



微小 RNA-21-5p 促进梗死心肌纤维化加重心力衰竭的作用及机制

孟华 安松涛 刘军 李文博 陈岩

450000 郑州, 阜外华中心血管病医院 河南省人民医院心内科

通信作者: 陈岩, 电子信箱: doctorchen04@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5410.2019.06.013

【摘要】目的 探讨微小 RNA-21-5p(miR-21-5p)在心肌梗死后心力衰竭中的作用及相关机制。**方法** 构建小鼠心肌梗死模型,利用实时荧光定量 PCR 方法分析梗死心肌中 miR-21-5p 的表达变化;构建 miR-21-5p 过表达慢病毒,通过在体感染合并心肌梗死小鼠模型,采用超声心动图及免疫组化方法明确 miR-21-5p 对心肌梗死后心肌纤维化、心力衰竭的影响;体外进行 miR-21-5p 慢病毒感染,采用细胞划痕试验及细胞计数检测明确 miR-21-5p 对心脏成纤维细胞功能的影响。**结果** 小鼠梗死心肌中 miR-21-5p 的表达是假手术组小鼠的 1.75 倍($t = 8.633, P < 0.01$);与阴性对照组相比,miR-21-5p 可导致心肌梗死后心功能进一步恶化(左室射血分数: $31.62\% \pm 7.63\%$ 比 $42.69\% \pm 4.47\%$, $t = 2.800, P = 0.02$),并加重梗死心肌纤维化程度($42.61\% \pm 6.73\%$ 比 $23.23\% \pm 4.07\%$, $t = 3.470, P = 0.01$);miR-21-5p 可下调 Smad7 表达(0.72 倍, $t = 3.432, P = 0.01$),促进心脏成纤维细胞的增殖(1.42 倍, $t = 5.855, P < 0.01$)和迁移能力(1.41 倍, $t = 6.658, P < 0.01$)。**结论** miR-21-5p 通过下调 Smad7 表达,增强心脏成纤维细胞的增殖和迁移能力,加重心肌梗死后心肌纤维化和心力衰竭。

【关键词】 心肌梗死; 心力衰竭; 心肌纤维化; 微小 RNA-21-5p; Smad7 蛋白质

基金项目:河南省科技厅基础与前沿技术研究计划项目(142300410264)

Role and mechanism of microRNA-21-5p on myocardial fibrosis aggravating heart failure secondary to myocardial infarction

Meng Hua, An Songtao, Liu Jun, Li Wenbo, Chen Yan

Department of Cardiology, Henan Provincial People's Hospital, Fuwai Central China Cardiovascular Hospital, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: Chen Yan, Email: doctorchen04@163.com

【Abstract】Objective To investigate the role and related mechanism of microRNA-21-5p (miR-21-5p) in heart failure after myocardial infarction (MI). **Methods** The MI mouse model was established to analyze the expression of miR-21-5p in infarction myocardial zone by quantitative real-time fluorescence PCR. Overexpressed miR-21-5p virus was constructed and conducted in MI mice. Control group was injected with placebo. Immunohistochemical staining was used to identify the degree of myocardial fibrosis, while echocardiography was used to evaluate the heart function after MI. Wound healing assay and CCK-8 assay was used to measure the degree of myocardial fibroblasts by infection with miR-21-5p lentivirus in vitro. **Results** Compared with the sham group, the expression of miR-21-5p was 1.75-fold higher in MI surgery group ($t = 8.633, P < 0.01$). Left ventricular ejection fraction (LVEF) was $31.62\% \pm 7.63\%$ and $42.69\% \pm 4.47\%$ in miR-21-5p group and control group respectively ($t = 2.800, P = 0.02$). Infarct myocardial fibrosis degree was $42.61\% \pm 6.73\%$ and $23.23\% \pm 4.07\%$ in miR-21-5p group and control group respectively ($t = 3.470, P = 0.01$). Smad7 expression significantly decreased in miR-21-5p group and was 0.72-fold compared with control group ($t = 3.432, P = 0.01$). Proliferation ability of cardiac fibroblasts was 1.41-fold ($t = 5.855, P < 0.01$) and migration ability was 1.41-fold ($t = 6.658, P < 0.01$) in miR-21-5p group compared with control group. **Conclusions** MiR-21-5p may down regulated the expression of Smad7 and promote proliferation and migration of cardiac fibroblasts, further lead to myocardial fibrosis and heart failure after MI.



