

论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0504-04

左向右分流型肺动脉高压大鼠肺组织中 microRNA 的表达谱及初步分析

卢荣鑫, 钟前进 (400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管外科)

[摘要] **目的** 检测晚期肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)大鼠肺组织中 microRNA (miRNA) 的表达, 初步预测差异表达的 microRNA 调控的靶基因。**方法** 4~5 周龄健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 20 只, 体质量 90~110 g, 按完全随机分组法分成分流组($n=10$)和对照组($n=10$)。分流组采用套管法行右侧颈总动脉-颈外静脉分流术以建立左向右分流型肺动脉高压模型, 对照组行假手术, 建立左向右分流型肺动脉高压大鼠模型。12 周后, 取大鼠外周肺组织, 运用 microRNA 表达谱芯片检测分流组和对照组大鼠肺组织 microRNA 的差异性表达。运用 Miranda、TargetScan、PicTar 软件预测可能调控的靶基因, 实时定量 PCR 验证 miR-98、miR-130b 和 miR-127 等的表达。**结果** 平均肺动脉压(mPAP)、肺动脉中膜厚度百分比(MT%)及右心室肥厚指数(RVHI)均明显高于对照组($P<0.01$), microRNA 芯片结果提示: 与对照组相比, 在分流组大鼠肺组织中表达明显上调的 miRNA 有 30 个(miR-122、miR-130b、miR-146b 等), 明显下的 miRNA 有 7 个(miR-382、miR-192、miR-29c 等), RT-PCR 结果与芯片结果一致。**结论** microRNA 在左向右分流型肺动脉高压大鼠中表达存在差异, microRNA 可能参与肺动脉高压大鼠肺血管的重构。

[关键词] 肺动脉高压; microRNA; 肺血管重构

[中图分类号] R544.02; R322.35; R394.3

[文献标志码] A

A preliminary analysis of microRNA expression profiles in pulmonary tissues of rats with left-to-right shunt pulmonary hypertension

Lu Rongxin, Zhong Qianjin (Department of Cardiovascular Surgery, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the differential expressions of microRNAs (miRNAs) in pulmonary tissues of rats with advanced pulmonary hypertension (PH), and to predict the target genes regulating miRNA differential expressions. **Methods** Twenty male SD rats (age 4–5 weeks and weight 95–110 g) were randomly divided into a shunt group and a control group with 10 rats of each group. The rats of the shunt group were treated with right common carotid artery-external jugular vein shunt to establish the rat models of left-to-right shunt PH, while the rats of the control group were given sham operation. The miRNA differential expressions in the pulmonary tissues that were collected from the two groups at 12 weeks after operation were examined by miRNA microarray. The target regulating genes were predicted by software such as miRanda, TargetScan and PicTar. Quantitative real-time PCR was applied to confirm the expressions of miR-98, miR-130b and miR-127. **Results** Mean pulmonary arterial pressure (mPAP), percentage of pulmonary artery media thickness (MT%) and right ventricular hypertrophy index (RVHI) were significantly higher in the shunt group than in the control group ($P<0.01$). The miRNA microarray results showed that 37 microRNAs were differentially expressed in the shunt group including 30 upregulated miRNAs (miR-122, miR-130b and miR-146b, etc.) and 7 downregulated miRNAs (miR-382, miR-192 and miR-29c, etc.) as compared with those in the control group. The RT-PCR results were in agreement with the microarray results. **Conclusion** There are differential expressions of miRNAs in pulmonary tissues of rats with left-to-right shunt pulmonary hypertension. These differentially expressed miRNAs may be involved in the pulmonary vessel reconstruction of PAH.

