

MicroRNA-21 和 146b 在病毒性心肌炎小鼠中的表达和意义*

刘艳丽¹ 伍伟锋¹

[摘要] 目的:研究小鼠病毒性心肌炎(VMC)模型中 microRNA-21(miR-21)和 microRNA-146b(miR-146b)基因表达,探究其在 VMC 发病中的变化及意义。方法:用柯萨奇病毒 B3(CVB3)建立 Balb/c VMC 小鼠模型,实验组注射 100TCID₅₀ 病毒液 0.1 ml,对照组注射等量磷酸盐缓冲液。在注射的第 0、1、2、4 周分别采用实时定量 PCR 法检测 2 组小鼠心肌组织 miRNA-21 和 miR-146b 表达水平。结果:与对照组比较,实验组小鼠心肌组织 miR-21 和 miR-146b 水平自第 1 周开始稳定表达,第 2 周时达峰值,并至少维持至第 4 周;实验组各时间点的表达量均高于对照组相应时间点(均 $P < 0.05$)。结论:miR-21 和 miR-146b 在 VMC 小鼠心肌组织中表达明显增高,提示 miR-21 和 miR-146b 可能参与了 VMC 的发病过程。

[关键词] 心肌炎;microRNA;miR-21;miR-146b

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.02.009

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

Expression of microRNA-21 and 146b in mice with viral myocarditis

LIU Yanli¹ WU Weifeng²

(¹Department of Cardiology; ²Institute of Cardiovascular Diseases; the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, 530021, China)

Corresponding author: WU Weifeng, Email: wucna@yahoo.com.cn

Abstract Objective: To explore microRNA-21 (miR-21) and microRNA-146b (miR-146b) gene expression in mice with viral myocarditis (VMC) and the role and significance in the pathogenesis of VMC. **Method:** We established the model of VMC, and Balb/c male mice were peritoneally injected (IP) with Coxsackie virus B3, and those peritoneally injected with PBS were taken as controls. At the end of 1st, 2nd, and 4th weeks after IP, the level of miR-21 and miR-146b in mice myocardial tissue were determined by RT-PCR. **Result:** Compared with controls, the expressions of miR-21 and miR-146b in VMC model were steadily increased from 1st week after IP, reaching the top on 2th week and then maintained a high trend to the end of the 4th week. All of the results at different time points in VMC model were higher than those in controls (all $P < 0.05$). **Conclusion:** There is significant increase level of miR-21 and miR-146b in myocardium of VMC. miR-21 and miR-146b might play a role in the pathogenesis of mice with VMC.

Key words myocarditis; microRNAs; miR-21; miR-146b

病毒性心肌炎(VMC)是常见的心血管疾病,以柯萨奇病毒 B3(CVB3)感染最为常见。VMC 除可导致猝死外,部分患者还可发展为扩张型心肌病,预后较差^[1]。VMC 发病的确切机制至今尚未完全阐明,普遍认为与病毒感染后在心肌细胞内大量复制所造成的直接损伤、炎性因子对心肌的损伤和继发于心肌损伤后自身抗原暴露而诱发的自身免疫机制密切相关。目前研究更倾向于继发于心肌损伤后自身抗原暴露而诱发的自身免疫机制。MicroRNA(miRNA)是一类全长为 19~25 nt 的单链小分子 RNA,通过碱基匹配原则识别靶基因 3'非

翻译区的靶 mRNA,与之近乎完全互补结合在转录后水平使其降解,或者与之不完全互补结合在翻译水平抑制蛋白合成,从而在基因表达中发挥重要的调节作用^[2]。已经有多种研究证实 miRNA 参与了肿瘤、自身免疫性疾病及其他系统疾病的发生发展。为探究 miRNA 是否参与 VMC 发病过程,本研究分析 miRNA-21 和 146b 在 VMC 小鼠心肌组织中的表达,并探讨其在 VMC 发病过程中的变化及其意义。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雄性 Balb/c 小鼠由国家啮齿类实验动物种子中心上海分中心(斯莱克公司)提供,许可证号 SCXK(SH)2007-0005。CVB3 Nancy 株由我校微生物教研室自复旦大学引进。总 RNA 用 Trizol