【Key words】 Myocardial infarction; Heart failure; Cardiac fibrosis; MicroRNA-21-5p;

Smad7 protein

Fund program: Foundation and Frontiers Technology Research Project of Henan Provincial Department of Science and Technology (142300410264)

心力衰竭是各种心血管疾病的终末阶段,患者预后差,死亡率高。据估算,成年人心力衰竭的患病率约为 1.5% ~ 2.0%,而 70 岁以上人群的心力衰竭患病率则高于 10%^[1]。心肌梗死可引起心肌坏死、心肌纤维化,导致心室重构,是心力衰竭发生发展的重要病因^[2-3]。尽管近年来心力衰竭的诊疗手段取得了诸多进展^[4],但心肌梗死后心力衰竭的分子发生机制仍未阐明,尚缺乏有效延缓甚至治愈心肌梗死后心力衰竭的有效手段。近期研究显示,微小 RNA-21-5p (microRNA-21-5p, miR-21-5p) 在肺、肾脏等诸多器官的纤维化过程中起重要的调控作用^[5-6]。然而,miR-21-5p 在心肌梗死后心力衰竭中的作用及机制尚不明确。本研究拟探讨 miR-21-5p 在心力衰竭中的作用,并对其作用机制进行阐释。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与材料

对照慢病毒 (Let-vector) 及 miR-21-5p 过表达慢病毒 (Let-mir-21-5p) 购自上海吉凯基因化学技术有限公司。青霉素-链霉素抗生素 (Gibco™)、DMEM/F-12 培养基 (Gibco™)、胎牛血清 (Gibco™)、0.25% 胰酶-EDTA (Gibco™)、脂质体 2000 (Invitrogen)、Opti-MEM (Invitrogen)、TRIzol 试剂 (Invitrogen)、Taqman™ miRNA 测试试剂盒等均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 2 型胶原酶购自美国 Worthington Biochemical Corporation 公司; miRNA 分离试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; AMV 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司; 引物购自上海赛百盛基因技术有限公司。

1.2 小鼠模型构建

实验动物采用 8 ~ 10 周雄性 C57BL/6 小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。通过结扎小鼠心脏冠状动脉前降支血管构建小鼠心肌梗死模型。即用 1.0% ~ 1.5% 的异氟烷麻醉小鼠,进行气管插管,连接至小动物呼吸机上。自第 4 肋间打开小鼠胸腔,钝性分离心包壁层,用 7-0 的丝线结扎小鼠冠状动脉前降支,见结扎区域心肌组织颜色变白代表造模成功,并用 5-0 的丝线关闭胸腔。

于小鼠心肌梗死手术前 1 周,将阴性对照慢病

毒或 miR-21-5p 过表达慢病毒通过尾静脉注射方式注入小鼠体内,每只小鼠给予病毒剂量为 1.0×10^7 TU,每只小鼠给药体积为 150 μ l。慢病毒转染效率利用实时荧光定量 PCR 方法进行检测。

1.3 心脏功能评估

小鼠心肌梗死模型构建 4 周后,进行超声心动图检测以评价心脏功能,如左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、短轴缩短率 (fractional shortening, FS)。超声心动图利用 Vevo 2100 小动物超声仪进行采集,探头型号为 MS-400 (富士胶片公司,加拿大)。

1.4 免疫组化染色

小鼠模型构建 4 周后,取小鼠心脏,固定于 4% 的多聚甲醛中,包埋,并切成 5 μ m 厚度的切片。对切片进行 Masson 染色,利用显微镜 (Olympus 公司,日本) 进行拍照,观察小鼠心脏纤维化程度。利用 Image J 软件对梗死交界区心肌纤维化程度进行定量分析。

