

microRNA 在先天性心脏病继发性肺动脉高压肺组织内变化的实验研究

陈伟丹 花中东 杨克明 孟强 张浩 张瑛 潘湘斌 王德 李岩 李守军*

(北京协和医学院, 中国医学科学院阜外心血管病医院小儿心脏外科中心, 北京 100037)

摘要 近年来发现多种 miRNA 在心血管系统中发挥了极其重要的作用。应用 microRNA (miRNA) 芯片技术对 miRNA 在先天性心脏病相关肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH) 肺组织内的变化进行研究。收集室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)合并重度 PAH(PAH 组, $n=6$)和不伴 PAH 患者肺组织(对照组, $n=6$)。分别提取总 RNA, 然后采用 miRNA 芯片进行 miRNA 表达谱差异分析, 并对结果进行实时定量 PCR 验证。和对照组相比, PAH 组 miRNA 表达谱中共有 78 个差异表达位点, 其中有 62 个上调, 16 个下调。提示 miRNA 参与了先天性心脏病继发性肺动脉高压的调节作用, 可能成为预防和逆转 PAH 的新靶点。

关键词 肺动脉高压; microRNA; 先天性心脏病

肺动脉高压(PAH)是一类以肺血管平滑肌细胞异常增殖、血管重构、肺血管阻力进行性增加为特征的疾病, 是先天性心脏病最常见的和较严重的并发症, 如何预防和逆转肺动脉高压成为当前研究的热点。miRNA 是一类不具有蛋白编码功能, 约有 22 个核苷酸的高度保守的小片段非编码 RNA^[1]。在基因转录后调控基因的表达, 在器官和组织的生成、分化和细胞的增生和凋亡中发挥重要的作用^[2,3]。但对 miRNA 在先天性心脏病继发性肺动脉高压肺组织中的变化及 miRNA 对肺动脉高压发生、发展的调节作用尚无研究。本实验旨在通过 miRNA 芯片技术研究肺动脉高压肺组织中 miRNA 表达谱的差异, 为后续研究 miRNA 在 PAH 发生、发展机制中发挥的作用, 以 miRNA 为靶点预防和逆转 PAH 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

心脏畸形矫治术中测压导管直接测量肺动脉压力, 选择室间隔缺损伴重度肺动脉高压患者 6 例为 PAH 组(平均肺动脉压力 >45 mmHg), 室间隔缺损伴轻度肺动脉高压患者 6 例为对照组(平均肺动脉压力 <25 mmHg)。3 月龄以后小儿肺血管床的发育成熟与分支接近成人, 在所有肺组织标本中, 选择年龄为 1~7 岁, 并排除弥漫性肺大泡和其他心脏畸形的患者。

体外循环前在右肺中叶切取部分肺组织, 大小约 $1\text{cm} \times 0.5\text{cm}$, 迅速冻存于液氮中。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及质量检测 参照 TRIZOL 试剂(Invitrogen life technologies)说明书的步骤, 逐步提取两组肺组织标本的 RNA。应用紫外分光光度计测定总 RNA 的吸光度 A_{260} 值和 A_{280} 值, 用 A_{260} 值计算其浓度, 并计算 A_{260}/A_{280} 值检测其纯度, A_{260}/A_{280} 值范围在 1.8~2.1 可认为合格。

1.2.2 miRNA 芯片检测不同肺组织 miRNA 的表达 该实验采用丹麦 Exiqon 公司生产的 11.0 版 LNATM miRNA 芯片, 此芯片使用基于锁定核苷酸 TM(lock nucleic acids, LNA)专利技术的捕获探针, 该探针可以高灵敏、高特异性地与互补的靶 RNA 结合, 从而准确检测样品中 miRNA 的表达水平。每张 miRNA 芯片中包含有至少 1 807 个特异性探针、435 个 Exiqon 公司特有的 miRplusTM 探针, 以及对照探针和无探针的空白对照, 可以检测 Sanger miRBase 11.0 数据库中全部 miRNA (约 847 条)。每个探针在芯片内重复 4 次, 即每张芯片对同一样本重复检测 4 次。分别取 $5 \mu\text{g}$ 上述两组肺组织样本的总 RNA, 用 miRCURYTM Array Labelling Kit(Exiqon)标记 Hy3TM 荧光, 再用 RNeasy Mini Kit(Qiagen)浓缩标记样品, 最后用 miRCURYTM Array Microarray Kit (Exiqon)和

收稿日期: 2010-03-25 接受日期: 2010-07-07

国家“十一五”基金(No.2006BA101A08)资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-88398241, E-mail: drlishoujun@yahoo.com

