

杨赟,王智强,王蕴红. 急性运动对大鼠心肌 miRNA-30a 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 76-79.
Yang Y, Wang ZQ, Wang YH. Expression of miRNA-30a in rat myocardium induced by acute exercise [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 76-79.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 07. 012

急性运动对大鼠心肌 miRNA-30a 表达的影响

杨 赟¹, 王智强^{2*}, 王蕴红²

(1.首都体育学院 研究生部,北京 100191; 2.首都体育学院 运动科学与健康学院,北京 100191)

【摘要】 目的 研究急性运动对大鼠心肌 miRNA-30a 及其对自噬相关基因表达的影响,探讨 miRNA-30a 对运动后不同恢复时期心肌自噬活性的调控机制。**方法** SD 大鼠随机分为安静对照组(Con),运动后 0 h 组(E0),运动后 3 h 组(E3)和运动后 12 h 组(E12)。急性运动后按不同时间点取材。使用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测左心室肌中 ACE mRNA、miRNA-30a、Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达量。**结果** 与安静对照组相比,运动后 0 h 组左心室肌中 ACE mRNA 和 miRNA-30a 表达显著性升高($P < 0.05$),Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达也显著提高($P < 0.05$),在运动后 3 h 均恢复到安静水平。**结论** 急性运动可以显著提高心肌 ACE mRNA、miRNA-30a、Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达,这种一过性升高可能是由运动应激导致的。

【关键词】 运动;心肌;自噬;miRNA-30a;SD 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 07-0076-04

Expression of miRNA-30a in rat myocardium induced by acute exercise

YANG Yun¹, WANG Zhiqiang^{2*}, WANG Yunhong²

(1. Department of Postgraduates, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191, China.

2. School of Sport Science and Health, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191)

【Abstract】 Objective To study the influence of acute exercise on rat myocardial microRNA-30a and autophagy-related gene expression, and investigate the possible mechanism through which microRNA-30a regulates myocardial autophagy during different recovery periods after exercise. **Methods** SD rats were randomly divided into a control group (Con), a 0 h after exercise group (E0), a 3 h after exercise group (E3), and a 12 h after exercise group (E12). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the expression of ACE mRNA, microRNA-30a, Beclin-1 mRNA, and LC3 mRNA in the left ventricular myocardium. **Results** Compared with the control group, in the E0 group, ACE mRNA and microRNA-30a gene expression in the left ventricular muscle was significantly increased ($P < 0.05$), and Beclin-1 mRNA and LC3 mRNA expression also significantly increased ($P < 0.05$). This was recovered to resting state approximately 3 h after exercise. **Conclusions** Acute exercise can significantly improve myocardial ACE mRNA, microRNA-30a, Beclin-1 mRNA and LC3 mRNA expression. This transient increase may be caused by exercise-induced stress.

【Keywords】 exercise; myocardial; autophagy; microRNA-30a; SD rat

miRNAs 是内源性非编码单链 RNA,它通过降解目的 mRNA 或抑制其翻译,调节目的基因表达,进而影响细胞的功能^[1]。研究显示,miRNAs 参与了心脏发育、血管生成、心肌肥大、心力衰竭、再灌注损伤等生理病理过程的调节,且可能是关键性的

调控因子之一^[2-3]。miRNA-30 是 miRNAs 中的一种,包含 miRNA-30a、b、c、d、e。在心肌组织中 miRNA-30a 有较高表达^[4],它对自噬相关基因的表达起重要的调控作用。有研究表明,IncRNA AK088388 是长链非编码 RNA 的一种,它作为内源