1.5 原代心脏成纤维细胞培养

取 3 d 以内的新生 C57BL/6 乳鼠心脏,将心脏剪成小块,置于 0.08% 的胰酶及 0.05% 的 2 型胶原酶混合液中,4 $^{\circ}$ C 消化过夜。利用含 15% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基终止消化,1 000 转/min 离心 10 min,并铺至培养皿中,1 h 后进行换液,贴壁细胞即为原代心肌成纤维细胞。利用传代后 2 ~ 3 代细胞进行 CCK-8 及细胞划痕等功能实验。

将原代成纤维细胞置于含 5 μ g/ml 的 Polybrene 与 5×10^7 TU/ml 的阴性对照慢病毒或 miR-21-5p 过表达慢病毒的 15% 胎牛血清 DMEM/F-12 培养基中 24 h,更换培养基继续培养 48 h 以实现慢病毒转染。慢病毒转染效率用实时荧光定量 PCR 法检测。

1.6 实时荧光定量 PCR

利用 TRIzol 试剂及 miRNA 分离试剂盒,按照操作说明提取总 RNA 及 miRNA。利用 AMV 反转录试剂盒和 SYBR premix DimerEraser™ 进行 cDNA 第一链合成及 mRNA 表达半定量分析。利用 TaqMan miRNA 试剂盒检测 miRNA 表达量分析。实时荧光定量 PCR 应用 StepOne™ 体系进行检测 (Applied Biosystems, 美国)。Smad7 引物序列: 前向引物: 5' -

GGCCGATCTCAGGCATTC-3’；后向引物：5’-TTGGGTATCTGGAGTAAGGAGG-3’。

1.7 Western blot 检测

采用 RIPA 蛋白裂解液提取目标细胞或目标组织中的蛋白,利用 BCA 法进行蛋白浓度测定。在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中进行蛋白电泳(上样量均为 20 μg),并进行转膜、封闭,以 1:1 000 的比例孵育 Smad7、TGF-β 及 GAPDH 一抗,4℃ 过夜;以 1:3 000 比例室温孵育二抗 1 h,并进行化学发光及显影。

1.8 统计学方法

利用 IBM SPSS 22 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的差异通过 Student's *t* 检验进行分析。检验水准 α 取 0.05。

2 结果

2.1 心肌梗死诱导 miR-21-5p 表达量上调

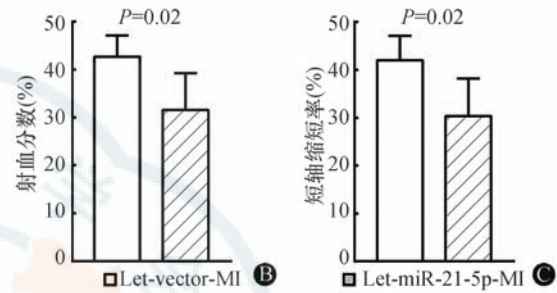
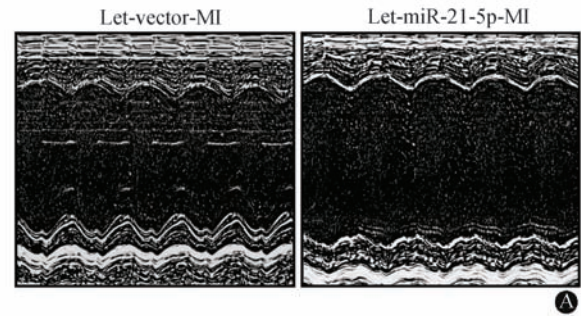
制作小鼠心肌梗死模型及假手术组,于术后 1 周取小鼠心肌梗死组织,提取假手术组及心肌梗死组小鼠心脏 miRNA,并通过实时荧光定量 PCR 检测梗死心脏中 miR-21-5p 的表达变化(以 U6 的参照)。结果发现,与假手术组($n=5$)相比,心肌梗死小鼠($n=5$)心脏 miR-21-5p 表达量明显上调,为假手术组的 1.75 倍($t=8.633, P<0.01$)。