Hybridization Buffer (Exiqon)进行miRNA芯片杂交,具体步骤按各试剂说明书进行;杂交后对芯片进行图像采集和定量,分别计算出两种样本中 miRNA 的标准值及两组之间标准值的比值。

1.2.3 实时定量PCR检测目的miRNA表达量 取 2 μg 上述两组肺组织样本的总 RNA 作为初始模板,总反应体系为 20 μl ,在 PCR 扩增仪 Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)上进行 RT 反应,反应条件为: 16 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 42 $^{\circ}\text{C}$, 42 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。将所有 cDNA 样品分别配置 Realtime PCR 反应体系。将混合液加到 384-PCR 板对应的每个孔中,再加入对应的 2 μl cDNA,小心粘上封口膜,并短暂离心混合,再将上述 384-PCR 板置于 Realtime PCR 仪上进行 PCR 反应,反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预热 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 40 个循环,收集荧光。为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后,按 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 99 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 并从 72 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢加热到 99 $^{\circ}\text{C}$ 的步骤进行。实验中所用引物均由 Invitrogen 公司合成(表 1)。所得数据用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析。

2 结果

2.1 两组肺组织病理检测

与对照组相比, PAH 组肺组织肺血管重构明显,血管平滑肌细胞增生显著,中膜明显增厚,具有肺动脉高压典型肺血管病变(图 1),所取肺组织均可反映肺动脉高压的病理改变。

2.2 总 RNA 的质量检测

紫外分光光度计检测结果表明,两组肺组织标本总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值均在 1.8 和 2.1 之间;凝胶电泳结果提示各样本的 18 S 和 28 S 条带均较清晰。表明来自 2 种不同类型肺组织标本的总 RNA 均有较好的质量,可以满足 miRNA 芯片检测和实时定量 PCR 的实验要求。

2.3 miRNA 芯片检测结果

芯片结果显示与对照组肺组织相比,重度肺动脉高压肺组织中表达上调超过 2 倍的 miRNA 有 62 个,表达下调超过 2 倍的 miRNA 有 12 个,表 1 中列举了表达差异超过 2 倍的 miRNA,其中与肺血管平滑肌细胞增殖相关的主要有 miR-130a、miR-27b、miR-18a 和 miR-19a,具体结果见表 2。

Table 1 Probe sequences for qRT-PCR

MiRNA	Bidirectional probe sequences	Annealing temperature($^{\circ}\text{C}$)	Size of product
U6	F: 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3' R: 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'	60	89
hsa-miR-130a	F: 5'-GGG GCA GTG CAA TGT TAA AA-3' R: 5'-GTG CGT GTC GTG GAG TCG-3'	60	64
hsa-miR-27b	F: 5'-GGG GTT CAC AGT GGC TAA G-3' R: 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'	60	65

F=forward; R=reverse.

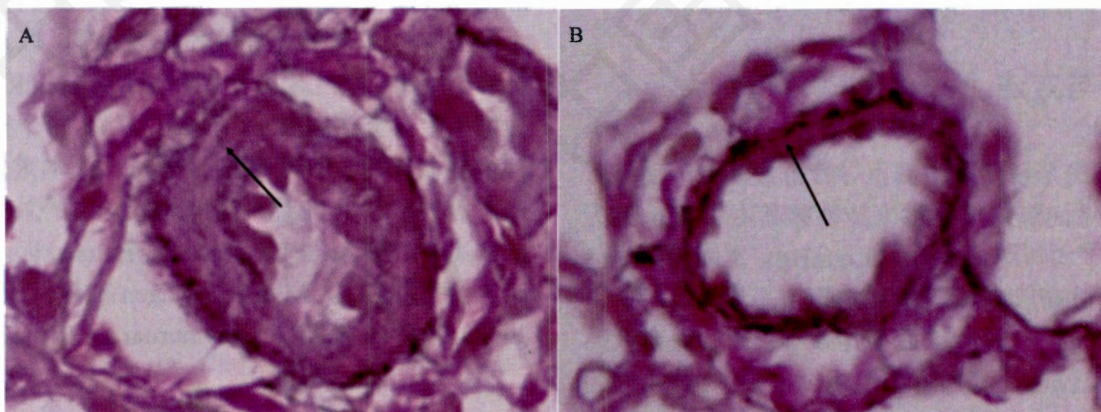


Fig.1 The result of pathology

Representative pulmonary artery is shown for each group (arrow). A: PAH group; B: control group.

