 , $P < 0.05$), PTEN 蛋白表达下降 (0.63 ± 0.19 比 2.23 ± 0.44 , $P < 0.05$)。**结论** 小鼠心肌梗死后在体高表达 microRNA-22 改善心脏收缩功能及运动能力, 改善心肌微结构, 减轻心肌纤维化。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Over-expression of microRNA-22 improves mouse cardiac function after myocardial infarction

LING Lin¹, LING Zi-Cheng², GU Shao-Hua³

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China; 2. Medical School of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225000, China; 3. The Third People's Hospital of Kunshan, Kunshan, Jiangsu 215300, China)

[KEY WORDS] MicroRNA-22; Myocardial infarction; Cardiac function; Ventricular remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protection effect of microRNA-22 on cardiac function and ventricular remodeling after myocardial infarction. **Methods** The study constructed mouse myocardial infarction model and transfected adenovirus containing microRNA-22 into peri-infarct area. It assessed cardiac function four weeks after myocardial infarction by using echocardiography. Mouse exercise ability was assessed by swimming. HE and Masson staining was applied to assess microstructure and fibrosis of myocardium. **Results** Over-expressing of microRNA-22 improved mouse left ventricular ejection fraction (LVEF) percentage ($49.38\% \pm 2.51\%$ vs $42.29\% \pm 2.74\%$, $P < 0.05$) and fractional shortening (FS) percentage ($24.24 \pm 0.64\%$ vs $22.59\% \pm 0.73\%$, $P < 0.05$) compared with adeno-null group. Mouse in adeno-microRNA-22 group showed longer swimming time and better exercise ability (8.13 ± 1.01 min vs 7.02 ± 1.32 min, $P < 0.05$). HE and Masson staining also showed better cardiac microstructure and less fibrosis. Adeno-microRNA-22 group showed elevated microRNA-22 expression (6.66 ± 2.01 vs 1.22 ± 0.07 , $P < 0.05$) and down-regulated PTEN protein expression (0.63 ± 0.19 vs 2.23 ± 0.44 , $P < 0.05$). **Conclusion** Over-expression of microRNA-22 protected mouse cardiac function and reduced ventricular remodeling after myocardial infarction.

[收稿日期] 2017-08-06

[修回日期] 2017-12-10

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目 (BK20140296); 苏州大学校级青年教师自然科学基金项目 (SDY2013A29)

[作者简介] 凌琳, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为心肌梗死后心肌修复的基础与临床研究, E-mail 为 Linglin@suda.edu.cn。

心肌梗死发病率逐年升高且呈年轻化趋势^[1]。心肌梗死导致不可逆的心室重构及心功能受损,长期导致进行性心力衰竭,严重影响患者生活质量及寿命^[2-7]。目前临床针对心肌梗死后心力衰竭治疗包括药物治疗、器械植入治疗等,治疗手段相对缺乏且疗效有限。研究表明基因治疗能一定程度上改善心肌梗死后动物心功能,是目前研究的热点^[8-9]。microRNA-22(miR-22)参与心脏疾病的发生发展^[10-11]。microRNA-22是microRNA家族的一员,被发现与应力条件下心肌细胞正常结构维持相关。主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction, TAC)压力负荷模型中,microRNA-22^(-/-)小鼠心脏收缩功能失代偿更显著,心脏扩张程度增加,组织学观察显示心肌纤维化加重;同时心肌细胞编码骨架蛋白的基因Dystrophin、Ldb3、Mlp及Titin表达减少;microRNA-22^(-/-)小鼠心肌对多巴酚丁胺的正性肌力反应消失,胞浆内Ca²⁺瞬变电流减少,同时Ca²⁺依赖的ATP酶活性下降;提示microRNA-22对于心脏应力条件下心肌细胞正常结构维持及Ca²⁺电流稳定中起重要调节作用^[12-13]。本研究组前期研究提示microRNA-22参与体外心肌细胞的保护作用,增强细胞活力,减少细胞凋亡。高表达microRNA-22下调PTEN蛋白表达,参与调控细胞生存及凋亡过程^[14]。本研究中,采用携带microRNA-22的腺病毒载体在体转染至小鼠心肌梗死周围区域,观察高表达microRNA-22对小鼠心肌梗死后心功能的保护作用,为microRNA-22用于心肌梗死后心功能改善提供理论及实践基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级C57/BL6小鼠,雄性,4~6周,体重18~22 g,购自苏州大学实验动物中心。SPF级实验动物屏障内饲养小鼠,全价营养颗粒饲料喂养,12/12节律光照,自由饮水。本研究遵循美国国家卫生机构发布的《实验动物保护和应用指南》(1996年修订);所有实验动物使用和实验操作遵循苏州大学附属第一医院动物实验管理委员会的相应规定。

