

心肌细胞特异性 miR-30b 转基因小鼠的建立及其功能研究*

范元元 龙波 刘昉 周露珂 王昆 李培峰**

(中国科学院动物研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 MicroRNAs(miRNAs)基因芯片结果显示, 携带有 MYH7 基因突变的家族性肥厚性心脏病病人的心脏组织以及小鼠心力衰竭模型中 miR-30b 表达下调, 提示 miR-30b 可能在心脏疾病发生发展过程中发挥了重要功能. 为研究 miR-30b 在心脏组织中的功能, 本实验室首先建立了在心肌细胞特异性启动子 α -肌球蛋白重链(α -MHC, 5.5 kb)控制下过表达 miR-30b 的转基因小鼠. 通过 qRT-PCR 方法, 证实 miR-30b 表达水平在转基因小鼠心脏组织中明显升高($P < 0.05$). miR-30b 转基因小鼠心重/体重比和左心室/体重比无明显变化, 心肌组织结构未见异常. 目前, 关于 miR-30b 在心肌梗死中的功能及相关机制未见报道. 本文通过冠状动脉左前降支结扎法建立心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)模型, 以假手术组作为对照组. 生化检测结果及 TTC-Evans blue 双染结果显示, I/R 损伤后, 与野生型小鼠相比, 转基因小鼠 LDH、CK-MB 和 cTn I 浓度显著减小($P < 0.05$), 并且心肌梗死面积明显减少($P < 0.05$). 超声心动图检测结果显示, 转基因小鼠心功能显著改善. 由此得出结论: miR-30b 对缺血再灌注损伤的心肌具有保护作用, 该研究成果可能为预防和治疗心肌梗死提供新策略.

关键词 miR-30b, 心脏, 转基因, 小鼠, 心肌梗死

学科分类号 Q527, R541.4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00324

心脏是哺乳动物在胚胎发育时期最早形成的器官, 是循环系统中的动力, 其作用是推动血液流动, 源源不断地向其他器官和组织中供给足够的氧和各种营养物质, 并带走二氧化碳、尿素等代谢终产物以维持细胞正常的代谢和功能. 心血管疾病已成为危害人类生命的主要因素之一, 心肌梗死更是成为人类生命的主要杀手之一, 因此, 对心脏疾病形成机制的研究已成为生命科学研究的热点问题.

MiRNAs 是一类高度保守的非编码小分子 RNA, 长约 22 个核苷酸, 这些小分子通过与靶基因 mRNA 碱基配对形成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)而行使阻碍翻译或降解 mRNA 的功能^[1]. 随着对其研究的深入, 发现 miRNA 在心脏发育以及心脏疾病发生发展过程中发挥了重要作用^[2-3].

有 miRNAs 基因芯片结果显示, 在携带有 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, MYH7)基因突变的家族性肥厚性心脏病病人的心脏组织中

miR-30b 表达下调^[4], 在小鼠心力衰竭模型中 miR-30b 的表达也是下调的^[5], 提示 miR-30b 可能在心脏疾病过程中扮演着重要角色. 为了研究 miR-30b 在心脏组织中的功能, 本研究选用含有心肌细胞特异性启动子, 即 α -MHC 基因启动子的载体 α -MHC clone 26, 构建了 α -MHC-miR-30b 载体, 通过显微注射的方法获得了在心肌细胞内特异性过表达 miR-30b 的转基因小鼠. 心室塑性研究结果表明, 该转基因小鼠心重/体重比和左心室/体重比无明显变化, 心肌组织结构正常, 未出现心肌纤维化. 目前, 心肌梗死是人类生命的主要杀手之一. 随着检测技术的快速发展, 血清酶学的检查和心肌结构蛋白的测定, 如血清 MB 型肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB)、乳酸脱

* 国家自然科学基金资助项目(31010103911).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64807158, E-mail: lpeifeng@hotmail.com

收稿日期: 2013-07-11, 接受日期: 2013-12-02

氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)和心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTn I)被公认为心肌损伤的标志物, 成为检测心肌梗死的重要手段之一^[6-7].

迄今为止, 关于 miR-30b 在心肌梗死中的功能及相关机制未见报道. 本研究进一步通过冠状动脉左前降支结扎法建立了心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)模型, 另设假手术组(sham)作为对照. 结果表明, miR-30b 可以显著减小 LDH、CK-MB 和 cTn I 的浓度、明显减少由 I/R 引起的心肌梗死面积, 并能够显著改善 I/R 小鼠心功能. 本研究旨在了解 miR-30b 在心肌梗死中发挥的生物学功能, 从而为心肌梗死提供新的预防和治疗策略. 同时, α -MHC-miR-30b 转基因小鼠的成功建立, 也有助于研究 miR-30b 在心脏疾病中的作用及其分子机制, 能够为治疗人类心脏疾病提供理想的实验动物模型.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物. SPF 级 4~10 周龄的 C57BL/6 小鼠和 7~9 周龄的 ICR 小鼠购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司, 动物饲养于中国科学院动物研究所实验动物中心, 温度 21℃~25℃, 湿度 50%~60%, 光照周期为 12 h, 每周添料 3 次, 换水 2 次.