[基金项目]北京市学科建设项目分子生物学研究平台(15516014)。

[作者简介]杨赟(1990—),男,硕士生,研究方向:心脏功能和能量代谢。E-mail: 674886563@qq.com

[通信作者]王智强(1976—),男,实验师,研究方向:运动分子生物学。E-mail: wangzhiqiang7020@cupes.edu.cn

性 RNA 能够通过竞争性结合 miRNA-30a 提高 Beclin-1 和 LC3 的表达,进而调控心肌细胞自噬水平^[5]。也有研究表明当 miRNA-30a 表达升高时, Beclin-1 mRNA 表达受到抑制。进一步研究发现,在 Ang II 诱导的心肌肥大模型中,miRNA-30a 的表达受到抑制,而 Beclin-1 mRNA 表达提高,自噬加强^[6]。提示在心肌存在着 Ang II 对 miRNA-30a 表达的调控,进而对心肌自噬产生调控的机制。而在运动模型的研究中发现,运动应激也可诱发心肌 Ang II 表达升高^[7]和心肌自噬水平的变化。因此我们推测,在急性运动中,伴随运动心肌的适应性变化,运动心肌 miRNA-30a 的表达也可能发生变化,且可能通过 AngII 对 miRNA-30a 的作用,影响心肌的自噬过程。所以我们通过建立大鼠一次急性运动模型,测定急性运动后不同时间心肌 miRNA-30a 以及自噬相关指标的表达变化,探讨在急性运动应激状态下运动心肌 miRNA-30a 的表达规律及其对自噬的调控机制,为进一步研究运动应激对该信号通路的调控作用进行初步探究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 24 只,体重 240~270 g,由维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK(京)2016-0011]。所有大鼠在北京体育大学动物房内饲养和训练 [SYXK(京)2016-0033],所有大鼠自由饮食,室温为 (22±20℃,空气湿度为 45%~55%,昼夜明暗交替时间 12 h,分笼饲养,每笼 5 只。本研究所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号: IACUC2016033),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

miRNA-30a-3p 和 miRNA-30a-5p 引物试剂盒由 Thermo Fisher 提供,试剂和引物货号如下: MirVana™ RNA 抽提试剂盒, REF: AM1556、TaqMan™ MicroRNA 反转录试剂盒, REF: 4366596 (has-miR-30a-3p, Assay ID: 000416、has-miR-30a-5p, Assay ID: 000417、U6 snRNA, Assay ID: 001973)、TaqMan™ Universal Master Mix II 预混液, REF: 4440038、SuperScript™ III 第一链合成系统, REF: 18080051、SYBR™ Select Master Mix 预混液, REF: 4472908。

六跑道动物实验跑台(ZS-PT-III型,中国);梯度 PCR 仪(Mastercycler Nexus,德国 Eppendorf);实时荧

光定量 PCR 系统(7500Fast,美国 ABI)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

所有大鼠适应性饲养 7 d 后随机分为安静对照组(Con),运动后 0 h 组(E0),运动后 3 h 组(E3)和运动后 12 h 组(E12),每组 6 只。急性运动方案:跑台坡度为 16°,速度 16 m/min,运动时间为 1 h。运动组运动后按时间点取材,安静组同时取材。左心室肌组织用预冷的 DEPC 水处理后投入液氮速冻,-80℃ 保存。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应

Ambion 试剂盒抽提心肌细胞总 RNA,通过 Bulge-Loop™ RT Primer 反转录,采用 TaqMan 荧光探针法进行 qRT-PCR 检测 miRNA-30a-3p、miRNA-30a-5p,U6 为内参照。20 μL 反应体系包括:2× PCR mix 10 μL、20×引物 1 μL、cDNA 1.5 μL 和 7.5 μL DEPC 水。实时定量反应:预变性 50℃ 2min,95℃ 10 min。95℃ 15 s,60℃ 60 s,45 个循环。常规 Trizol 方法抽提心肌细胞总 RNA,用 Bulge-Loop™ RT Primer 反转录,采用 SYBR Green 进行常规 qRT-PCR,检测心肌血管转化酶(ACE)、Beclin-1 和 LC3,GAPDH 为内参照,各引物序列见表 1。反应体系包括 2× SYBR 6 μL、Rox 0.2 μL、cDNA 1.5 μL、10 μmol/L P1+P2 1 μL、DEPC 水 6 μL。反应参数:95℃ 30 s,95℃ 3 s、60℃ 30 s,45 个循环,95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s。实验重复三次,3p、5p、U6、Beclin-1、LC3 和 GAPDH 产物倍数按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