[Key words] pulmonary hypertension; microRNA; pulmonary vascular remodeling

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5172). Corresponding author: Zhong Qianjin, Tel: 86-23-68757821, E-mail: zhongqianjin@gmail.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5172)

[通信作者] 钟前进, 电话: (023)68757821, E-mail: zhongqianjin@gmail.com

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是左向右分流型先天性心脏病常见的并发症,PH的形成严重影响患者的预后。PH形成包括肺动脉收缩、肺循环阻力增加、肺血管重构(pulmonary vascular remodeling, PVR)、原位血栓形成、管腔狭窄和肺小动脉丛样改变等病理过程,而PVR是PH的主要病理基础。构成肺动脉壁的所有细胞(如内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和基质细胞等)均参与了PH的PVR,如肺动脉内皮细胞功能障碍、中层平滑肌细胞过度增殖、成纤维细胞和基质细胞过度增殖等。左向右分流型PH,在高灌注状态下引起肺血管阻塞、被动调节失衡,血管内皮细胞(VEC)受损,血管内膜的功能和完整性受到破坏,诱发PVR形成^[1],肺血管重构决定着PH的发生与发展。大量研究发现,在心血管系统中存在某些特异性的miRNAs,能调节心肌细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞的病理生理变化^[2]。本研究运用芯片技术找出左向右分流型肺动脉高压大鼠肺组织中异常表达的microRNA并进行靶基因的初步分析,为肺动脉高压的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 左向右分流型肺动脉高压大鼠模型的建立

4~5周龄健康雄性SPF级SD大鼠20只,体质量90~110g(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。适应性饲养1周后,完全随机分组法将全部大鼠分成分流组($n=10$)和对照组($n=10$)。所有大鼠术前禁食12h,1%戊巴比妥钠腹腔麻醉,颈部正中切口,游离颈总动脉和颈外静脉,4-0缝线结扎颈总动脉的远心端,血管钳阻断近心端,于远心端结扎线以下0.5cm处切断颈总动脉,结扎颈外静脉近心端,血管钳阻断其远心端,距离近心端结扎线以上0.5cm处切断颈外静脉,参照汪健春等^[3]的方法自制血管套管,牵引颈总动脉游离端穿过套管,翻转颈总动脉内膜套于套管上,8-0编织丝线结扎固定,40%肝素钠冲洗颈外静脉,近心端套于翻转的颈总动脉上,结扎固定,开放血管钳,可见明显的血管搏动,表明血管通畅。对照组仅游离颈总动脉和颈外静脉。实验组和对照组均用40%肝素钠抗凝1周。

1.2 肺动脉压力测量

术后12周,所有大鼠均存活,1%戊巴比妥钠行腹腔麻醉,用测压导管分别经左侧颈静脉、上腔静脉、右心房、右心室至肺动脉,通过连接的压力感受器和生理记录仪,记录肺动脉压力值,并统计出平均肺动脉压力值(mPAP)。

1.3 HE染色、右心室肥厚指数测量

开胸取大鼠的右下肺外周1/3经液氮保存,留作芯片检测,

取右肺中叶经中性甲醛固定液固定,经脱水、清洗、石蜡包埋后制成切片,HE染色后于400倍光镜下观察各型肺动脉的形态学变化。完整切除右心室(RV)、左心室加室间隔(LV+SP),滤纸吸干后称量,计算右心室肥厚指数(RVHI) = $RV/(LV+SP)$ 。

1.4 中等动脉中膜厚度百分比

中等动脉定义为直径在50~200 μm 之间的动脉。血管中膜厚度为外弹力膜到内弹力膜之间的距离,随机测量至少10条中等肺动脉以计算血管中膜厚度(MT)占管径(ED)百分比($MT = 2 \times MT/ED \times 100\%$)^[4]并求其平均值。

1.5 大鼠肺组织总RNA提取

按照Trizol试剂说明提取总RNA。紫外分光光度计分别测定波长230、260和280nm的光密度值,确定样品总RNA的纯度和浓度,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测样品总RNA中28S和18S的比例,评估RNA纯度及完整性。

1.6 microRNA芯片杂交

由北京博奥公司提供的Affymetrix miRNA芯片,根据总RNA的起始量,分别加入ATP mix、Tris·Cl,选择相应的稀释比例,制备poly(A)加尾Mix,利用生物标记素标记microRNA,将Poly(A) Tailing Mix转移至RNA/ATP mix、TrisCl混合物中,配置杂交液,将杂交液加入到标记好的miRNA体系中,经过温浴、离心等程序后置于杂交炉中,48 $^{\circ}\text{C}$,60 r/min旋转杂交16h,杂交结束后,吸走杂交液,注入100 μl Array Holding Buffer。打开GCOS软件,建立实验信息,包括输入芯片的Barcode,准备Fluidics Station,运行Prime,在Fluidics对话框中,选择Experiment Name即FS450_0003,根据芯片类型不同选择相应的Protocol,点击运行,开始芯片清洗染色,运用LuxScan10K/A共聚焦激光扫描仪(CapitalBio公司)进行芯片扫描。采用LuxScan3.0图像分析软件对芯片图像进行分析,最后用Significance Analysis of Microarrays软件SAM version 2.1挑选差异表达基因。