* 基金项目:国家自然科学基金资助(No:81050020)

¹ 广西医科大学第一附属医院老年心内科 广西心血管病研究所(南宁,530021)

² 广西医科大学第一附属医院心内科 广西心血管病研究所
通信作者:伍伟锋, E-mail: wucna@yahoo.com.cn

Trizol 试剂(美国 Invitrogen)提取。应用 All-in-One[®] qPCR 试剂盒(广州复能基因有限公司,中国)检测 miR-21 及 146b 的表达水平。

1.2 方法

1.2.1 VMC 小鼠模型的建立与分组

CVB3Nancy 株经人喉癌细胞系细胞活化增殖,细胞病变程度达 75% 以上(Ⅲ~Ⅳ)时收获,测 50% 组织培养感染浓度(TCID₅₀)为 10⁻⁷/0.1 ml。实验组(32 只)每只小鼠腹腔注射 100 TCID₅₀ 病毒液 0.1 ml,对照组(20 只)注射等量 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)0.1 ml。注射当日定为 0 周,设 0、1、2、4 周 4 个时间点(实验组每个时间点为 8 只,对照组每个时间点为 5 只),分别于不同时间点处死小鼠留取心脏。

1.2.2 心肌组织病理学检查 取 2 组各时间点小鼠心肌组织,10% 甲醛固定后石蜡包埋、Hematoxylin-Eosin 染色,光镜下观察组织病理改变。

1.2.3 小鼠心肌 miRNA-21 和 146b 的表达测定

收集各组小鼠心肌组织,用 Trizol 试剂提取总 RNA,用于检测成熟 miR-21 和 146b 的表达。应用 All-in-One qPCR 试剂盒(广州复能基因有限公司,中国)。用特定的 miRNA 的正向引物,U6 snRNA 为内参。应用 delta-delta 方法计算相对 miR-21 和 146b 在每个组中的表达水平。所有反应均设有 3 个复孔,每个样本重复进行 3 次实验。引物:miRNA-21: TGACATCGCATGGCTGTA, GATGCTGGGTAATGTTTGAAT;miRNA-146b: CGGAUACCUUAAG-UCAAGAGU, UUUUAA-AGGCAGAGAAGUUCUCA。在 200 μPCR 管中加入 2 μg 总 RNA,1 μl PolyA Polymerase,1 μl RTase Mix,1 μl 5× Reaction Buffer 1 μl, ddH₂O。(RNase/DNase free)补至 25 μl,短暂离心后在 37℃ 反应 60 min,结束后再进行 85℃ 5 min 灭活处理。PCR 反应体系:加入 10 μl 2× All-in-One qPCR Mix,2 μl All-in-One miRNA qPCR Primer,2 μl Universal Adaptor PCR Primer,2 μl 1st strand cDNA(5 倍稀释液)ddH₂O Final Volume 加至 20 μl。95℃ 预变性 10 min,变性 95℃ 10 s,60℃ 退火 20 s,循环 40 次,72℃ 延伸 10 s。

1.3 统计学处理

用 SPSS16.0 统计软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,多个均数之间用两两比较 *q* 检验。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验组小鼠于感染 CVB3 第 3 天开始出现耸毛、倦缩驼背、活动减少、对刺激反应不敏感或易激

惹等症状,第 2、4 周时间点死亡的小鼠分别为 1 和 2 只,对照组小鼠无异常表现,各时间点均无一只死亡。

2.2 心肌组织病理学检查

实验组和对照组小鼠 0 周时心肌组织学无异常改变。接种病毒后 1 周,光镜下可见局灶性心肌细胞坏死伴有炎性细胞浸润;2 周时心肌坏死明显增多并伴有大量炎性细胞浸润;4 周时心肌细胞坏死及间质炎性细胞浸润减少,心肌有不同程度的纤维增生,提示小鼠 VMC 模型成功(图 1)。