1.1.2 质粒和菌株. 含有 α -MHC 启动子的质粒 α -MHC clone 26 由南京大学杨中洲教授惠赠; 大肠杆菌(Top10 菌株)购自北京全式金生物技术有限公司.

1.1.3 试剂. 所用的各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、dNTP、Ex Taq 聚合酶、RRI、RT Ace 和 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒均购自 TaKaRa(大连)公司; Phusion 高保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司; Trans 15K DNA Marker、Trans 2K Plus DNA Marker 和蛋白酶 K 购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒 TIANprep Mini Plasmid Kit 和 DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 大提试剂盒 EndoFree Plasmid Maxi Kit 购自 Qiagen 公司; RNA 抽提试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; OCT 樱花冰冻切片包埋剂、Harris 苏木素染色液和水溶性伊红购自北京中杉金桥生物技术有限公司; CK-MB 试剂盒、LDH 试剂盒和 cTn I 试剂盒均购自南京建成科技有限公司; DEPC、TTC、Evans blue 购自 Sigma 公司; PCR

引物由 Invitrogen 公司合成; DNA 测序由博尚生物技术(北京)有限公司完成; 琼脂糖购自北京百灵克生物科技有限公司. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 转基因载体. α -MHC-miR-30b 的构建. 以小鼠基因组 DNA 为模板扩增获得 miR-30b, 引物包括: MHC-miR-30b-F(5' TGAAAGAGAGAACG-ATAAATGTT 3')和 MHC-miR-30b-R(5' ACTTCT-GAATCAAAATATTGGTA 3'), 引物两端分别引入 *Sal* I 和 *Hind* III 酶切位点. PCR 扩增条件为: 98℃ 预变性 30 s; 98℃ 变性 10 s, 67℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 33 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温. 将 PCR 产物于 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 回收纯化 471 bp 的目的片段. α -MHC clone 26 载体及纯化回收的目的片段用 *Sal* I /*Hind* III 进行双酶切, 分别于 0.8% 和 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 切胶回收、纯化约为 9.1 kb 的大片段和 471 bp 的目的片段. 将目的片段和载体片段以摩尔比 3 : 1~10 : 1 连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 Top10 后, 用天根小提试剂盒提取重组质粒. 构建质粒主要含有 α -MHC 启动子、miR-30b 和 hGH PolyA 3 个元件, 经鉴定正确后, 用 Qiagen 去内毒素大提试剂盒大提重组质粒, 得到连有 miR-30b 片段的转基因载体.

1.2.2 受精卵的显微注射和移植. 用 *Not* I 线性化大提后的质粒, 回收注射片段, 溶解于 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mmol/L EDTA) 中, 并将质粒浓度稀释至 2.0 mg/L, 注射到小鼠 0.5d 受精卵的雄原核中, 并将受精卵移植到 ICR 假孕鼠输卵管中^[8-10]. 小鼠饲养于 SPF 级动物房.

1.2.3 转基因小鼠的基因型鉴定. 取出生后 21 d 左右的子代小鼠, 剪下长约 0.5 cm 的尾尖置于 1.5 ml 灭菌离心管中, 加入 180 μ l SNET(20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 400 mmol/L NaCl, 1% SDS)和 20 μ l 蛋白酶 K, 于 55℃ 水浴中裂解过夜, 提取基因组 DNA, 用 PCR 法进行转基因小鼠的基因型鉴定. 所用引物为 miR-30b 转基因特异引物: 上游 miR-30b-Geno-F, 5' TTAGCAAACCTCAG-GCACCT 3', 位于 miR-30b 片段上; 下游 miR-30b-Geno-R, 5' AGCCAACGCATGTATGAC-AGC 3', 位于 α -MHC 启动子序列上. PCR 扩增的条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 33 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温. 扩增出的目的片段大小为 462 bp.

1.2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测心脏中 miR-30b 的表达. 分别提取野生型小鼠 (wild-type, WT) 和 miR-30b 转基因小鼠 (Tg) 的心脏组织 RNA, 反转录成 cDNA, 引物序列为: mmu-miR-30b, 5' GTCGTATCCAGTGC GTGTCGTGGAGTCGGC-AATTGCACTGGATACGACAGCTGA 3', 内参 U6, 5' AACGCTTCACGAATTTGCGT 3'. 采用 Real-time PCR 仪 (CFX96 Real-Time System C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD 公司) 对反转录后获得的 cDNA 进行定量检测. 引物序列为: U6 正义链, 5' GCTTCGGCAGCACATATACTAA 3'; U6 反义链, 5' AACGCTTCACGAATTTGCGT 3'; mmu-miR-30b 正义链, 5' GCGCCTGTAAACATC-CTACAC 3', mmu-miR-30b 反义链, 5' GTGCAG-GGTCCGAGGT 3'. 扩增条件为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 45 个循环.