1.7 RT-PCR验证及靶基因预测

提取肺组织总RNA后,使用荧光定量逆转录试剂盒转录为cDNA,按照SYBR PremixEx Taq说明书操作加样,并使用美国MX3000P PCR仪进行扩增,使用的引物见表1,反应参照试剂盒说明书进行。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30s,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸20s,共40个循环,每个样本做3个复孔。最终数据用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式分析得到差异倍数。采用生物信息学分析的方法,运用TargetScan、PicTar和miRanda等靶基因预测软件对miR-98、miR-130b和miR-127进行靶基因的预测。为了减少假阳性率,挑选出至少出现在2个预测软件中的基因作为其可能的靶基因。

1.8 统计学方法

芯片结果以实验组标准值/对照组标准值表示;定量PCR结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算得到。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计学软件,各组间比较采用 t 检验。

表1 miR-130b、miR-127 和 miR-98 的 Real-time RT-PCR 引物

引物名称	引物序列(5'→3')
miR-130b	
逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACATGCC
Real-time PCR 引物	正义链: GTCGAGGTCCTCCAGCT 反义链: CCGAGTGAATGATGAAAGG
miR-127	
逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACAGCCAA
Real-time PCR 引物	正义链: GTCGAGGTCCTCCAGCT 反义链: TCGGATCCGCTCTGAGCTTG
miR-98	
逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACAACAAT
Real-time PCR 引物	正义链: GTCGAGGTCCTCCAGCT 反义链: CCGCTGAGGTAGTAAGTTGTAT
U6(内标)	
Real-time PCR 引物	正义链: CTCGCTTCGGCAGCACA 反义链: AACGCTTCACGAATTTGCC

2 结果

2.1 各组大鼠 mPAP、RVHI、MT 的比较

分流术后 12 周分流组大鼠 mPAP、RVHI、MT 均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 见表 2。

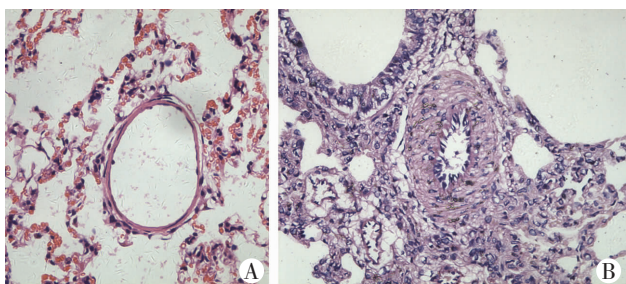
表2 肺动脉高压大鼠血流动力学及心脏、肺动脉结构变化
($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	mPAP(mmHg)	RVHI	MT(%)
对照组	10.70 ± 1.70	0.30 ± 0.03	28.90 ± 2.37
分流组	20.50 ± 2.17 ^a	0.39 ± 0.03 ^a	52.30 ± 5.12 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较

2.2 HE 染色

分流术后 12 周, 和对照组相比, 肺小动脉内皮细胞、平滑肌细胞增生肥大, 血管内膜纤维化增厚, 中膜肥厚, 管腔狭窄, 闭塞, 扭曲变形(图 1)。



A: 对照组; B: 左向右分流型肺动脉高压组

图1 大鼠分流术后 12 周与对照组肺小动脉形态学观察
(Masson ×400)

2.3 肺组织总 RNA 提取和芯片检测结果

通过紫外分光光度计对肺组织总 RNA 质量进行检测提示: $D(260)/D(280) \geq 1.80$; RNA 总量 $\geq 15 \mu\text{g}$; 经甲醛变性胶电泳检测, RNA 样品电泳条带清晰, 28S: 18S rRNA 条带接近 2:1, 各项指标符合 miRNA 芯片实验要求。对分流组和对照组中 miRNAs 表达谱数据进行分析, 取差异比值 > 1.5 倍或