2.2 miR-21-5p 加重心肌梗死后心力衰竭

阴性对照组和 miR-21-5p 过表达组小鼠冠状动脉前降支结扎术后 4 周,进行超声心动图检测,比较两组小鼠心脏功能变化情况。结果发现,与阴性对照组相比,miR-21-5p 过表达组小鼠的 LVEF ($31.62\% \pm 7.63\%$ 比 $42.69\% \pm 4.47\%$, $n=5, t=2.800, P=0.02$) 和 FS ($15.16\% \pm 3.90\%$ 比 $20.98\% \pm 2.57\%$, $n=5, t=2.788, P=0.02$) 显著下降,心脏功能明显恶化,见图 1。

2.3 miR-21-5p 促进梗死心肌纤维化形成

将小鼠分为阴性对照组(Let-vector-MI)和 miR-21-5p 过表达组(Let-miR-21-5p-MI),并分别制作心肌梗死模型。术后 4 周取心脏标本行 Masson 染色,比较梗死交界区心肌纤维化水平。结果发现,与阴性对照组相比,miR-21-5p 过表达组小鼠心脏组织中 miR-21-5p 的表达水平显著上调($P=0.01$);miR-21-5p 过表达组小鼠梗死交界区心肌纤维化水平显著升高($42.61\% \pm 6.73\%$ 比 $23.23\% \pm 4.07\%$, $n=5, t=3.470, P=0.01$),见图 2。



慢病毒介导的 miR-21-5p 过表达可导致小鼠心肌梗死后心脏功能恶化。A:阴性对照慢病毒心肌梗死组(Let-vector-MI)与 miR-21-5p 过表达慢病毒心肌梗死组(Let-miR-21-5p-MI)小鼠心肌梗死模型建立后 4 周的 M 型超声心动图;B:两组 LVEF 比较;C:两组 FS 比较
图 1 miR-21-5p 过表达导致心肌梗死后心力衰竭加重 ($n=5$)

2.4 miR-21-5p 促进心脏成纤维细胞增殖及迁移

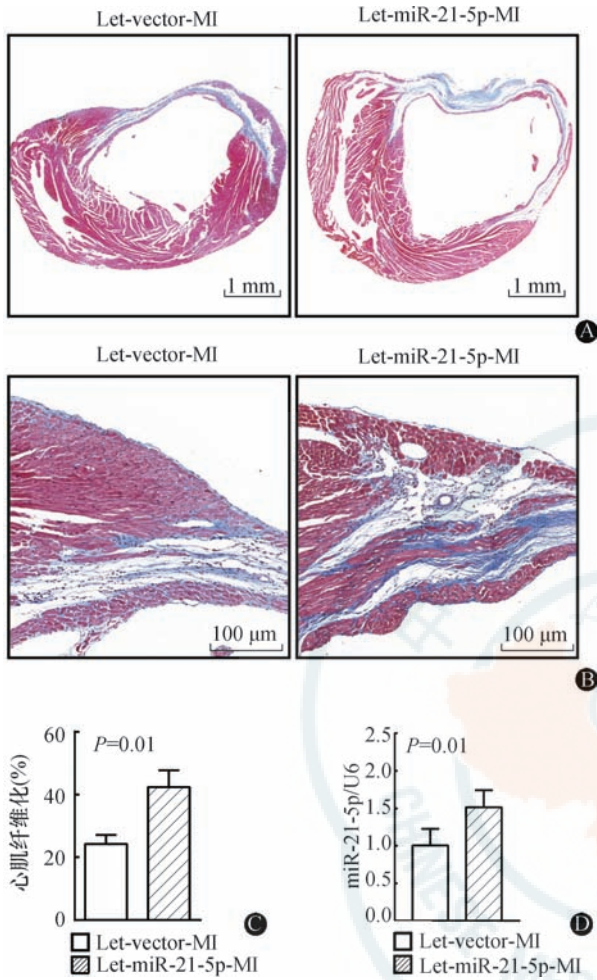
培养原代心脏成纤维细胞,进行阴性对照慢病毒、miR-21-5p 过表达慢病毒转染,CCK-8 及细胞划痕实验验证 miR-21-5p 对心脏成纤维细胞功能的影响。结果发现,与阴性对照组相比,miR-21-5p 过表达组小鼠心脏成纤维细胞中 miR-21-5p 的表达水平显著增加(1.66 倍, $n=5, t=3.126, P=0.02$);miR-21-5p 过表达明显促进心脏成纤维细胞的增殖($P<0.01$)及迁移能力($P<0.01$),见图 3。

