

• 论著 •

微小 RNA-1 在高糖培养下心肌成纤维细胞致纤维化中的调控作用

王安 孙波 仇佳 乔世刚 王琛

215004 江苏苏州, 苏州大学附属第二医院麻醉科(王安、孙波、仇佳、乔世刚、王琛); 215153 江苏苏州, 苏州科技城医院麻醉科(乔世刚、王琛); 215001 江苏苏州, 南京医科大学附属苏州医院西区麻醉科(乔世刚、王琛)

通讯作者: 王琛, Email: wangchen1791@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.12.010

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-1 (miR-1) 在高糖培养下心肌成纤维细胞致纤维化中的作用。**方法** 取 1~3 日龄 SD 大鼠心尖组织培养原代成纤维细胞, 选用 3~4 代细胞并随机分为正常糖空病毒组 (CON+Lv-Vehicle 组)、正常糖 miR-1 沉默组 (CON+Lv-miR1 组)、高糖空病毒组 (HG+Lv-Vehicle 组)、高糖 miR-1 沉默组 (HG+Lv-miR1 组) 4 组, 分别置于含葡萄糖 5.5 mmol/L (正常糖) 或 25 mmol/L (高糖) 的 DMEM 培养基中, 并分别接种含 miR-1 沉默序列的慢病毒或慢病毒载体, 于 12 h 后更换新鲜培养基。接种病毒 3 d 后病毒转染效率达 90% 时, 采用实时定量反转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-1 表达, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测胶原蛋白 I 和 III 的分泌量, 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测胶原蛋白 I 和 III、基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 及自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3B-II (LC3B-II)、死骨片重组蛋白 1 (P62/SQSTM1)、组织蛋白酶 D (Cathepsin D) 的蛋白表达。**结果** 与 CON+Lv-Vehicle 组比较, CON+Lv-miR1 组各指标差异均无统计学意义; HG+Lv-Vehicle 组 miR-1 表达明显升高 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.82 ± 0.17 比 1.00 ± 0.04), 胶原蛋白 I 和 III 的分泌量 (mg/L: 14.55 ± 0.33 比 7.28 ± 0.22 , 157.50 ± 13.22 比 61.25 ± 8.54) 及表达量 (灰度值: 432.35 ± 56.00 比 100.00 ± 15.00 , 320.35 ± 47.00 比 100.00 ± 15.00) 明显升高, MMP-2、MMP-9、LC3B-II、P62/SQSTM1 蛋白表达明显增高 (灰度值: 249.0 ± 21.0 比 100.0 ± 15.0 , 142.3 ± 20.0 比 100.0 ± 16.0 , 178 ± 19 比 100 ± 14 , 378.3 ± 20.0 比 100.0 ± 15.0), 而 Cathepsin D 表达明显降低 (灰度值: 60 ± 14 比 100 ± 10), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。与 HG+Lv-Vehicle 组比较, HG+Lv-miR1 组 miR-1 表达明显降低 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.21 ± 0.10 比 1.82 ± 0.17), 胶原蛋白 I 和 III 的分泌量 (mg/L: 10.68 ± 0.54 比 14.55 ± 0.33 , 87.25 ± 13.55 比 157.50 ± 13.22) 及表达量 (灰度值: 179.41 ± 45.00 比 432.35 ± 56.00 , 173.41 ± 50.00 比 320.35 ± 47.00) 明显减少, MMP-2、MMP-9、LC3B-II、P62/SQSTM1 蛋白表达明显降低 (灰度值: 172.0 ± 23.0 比 249.0 ± 21.0 , 90.0 ± 17.0 比 142.3 ± 20.0 , 138 ± 15 比 178 ± 19 , 265.0 ± 17.0 比 378.3 ± 20.0), Cathepsin D 表达明显升高 (灰度值: 110 ± 17 比 60 ± 14), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** 高糖培养下的心肌成纤维细胞可明显上调 miR-1 表达, miR-1 基因沉默对高糖培养下心肌成纤维细胞致纤维化作用具有抑制作用, 其机制可能与恢复成纤维细胞自噬流、上调 Cathepsin D 表达、抑制胶原蛋白生成有关。