1.2 仪器和试剂

医用小动物呼吸机(江西特力麻醉呼吸设备有限公司),倒置荧光显微镜(Zeiss),倒置相差光学显微镜(Olympus),CO₂恒温培养箱,台式冷冻高速离心机(Heraeus),液氮罐(四川乐山东亚机电工贸有限公司),超低温冰箱(Thermo),超净工作台(苏州

中亚净化设备有限公司),电泳及转膜装置/稳压电源(Bio-Rad),凝胶成像系统(Pierce)。

1.3 小鼠心肌梗死模型构建及腺病毒转染

采用结扎冠状动脉前降支的方法建立小鼠心肌梗死模型。腹腔注射氯胺酮(50 mg/kg)和地西泮(5 mg/kg)混合麻醉。小鼠仰卧位固定于动物手术台上,行气管插管术,成功后接通小动物呼吸机。在胸骨左侧第3~4肋间沿肋骨走向切开皮肤暴露心脏,在左心耳下缘2~3 mm水平,采用7-0丝线结扎冠状动脉前降支,结扎后缺血区域心肌变白,室壁运动减弱,体表心电图示ST段抬高,提示心肌梗死模型建模成功。心肌梗死模型构建成功后,立即予心肌梗死周围区域均匀分5点心肌内注射表达microRNA-22腺病毒/空载体腺病毒(adeno-miR-22/adeno-null),病毒量约0.1 mL(2×10¹² viral particles/L)。腺病毒及空载病毒由Invitrogen公司构建并验证病毒转染效率,病毒同时携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)。实验动物分两组,每组6只。心肌梗死模型成功率80%。

1.4 超声心动图检测动物心功能

小鼠心肌梗死模型构建前、心肌梗死后1天和4周,采用超声心动图检测动物心功能。采用探头频率10 MHz的Philips SONOS 5500彩色多普勒超声诊断仪测量。取胸骨旁左心室长轴切面,用M型超声进行测量,左心室收缩功能以左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)及短轴缩短率(fraction shortening, FS)表示。至少重复测量3个心动周期。所有测量采用双盲法,由心脏超声专业医师进行测定。

1.5 运动能力测定

4周后所有小鼠采用游泳力竭实验进行运动能力的测试。场所为动物实验中心,在小鼠尾部系一重量为其体重5%即约1 g的重物后,将小鼠放入深度为50 cm,水温为25℃的1 m×1 m大水箱内进行游泳。观察到小鼠开始下沉为实验终点,提示小鼠已经达到游泳极限,记录小鼠的游泳时间。

1.6 组织病理学检测

完成在体检测后处死小鼠,10%福尔马林固定心脏组织,HE染色观察心脏大体形态及心肌细胞大小及排列,Masson染色观察心肌纤维化程度。HE染色采用苏木精染液及乙醇伊红染液染色后,梯度酒精及苯酚二甲苯脱水透明,中性树胶封片。Masson染色采用Gill改良苏木精染液染色,盐酸酒精分化后加入Masson复合染液染色,1%磷钨酸液、亮绿染色液、1%冰醋酸染液染色后脱水封片。倒置

