

低硒大鼠心肌组织中微小 RNA 的差异表达研究

高登峰^{1,2}, 冯雁京², 邢玉洁², 牛小麟^{1,2}

【摘要】 **目的** 筛选低硒大鼠心肌组织中差异表达的微小 RNA (miRNA), 为克山病的发病机制研究提供参考。**方法** 采用随机数字表法将 30 只清洁级 SD 大鼠分为对照组、低硒组、补硒组, 每组 10 只。对照组大鼠给予 AIN-93 标准饲料喂养, 低硒组及补硒组大鼠均给予 AIN-93 M (低硒) 饲料喂养; 3 组大鼠均喂养 14 周。之后补硒组大鼠给予亚硒酸钠溶液灌胃, 对照组和低硒组大鼠则给予相同剂量蒸馏水灌胃; 3 组大鼠均连续灌胃 3 周。入组 17 周后留取 3 组大鼠外周血检测血清硒及血浆脑钠肽 (BNP) 水平; 采用基因芯片测序筛选差异表达的 miRNA, 并行聚类分析及靶基因功能显著性分析; 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测差异表达显著的 miRNA 表达情况。**结果** (1) 低硒组和补硒组大鼠血清硒水平低于对照组, 血浆 BNP 水平高于对照组 ($P<0.05$); 低硒组大鼠血清硒水平低于补硒组, 血浆 BNP 水平高于补硒组 ($P<0.05$)。 (2) 基因芯片测序结果显示, 有 40 个 miRNA 为硒敏感性 miRNA。 (3) 基因本体 (GO) 功能富集分析结果显示, 上述 40 个差异表达 miRNA 靶基因功能主要富集于脂代谢、心脏发育、细胞黏附、血管发育、轴突导向、细胞迁移调控、输尿管芽发育、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、细胞分化、有机氯化物反应、棕色脂肪分化、髓系祖细胞分化、细胞-基质黏附、细胞增殖调控、生物钟节律。靶基因投射的 13 条信号转导通路为肾细胞癌、转录调节、多巴胺能突触、焦点黏附、Rap 信号通路、脂代谢、PPAR 信号通路、Ras 信号通路、Oxytocin 信号通路、长期抑制、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、HTLV-1 感染。 (4) 以表达最显著的 8 种 miRNA 作为验证基因, 以对照组心肌组织 miRNA 为参照, 补硒组大鼠心肌组织 miRNA-374、miRNA-16、miRNA-199a-5p、miRNA-195、miRNA-30e* 相对表达量低于低硒组, 心肌组织 miRNA-3571、miRNA-675、miRNA-450a* 相对表达量高于低硒组 ($P<0.05$)。**结论** 低硒会导致大鼠心功能损伤, 低硒大鼠心肌组织中存在多个差异表达的 miRNA, 主要涉及 15 种生物学功能和 13 条信号转导通路, 这些差异表达的 miRNA 可能参与克山病的发生发展。

【关键词】 硒; 克山病; 微小 RNA; 大鼠

【中图分类号】 R 916.3 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2018.08.011

高登峰, 冯雁京, 邢玉洁, 等. 低硒大鼠心肌组织中微小 RNA 的差异表达研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2018, 26 (8): 48-52. [www.syxnf.net]

GAO D F, FENG Y J, XING Y J, et al. Differential expression of miRNA in myocardial tissue in rats with low selenium [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2018, 26 (8): 48-52.

Differential Expression of miRNA in Myocardial Tissue in Rats with Low Selenium GAO Deng-feng^{1,2}, FENG Yan-jing², XING Yu-jie², NIU Xiao-lin^{1,2}

1. Meishan Cardiovascular and Cerebrovascular Hospital of the Third Affiliated Hospital, Medical College of Yan'an University, Meishan 620000, China

2. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710000, China

Corresponding author: NIU Xiao-lin, E-mail: niuxl@mail.xjtu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To screen miRNA with differential expression in myocardial tissue in rats with low selenium, in order to provide a reference for study on pathogenesis of Keshan disease. **Methods** A total of 30 clean SD rats were divided into control group, low-selenium group and selenium supplement group according to random number table, each of 10 rats. Rats in control group fed with AIN-93 standard feed for 14 weeks, rats in low-selenium group and selenium supplement group fed with AIN-93 M (low selenium) feed for 14 weeks; then rats in selenium supplement group received gavage of sodium selenite solution for 3 weeks, while rats in control group and low-selenium group receive gavage of distilled water for 3 weeks. After 17 weeks of entering the group, serum selenium level and plasma BNP level were detected; gene chip sequencing method was used to screen miRNA with differential expression, clustering analysis and target gene function significant analysis were used too;

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972557)

1.620000 四川省眉山市, 延安大学医学院第三附属医院眉山心脑血管病医院 2.710000 陕西省西安市, 西安交通大学第二附属医院心内科

通信作者: 牛小麟, E-mail: niuxl@mail.xjtu.edu.cn

real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of miRNA with significant differential expression.

Results (1) Serum selenium level in low-selenium group and selenium supplement group was statistically significantly lower than that in control group, respectively, while plasma BNP level in low-selenium group and selenium supplement group was statistically significantly higher than that in control group, respectively ($P<0.05$); serum selenium level in low-selenium group was statistically significantly lower than that in selenium supplement group, while plasma BNP level in low-selenium group was statistically significantly higher than that in selenium supplement group ($P<0.05$). (2) Gene chip sequencing method found 40 miRNA with sensitivity of selenium. (3) Gene ontology functional enrichment analysis results showed that, target gene function of above the 40 miRNA with sensitivity of selenium mainly enriched in lipid metabolism, heart development, cell adhesion, vascular development, axon guidance, regulation of cell migration, development of ureteral buds, transmembrane receptor protein tyrosine kinase signal pathway, cell differentiation, organic nitride reactions, brown fat differentiation, myeloid progenitor cells differentiation, cell-matrix adhesion, regulation of cell proliferation and biological clock rhythm; target gene projected 13 signal transduction pathways included renal cell carcinoma, transcription regulation, dopaminergic synapses, focal adhesion, Rap signal pathway, lipid metabolism, PPAR signal pathway, Ras signal pathway, Oxytocin signal pathway, long-term inhibition PI3K-Akt signal pathway, MAPK signal pathway and HTLV-1 infection. (4) Taking 8 miRNA with the most significant differential expression as validation gene, taking miRNA in myocardial tissue in control group as reference, the real-time fluorescence quantitative PCR results showed that, relative expression quantity of miRNA-374, miRNA-16, miRNA-199a-5p, miRNA-195 and miRNA-30e* in myocardial tissue in selenium supplement group was statistically significantly lower than that in low-selenium group, respectively, while relative expression quantity of miRNA-3571, miRNA-675 and miRNA-450a* in myocardial tissue in selenium supplement group was statistically significantly higher than that in low-selenium group, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** Low selenium may lead to cardiac function damage in rats, many miRNA with differential expression exist in myocardial tissue in rats with low selenium, mainly refer to 15 biological function and 13 signal transduction pathways, so miRNA with differential expression may play an important role in the occurrence and development of Keshan disease.

【Key words】 Selenium; Keshan disease; MicroRNA; Rats

克山病是一种原因未明的地方性心肌病,曾多次暴发流行,病死率较高^[1]。硒是一种与人类健康息息相关的微量元素,与多种心血管疾病的发生、发展有关^[2]。目前研究认为体内硒缺乏是克山病的重要发病原因之一,体内硒水平较低会引起左心室收缩功能下降,最终导致心力衰竭,但低硒与心功能不全的关系及具体机制尚不清楚^[3-5]。近年研究发现,微小RNA(miRNA)在心脏发育及心脏病发生发展过程中发挥着重要作用,其已成为心血管疾病研究领域的热点^[6-7]。但低硒所致克山病是否存在miRNA异常表达尚不清楚。本研究拟给予低硒饲料制备低硒大鼠模型,并分析心肌组织中miRNA的差异表达,为克山病的发病机制研究及防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30只清洁级SD大鼠购自西安交通大学动物中心,3周龄,平均体质量(75 ± 10)g;按照随机数字表法将大鼠分为对照组、低硒组、补硒组,每组10只。