【关键词】 高糖损伤; 心肌成纤维细胞; 纤维化; 微小 RNA; 自噬

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20141187); 江苏省苏州市科技计划项目 (SS201613, SYS201473); 苏州大学科研预研基金项目 (SDY2015A18)

Role of microRNA-1 on fibrosis induced by high glucose cultured cardiac fibroblasts Wang An, Sun Bo, Qiu Jia, Qiao Shigang, Wang Chen

Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu, China (Wang A, Sun B, Qiu J, Qiao SG, Wang C); Department of Anesthesiology, Suzhou Science and Technology Town Hospital, Suzhou 215153, Jiangsu, China (Qiao SG, Wang C); Department of Anesthesiology, Suzhou Hospital, Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu, China (Qiao SG, Wang C)

Corresponding author: Wang Chen, Email: wangchen1791@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of microRNA-1 (miR-1) on the fibrosis of cardiac fibroblasts induced by high glucose. **Methods** The primary cultured fibroblasts from 1-3 days old Sprague-Dawley (SD) rats, were randomly divided into 4 groups ($n = 3$): normal glucose + lentivector-vehicle (CON+Lv-Vehicle group), normal glucose + lentivector-miR-1 (CON+Lv-miR1 group), high glucose + lentivector-vehicle (HG+Lv-Vehicle group), high glucose + lentivector-miR-1 (HG+Lv-miR1 group). Fibroblasts were cultured in glucose concentration 5.5 mmol/L and 25 mmol/L DMEM culture, and were injected lentiviral vector carrying miR-1 silencer sequence or the same volume of lentiviral vector. After 12 hours, the medium was replaced with fresh complete medium. After 3 days when transfection efficiency was up to 90%, the cellular miR-1 content was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain

reaction (qRT-PCR). The secretion of collagen I and III were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expression of collagen I and III, matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2, MMP-9), autophagy related protein LC3B-II, P62/SQSTM1 and Cathepsin D were assessed by Western Blot. **Results** Compared with the CON+Lv-Vehicle group, the content of miRNA in the CON+Lv-miR1 group had no statistical significance. Compared with the CON+Lv-Vehicle group, high glucose increased the amount of miR-1 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.82 ± 0.17 vs. 1.00 ± 0.04), collagen I and III secretion (mg/L: 14.55 ± 0.33 vs. 7.28 ± 0.22 , 157.50 ± 13.22 vs. 61.25 ± 8.54) and expression (gray value: 432.35 ± 56.00 vs. 100.00 ± 15.00 , 320.35 ± 47.00 vs. 100.00 ± 15.00), the level of MMP-2, MMP-9 and the expression of autophagy related protein LC3B-II and P62/SQSTM1 (gray value: 249.0 ± 21.0 vs. 100.0 ± 15.0 , 142.3 ± 20.0 vs. 100.0 ± 16.0 , 178 ± 19 vs. 100 ± 14 , 378.3 ± 20.0 vs. 100.0 ± 15.0), decreased the expression of lysosomal associated protein Cathepsin D (gray value: 60 ± 14 vs. 100 ± 10), and the differences were statistically significant (all $P < 0.01$). Compared with the HG+Lv-Vehicle group, the amount of miR-1 in the HG+Lv-miR1 group was significantly decreased ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.21 ± 0.10 vs. 1.82 ± 0.17), collagen I and III secretion (mg/L: 10.68 ± 0.54 vs. 14.55 ± 0.33 , 87.25 ± 13.55 vs. 157.50 ± 13.22) and expression (gray value: 179.41 ± 45.00 vs. 432.35 ± 56.00 , 173.41 ± 50.00 vs. 320.35 ± 47.00), the level of MMP-2, MMP-9 and the expression of autophagy related protein LC3B-II and P62/SQSTM1 (gray value: 172.0 ± 23.0 vs. 249.0 ± 21.0 , 90.0 ± 17.0 vs. 142.3 ± 20.0 , 138 ± 15 vs. 178 ± 19 , 265.0 ± 17.0 vs. 378.3 ± 20.0) in the HG+Lv-miR1 group were decreased and the expression of lysosomal associated protein Cathepsin D was higher (gray value: 110 ± 17 vs. 60 ± 14), and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusions** The expression of miRNA-1 was up-regulated in cardiac fibroblasts cultured in high glucose, and miRNA-1 silencing inhibited cardiac fibroblast induced fibrosis in high glucose. The mechanism may be related to the recovery of autophagy flux, up-regulation of Cathepsin D expression and inhibition of collagen production.