2.5 miR-21-5p 下调 Smad7 mRNA 表达

我们通过 TargetScan 数据库,对 miR-21-5p 的靶基因进行分析,结果发现 miR-21-5p 可与 Smad7 的 3’ UTR 区结合,具有调控 Smad7 表达的潜在作用(图 4A)。通过提取阴性对照及 miR-21-5p 过表达心脏成纤维细胞的 mRNA,进行实时定量荧光 PCR,发现 miR-21-5p 显著下调 Smad7 的 mRNA 表达水平(0.72 倍, $n=5, t=3.432, P=0.01$,图 4B)。另外,Western blot 实验显示,miR-21-5p 可下调 Smad7 的蛋白表达,并上调 TGF-β 的蛋白表达(图 4C)。

3 讨论

心肌纤维化是心肌梗死后心力衰竭的关键致病

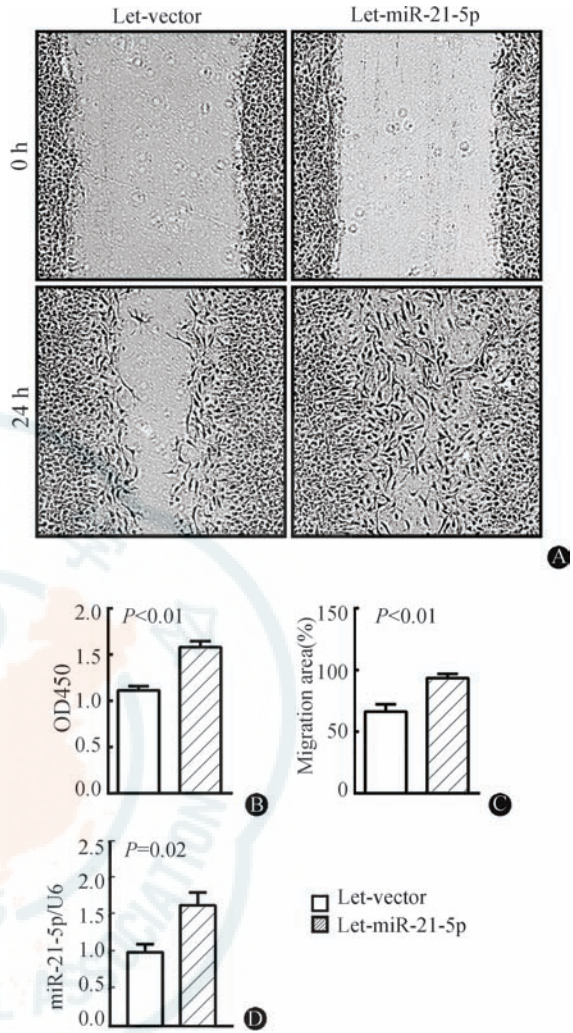


A - C: 慢病毒介导的 miR-21-5p 过表达可导致小鼠梗死心肌纤维化水平显著增加; D: 实时荧光定量 PCR 显示, miR-21-5p 过表达慢病毒组小鼠心脏中 miR-21-5p 的表达量显著上调

图 2 miR-21-5p 过表达增加梗死心肌纤维化程度 (n = 5)

因素,而心肌梗死后心肌纤维化形成的具体发病机制目前仍在研究之中^[7]。研究显示,miR-21-5p 在早期胚胎发育、哮喘、肿瘤发生等重要生理病理中发挥重要作用^[8-9]。MiR-21-5p 通过靶向 Smad7 的表达,调控 TGF-β 信号通路,促进胶原形成,参与到肺、肝及肾的纤维化过程中^[5-6, 10]。但 miR-21-5p 在心肌梗死后心力衰竭中的作用及相关机制的研究并未得到阐释。