表 1 引物和内参序列

Table 1 Primer and internal reference sequences	
引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequences
Acef	CCATATGCCGACCAAAGCAT
Acer	TTTCGTTGTCGGTCCATTCA
Beclin-1f	CCCCTGTGTGAGGAATGCA
Beclin-1r	GTCGCCCTCATTCATTGCT
Lc3f	TGCCCTCCGAGAAGACCTT
Lc3r	GATGAGCCGGACATCTTCCA
GAPDHr	ACTCCCACTCTTCCACCTTC
GAPDHF	TCTTGCTCAGTGTCTTGC

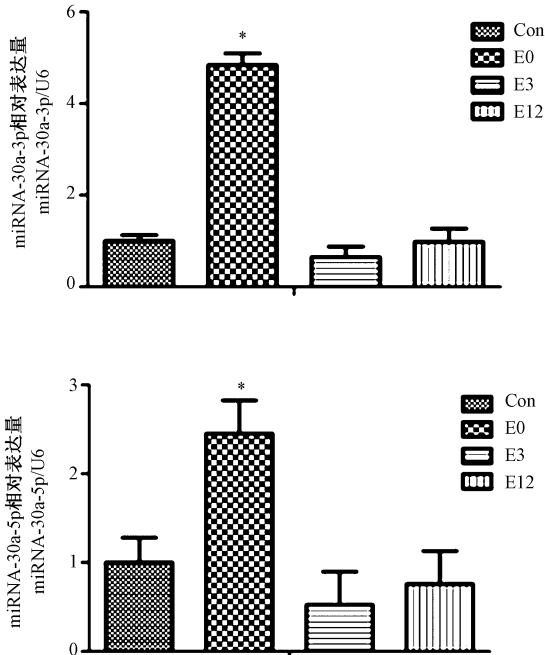
1.4 统计学方法

数据输入 SPSS 23.0 统计软件,采用双因素方差分析统计方法分析数据,所有数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 LSD 进行 post-hoc test, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 运动后不同时间大鼠心肌 miR-30a 表达

与安静对照组相比,运动后 0 h 组心肌 miRNA-30a-3p 和 miRNA-30a-5p 表达都显著性增高 ($P < 0.05$),运动后 3 h 组和 12 h 组与安静组相比没有显著性差异(见图 1)。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

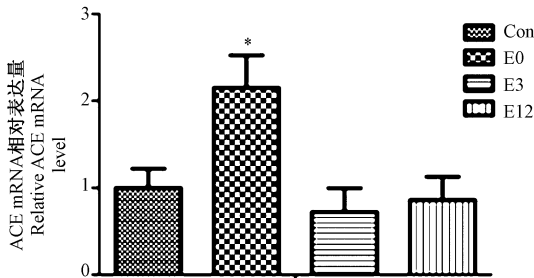
图 1 运动后大鼠心肌 miRNA-30a 表达

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Post-exercise myocardial miRNA-30a-3p and miRNA-30a-5p expression in the rats

2.2 运动后不同时间大鼠心肌 ACE mRNA 表达

与安静对照组相比,运动后 0 h 组心肌 ACE mRNA 表达显著性增高 ($P < 0.05$),运动后 3 h 组和 12 h 组与安静组相比没有显著性差异(见图 2)。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

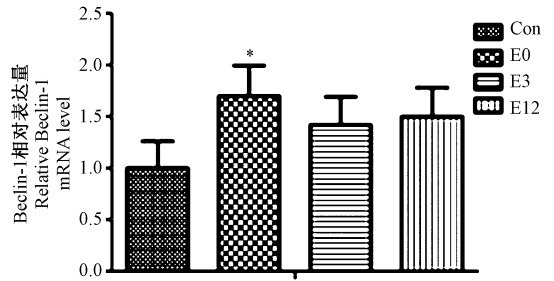
图 2 运动后大鼠心肌 ACE mRNA 表达

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Post-exercise myocardial ACE mRNA expression in the rats