【Key words】 High glucose damage; Cardiac fibroblast; Fibrosis; MicroRNA; Autophagy

Fund program: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20141187); Science and Technology Development Plan of Suzhou City (SS201613, SYS201473); Pre-research Programme of Soochow University (SDY2015A18)

糖尿病心肌纤维化是心脏对体内持续高糖、高脂状态所显示的一种适应性反应,主要表现为心肌成纤维细胞增生、细胞外基质(ECM)沉积和胶原纤维过量堆积,最终导致舒张功能不全,心肌重构和心脏衰竭^[1-2]。有研究表明糖尿病心肌纤维化可使心房结构重塑、电生理活动异常,最终导致糖尿病相关的心房颤动^[3];糖尿病伴发急性心肌梗死时更易发生应激性高血糖,且病死率高,住院时间延长,故危险性更高^[4]。微小RNA(miRNA)是一类短小的非编码RNA,它与目的基因转录的mRNA结合干扰翻译过程,近年研究发现,miRNA参与了心脑血管系统和肿瘤等重大疾病的发生发展^[5-6]。不同心脏疾病中存在多种miRNA异常表达^[7-9],如最近有研究报道,miRNA-1(miR-1)高表达可明显损害心脏功能^[10];循环中miR-1升高发生在心肌梗死的早期^[11],且其诊断的敏感性优于心肌肌钙蛋白T(cTnT)^[12];miRNA可抑制高糖下的热休克蛋白表达并促进心肌细胞凋亡^[13]。现已证明miR-1参与了糖尿病心肌病的心肌肥大^[14],而miR-1对心肌纤维化的影响尚不明确。本研究采用慢病毒转染基因沉默miR-1,观察miR-1在高糖条件下心肌成纤维细胞致纤维化中的作用,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂: SPF级SD大鼠,1~3日龄,雌雄不拘,体重8.5 g,苏州大学实验动物中心提供,

许可证号SYXK(苏)-0045。胎牛血清(美国GIBCO公司),胰蛋白酶(碧云天试剂公司),DMEM培养基(上海立菲生物技术有限公司);抗波形蛋白(Vimentin)多抗、一抗胶原蛋白I和III、一抗基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-9)、一抗组织蛋白酶D(Cathepsin D,美国Abcam公司),一抗微管相关蛋白1轻链3B-II(LC3B-II,美国Cell Signaling公司),一抗死骨片重组蛋白1(P62/SQSTM1,中国Abnova公司), β -肌动蛋白(β -actin,美国Sigma公司)。

1.2 心肌成纤维细胞体外培养: 无菌条件下开胸取心尖组织,37℃下加0.1%胶原酶II消化3 min,弃上清液重复加入胶原酶II 3~4次,转移上清液至含10%胎牛血清的正常或高糖DMEM培养基中终止消化,离心重悬细胞悬液后200目滤网过滤,差速贴壁后获得较纯的原代心肌成纤维细胞,将其放入培养皿中培养,待单层细胞生长铺满皿底时用0.25%胰蛋白酶消化传代,选用3~4代细胞进行实验。行抗Vimentin多抗免疫组化染色鉴定,结果为阳性。

1.3 实验分组及处理: 将细胞分为正常糖空病毒组(CON+Lv-Vehicle组)、正常糖miR-1沉默组(CON+Lv-miR1组)、高糖空病毒组(HG+Lv-Vehicle组)、高糖miR-1沉默组(HG+Lv-miR1组)4组,共重复3次。正常组和高糖组分别培养于含葡萄糖为5.5 mmol/L和25 mmol/L的DMEM培养基中;空病毒组给予慢病毒载体,沉默组给予慢病毒miR-1