Table 2 MiRNAs change >2-fold by microRNA array

MiRNA	Regulation	MiRNA	Regulation
hsa-miR-135a	↑	hsa-miR-576-5p	↑
hsa-miR-130a	↑	hsa-miR-138-2	↑
hsa-miR-299-3p	↑	hsa-miR-513a-3p	↑
hsa-miR-502-5p	↑	hsa-miR-27a	↑
hsa-miR-122	↑	hsa-miR-1287	↑
hsa-miR-208b	↑	hsa-miRPlus-F1240	↑
hsa-miR-212	↑	hsa-miR-183	↑
hsa-miR-1286	↑	kshv-miR-K12-2	↑
hsa-miR-548m	↑	hsa-miR-98	↑
hsa-miRPlus-F1027	↑	hsa-miR-487b	↑
hsa-miR-215	↑	hsa-miR-601	↑
hsa-miR-337-5p	↑	hsa-miR-377	↑
hsa-miR-767-5p	↑	hsa-miR-453	↑
hsa-miR-127-5p	↑	hsa-miRPlus-F1104	↑
hsa-miR-127-3p	↑	hsa-miRPlus-E1049	↑
hsa-miR-187	↑	hsa-miR-34b	↑
hsa-miRPlus-F1222	↑	hsa-miRPlus-C1100	↑
hsa-miR-1204	↑	hsa-miR-27b	↑
hsa-miR-140-5p	↑	hsa-miR-542-3p	↑
hsa-miR-132	↑	hsa-miR-125b-1	↑
hsa-miR-629	↑	hsa-miR-335	↑
hsa-miR-376c	↑	hsa-miRPlus-E1067	↓
hsa-miRPlus-E1027	↑	hsa-miR-654-5p	↓
hsa-miR-24-2	↑	hsa-miRPlus-E1175	↓
hsa-miR-1224-3p	↑	hsa-miR-147	↓
hsa-miR-136	↑	hsa-miR-92b	↓
hsa-miR-195	↑	hsa-miRPlus-F1088	↓
hsa-miR-33a	↑	hsa-miRPlus-E1071	↓
hsa-miR-18a	↑	hsa-miR-194	↓
hsa-miR-7-2	↑	hsa-miR-516a-3p/hsa-miR-516b	↓
hsa-miR-1201	↑	hsa-miRPlus-F1035	↓
hsa-miR-135b	↑	hsa-miRPlus-E1113	↓
hsa-miR-374a	↑	hsa-miR-518f	↓
hsa-miR-944	↑	hsa-miR-1276	↓
hsa-miRPlus-F1147	↑	hsa-miR-657	↓
hsa-miR-455-5p	↑	hsa-miR-492	↓
hsa-miR-937	↑	hsa-miR-302b	↓

2.4 实时定量 PCR 检测 miRNA 结果

因肺动脉高压是肺血管增殖性疾病, 以上述 miRNA 芯片检测的两组不同类型肺组织标本总 RNA 为模板, 实时定量 PCR 检测可能与血管生成相关的 miR-130a 和 miR-27b, 结果 miR-130a 和 miR-27b 分别平均上调 2.378 倍(1.137~2.862 倍)和 1.636 倍(1.053~4.008 倍)。可见实时定量 PCR 验证结果与 miRNA 芯片结果趋势一致(图 2)。

3 讨论

microRNA 是当前肿瘤疾病和心血管疾病研究的

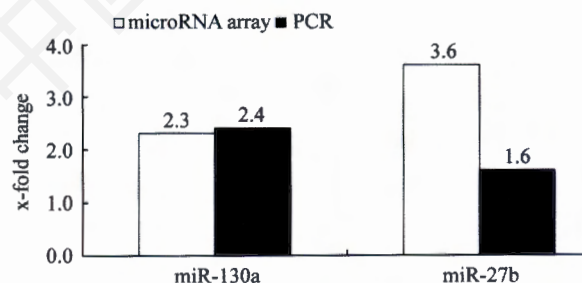


Fig.2 Comparison of miR-130a and miR-27b expression detected by microRNA array and qRT-PCR

热点, 已经成为肿瘤诊断、分级和治疗的有效工

具。对于先天性心脏病继发性肺动脉高压肺组织 miRNA 表达研究国内外尚无报道, 本研究首次报道了先天性心脏病继发性肺动脉高压肺组织 miRNA 表达差异。

本实验研究在排除年龄和其他疾病的影响下, 通过 microRNA 芯片和实时定量 PCR 检测验证发现: 与不伴肺动脉高压肺组织相比, 重度肺动脉高压肺组织中有 78 种 miRNA 表达具有显著差异, 其中 62 种表达明显上调, 如 miR-135a、miR-130a、miR-27b、miR-299a-3p、miR-502-5p、miR-132 等; 16 种表达明显下调, 如 miRPlus-E1067、miR-654-5p、miRPlus-E1175、miR-147、miR-92b 等, 其中 miR-130a、miR-27b、miR-19a、miR-18a 等已有文献报道其在促进血管生成过程中起到重要的作用^[4-6]。