本研究发现,梗死心肌中的 miR-21-5p 的表达水平明显上调,慢病毒介导的 miR-21-5p 过表达可导致心肌梗死后心力衰竭的程度进一步加重。考虑到 miR-21-5p 具有通过调控 TGF-β 信号通路,促进肝、肾等脏器纤维化的作用,我们同时对 miR-21-5p 过表达小鼠心脏纤维化水平进行了观察,结果发现 miR-21-5p 可显著增加梗死心肌纤维化的水平。因

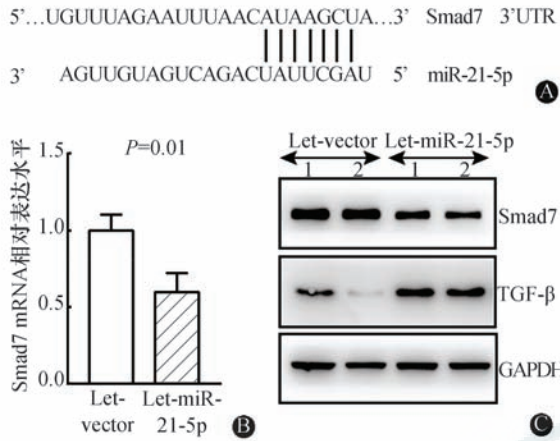


A, C: 细胞划痕实验显示,慢病毒介导的 miR-21-5p 过表达促进心脏成纤维细胞的迁移能力; B: CCK8 实验显示,慢病毒介导的 miR-21-5p 过表达促进心脏成纤维细胞的增殖能力; D: 实时荧光定量 PCR 显示, miR-21-5p 过表达慢病毒组心脏成纤维细胞中 miR-21-5p 的表达量显著上调

图 3 miR-21-5p 促进心脏成纤维细胞增殖和迁移能力 (n = 5)

此,考虑 miR-21-5p 的致心力衰竭作用很可能与其促进心肌纤维化的作用有关。为明确 miR-21-5p 对心肌纤维化的作用机制,分离小鼠原代心脏成纤维细胞,并进行了细胞增殖和迁移功能检测。结果发现,miR-21-5p 过表达明显促进了心脏成纤维细胞的增殖能力和迁移能力。可见,miR-21-5p 参与了心肌纤维化过程,导致心力衰竭程度进一步加重。

Smad7 是经典的 TGF-β 信号通路拮抗因子,其主要通过参与 TGF-β 信号通路发挥其抗纤维化作用^[11]。既往研究显示,在肺脏及瘢痕纤维组织中,miR-21-5p 可下调 Smad7 的表达,致使其抗纤维化能力受到抑制,从而促进纤维化的进程^[6, 12]。本研



A: miR-21-5p 与 Smad7 3' UTR 区结合位点展示; B: miR-21-5p 可下调 Smad7 的 mRNA 表达; C: miR-21-5p 可下调 Smad7 的蛋白表达, 并上调 TGF- β 的蛋白表达

图 4 miR-21-5p 下调 Smad7 的表达 ($n = 5$)

究结果显示,在心脏成纤维细胞中,miR-21-5p 明显下调 Smad7 的表达水平,通过调控 TGF- β 信号通路,促进心脏成纤维细胞的增殖和迁移能力,是调控心肌梗死后心力衰竭的潜在发生机制。这一结果与既往研究一致,验证了 miR-21-5p/Smad7 信号轴在心肌梗死后心力衰竭中的作用。然而,也有学者认为,由于 mRNA 调控机制纷繁复杂,并可受到多个 miRNA 的调控,我们很难确定在疾病的发生发展过程中单个 miRNA 对 mRNA 的调控作用。因此,我们仍需开展更多的基础及临床研究,进一步明确 miRNA 调控 mRNA 的本质及其在各种疾病发生发展中的具体机制和作用。

本研究尚有一定的局限性。首先,本研究主要利用动物及细胞实验来证明 miR-21-5p 在心肌梗死后心力衰竭中的作用,并未在人群中进行验证;其次,由于人体心脏标本难以获取,本研究仅针对动物心脏组织中的 miRNA 表达变化及作用进行了研究;再次,本研究虽在动物及细胞水平证实了 miR-21-5p 的致心肌纤维化及心力衰竭作用,但将其作为临床诊疗的生物标记物或治疗靶点仍需进一步的基础及临床研究进行验证。