反义寡聚核苷酸 AMO-1。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 慢病毒转染：第 3 代成纤维细胞以细胞密度为 $(3 \sim 5) \times 10^7/L$ 铺于 6 孔板，慢病毒以复感染指数 (MOI 值) 50 接种成纤维细胞，12 h 后更换新鲜培养基，3 d 后用于观察慢病毒转染率即绿色荧光蛋白 (GFP) 阳性细胞数超过 90%。序列为 miR-1 成熟区的翻译核酸序列由中国比昂生物公司构建，慢病毒滴度为 1×10^{12} TU/L。

1.4.2 实时定量反转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-1：以 miR-1 反转录 cDNA 为模版，扩增每组的 miR-1，以 β -actin 作为内参基因。引物序列由金唯智生物科技公司设计。反应条件：反转录 65°C 10 min， 25°C 5 min；预变性 94°C 4 min；循环 94°C 30 s； 50°C 退火 30 s； 70°C 延伸 40 s；共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组 miR-1 表达。

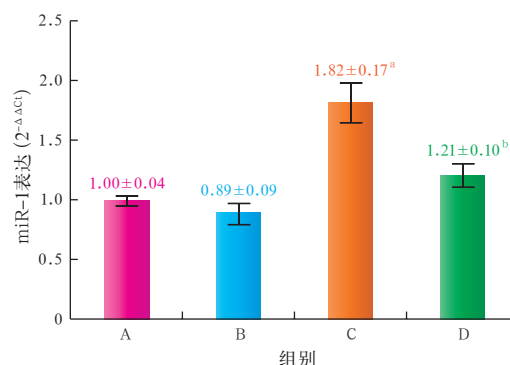
1.4.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测胶原蛋白分泌量：按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测胶原蛋白 I 和 III 的分泌量。

1.4.4 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 测定蛋白表达：提取蛋白，采用 BCA 法测定蛋白含量，取样 50 μg ，于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白，转印至硝酸纤维素膜上，5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 1 h，分别加入一抗胶原蛋白 I (1:1000)、一抗胶原蛋白 III (1:1000)、一抗 MMP-2 (1:1000)、一抗 MMP-9 (1:1000)、一抗 LC3B-II (1:200)、一抗 Cathepsin D (1:1000)、一抗 P62/SQSTM1 (1:1000) 和抗 β -actin (1:5000)， 4°C 冰箱孵育过夜。用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (TBST) 洗涤，加入相应二抗后摇床孵育 1 h。使用奥德赛显影仪显影，Image J 软件分析，测定各条带灰度值，以目的蛋白与 β -actin 的灰度值比值表示。

1.5 统计学处理：使用 SPSS 20.0 软件统计分析数据，采用 Graph Pad Prism 5 软件处理数据，计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD- t 法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌成纤维细胞 miR-1 表达 (图 1)：与 CON+Lv-Vehicle 组比较，CON+Lv-miR1 组 miR-1 表达量差异无统计学意义，而 HG+Lv-Vehicle 组 miR-1 表达量明显增高 ($P < 0.05$)；HG+Lv-miR1 组 miR-1 表达量较 HG+Lv-Vehicle 组明显降低 ($P < 0.05$)。



注：A 为正常糖空病毒组 (CON+Lv-Vehicle 组)，B 为正常糖 miR-1 沉默组 (CON+Lv-miR1 组)，C 为高糖空病毒组 (HG+Lv-Vehicle 组)，D 为高糖 miR-1 沉默组 (HG+Lv-miR1 组)；与 CON+Lv-Vehicle 组比较，^a $P < 0.01$ ；与 HG+Lv-Vehicle 组比较，^b $P < 0.05$

图 1 实时定量反转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测高糖处理以及微小 RNA-1 (miR-1) 沉默对 miR-1 表达的影响

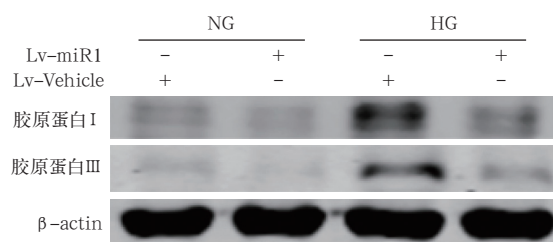
2.2 成纤维细胞胶原蛋白分泌量及蛋白表达 (表 1；图 2)：与 CON+Lv-Vehicle 组比较，CON+Lv-miR1 组胶原蛋白 I 和 III 的分泌量及表达量差异无统计学意义，而 HG+Lv-Vehicle 组均明显增高 (均 $P < 0.05$)；HG+Lv-miR1 组胶原蛋白 I 和 III 分泌量及表达量较 HG+Lv-Vehicle 组明显降低 (均 $P < 0.05$)。