肺动脉高压是血管增殖性疾病^[7], 与血管生成相关的 miRNA 可能在肺动脉高压血管重构中发挥重要的作用。故应用实时定量 PCR 检验具有促进血管生成作用的 miR-130a 和 miR-27b 的表达量, 结果 miR-130a、miR-27b 和 microRNA 芯片结果趋势一致。其中 miR-130a 可通过下调具有抗血管生成作用的同源盒基因 GAX 和 HOXA5 表达, 促进血管生成^[4]。而 miR-27b 可靶向作用于血管生成基因促进血管生成, 表达异常时可影响血管再生^[5]。此外, 上调的 miRNA 中尚有多种与肿瘤细胞异常增殖密切相关。

以往研究认为 let-7f、miR-378、miR-210 具有促进血管生成、诱导平滑肌细胞增生的作用^[5,8,9], 而 miR-21、miR-126、miR-221、miR-222、miR-15、miR-16、miR-20a 和 miR-20b 具有抑制平滑肌细胞增殖, 促进其凋亡的作用^[10-14]。但本实验未发现这些 microRNA 与肺动脉高压具有相关性。

以上研究结果表明, microRNA 与肺动脉高压的发生发展具有密切相关性, microRNA 可能参与肺动脉高压肺血管重构, 对肺血管平滑肌细胞异常增殖具有重要调节作用, 其机制还需进一步研究。通过深入研究 microRNA 参与肺动脉高压形成和发展的分子生物学机制, 我们将为肺动脉高压的预防和逆转找到新的有效治疗靶点。

参考文献(References)

- 1 Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005;132(21): 4645-52.
- 2 Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132(21): 4653-62.
- 3 Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biol Chem* 2008; 389(3): 305-12.
- 4 Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* 2008; 111(3): 1217-26.
- 5 Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 2007; 101(1): 59-68.
- 6 Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Fischler M, *et al.* Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res* 2009; 104(10): 1184-91.
- 7 Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2008; 118(7): 2372-9.
- 8 Lee DY, Deng Z, Wang CH, Yang BB. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(51): 20350-5.
- 9 Fasanaro P, D'Alessandra Y, di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, *et al.* MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* 2008; 283(23): 15878-83.
- 10 Lin Y, Liu X, Cheng Y, Yang J, Huo Y, Zhang C. Involvement of MicroRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2009; 284(12): 7903-13.
- 11 Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2009; 104(4): 476-87.
- 12 Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(5): 1516-21.
- 13 Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, *et al.* MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One* 2006; 1: e116.
- 14 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(39): 13944-9.

Analysis of microRNA Expression Patterns in Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Congenital Heart Disease

Wei-Dan Chen, Zhong-Dong Hua, Ke-Ming Yang, Qiang Meng, Hao Zhang, Ying Zhang,
Xiang-bin Pan, De Wang, Yan Li, Shou-Jun Li*

(*Pediatric Cardiac Surgery Center, Fuwai Cardiovascular Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences,
Peking Union Medical College, Beijing 100037, China*)

Abstract It has been found that several miRNAs play a great role in cardiovascular system recently. To investigate the expression pattern of microRNA (miRNA) in pulmonary arterial hypertension (PAH) associated with congenital heart disease (CHD) by miRNA array, lung tissues were collected from patients with severe PAH due to ventricular septal defect (VSD) (PAH group, $n=6$) and patients with VSD but without PAH (control group, $n=6$). Total RNA was extracted from tissues collected and the different expression of miRNA was detected by miRNA array and also verified using real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Among 1 468 target miRNAs, 78 miRNAs showed different expression levels, 62 miRNAs were up-regulated and 16 miRNAs were down-regulated. In conclusion, miRNA may become a new target of PAH reversing and preventing drug since it is involved in the development of PAH associated with CHD.

Key words pulmonary arterial hypertension; microRNA; congenital heart disease

Received: March 25, 2010 Accepted: July 7, 2010

This work was supported by the Government Foundation from National Eleventh Five-Year Project(No.2006BAI01A08)

*Corresponding author. Tel: 86-10-88398241, E-mail: drlishoujun@yahoo.com