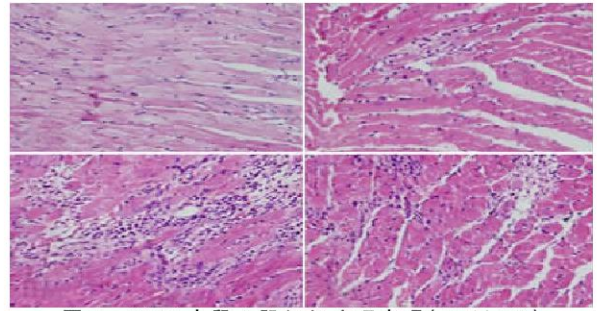
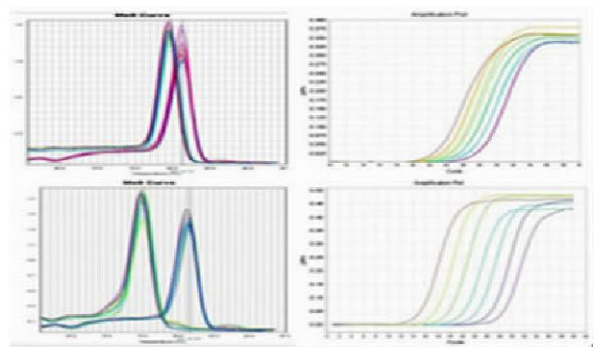


图 1 VMC 小鼠心肌组织病理表现(HE×400)

Figure 1 Pathology of myocardial tissue in VMC mice(HE×400)

2.3 小鼠心肌组织 miRNA-21 和 146b 水平

溶解曲线显示 PCR 产物均呈单峰状,表明引物特异性较好;扩增曲线提示达到阈值时的循环数和起始模板的浓度对数呈高度的线性关系(图 2)。实验组/对照组小鼠心肌组织 miRNA-21 和 146b 比值水平见表 1。



左列为溶解曲线,右列为扩增曲线。

图 2 miRNA-21 和 146b 的溶解曲线和扩增曲线

Figure 2 miRNA-21 and 146b melt curve and amplification curve

表 1 各时间点 miRNA-21 和 146b 水平的实验组/对照组比值

Table 1 Ratio miRNA-21 and 146b levels $\bar{x} \pm s$			
组别	只数	miRNA-21	miRNA-146b
0 周	8	1.12 ± 0.08	1.04 ± 0.18
1 周	8	3.12 ± 0.66 ¹⁾	4.23 ± 0.97 ¹⁾
2 周	7	7.36 ± 1.38 ¹⁾	6.72 ± 1.10 ¹⁾
4 周	6	4.75 ± 1.06 ¹⁾	3.88 ± 0.70 ¹⁾

与 0 周比较,¹⁾*P* < 0.05。

3 讨论

自 1993 年 Lee 和 2000 年 Reinhart 等在研究线虫的发育调控过程中发现了 miRNA_{Lin-4} 和 _{Lin-7} 以来,有关 miRNA 的研究迅速成为生命科学领域研究的热点。人类基因组中约 30% 基因受 miRNA 调节^[3]。同时同一种 miRNA 可能同时参与 100 多个基因的表达调节,而同一基因的表达可能同时受多种 miRNA 调节。部分 miRNA 包括 miRNA-21 的生物学功能已被研究证实^[4]。miRNA-21 由单个基因编码,进化上高度保守。人类的 miRNA-21 基因位于染色体 17q23.2,与蛋白编码基因 VMP1(或 TMEM49)重叠。与其他一些选择性较强的 miRNA 不同,miRNA-21 在哺乳动物器官组织如心脏、小肠、结肠、脾中广泛表达^[5]。同时研究也发现,miRNA-21 参与银屑病、湿疹和 Sézary 综合征等自身免疫的调节^[6-7]。miRNA-146 也是其中研究较多的一个。Pre-miRNA-146 经胞质 Dicer 酶加工后形成成熟的 miR-146a 和 miR-146b。两者定位于不同的染色体。研究也发现,miRNA-146 参与类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和口腔扁平苔藓等自身免疫疾病的免疫调节过程^[8-10]。