表 1 高糖处理以及微小 RNA-1 (miR-1) 沉默对胶原蛋白 I 和 III 的分泌量及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	分泌量 (mg/L)	
		胶原蛋白 I	胶原蛋白 III
CON+Lv-Vehicle 组	3	7.28 ± 0.22	61.25 ± 8.54
CON+Lv-miR1 组	3	7.38 ± 0.39	58.75 ± 4.35
HG+Lv-Vehicle 组	3	14.55 ± 0.33 ^a	157.50 ± 13.22 ^a
HG+Lv-miR1 组	3	10.68 ± 0.54 ^b	87.25 ± 13.55 ^b

组别	样本数	蛋白表达 (灰度值)	
		胶原蛋白 I	胶原蛋白 III
CON+Lv-Vehicle 组	3	100.00 ± 15.00	100.00 ± 15.00
CON+Lv-miR1 组	3	94.12 ± 23.00	81.72 ± 22.00
HG+Lv-Vehicle 组	3	432.35 ± 56.00 ^a	320.35 ± 47.00 ^a
HG+Lv-miR1 组	3	179.41 ± 45.00 ^b	173.41 ± 50.00 ^b

注：CON+Lv-Vehicle 组为正常糖空病毒组，CON+Lv-miR1 组为正常糖 miR-1 沉默组，HG+Lv-Vehicle 组为高糖空病毒组，HG+Lv-miR1 组为高糖 miR-1 沉默组；与 CON+Lv-Vehicle 组比较，^a $P < 0.01$ ；与 HG+Lv-Vehicle 组比较，^b $P < 0.01$



NG 为正常糖培养，HG 为高糖培养，Lv-miR1 为 miR-1 沉默，Lv-Vehicle 为空病毒， β -actin 为 β -肌动蛋白

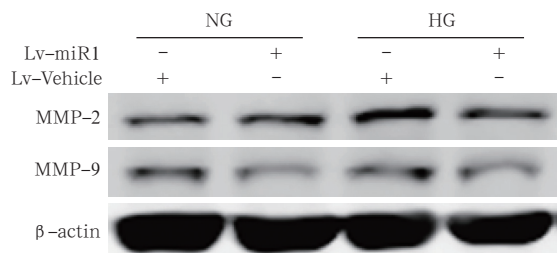
图 2 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测高糖处理以及微小 RNA-1 (miR-1) 沉默对胶原蛋白 I 和 III 表达的影响

2.3 成纤维细胞 MMP 蛋白表达(表 2; 图 3): 与 CON+Lv-Vehicle 组比较, CON+Lv-miR1 组 MMP-2 和 MMP-9 表达差异无统计学意义, 而 HG+Lv-Vehicle 组均明显增高 (均 $P < 0.05$); HG+Lv-miR1 组降低程度较 HG+Lv-Vehicle 组明显 (均 $P < 0.05$)。

表 2 高糖处理以及微小 RNA-1 (miR-1) 沉默对基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 表达的影响

组别	样本数	蛋白表达 (灰度值)	
		MMP-2	MMP-9
CON+Lv-Vehicle 组	3	100.0 ± 15.0	100.0 ± 16.0
CON+Lv-miR1 组	3	107.0 ± 23.0	83.2 ± 23.0
HG+Lv-Vehicle 组	3	249.0 ± 21.0 ^a	142.3 ± 20.0 ^a
HG+Lv-miR1 组	3	172.0 ± 23.0 ^b	90.0 ± 17.0 ^b

注: CON+Lv-Vehicle 组为正常糖空病毒组, CON+Lv-miR1 组为正常糖 miR-1 沉默组, HG+Lv-Vehicle 组为高糖空病毒组, HG+Lv-miR1 组为高糖 miR-1 沉默组; 与 CON+Lv-Vehicle 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 HG+Lv-Vehicle 组比较, ^b $P < 0.05$