综上所述,miR-21-5p 在调控心肌梗死后心力衰竭中发挥一定的致病作用。这一作用可能是通过 miR-21-5p 促进心脏成纤维细胞增殖和迁移能力,导致心脏纤维化来实现的。另外,miR-21-5p/Smad7 信号轴是调控心肌梗死后心力衰竭的重要分子机制。这一研究为明确心肌梗死后心力衰竭的发生机

制,探索新型临床治疗靶点提供了一定的理论依据。
利益冲突:无

参 考 文 献

- [1] 殷伟贤. 全球心力衰竭现状[J]. 中国心血管杂志, 2018, 23(1): 11-14. DOI:10.3969/j.issn.1007-5410.2018.01.004. Yin WX. Global status report on heart failure [J]. Chin J Cardiovasc Med, 2018, 23(1): 11-14. DOI:10.3969/j.issn.1007-5410.2018.01.004.
- [2] Dassanayaka S, Jones SP. Recent Developments in Heart Failure [J]. Circ Res, 2015, 117(7): e58-e63. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.115.305765.
- [3] 刘静雯, 黄广勇, 杨文波, 等. 血小板-白细胞聚集对急性心肌梗死患者直接经皮冠状动脉介入治疗预后价值[J]. 中国心血管杂志, 2017, 22(1): 24-28. DOI:10.3969/j.issn.1007-5410.2017.01.005. Liu JW, Huang GY, Yang WB, et al. Prognosis value of platelet-leukocyte aggregation in ST-elevation myocardial infarction patients after primary percutaneous coronary intervention [J]. Chin J Cardiovasc Med, 2017, 22(1): 24-28. DOI:10.3969/j.issn.1007-5410.2017.01.005.
- [4] Fitchett D, Inzucchi SE, Cannon CP, et al. Empagliflozin Reduced Mortality and Hospitalization for Heart Failure Across the Spectrum of Cardiovascular Risk in the EMPA-REG OUTCOME Trial [J]. Circulation, 2018, 139(11): 1384-1395. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037778.
- [6] Sun Q, Miao J, Luo J, et al. The feedback loop between miR-21, PDCD4 and AP-1 functions as a driving force for renal fibrogenesis [J]. J Cell Sci, 2018, 131(6): pii: jcs202317. DOI:10.1242/jcs.202317.
- [6] Marts LT, Green DE, Mills ST, et al. MiR-21-Mediated Suppression of Smad7 Induces TGFbeta1 and Can Be Inhibited by Activation of Nrf2 in Alcohol-Treated Lung Fibroblasts [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2017, 41(11): 1875-1885. DOI:10.1111/acer.13496.
- [7] Heusch G, Libby P, Gersh B, et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure [J]. Lancet, 2014, 383(9932): 1933-1943. DOI:10.1016/S0140-6736(14)60107-0.
- [8] Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression [J]. J Immunol, 2009, 182(8): 4994-5002. DOI:10.4049/jimmunol.0803560.
- [9] Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21 [J]. Cancer Cell, 2010, 18(3): 282-293. DOI:10.1016/j.ccr.2010.08.013.
- [10] Yang F, Wang Y, Xue J, et al. Effect of Corilagin on the miR-21/smad7/ERK signaling pathway in a schistosomiasis-induced hepatic fibrosis mouse model [J]. Parasitol Int, 2016, 65(4): 308-315. DOI:10.1016/j.parint.2016.03.001.
- [11] Hu ZC, Shi F, Liu P, et al. TIEG1 Represses Smad7-Mediated Activation of TGF-beta1/Smad Signaling in Keloid Pathogenesis [J]. J Invest Dermatol, 2017, 137(5): 1051-1059. DOI:10.1016/j.jid.2016.12.019.
- [12] Wang Y, Yang F, Xue J, et al. Antischistosomiasis Liver Fibrosis Effects of Chlorogenic Acid through IL-13/miR-21/Smad7 Signaling Interactions In Vivo and In Vitro [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(2): pii: e01347-16. DOI:10.1128/AAC.01347-16.

(收稿日期:2019-02-13)

(本文编辑:谭潇)