1.2.5 取材及 HE (苏木素 - 伊红) 染色. 颈椎脱臼法处死小鼠, 迅速取出完整心脏, 用预冷的 PBS 冲洗 3 遍, 置于平皿上称重, 去除心耳、心房及右心室, 称左心室重量, 分别计算心重 / 体重比和左心室 / 体重比. 完整的心脏组织经 OCT 冰冻切片包埋剂包埋, 包埋后用 LEICA CM 1900 恒冷切片机进行切片 (切片厚度为 10 μm), 然后进行 HE 染色, 步骤如下: 100% 甲醇固定切片 10 min, 水洗, 苏木素染色 10 min, 水洗, 伊红染色 1 min, 脱水, 透明, 中性树胶封片.

1.2.6 小鼠心肌 I/R 模型的建立. 通过缺血 45 min 再灌 24 h 建立小鼠心肌 I/R 模型, 另设 sham 组作为对照, 共分 4 组, 分别为: WT-sham 组, Tg-sham 组, WT-I/R 组, Tg-I/R 组. 心肌 I/R 模型: 小鼠用 3% 水合氯醛麻醉后, 仰卧位于动物手术板上, 固定四肢, 对左胸部剪毛、消毒, 首先在颈中线切口, 钝性分离暴露气管, 经气管插管, 接通小动物呼吸机, 调整呼吸参数, 呼与吸次数比为 1:2, 呼吸频率 95 次 / min, 潮气量 2 ml. 然后左侧胸腔第四肋间开胸, 进入胸腔后, 镊子钝性撕开心包, 暴露心脏. 用 6/0 无损伤缝合线穿过左心耳下约 3~4 mm 处的左前降支动脉处, 打一活结, 进针深度为 0.2~0.4 mm, 以心电图 II 导联 ST 端抬高、心肌颜色变为苍白、局部心肌运动减弱为阻断成功标志. 缺血 45 min 后打开活结进行心肌再灌注, 用生理盐水冲洗胸腔, 确认闭合完好后逐层关胸. Sham 组: 小鼠只打开胸腔, 不结扎冠状动脉左前降支, 其余处理同心肌 I/R 模型.

1.2.7 心肌损伤生化指标的检测. 缺血 45 min, 再灌 1 h 后, 内眦静脉采血, 分离血清, -80℃ 冻存, 测定 CK-MB、LDH 和 cTn I 的浓度, 操作过程按试剂盒说明书进行.

1.2.8 心肌梗死面积的评估. 再灌 24 h 后, 再行结扎左前降支, 股静脉注射 3% Evans blue, 待心脏蓝染后, 取出心脏, 放入 -20℃ 冰箱中冷冻 10 min, 然后垂直其长轴横切为厚约 2 mm 的心肌片, 浸入 2% 的 2, 3, 5- 氯化三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中, 37℃ 避光孵育 10 min, 10% 甲醛固定, 此时缺血危险区 (area at risk, AAR) 呈深红色, 梗死区 (infarct size, INF) 呈灰白色, 非缺血区呈蓝色. 数码相机拍照后采用图像分析软件 Image Tool 2.0 分别计算 AAR/LV (缺血心肌面积占左室面积的百分比)、INF/AAR (梗死区心肌面积占缺血区心肌面积百分比) 和 INF/LV (梗死区心肌面积占左室面积的百分比).

1.2.9 心功能的检测. 再灌 2 周后, 采用高分辨率小动物超声影像系统 (Vevo 770, 加拿大 Visualsonic 公司) 检测小鼠的心脏收缩与舒张功能、心腔大小等指标, 每次读取 4 个连续心动周期的数值, 取平均值用于统计, 计算左室收缩期内径 (systolic left ventricular internal diameters, LVIDs)、左室舒张期内径 (diastolic left ventricular internal diameters, LVIDd) 和左室短轴缩短率 (fractional shortening of left ventricular diameter, FS).

1.2.10 统计学分析. 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理, 统计数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较采用 Student's *t*-test, **P* < 0.05 时表示差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 α-MHC-miR-30b 转基因载体的构建和鉴定

α-MHC-miR-30b 转基因载体主要含有 3 个元件: 5.5 kb 的启动子片段, 471 bp 的 miR-30b 基因和 2.1 kb 含有内含子的 hGH PolyA 序列 (图 1a), 此载体分别用 *Not* I、*Bam*HI、*Eco*RI、*Sal*I、*Hind*III 酶切鉴定, 其结果与预想结果相符 (图 1c). PCR 鉴定出现 471 bp 的一条带, 其结果与预期结果相符 (图 1d). 转基因载体 α-MHC-miR-30b 的测序结果表明, α-MHC clone 26 载体与 miR-30b 接头部分及 miR-30b 本身序列均正确无误, 无任何碱基突变.