NG 为正常糖培养, HG 为高糖培养, Lv-miR1 为 miR-1 沉默, Lv-Vehicle 为空病毒, β-actin 为 β-肌动蛋白

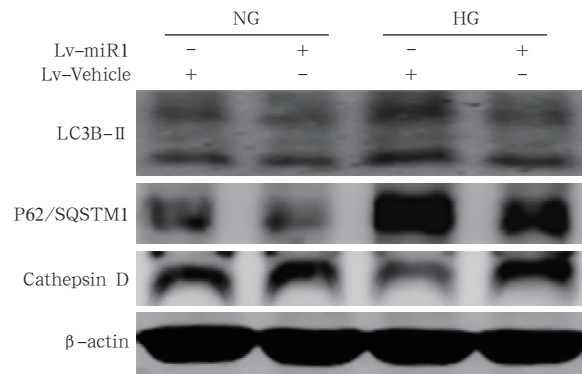
图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测高糖处理以及微小 RNA-1 (miR-1) 沉默对基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 表达的影响

2.4 miR-1 沉默恢复成纤维细胞高糖下的自噬潮结果(表 3; 图 4): 与 CON+Lv-Vehicle 组比较, HG+Lv-Vehicle 组 LC3B-II、P62/SQSTM1 表达明显增高, Cathepsin D 表达明显降低 (均 $P < 0.01$); 而 CON+Lv-miR1 组各指标变化均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。与 HG+Lv-Vehicle 组比较, HG+Lv-miR1 组 LC3B-II、P62/SQSTM1 表达明显降低, Cathepsin D 表达明显升高 (均 $P < 0.05$)。

表 3 高糖处理以及微小 RNA-1 (miR-1) 沉默对自噬溶酶体相关蛋白表达的影响

组别	样本数	蛋白表达 (灰度值)		
		LC3B-II	P62/SQSTM1	Cathepsin D
CON+Lv-Vehicle 组	3	100 ± 14	100.0 ± 15.0	100 ± 10
CON+Lv-miR1 组	3	96 ± 17	83.2 ± 23.0	111 ± 14
HG+Lv-Vehicle 组	3	178 ± 19 ^a	378.3 ± 20.0 ^a	60 ± 14 ^a
HG+Lv-miR1 组	3	138 ± 15 ^b	265.0 ± 17.0 ^c	110 ± 17 ^c

注: CON+Lv-Vehicle 组为正常糖空病毒组, CON+Lv-miR1 组为正常糖 miR-1 沉默组, HG+Lv-Vehicle 组为高糖空病毒组, HG+Lv-miR1 组为高糖 miR-1 沉默组; LC3B-II 为微管相关蛋白 1 轻链 3B-II, P62/SQSTM1 为死骨片重组蛋白 1, Cathepsin D 为组织蛋白酶 D; 与 CON+Lv-Vehicle 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 HG+Lv-Vehicle 组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$



NG 为正常糖培养, HG 为高糖培养, Lv-miR1 为 miR-1 沉默, Lv-Vehicle 为空病毒, LC3B-II 为微管相关蛋白 1 轻链 3B-II, P62/SQSTM1 为死骨片重组蛋白 1, Cathepsin D 为组织蛋白酶 D, β-actin 为 β-肌动蛋白

图 4 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测高糖处理以及微小 RNA-1 (miR-1) 沉默对自噬溶酶体相关蛋白表达的影响

3 讨论

已有研究证实, 心肌成纤维细胞在糖浓度超过 10 mmol/L 时即有促进纤维化的作用^[15-17], 故本实验选择将成纤维细胞置于含有 25 mmol/L 葡萄糖的培养基中培养, 模拟糖尿病心脏在高糖环境下的病理改变。考虑高糖渗透压的影响, 本课题组预实验通过添加甘露醇达到与高糖同样的渗透压, 即在 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基中加入终浓度 19.5 mmol/L 的甘露醇培养心肌成纤维细胞, 与正常糖组相比, 添加甘露醇组细胞的自噬及纤维化指标差异不大, 说明在排除了细胞渗透压因素外, 葡萄糖含量作为单一影响因素建立高糖损伤模型是成功的。