光学显微镜下,每张切片随机选取 5 个视野拍照。

1.7 免疫荧光染色

4 周后取心脏标本冰冻连续切片(厚度 5 μm 左右),在荧光显微镜下观察梗死周围区域 GFP 表达,同时染色心肌蛋白 α -sarcomeric actin 及细胞核 DAPI。采用大鼠抗小鼠 α -sarcomeric actin 一抗(1:500)孵育过夜,Alexa Fluor 594 标记的山羊抗大鼠 IgG(H+L)二抗孵育(1:400),充分洗净后加入 0.5 mg/L DAPI,封片后 1 h 内荧光显微镜观察。每个心脏标本在荧光显微镜下观察不同切面的至少 10 张组织切片,观察 GFP 表达情况。

1.8 Taqman 荧光定量 PCR 检测 microRNA-22 表达

采用 Taqman 探针法检测心肌梗死周围区域 microRNA-22 表达情况,引物设计及合成由 Invitrogen 公司完成。心肌组织总 RNA 提取后,检测纯度及浓度,根据试剂盒配制逆转录反应体系及反应条件,反应体系为 20 μL :2 \times Real-time PCR Mix 10 μL ,Primer Set (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.40 μL ,Taqman 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.10 μL ,rTaq DNA 聚合酶(5000 kU/L)0.25 μL ,逆转录产物 2.00 μL ,RNase-free 去离子水 7.30 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 12 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,40 个循环。基因表达变化采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法, $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{实验组 Ct}_{\text{miR-22}}-\text{实验组 Ct}_{\text{U6 mRNA}})-(\text{对照组 Ct}_{\text{miR-22}}-\text{对照组 Ct}_{\text{U6 mRNA}})$ 。

1.9 Western blot 检测 PTEN 蛋白的表达

采用 Western blot 检测 PTEN 蛋白表达情况。

提取心肌组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,10% SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白表达。电泳完成后,进行切胶与恒压转膜 2 h;转膜结束后,小心取下 PVDF 膜,使其蛋白面向上,浸入现配的 5% 脱脂牛奶,摇床上室温封闭 1 h。抗体孵育采用一抗为 anti-GADPH(1:4000),anti-PTEN(1:3000)。二抗为羊抗兔 IgG(1:5000),羊抗小鼠 IgG(1:5000)。孵育后进行显影与定影,采用 Quantity One 图象分析软件对所得图像进行光密度值分析,GAPDH 蛋白条带作为内参。

1.10 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件包完成所有数据的处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 Student's-T 检验, $P < 0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠心肌梗死模型构建成功

构建小鼠心肌梗死模型,结扎冠状动脉左前降支后,体表心电图证实 ST 段持续弓背上抬(>30 min),肉眼见结合局部组织发白,活动减弱,提示心肌梗死模型成功(图 1)。