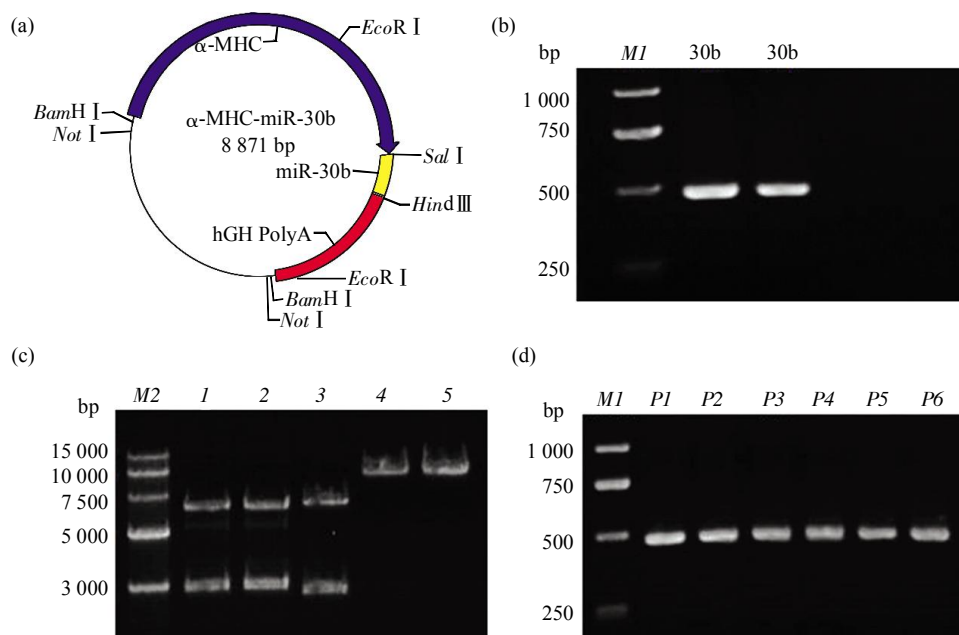


Fig. 1 Construction and identification of α-MHC-miR-30b transgenic vector

(a) Schematic map of α-MHC-miR-30b transgenic vector. (b) Electrophoresis of PCR amplified miR-30b gene. *M1*: Trans 2K Plus DNA Marker. (c) Restriction enzyme analysis of transgenic vector. *M2*: Trans 15K DNA Marker; *1*~*5*: Transgenic vector digested by *Not* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Sal* I, *Hind* III, respectively. (d) PCR analysis of transgenic vector. *P1*~*6*: Transgenic vector.

2.2 miR-30b 转基因小鼠的基因型鉴定

将 α-MHC-miR-30b 重组质粒经 *Not* I 单酶切后, 电泳回收注射片段。该片段经纯化后, 用注射用 TE 缓冲液稀释至 2.0 mg/L, 并显微注射到小鼠受精卵的雄原核中。共注射受精卵 273 枚, 移植卵 244 枚, 植入 4 只 ICR 假孕母鼠受精卵中, 其中有 1 只母鼠怀孕, 获得子代小鼠 7 只。提取子代小鼠尾基因组 DNA, 用 miR-30b 转基因特异引物进行 PCR 鉴定, 结果显示, 有 2 只小鼠整合有 miR-30b 基因, 即得到了 2 只转基因首建者小鼠 (图 2)。

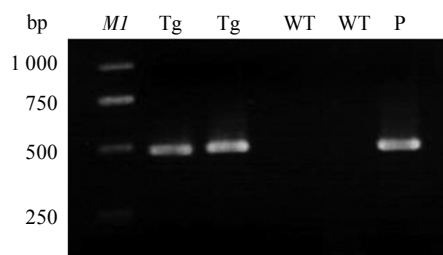


Fig. 2 Genotype identification of miR-30b transgenic mice
MI: Trans 2K Plus DNA Marker; *Tg*: miR-30b transgenic mice which integrate with exogenous gene; *WT*: Genomic DNA of wild-type mouse as template; *P*: Positive control (α-MHC-miR-30b transgenic vector as template).