2.3 运动后不同时间大鼠心肌 Beclin-1 mRNA 的表达

与安静对照组相比,运动后 0 h 组心肌 Beclin-1 mRNA 的表达显著性提高 ($P < 0.05$),在运动后 3 h 逐渐恢复到安静状态(见图 3)。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

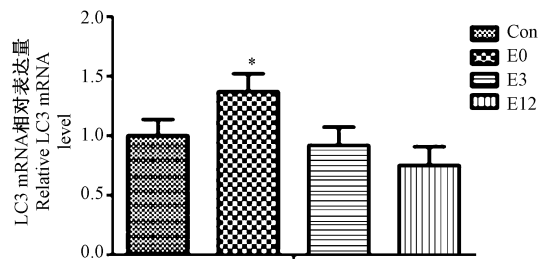
图 3 运动后不同时间大鼠心肌 Beclin-1 mRNA 表达

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Post-exercise myocardial Beclin-1 mRNA expression in the rats

2.4 运动后不同时间大鼠心肌 LC3 mRNA 的表达

与安静对照组相比,运动后 0 h 组心肌 LC3 mRNA 的表达均显著性提高 ($P < 0.05$),在运动后 3 h 逐渐恢复到安静状态(见图 4)。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 运动后大鼠心肌 LC3 mRNA 的表达

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Post-exercise myocardial LC3 mRNA expression in the rats

3 讨论

成熟的心肌细胞是终末分化的细胞,因此,其细胞器和蛋白质质量的维持,对实现心肌细胞的正常功能起重要的作用。自噬是细胞溶酶体降解受损、衰老细胞器和蛋白质等内源性底物的重要过程。在心肌重塑过程中,适宜的自噬是对刺激因素适应和自我保护的反应,但过度自噬则可能导致心肌细胞凋亡^[8]。

研究显示,血管紧张素II(AngII)参与了心肌重塑过程,而用黄芪多糖可有效抑制血管紧张素II诱导的心肌细胞肥大^[9]。在血管紧张素II诱导的心肌肥厚模型中,Beclin-1 和 LC3 在基因和蛋白水平表达均明显

提高,并且当 Beclin-1 mRNA 过度表达时,与心肌肥厚有关基因表达也增强;而缄默 Beclin-1 基因,则引起与心肌肥厚有关基因表达下调,提示血管紧张素 II 参与了 Beclin-1 mRNA 表达的调控过程^[6]。在大鼠急性力竭运动模型中发现运动后心肌局部 AngII 的含量降低了 43%,血浆 AngII 的含量增加了 83%^[10]。也有研究发现,长期游泳训练造成的心肌肥大大鼠,心肌局部 AngII 含量显著升高^[7]。提示运动诱发心肌 AngII 释放可能与心肌 Beclin-1 mRNA 表达升高有密切关系。本研究进一步显示,急性运动后心肌 ACE mRNA 显著性升高,由于 ACE 是血管紧张素转化酶,编码的蛋白可以将血管紧张素 I 转化为具有调节血管张力和血管平滑肌增生的血管紧张素 II^[11]。推测运动后心肌 ACE mRNA 表达升高与运动心肌 AngII 的更新变化有关。

已有研究表明,急性运动也可提高心肌自噬水平,使 Beclin-1 和 LC3 蛋白表达升高^[12]。本研究发现,一次力竭运动后即刻心肌 Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 的表达显著升高,进一步表明急性运动可以促进心肌自噬相关基因表达提高,导致了 Beclin-1 和 LC3 II 蛋白表达的提高。