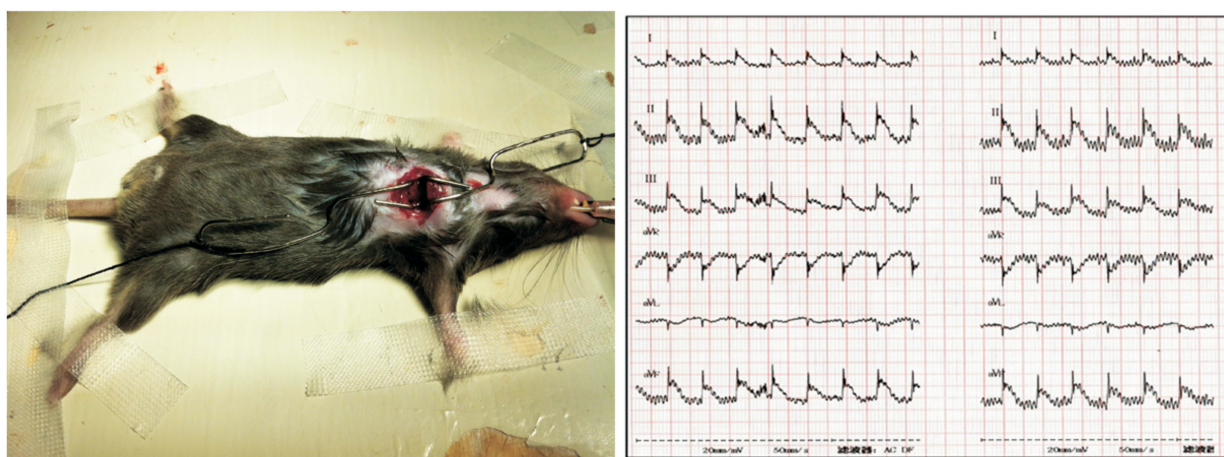


图 1. 小鼠心肌梗死模型构建图(左图)及心电图(右图)

Figure 1. Construction diagram and ECG of mouse myocardial infarction

2.2 高表达 microRNA-22 改善小鼠心功能

心肌梗死前、心肌梗死后 1 天及心肌梗死后 4 周(28 天),超声心动图检测小鼠心功能,发现与空载腺病毒组(adeno-null)相比,高表达 microRNA-22

组(adeno-miR-22)小鼠 LVEF ($49.38\% \pm 2.51\%$ 比 $42.29\% \pm 2.74\%$, $P < 0.05$)及 FS ($24.24\% \pm 0.64\%$ 比 $22.59\% \pm 0.73\%$, $P < 0.05$)均显著升高,提示心脏收缩功能维持较好(图 2)。

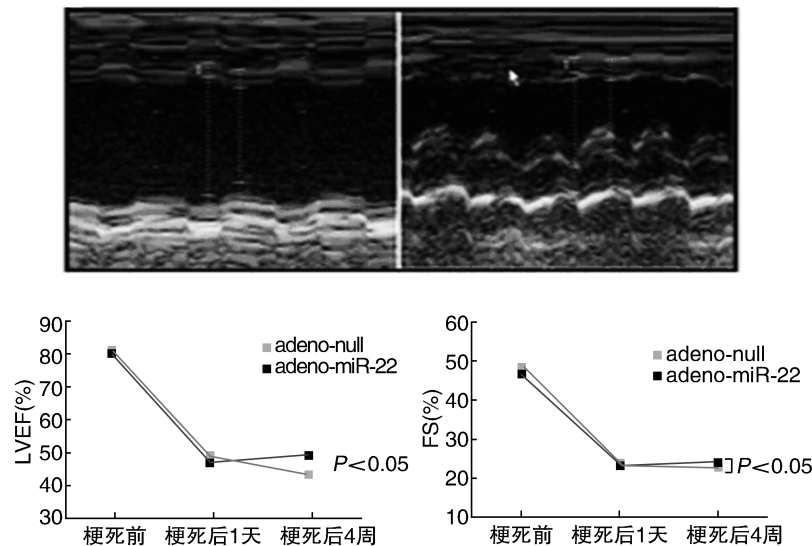


图 2. 超声心动图检测小鼠心肌梗死前后心功能情况

Figure 2. Mouse cardiac function assessment by echocardiography

2.3 高表达 microRNA-22 延长小鼠运动时间

术后 4 周评估小鼠的整体活动能力,采用力竭游泳运动时间测量,结果提示高表达 microRNA-22 组力竭运动时间较空载腺病毒组延长 (8.13 ± 1.01 min 比 7.02 ± 1.32 min, $P < 0.05$),高表达 microRNA-22 能改善小鼠的整体运动能力。

2.4 高表达 microRNA-22 改善小鼠心肌微结构

HE 染色显示 microRNA-22 高表达组小鼠心肌细胞结构维持较好,细胞排列规律;Masson 染色(绿色为纤维化,红色为心肌组织)结果表明, microRNA-22 高表达组小鼠心肌间质纤维化程度较轻(图 3)。