2.3 miR-30b 转基因小鼠心脏组织中 miR-30b 表达水平的检测

为了检测转基因小鼠心脏组织中 miR-30b 的表达情况, 本研究利用了 qRT-PCR 方法, 结果显示, 与野生型小鼠组比较, miR-30b 在转基因小鼠心脏中表达量明显升高 (图 3), 而其他组织, 如肝脏、肾脏、脑组织中 miR-30b 表达水平无明显差异。以上结果表明心肌细胞特异性 miR-30b 转基因

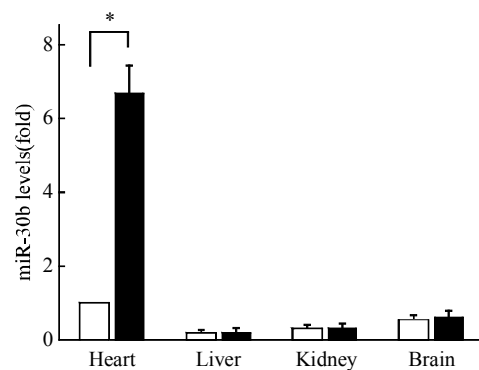


Fig. 3 qRT-PCR analyzes the expression of mature miR-30b in different tissues isolated from miR-30b transgenic mice and WT mice

* $P < 0.05$; $n = 6$. □: WT mice; ■: miR-30b Tg mice.

小鼠特异性地在心脏组织内成功过表达了 miR-30b, 因此成功地建立了在心脏组织中过表达 miR-30b 的转基因小鼠。

2.4 miR-30b 转基因小鼠心肌组织结构未见异常

随机各取 6 只 10 周龄的 miR-30b 转基因小鼠和野生型小鼠, 计算心重/体重比和左心室/体重比。结果显示, 与野生型小鼠相比, 转基因小鼠心重/体重比和左心室/体重比无显著变化, 提示 miR-30b 转基因小鼠未出现明显心脏肥厚。为进一步检测 miR-30b 转基因小鼠心肌细胞的形态变化, 进行了 HE 染色法, 结果显示 10 周龄转基因小鼠心肌细胞排列整齐、细胞核大小均一、胞浆染色均匀, 提示未发生心肌细胞形态结构的改变及心肌纤维化(图 4)。

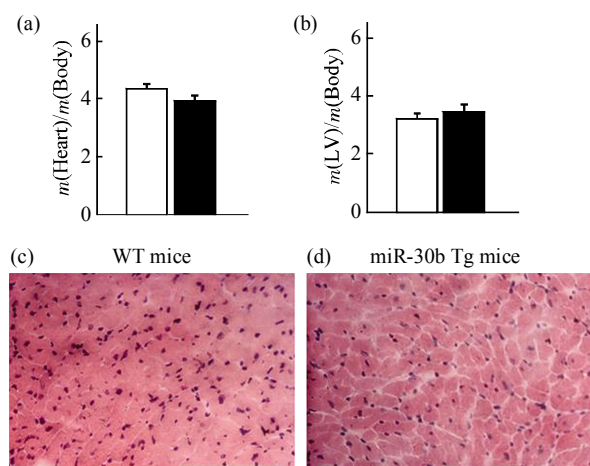


Fig. 4 miR-30b transgenic mice do not exhibit cardiac fibrosis

(a, b) Heart/body weight, Left ventricular (LV)/body weight of wild-type (WT) and miR-30b transgenic (Tg) mice. (c, d) HE staining of WT mice and miR-30b Tg mice myocardium ($\times 200$). □: WT; ■: Tg.

2.5 心肌损伤生化指标的检测结果

为了检测 I/R 手术是否造成了明显的心肌梗死损伤及初步研究 miR-30b 对心肌的功能, 我们在缺血 45 min, 再灌注 1 h 后, 分别对四组小鼠进行了内眦静脉采血, 分离血清后用试剂盒分别检测了 CK-MB、LDH 及 cTn I 的活力。结果发现, 此三种物质的浓度 I/R 组小鼠均较 sham 组小鼠明显上升 ($P < 0.05$, 图 5), 并且与 WT-I/R 组相比, Tg-I/R 组小鼠明显降低 ($P < 0.05$, 图 5), 说明 I/R 模型构建成功, 并且 miR-30b 具有一定的心肌保护作用。

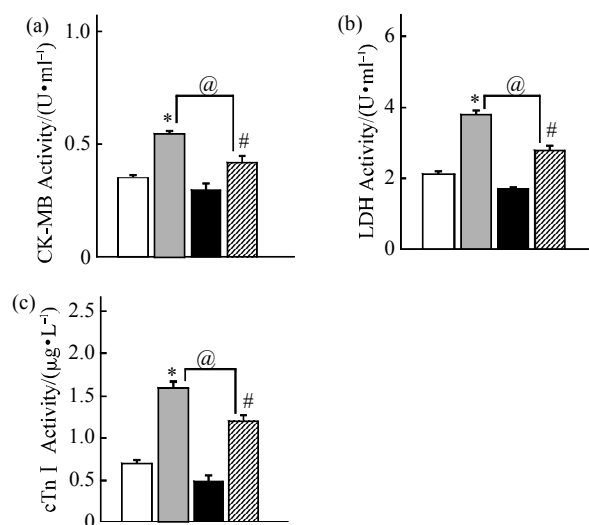


Fig. 5 Effects of miR-30b on levels of serum CK-MB, LDH and cTn I after I/R injury in mice