基础和临床研究均证实了 miRNA 在众多心脏疾病中表达增高, 并参与疾病的发生发展^[14, 18]。有研究证实, 降低 miR-1 表达可明显减少缺氧或再灌注后的心肌细胞凋亡^[19]; 过表达 miR-1 可损伤心肌收缩功能^[10]。故调节疾病过程中 miR-1 的表达水平可达到治疗疾病的目的。本实验中应用 ELISA 及 Western Blot 检测心肌成纤维细胞的纤维化水平, 结果显示, 与 CON+Lv-Vehicle 组比较, HG+Lv-Vehicle 组胶原蛋白 I 和 II 的分泌量及表达量以及 MMP 表达量均明显升高, 而给予 miR-1 沉默处理后纤维化水平明显下降, 说明 miR-1 能缓解高糖下的纤维化作用。

既然 miR-1 过表达与 T2DM 心肌纤维化有直接联系, 那么 miR-1 是通过何种机制影响糖尿病心脏? 研究发现, 异常表达的 miRNA 直接改变了转录后自噬相关基因生成和自噬活性, T2DM 心脏自噬活性的改变为心肌氧化应激损伤提供了可能^[20]。

自噬流过程是自噬小体的最终消化过程,即自噬小体与胞质内的初级溶酶体相接触,两者结合形成自噬/溶酶体,并将存在于自噬小体内的物质消化降解的过程。虽然在细胞中增长的 LC3-II 预示着自噬水平增高,但只是因自噬终末阶段受抑制才表现为 LC3-II 大量蓄积。LC3-II 和 P62 作为自噬小体的底物会在溶酶体中部分降解, Cathepsin D 作为溶酶体蛋白,参与了自噬小体的降解^[18]。本研究检测自噬相关蛋白表达的结果显示, HG+Lv-Vehicle 组 LC3B-II、P62/SQSTM1 表达明显高于 CON+Lv-Vehicle 组,而 Cathepsin D 表达明显降低,说明高糖下细胞内大量自噬体蓄积,溶酶体活性降低,进而自噬流受到损伤;而给予 miR-1 沉默处理后自噬相关蛋白表达基本恢复正常,提示 miR-1 沉默可能参与细胞自噬流的恢复而发挥其抗纤维化作用。