< 0.67 倍, 得到 37 条有差异表达的 miRNA, 其中分流组中表达上调的 miRNA 有 30 条(分别为: miR-122、miR-130b、miR-146b、miR-146a、miR-125b、miR-181d、miR-98、miR-378、miR-193、miR-181a、miR-148b-3p、miR-674-5p、miR-330、miR-181b、miR-449a、miR-30c-1-star、miR-184、miR-760-3p、miR-383、miR-423、miR-181a-star、miR-125a-3p、miR-30c-2-star、miR-500、miR-106b-sta、miR-150、miR-181c、miR-350、miR-138、miR-488), 表达下调的 miRNA 有 7 个(miR-382、miR-192、miR-29c、miR-541、miR-379、miR-127、miR-217)。这些 miRNA 可能在大鼠左向右分流型肺动脉高压形成中发挥了重要作用。

2.4 RT-PCR 验证芯片结果

将芯片结果中差异表达较显著的 miRNA 进一步采用 RT-PCR 检测, 结果与 miRNA 芯片结果基本相符合(表 3), 提示 miRNA 芯片结果能正确反映分流组和对照组大鼠肺组织中 miRNA 的表达差异。

表3 芯片与 PCR 检验部分差异表达 miRNA 的结果比较

miRNA 名称	芯片结果	PCR 结果
miR-130b	2.020	1.648
miR-127	0.299	0.084
miR-98	1.776	2.016

3 讨论

microRNA(miRNA) 是一类内源性、大小为 22 个左右核苷酸的非编码 RNA 分子, 在进化中具有高度保守性, 通过碱基匹配原则识别靶基因 3' 非翻译区(3'UTR) 的靶位点, 从而抑制编码蛋白靶基因(mRNA) 的翻译和(或)降解靶基因^[5]。先天性心脏病合并肺动脉高压明显增加手术的风险, 晚期重度肺动脉高压的存在使得很多先天性心脏病患者失去手术机会, 而术后肺动脉高压危象成为先天性心脏病术后极高危的并发症, 严重影响患者预后。本研究通过颈总动脉和颈外静脉吻合术建立左向右分流型肺动脉高压大鼠模型, 其基本原理是通过动静脉分流增加回心血量, 进一步增加肺血流量, 形成高动力型肺动脉高压, 分流术后血流动力学及病理学检测表明分流组大鼠平均肺动脉压力明显高于对照组, 且右心室明显肥厚, 肺动脉呈现增殖性改变、管腔趋于闭塞, 提示重度肺血管重构。

miRNA 通过介导胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡、发育、肿瘤、病毒性和免疫性疾病等参与很多疾病的形成, miRNA 在血管形成、心肌肥厚、心肌梗死等方面有广泛研究^[6-8]。在对低氧和野百合碱 2 种不通机制引起的肺动脉高压大鼠肺组织 miRNA 表达谱的研究中发现, 2 种机制引起的肺动脉高压大鼠肺组织中有共同表达增高的 miRNA, 也有共同表达降低的 miRNA, 同时有部分 miRNA 只在低氧诱导 PH 大鼠肺组织中呈高表达, 部分 miRNA 只在野百合碱诱导 PH