(a) Levels of serum CK-MB. (b) Levels of LDH. (c) Levels of cTn I. $n = 8$ mice per group; * $P < 0.05$ vs WT, # $P < 0.05$ vs I/R, @ $P < 0.05$ compared with WT-I/R. □: WT-sham; ■: WT-I/R; ■: Tg-sham; ▨: Tg-I/R.

2.6 TTC-Evans blue 双染色法结果

为了研究 miR-30b 在心脏组织中的功能, 我们采用 TTC-Evans blue 双染色法检测再灌注 24 h 后的转基因小鼠和野生型小鼠的心肌梗死面积。结果发现, 与 WT-I/R 组相比, Tg-I/R 组小鼠心肌梗死面积显著减小 ($P < 0.05$, 图 6), 提示 miR-30b 参与了心脏功能的维持, 具有缺血再灌注后的心肌保护作用。

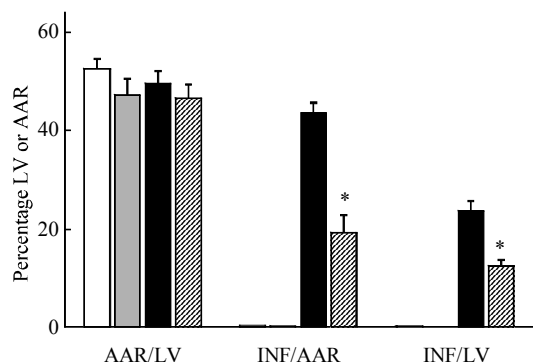


Fig. 6 Percentage of LV or AAR

WT and Tg mice are exposed to I/R or sham operation. AAR: area at risk; LV: left ventricular area; INF: infarct area. The ratios of AAR to LV, INF to AAR and INF to LV are shown. $n = 4$ mice per group; * $P < 0.05$ compared with WT-I/R. □: WT-sham; ■: Tg-sham; ■: WT-I/R; ▨: Tg-I/R.

2.7 miR-30b 转基因小鼠心肌 I/R 损伤后的心功能检测

再灌注 2 周后, 用超声心动图检测小鼠的心功能, 结果发现, 与 WT-I/R 组相比, Tg-I/R 组小鼠 LVIDs(2.35 ± 0.13)mm 显著下降($P < 0.05$, 图 7a), LVIDd(3.21 ± 0.06)mm 显著下降($P < 0.05$, 图 7b) FS(32.1 ± 0.14)%显著增加($P < 0.05$, 图 7c). 这些数据表明, I/R 处理后, miR-30b 转基因小鼠较野生型小鼠的心功能得到了明显改善, 进一步说明 miR-30b 具有心肌保护作用.

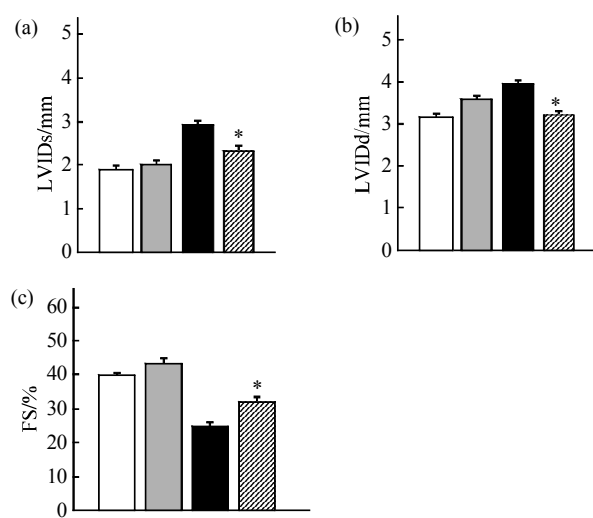


Fig. 7 Echocardiographic analysis of left ventricular dimensions and cardiac function in mice exposed to I/R or sham operation

(a) LVIDs, systolic left ventricular internal diameters. (b) LVIDd, diastolic left ventricular internal diameters. (c) FS, fractional shortening of left ventricular diameter, calculated as $(\text{LVIDd} - \text{LVIDs}) / \text{LVIDd} \times 100$.

* $P < 0.05$ compared with WT-I/R; $n = 4$ mice per group. □: WT-sham;

■: Tg-sham; ■: WT-I/R; ▨: Tg-I/R.