综上, miR-1 沉默可能通过激活细胞自噬流上调溶酶体酶活性,清除细胞内大量蓄积的自噬小体,最终抑制高糖下心肌成纤维细胞的纤维化程度。

参考文献

- [1] Goyal BR, Mehta AA. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiological mechanisms and cardiac dysfunction [J]. Hum Exp Toxicol, 2013, 32 (6): 571-590. DOI: 10.1177/0960327112450885.
- [2] 黄娅茜,王宪,孔炜. 糖尿病心脏病发病机制的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2010, 41 (1): 31-36.
Huang YQ, Wang X, Kong W. Diabetic Cardiomyopathy [J]. Progress Physiol Sci, 2010, 41 (1): 31-36.
- [3] 赵辉,张其同,刘彤. 糖尿病心房重构的研究进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (3): 334-336. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.03.028.
Zhao H, Zhang QT, Liu T. Research progress of atrial remodeling of diabetes [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (3): 334-336. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.03.028.
- [4] 彭晓初,赵艳芳,邹大进,等. 糖尿病在急性心肌梗死危险评估中地位的探讨 [J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23 (6): 322-328. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.002.
Pan XR, Zhao YF, Zou DJ, et al. The role of diabetes mellitus as a risk factor of acute myocardial infarction [J]. Chin Crit Care Med, 2011, 23 (6): 322-328. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.002.
- [5] Duan X, Ji B, Wang X, et al. Expression of microRNA-1 and microRNA-21 in different protocols of ischemic conditioning in an isolated rat heart model [J]. Cardiology, 2012, 122 (1): 36-43. DOI: 10.1159/000338149.
- [6] Vienberg S, Geiger J, Madsen S, et al. MicroRNAs in Metabolism [J]. Acta Physiol (Oxf), 2016 [2016-08-25]. [published online ahead of print March 24, 2016]. DOI: 10.1111/apha.12681.
- [7] Shantikumar S, Caporali A, Emanueli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications [J]. Cardiovasc Res, 2012, 93 (4): 583-593. DOI: 10.1093/cvr/cvr300.
- [8] Greco S, Fasanaro P, Castelvécchio S, et al. MicroRNA dysregulation in diabetic ischemic heart failure patients [J]. Diabetes, 2012, 61 (6): 1633-1641. DOI: 10.2337/db11-0952.
- [9] Yildirim SS, Akman D, Catalucci D, et al. Relationship between downregulation of miRNAs and increase of oxidative stress in the development of diabetic cardiac dysfunction: junctin as a target protein of miR-1 [J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 67 (3): 1397-1408. DOI: 10.1007/s12013-013-9672-y.
- [10] Ai J, Zhang R, Gao X, et al. Overexpression of microRNA-1 impairs cardiac contractile function by damaging sarcomere assembly [J]. Cardiovasc Res, 2012, 95 (3): 385-393. DOI: 10.1093/cvr/cvs196.
- [11] 苏彤,张晓璞,韩志君,等. 循环微小 RNA-1 对胸痛患者发生急性心肌梗死的早期诊断价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (7): 607-611. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.07.007.
Su T, Zhang XP, Han ZJ, et al. Early diagnostic value of circulating microRNA-1 on acute myocardial infarction in patients with chest pain [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (7): 607-611. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.07.007.
- [12] 黎立明,蔡文波,叶钦,等. 血浆 microRNA-1 与肌钙蛋白 T 在急性心肌梗死早期诊断中的比较 [J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22 (11): 1247-1251. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2013.11.010.
Li LM, Cai WB, Ye Q, et al. Comparison of early diagnostic value between plasma microRNA-1 and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction [J]. Chin J Emerg Med, 2013, 22 (11): 1247-1251. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2013.11.010.
- [13] 杨永丽,何静,肖志英. 微小 RNA-499 对脓毒症患者心肌损伤的诊断价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (3): 218-220. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.012.
Yang YL, He J, Xiao ZY. Value of Micro RNA-499 in prediction of myocardial damage in sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (3): 218-220. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.012.
- [14] 郑丽霞,李天时,李雪连. 微小 RNA 与糖尿病心肌病的相关性研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31 (19): 1977-1979. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2015.19.028.
Zheng LX, Li TS, Li XL. Progress of the relationship between microRNAs and diabetic cardiomyopathy [J]. Chin J of Clin Pharmacol, 2015, 31 (19): 1977-1979. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2015.19.028.
- [15] Tang M, Zhang W, Lin H, et al. High glucose promotes the production of collagen types I and III by cardiac fibroblasts through a pathway dependent on extracellular-signal-regulated kinase 1/2 [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 301 (1-2): 109-114. DOI: 10.1007/s11010-006-9401-6.
- [16] 张琳,周丽诺,沈稚舟,等. 成纤维细胞在糖尿病心肌纤维化病变中的作用 [J]. 复旦学报 (医学版), 2002, 29 (5): 399-402. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2002.05.020.
Zhang L, Zhou LN, Shen ZZ, et al. Effects of Myocardial Fibroblasts on Fibrosis in Diabetic Cardiomyopathy [J]. J Fudan Univ Med Sci, 2002, 29 (5): 399-402. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8467.2002.05.020.
- [17] 戴斌,崔猛,张宏. 高糖状态下心肌成纤维细胞 I、III 型胶原表达变化的观察 [J]. 重庆医学, 2013, 42 (15): 1724-1726. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.016.
Dai B, Cui M, Zhang H. Observation on expression change of type I and III collagen of cardiac fibroblasts under high glucose state [J]. Chongqing Med, 2013, 42 (15): 1724-1726. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.15.016.
- [18] Kanamori H, Takemura G, Goto K, et al. Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes [J]. Autophagy, 2015, 11 (7): 1146-1160. DOI: 10.1080/15548627.2015.1051295.
- [19] Zhai C, Tang G, Peng L, et al. Inhibition of microRNA-1 attenuates hypoxia/re-oxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes by directly targeting Bcl-2 but not GADD45Beta [J]. Am J Transl Res, 2015, 7 (10): 1952-1962.
- [20] Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852 (2): 252-261. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.05.020.

(收稿日期: 2016-08-29)

(本文编辑: 保健媛, 李银平)