miRNA-30a 由 Drosha 和 Dicer 两种 RNA 酶加工形成。Drosha 酶将原始长链转录本加工成含有 60-70 个碱基的颈环结构前体(包括相反的两个臂“-3p”和“-5p”)然后由 Dicer 酶将其剪切成为成熟的 miRNAs^[13-14]。由于 Beclin-1 是 miRNA-30a 的靶基因,miRNA-30a 可以与 Beclin-1 的 3' UTR 结合来调控该基因^[13]。miRNA-30a 拟似剂处理心肌细胞后,Beclin-1 mRNA 的表达下调,而用 miRNA-30a 抑制剂处理时,Beclin-1 mRNA 表达上调。进一步研究发现,心肌细胞转入 miRNA-30a 抑制剂损害 miRNA-30a 的功能时,能够引起心肌肥厚相关的基因表达上调^[7],这些结果提示,miRNA-30a 介导了 Ang II 诱导的心肌肥厚和自噬的过程。为此,我们测定了运动心肌 miR-30a“-3p”和“-5p”表达的变化。结果进一步显示,运动应激也能够诱发 miRNA-30a、Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达,同时诱发 ACE mRNA 表达的同时升高,提示在运动心肌中,Ang II 对 Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达发挥调控作用。在急性运动中能够同时诱发正、负调控自噬相关基因的表达提高,而且这种暂时转录水平的升高只发生在运动后即刻,而我们和其他研究者研究显示,急性运动可引起 Beclin-1 蛋白表达的升高,提示这种运动应激引起 miRNA-30a 表达的升高,对

于翻译水平的调控不起决定性的作用。

综上所述,本实验结果表明急性运动应激可以一过性的提高心肌 ACE mRNA、miRNA-30a、Beclin-1 mRNA 和 LC3 mRNA 表达,推测运动应激诱发 miRNA-30a 对心肌 Beclin-1 mRNA 表达的调控作用可能是一过性的,具体调控情况还需要通过药物干预或基因阻断模型进一步证实。

参考文献:

- [1] Chen Y, Fu LL, Wen X, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy [J]. *Apoptosis*, 2014, 19(8): 1177-1189.
- [2] Small EM, Frost RJ, Olson EN. microRNAs add a new dimension to cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2010, 121(8): 1022-1032.
- [3] Condorelli G, Latronico MV, Dorn GW, et al. microRNAs in heart disease: Putative novel therapeutic targets? [J]. *Eur Heart*, 2010, 31(6): 649-658.
- [4] Ikeda S, Kong SW, Lu J, et al. Altered microRNA expression in human heart disease [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 9(31): 367-373.
- [5] 王竞靖,何儒华,王学忠,等. lncRNA AK088388 通过 miR-30a 调控细胞自噬促进心肌细胞损伤 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2018, 40(11): 1274-1278, 1283.
- [6] Pan W, Zhong Y. miRNA-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53950.
- [7] 李维根,高云秋,张继峰,等. 血管紧张素 II 在运动性心肌肥大中的作用 [J]. *中国运动医学杂志*, 1994(3): 133-135.
- [8] 马晓雯,常芸,王世强,等. 不同强度不同时间耐力训练对大鼠心肌细胞自噬发生程度的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 1(1): 237-239.
- [9] 李琴,李言,高珊珊,等. 黄芪多糖抑制血管紧张素 II 诱导心肌肥大的作用途径 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(19): 3086-3091.
- [10] 李维根,刘晓明,高云秋,等. 大鼠极量运动后心肌血管紧张素 II 的变化 [J]. *中国运动医学杂志*, 1994(1): 11-12, 63-64.
- [11] 李欣,潘珊珊. 局部血管紧张素 II 及其受体对运动心脏的影响 [J]. *上海体育学院学报*, 2005(2): 39-43.
- [12] Li H, Miao W, Ma J, et al. Acute excise-induce mitochondrial stress triggers an inflammatory response in the myocardium via NLRP3 inflammasome activation with mitophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 1987149.
- [13] Neerinx M, Sie DL, Dekker H, et al. miRNA expression profiles of paired primary colorectal cancer and metastases by next-generation sequencing [J]. *Oncogenesis*, 2015, 4(10): e170.
- [14] Kroesen BJ, Teteloshvili N, Brouwer E, et al. Immuno-miRNAs: Critical regulators of T-cell development, function and ageing [J]. *Immunology*, 2015, 144(1): 1-10.