3 讨 论

MiRNAs 是一类进化保守的短的非编码小分子 RNA, 长约 22 个核苷酸. miRNAs 通过碱基配对, 结合靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区而在转录后水平发挥抑制特定基因表达的功能^[1]. 近年来, 越来越多的研究表明, miRNAs 在心脏发育、功能和生理学等方面发挥着关键作用^[12-15], Zhao 等^[16]证明, 在经吡格列酮给药后的心肌梗死大鼠中, miR-711 表达上调, 抑制靶基因 SP1 的表达、减少 I 型胶原蛋白的合成、进而减少心肌细胞纤维化.

MiR-30b 位于染色体 8q24 上, 是 miR-30 家族

的一员, 目前关于它的研究较少. 有研究表明, miR-30b 家族作用于 DLL4(Delta-like 4) 3'UTR 区从而调控血管生成, 并能通过间接影响 *kdr1* 表达增强 *Vegfa* 信号^[17]; BMP-2(bone morphogenetic protein-2)下调 miR-30b 和 miR-30c 的表达, 增加 Runx2(runt-related transcription factor 2)的表达, 从而促进血管平滑肌细胞的钙化^[18]; miR-30b-5p 抑制 CaMK II δ (Ca/calmodulin-dependent protein kinase II δ)的表达, 参与心肌肥大的调控^[19]. 这些研究表明 miR-30b 确实在生物体内发挥了某些重要功能. 近几年来, miRNA 基因芯片结果显示, 在携带 MYH7 基因突变的家族性肥厚性心肌病患者心脏组织和小鼠心力衰竭模型中 miR-30b 均表达下调, 提示 miR-30b 可能在心脏疾病的发生发展过程中扮演着重要角色.

为了研究 miR-30b 在心脏组织中的具体功能, 我们首先利用转基因技术构建了心肌细胞特异性 miR-30b 转基因小鼠, 子代小鼠的基因型鉴定结果及 qRT-PCR 结果表明转基因小鼠构建成功. 进一步对转基因小鼠进行表型和细胞形态的分析, 结果发现, 相对于野生型小鼠, 该小鼠在 10 周龄时心重/体重比和左心室/体重比无显著变化, 心肌细胞未出现心肌纤维化, 提示在心肌细胞内过表达 miR-30b 不会导致心肌组织结构的变化.

心脏作为一种重要的功能器官, 源源不断地向其他器官和组织中供给足够的氧和各种营养物质, 并带走二氧化碳、尿素等代谢终产物以维持细胞正常的代谢和功能. 由于心肌长时间缺血、心肌细胞能量代谢不足导致心肌细胞死亡的发生, 进而引起心肌梗死. 心肌梗死是临床上的急重症, 严重危害着人类的身体健康. 近年来, 心肌损伤生化指标 LDH、CK-MB 和 cTn I 成为检测心肌梗死的最主要依据.

目前, 关于 miR-30b 在心肌梗死中的功能及相关机制未见报道. 为了研究 miR-30b 在心肌梗死中的功能, 我们通过结扎冠状动脉左前降支的方法建立了小鼠 I/R 模型, 并以 sham 组作为对照. 生化检测结果表明, 与 sham 组小鼠相比, I/R 组小鼠 LDH、CK-MB 和 cTn I 的浓度均显著上升, 表明我们成功构建了 I/R 模型, 与 WT-I/R 组相比, Tg-I/R 组小鼠此三个生化指标的浓度明显降低, 说明 miR-30b 具有一定的心肌保护作用. TTC-Evans blue 结果显示, 与野生型小鼠相比, miR-30b 转基因小鼠心肌梗死面积明显减少, 表明 miR-30b 能够

抑制心肌梗死, 进一步说明 miR-30b 对缺血再灌注后的心肌具有保护作用。

超声心动图是应用超声的特殊物理学特性探查心脏和大血管的解剖结构及功能状态的一种首选无创性检查方法。本实验检测了再灌注两周后小鼠的心功能状况。检测结果表明: I/R 处理后, miR-30b 转基因小鼠较野生型小鼠, FS 等心功能各项指标明显改善, 提示 miR-30b 能够维持心脏功能, 具有心肌保护功能。该研究成果为心肌梗死的预防和治疗提供了新的思路, 特别是对开发微小 RNA 作为治疗心脏疾病药物具有重要的指导意义。

以上结果初步显示了 miR-30b 能够抑制心肌梗死, 具有心肌保护功能。另外, 该转基因小鼠的成功建立能够研究人类心脏疾病的发生机制、预防、新药研发及疗效评价提供良好的实验动物模型。我们今后将会通过 targets can 等 miRNA 靶基因预测软件预测 miR-30b 作用靶标蛋白, 并用荧光素酶报告法验证以确定 miR-30b 的靶标及研究 miR-30b 保护心肌的分子机制。我们初步推测 miR-30b 可能通过抑制细胞凋亡相关通路而发挥其心肌保护功能。