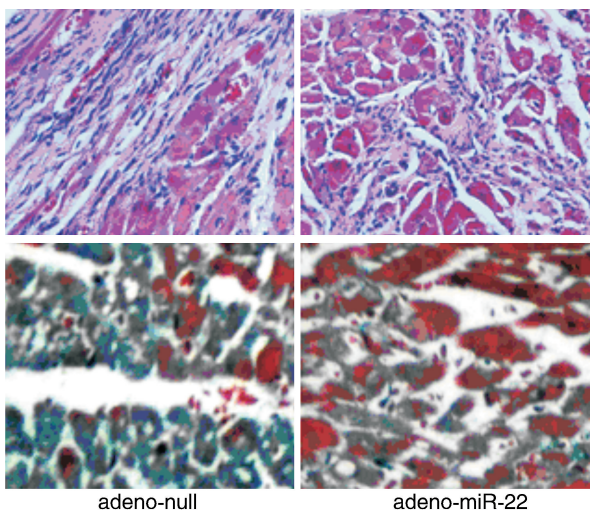


图 3. HE 染色(上图,50×)及 Masson 染色(下图,200×)检测心肌微结构及纤维化

Figure 3. HE (50×) and Masson(200×)stain of myocardium

2.5 腺病毒转染后心肌内 microRNA-22 及绿色荧光蛋白表达增加

腺病毒转染后 4 周,心肌组织免疫荧光染色提示心肌梗死周围组织内绿色荧光蛋白表达(绿色为 GFP,红色为心肌蛋白 α -sarcomeric actin,蓝色为细胞核 DAPI),提示转染成功(图 4);TaqMan RT-PCR 检测 4 周后心肌梗死周围区域内局部 microRNA-22 表达增加,差异有统计学意义(6.66 ± 2.01 比 1.22 ± 0.07 , $P < 0.05$)。

2.6 高表达 microRNA-22 下调 PTEN 蛋白表达

提取心肌组织蛋白质,测定 PTEN 蛋白表达,结果提示高表达 microRNA-22 组 PTEN 表达下降,差异有统计学意义(0.63 ± 0.19 比 2.23 ± 0.44 , $P < 0.05$) (图 5),提示 microRNA-22 通过调控 PTEN 参与心肌梗死后心肌重构的调节。

3 讨论

急性心肌梗死导致的心力衰竭严重影响患者生活质量及预后。心肌细胞具有不可再生特点,心肌梗死后,局部心肌组织损伤坏死,丧失原有收缩及电耦联功能,通过心肌重构,局部胶原及纤维组织增生,形成瘢痕组织替代坏死的心肌。瘢痕组织因其无收缩性及电生物学特性,导致心肌梗死后心脏收缩功能受损,进一步出现心脏失代偿性扩大及心功能下降^[15-16]。

目前针对心力衰竭的临床治疗主要包括慢性期的口服药物治疗,如血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素 II 受体拮抗剂(ARB)、 β 受体