大鼠肺组织中呈高表达,这种差异性可能与同种疾病不同的发生机制有关^[9]。

运用 miRNA 芯片技术找出 PH 大鼠肺组织中差异性表达的 miRNA,其中高表达的 miRNA 有 30 个,低表达的 miRNA 有 7 个,我们通过靶基因预测软件对差异性表达的 miRNA 进行生物信息学分析,发现其中部分异常表达的 miRNA 可能参与肺动脉高压形成,并进一步运用 RT-PCR 技术对其验证,从而降低了芯片筛选时出现的假阳性率和实验偏差,表明 miR-98、miR-130b 在实验组大鼠肺组织中的表达高于对照组,而 miR-127 在实验组大鼠肺组织中的表达低于对照组,与芯片结果一致,一定程度上说明芯片结果的可靠性。肺动脉高压是一种明显的肺血管的增殖性及炎症性疾病,抑制肺血管增殖和重构能有效地抑制肺动脉高压的形成^[10]。靶基因预测软件提示 TGF、bcl-2 等为 miR-130b 的靶基因,TGF 在肺动脉高压大鼠肺组织中的表达活性明显增加,抑制 TGF 的表达能有效抑制肺动脉高压的形成^[11]。bcl-2 和 bax 在肺动脉高压肺组织上均有表达,随着 bcl-2 和 bax 比值的上调,血管发生重构,bcl-2/bax 比值失衡可能是大鼠左向右分流 PH 形成的机制之一^[12]。Yang 等^[13]的研究表明硫氧还蛋白(Trx1)上调 miR-98 的表达,敲除 miR-98 可以增加血管紧张素 Ang II 诱导的心肌细胞肥大,表明内源性的 miR-98 可以介导硫氧还蛋白的抗心肌肥大效果。国外有研究^[14]表明血管紧张素 II (Ang II) 在低氧诱导肺动脉高压中表达明显增高、且可能参与肺动脉内膜增厚及右心室肥厚的形成。靶基因预测软件进一步提示内皮素(ET-1)为 miR-98 的重要靶基因,而既往的研究^[15]表明:内皮素 ET-1 是一种内源性的多肽,可以促进肺血管收缩,内皮细胞及平滑肌细胞的增殖和纤维化,内皮素受体拮抗剂是治疗肺动脉高压的有效方法。生物信息学分析是 miRNA 研究的重要技术方法,miRNA 在肺动脉高压中的具体作用机制,有待进一步的实验验证。

综上所述,本研究发现与正常大鼠肺组织相比,microRNA 在左向右分流型肺动脉高压大鼠肺组织中存在明显差异表达,这种差异性表达可能与肺动脉高压的形成有关,为课题组进一步研究 microRNA 在肺动脉高压形成中的作用机制提供理论基础,部分尚未报道的差异性表达 miRNA 有待进一步研究。

参考文献:

[1] McLaughlin V V, Archer S L, Badesch D B, *et al.* ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Con-

sensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc. ; and the Pulmonary Hypertension Association [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(17): 1573-1619.

[2] Cordes K R, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development[J]. *Circ Res*, 2009, 104(6): 724-732.

[3] 汪健春, 钟前进. 应用左向右分流建立大鼠慢性肺动脉高压模型及其特征[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(41): 8183-8186.

[4] Jouannic J M, Roussin R, Hislop A A, *et al.* Systemic arteriovenous fistula leads to pulmonary artery remodeling and abnormal vasoreactivity in the fetal lamb[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(3): L701-L709.

[5] Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(2): 102-114.

[6] Thum T, Gross C, Fiedler J, *et al.* MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. *Nature*, 2008, 456(7224): 980-984.

[7] Chen J F, Murchison E P, Tang R, *et al.* Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(6): 2111-2116.

[8] Van-Rooij E, Sutherland L B, Thatcher J E, *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35): 13027-13032.

[9] Caruso P, MacLean M R, Khanin R, *et al.* Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(4): 716-723.

[10] Hatton N, Frech T, Smith B, *et al.* Transforming growth factor signaling: a common pathway in pulmonary arterial hypertension and systemic sclerosis[J]. *Int J Clin Pract Suppl*, 2011, (172): 35-43.

[11] Long L, Crosby A, Yang X, *et al.* Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease [J]. *Circulation*, 2009, 119(4): 566-576.

[12] 汪健春, 钟前进, 肖颖彬. bcl-2/bax 表达在左向右分流型肺动脉高压肺血管重构中的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(24): 2425-2428.

[13] Yang Y, Ago T, Zhai P, *et al.* Thioredoxin 1 negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through upregulation of miR-98/let-7[J]. *Circ Res*, 2011, 108(3): 305-313.

[14] Adamy C, Oliviero P, Eddahibi S, *et al.* Cardiac modulations of ANG II receptor expression in rats with hypoxic pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(2): H733-H740.

[15] Meoli D F, White R J. Endothelin-1 induces pulmonary but not aortic smooth muscle cell migration by activating ERK1/2 MAP kinase[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(8): 830-839.

(收稿:2011-10-15;修回:2011-12-26)

(编辑 梁嘉)