参 考 文 献

- [1] Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, **425**(6956): 415-419
- [2] Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovascular Research*, 2008, **79**(4): 562-570
- [3] Yang B, Lu Y, Wang Z. Control of cardiac excitability by microRNAs. *Cardiovascular Research*, 2008, **79**(4): 571-580
- [4] Palaci M, Reguero J R, Martín M, *et al.* Profile of microRNAs differentially produced in hearts from patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomeric mutations. *Clinical Chemistry*, 2011, **57**(11): 1614-1616
- [5] Ikeda S, He A, Kong S W, *et al.* MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol*, 2009, **29**(8): 2193-2204
- [6] Dolci A, Panteghini M. The exciting story of cardiac biomarkers: from retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more. *Clinica Chimica Acta*, 2006, **369**(2): 179-187
- [7] Robinson D J, Christenson R H. Creatine kinase and its CK-MB isoenzyme: the conventional marker for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Clinical Laboratory in Emergency Medicine*, 1999, **17**(1): 95-104
- [8] 刘 薇, 卢光秀, 卢惠霖. 显微注射法制备转基因小鼠模型的研究. *动物学杂志*, 1997, **32**(2): 32-35
Liu W, Lu G X, Lu H L. *Chin J Zoology*, 1997, **32**(2): 32-35
- [9] Gordon J W, Scangos G A, Plotkin D J, *et al.* Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**(12): 7380-7384
- [10] Zhao Z, Hou N, Sun Y, *et al.* Atp4b promoter directs the expression of Cre recombinase in gastric parietal cells of transgenic mice. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, **37**(9): 647-652
- [11] Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science Signaling*, 2003, **301**(5631): 336-338
- [12] van Rooij E, Sutherland L B, Liu N, *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(48): 18255-18260
- [13] Sayed D, Hong C, Chen I Y, *et al.* MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, 2007, **100**(3): 416-424
- [14] van Rooij E, Sutherland L B, Qi X, *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science Signaling*, 2007, **316**(5824): 575-579
- [15] Callis T E, Wang D Z. Taking microRNAs to heart. *Trends in Molecular Medicine*, 2008, **14**(6): 254-260
- [16] Zhao N, Yu H, Yu H, *et al.* MiRNA-711-SPI-collagen-I pathway is involved in the anti-fibrotic effect of pioglitazone in myocardial infarction. *Science China Life Sciences*, 2013, **56**(5): 431-439
- [17] Bridge G, Monteiro R, Henderson S, *et al.* The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis. *Blood*, 2012, **120**(25): 5063-5072
- [18] Balderman J A, Lee H Y, Mahoney C E, *et al.* Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of the American Heart Association*, 2012, **1**(6): e003905
- [19] He J, Jiang S, Li F L, *et al.* MicroRNA-30b-5p is involved in the regulation of cardiac hypertrophy by targeting CaMK II δ . *Journal of Investigative Medicine*, 2013, **61**(3): 604-612

Establishment of Cardiomyocyte-specific miR-30b Transgenic Mice and Exploring The Function of miR-30b*

FAN Yuan-Yuan, LONG Bo, LIU Fang, ZHOU Lu-Yu, WANG Kun, LI Pei-Feng**

(State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) array results have shown that the expression of miR-30b is downregulated in heart tissues from patients with familial hypertrophic cardiomyopathy who were carriers of missense mutations in the MYH7, and also in a murine heart failure model, implying that miR-30b might play an important role in heart diseases. To study miR-30b *in vivo* function, we generated a transgenic mouse line overexpressing miR-30b under the control of the 5.5 kb promoter of α -myosin heavy chain (α -MHC). qRT-PCR results demonstrated that miR-30b was significantly increased in the heart tissues of miR-30b transgenic mice ($P < 0.05$). miR-30b transgenic mice did not exhibit significant heart/body weight and left ventricular(LV)/body weight changes and abnormal myocardium structure. At present, little is known about how miR-30b regulates myocardial infarction. We constructed I/R models by the coronary artery ligation method and sham-operated mice were used as controls. Biochemical detection results and TTC-Evans blue results showed that after ischemia-reperfusion, these transgenic mice had lower releases of LDH, CK and cTn I ($P < 0.05$) and their hearts exhibited a smaller infarct size compared to those from control mice ($P < 0.05$). Echocardiographic results indicated that cardiac function of transgenic mice was markedly improved compared to that of control mice. In conclusion, miR-30b has protective effect upon ischemic-reperfusion injury. And it may provide a new therapeutic approach for preventing and treating myocardial infarction.

Key words miR-30b, heart, transgene, mice, myocardial infarction

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00324

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31010103911).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64807158, E-mail: lpeifeng@hotmail.com

Received: July 11, 2013 Accepted: December 2, 2013