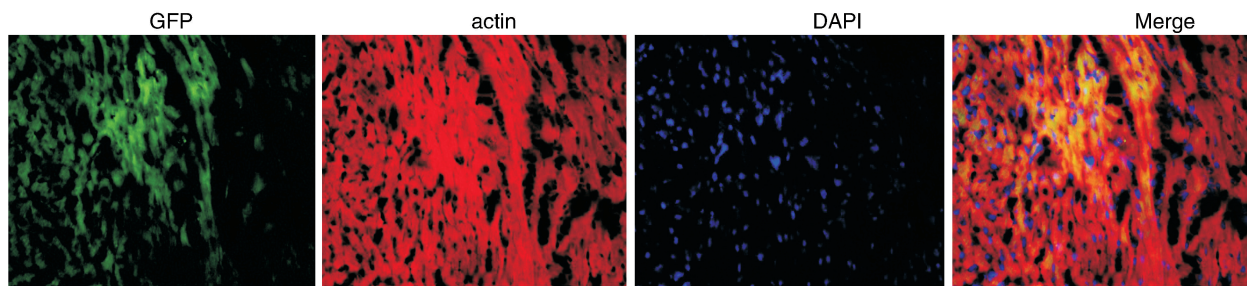


图 4. 腺病毒转染后心肌梗死周围区域心肌中 GFP 表达 绿色为 GFP, 红色为心肌蛋白, 蓝色为细胞核 DAPI。

Figure 4. Expression of GFP in myocardium surrounding myocardial infarction after adenovirus transfection

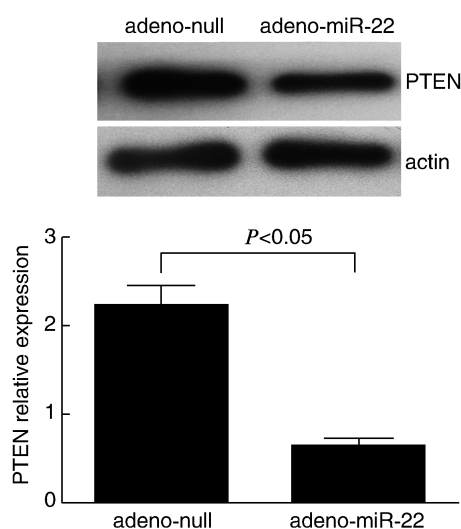


图 5. Western blot 检测 PTEN 蛋白表达

Figure 5. PTEN protein quantification by Western blot assessment

阻滞剂、醛固酮受体拮抗剂、脑啡肽酶抑制剂等;急性发作期的静脉药物如米力农、左西孟旦、新活素以及器械辅助治疗如左心室辅助装置等,治疗手段及疗效有限。寻找有效地改善心力衰竭及心室重构的手段是目前全球范围的难题,也是目前心血管领域最后一座堡垒。

通过基因、干细胞及其他组织工程手段进行心肌修复,改善心肌梗死后心功能,延缓心力衰竭的发生发展,是目前的研究热点。近年来研究提示 microRNA 在心脏疾病的发生发展中起重要调控作用。通过识别靶基因 mRNA 的 3' 端序列, microRNA 能调节靶基因的翻译,参与细胞分化及代谢等^[10-11]。microRNA-22 在心肌及骨骼肌中均有表达^[17-18]。microRNA-22 参与心脏压力负荷下心肌结构的维持并与离子通道的电稳定相关^[12-13]。高表达 microRNA-22 能在脑老化模型中增强神经元细胞的活性,减少细胞降解,减少神经细胞缺血再灌注损伤^[19-20]。作者前期研究提示 microRNA-22 参与体

外心肌细胞的保护作用。体外培养的原代心肌细胞高表达 microRNA-22 后,细胞活力增加,细胞生长更快,细胞 DNA 增殖能力增强,缺氧诱导的细胞凋亡减少。高表达 microRNA-22 下调 PTEN 蛋白表达,参与调控细胞生存及凋亡过程^[14]。

本研究发现,小鼠心肌梗死后局部心肌组织高表达 microRNA-22 能改善小鼠心肌梗死后心功能,超声心动图提示心脏收缩功能提高,小鼠运动能力维持较好。进一步分析发现,高表达 microRNA-22 有利于心肌微结构的维持,减轻心肌间质纤维化程度。提示高表达 microRNA-22 能延缓心肌梗死后心室重构,为 microRNA-22 基因治疗心肌梗死后心力衰竭提供实验基础。

综上所述,小鼠心肌梗死后在体高表达 microRNA-22 能改善心脏收缩功能及运动能力,改善心肌微结构,减轻心肌纤维化,延缓心肌梗死后心室重构及心力衰竭的发展。