本研究发现,VMC 小鼠心肌组织中 miRNA-21 和 146b 表达均较对照组小鼠心肌组织明显增高,提示 miRNA-21 和 146b 可能在 VMC 的发病中起到重要作用。而且随着炎症的加重,miRNA-21 和 146b 表达水平逐渐增高。但 miRNA-21 和 146b 通过什么机制在 VMC 的发病中起作用目前尚不明确。Th17 细胞被认为是一群重要的介导炎症反应的细胞,主要效应因子是白细胞介素(IL)-17。Th17 细胞与自身免疫性疾病密切相关,在多发性硬化症(MS)、类风湿性关节炎(RA)患者模型病灶部位高表达,并与疾病的严重程度相一致^[11]。研究提示,Th17 参与了 VMC 的发病过程^[12-13]。miRNA-21 和 miRNA-146 是否通过 Th17 在 VMC 中发挥作用尚不明确。DU 等^[14]对 miR-326 在 MS 中与 Th17 细胞的相关性进行了研究,发现 miR-326 与 IL-17 的表达水平相一致,均明显高于正常对照组,且与疾病严重程度呈正相关。实验者在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型中同样进行了上述实验,得到了相同的结果,提示 miR-326 与 Th17 细胞有一定的相关性。

本实验证实了 miRNA-21 和 miRNA-146 在小鼠 VMC 心肌组织中的高表达,有助于进一步探索 VMC 的自身免疫机制,但其是否对 VMC 中 Th17 细胞起调节作用及其免疫作用机制尚不明确,尚需进一步的研究证实。

参考文献

- [1] YAJIMA T, KNOWLTON K U. Viral myocarditis: from the perspective of the virus [J]. *Circulation*, 2009,119:2615-2624.
- [2] PUSHARAJ P N, AARTHI J J, KUMAR S D, et al. RNAi and RNAa—the Yin and Yang of RNAome [J]. *Bioinformatics*, 2008,2:235-237.
- [3] LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005,120:15-20.
- [4] KRICHEVSKY A M, GABRIELY G. miR-21: a small multifaceted RNA [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13:39-53.
- [5] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, YALCIN A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [J]. *Curr Biol*, 2002,12:735-739.
- [6] WU H, NEILSON JR, KUNMAR P, et al. miRNA profiling of naïve effector and memory CD8 T cells [J]. *PLoS One*, 2007,2:e1020-1020.
- [7] NARDUCCI M G, ARCELLI D, PICCHIO M C, et al. MicroRNA profiling reveals that miRNA-21, miR486 and miRNA-214 are upregulated and involved in cell survival in Sézary syndrome [J]. *Cell Death Dis*, 2011,2:e151-151.
- [8] STANCZYK J, PEDRIOLI D M, BRENTANO F, et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in transudates rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2008,58:1001-1009.
- [9] DAI Y, HUANG Y S, TANG M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients [J]. *Lupus*, 2007,16:939-946.
- [10] 张文怡,周永梅,沈雪敏,等. 口腔扁平苔藓差异表达 miRNAs 的筛选 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2011,27(4): 490-494.
- [11] PARK H, LI Z, YANG X O, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin [J]. *Nat Immunol*, 2005,6:1133-1141.
- [12] 庞羽,伍伟锋,颜玉鸾. 外源性细胞因子对柯萨奇病毒性心肌炎小鼠 Th17 细胞的影响 [J]. *临床心血管病杂志*, 2012,28(2):97-100.
- [13] 袁璟,曹爱林,余娴,等. 急性病毒性心肌炎患者 Th17 细胞作用初步研究 [J]. *临床心血管病杂志*, 2009,25(1):9-12.
- [14] DU C S, LIU C, KANG J H, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis [J]. *Nat Immunol*, 2009,10:1252-1260.

(收稿日期:2013-03-27)