[参考文献]

- [1] Dreyer RP, Scirra C, Spatz ES, et al. Young women with acute myocardial infarction: current perspectives [J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2017, 7: 10-15.
- [2] Cahill TJ, Kharbanda RK. Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: mechanisms, incidence and identification of patients at risk [J]. World J Cardiol, 2017, 26: 407-415.
- [3] Dondo TB, Hall M, West RM, et al. Beta-blockers and mortality after acute myocardial infarction in patients without heart failure or ventricular dysfunction [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 69: 2 710-720.
- [4] Huttin O, Coiro S, Selton-Suty C, et al. Prediction of left ventricular remodeling after a myocardial infarction: role of myocardial deformation: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2016, 11: e0168 349.
- [5] Manrique A, Lemarchand P, Delasalle B, et al. Predictors of ventricular remodelling in patients with reperfused acute

- myocardial infarction and left ventricular dysfunction candidates for bone marrow cell therapy: insights from the BONAMI trial [J]. *Eur J Nucl Med Mol*, 2016, 43: 740-748.
- [6] Ertl G, Brenner S, Angermann CE. Cardiac remodeling after myocardial infarction: clinical practice update [J]. *Herz*, 2017, 42(1): 107-120.
- [7] Huttin O, Mandry D, Eschalier R, et al. Cardiac remodeling following reperfused acute myocardial infarction is linked to the concomitant evolution of vascular function as assessed by cardiovascular magnetic resonance [J]. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2017, 19: 2-4.
- [8] Rygiel K. Adult stem cell therapy for cardiac repair in patients after acute myocardial infarction leading to ischemic heart failure: an overview of evidence from the recent clinical trials [J]. *Cur Cardiol Rev*, 2017, 8: 123-130.
- [9] Cao S, Zhou Q, Chen JL, et al. Comparison of intracoronary and intravenous ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated Ang1 gene transfection on left ventricular remodeling in canines with acute myocardial infarction [J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2017, 70: 25-33.
- [10] Yang J, Fan Z, Yang J, et al. MicroRNA-22 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via an anti-inflammatory mechanism in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12: 3 249-255.
- [11] Tan G, Shi Y, Wu ZH. MicroRNA-22 promotes cell survival upon UV radiation by repressing PTEN [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417: 546-551.
- [12] Ono K, Kuwabara Y, Han J. MicroRNAs and cardiovascular diseases [J]. *FEBS J*, 2011, 278: 1 619-633.
- [13] Gurha P, Abreu-Goodger C, Wang T, et al. Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction [J]. *Circulation*, 2012, 125: 2 751-761.
- [14] 凌琳, 凌子成, 顾少华. 高表达 MicroRNA-22 对缺氧心肌细胞的保护作用及机制研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25: 997-1 001.
- [15] Anderson KM. Discharge clinical characteristics and 60-day readmission in patients hospitalized with heart failure [J]. *J Cardiovasc Nurs*, 2014, 29: 232-241.
- [16] Putko BN, Wang Z, Lo J, et al. Circulating levels of tumor necrosis factor-alpha receptor 2 are increased in heart failure with preserved ejection fraction relative to heart failure with reduced ejection fraction: evidence for a divergence in pathophysiology [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e99 495.
- [17] Xu XD, Song XW, Li Q, et al. Attenuation of microRNA-22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227: 1 391-398.
- [18] Zhao H, Wen G, Huang Y, et al. MicroRNA-22 regulates smooth muscle cell differentiation from stem cells by targeting methyl CpG-binding protein 2 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc*, 2015, 35(4): 918-929.
- [19] Jovicic A, Zaldivar Jolissaint JF, Moser R, et al. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e54222.
- [20] Yu H, Wu M, Zhao P, et al. Neuro-protective effects of viral over-expression of microRNA-22 in rat and cell models of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116: 233-241.
- (此文编辑 许雪梅)