1.2 方法 对照组大鼠给予AIN-93标准饲料(西安交通大学动物中心提供)喂养,低硒组及补硒组大鼠均给予AIN-93 M(低硒)饲料(西安交通大学动物中心提供)喂养;3组大鼠均喂养14周。之后补硒组大鼠给予亚硒酸钠溶液(南京通盈生物科技有限公司生产)

0.05 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,对照组和低硒组大鼠则给予相同剂量蒸馏水灌胃;3组大鼠均连续灌胃3周。入组17周后腹腔内注射10%水合氯醛0.03 ml/100 g,麻醉满意后处死3组大鼠,腹主动脉留取全血,采用2,3-二氨基萘荧光法检测血清硒水平;采用Triage脑钠肽(BNP)快速检测试验检测血浆BNP水平。

1.3 HE染色 留取3组大鼠部分心肌组织标本,采用4%多聚甲醛固定24 h,石蜡包埋切片,厚度10 μm/片,之后按照HE标准流程进行染色,光镜下观察心肌组织形态学结构。

1.4 基因芯片测序 留取3组大鼠剩余心脏组织并迅速投入液氮20~30 s,置于-80℃环境下冻存,采用TRIzol试剂(Invitrogen公司生产)和Qiagen miRNeasy Mini Kit提取总RNA,使用NanoDrop 1000超微量分光光度计检测RNA质量及数量,并通过凝胶电泳确定RNA完整性。采用miRCURY™ Hy3™/Hy5™标记试剂盒(Exiqon, Vedbaek, Denmark)对miRNA进行标记,根据阵列说明书在miRCURY™ TMLNA阵列(v.16.0)上对Hy3™标记的样品进行杂交。采用洗涤缓冲液试剂盒(Exiqon)洗涤,400 r/min离心5 min,最后干燥。采用AXON GenePix 4000B生物芯片扫描仪扫描切片,采用Significant Analysis of Microarrays (SAM) v4.0软件挑选差异表达基因,差异表达基因筛选标准:错误发现率

(FDR) $\leq 5\%$, Fold change > 2 倍。miRNA 表达的聚类分析采用每张芯片平均值归一化后的数据, 采用 Cluster 3.0 软件进行聚类分析。

1.5 靶基因功能的显著性分析 采用 miRNA 生物信息学分析软件 Targetscan 和 miRanda 对芯片检测的差异表达 miRNA 进行靶基因预测, 选择两种软件交集的靶基因。基于基因本体 (gene ontology, GO) 数据库, 应用 DAVID 软件根据靶基因的功能富集程度进行 GO 显著性分析; 基于 KEGG 数据库, 应用 DAVID 软件根据靶基因在信号通路中的富集程度进行 Pathway 显著性分析。

1.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 选取差异表达显著的 miRNA 作为验证基因, 设计 miRNA 特异性反反录引物和 PCR 引物。取 500 ng 总 RNA, 利用 miRNA 特异性反转录引物和 oligo-dT16 在反转录酶作用下反转录合成 cDNA。以 U6 为内参, 在冰上按照实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ II 说明书进行反应体系配制。反应体系为 20 μ l: 试剂盒中 SYBR Premix Ex Taq 10 μ l, cDNA 模板, 引物 0.4 μ mol/L, 并使用 RNase Free H₂O 溶解至 20 μ l。95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 变性 95 $^{\circ}$ C 10 s、退火 67 $^{\circ}$ C 30 s、延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miRNA 相对表达量。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, 两组间比较采用两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清硒和血浆 BNP 水平 3 组大鼠血清硒和血浆 BNP 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 低硒组和补硒组大鼠血清硒水平低于对照组, 血浆 BNP 水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 低硒组大鼠血清硒水平低于补硒组, 血浆 BNP 水平高于补硒组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表 1)。

2.2 HE 染色结果 对照组大鼠心肌组织结构清晰, 闰盘连接结构良好, 肌丝排列、肌走行均正常 (见图 1A)。低硒组大鼠肌纤维肿胀、排列紊乱 (见图 1B), 心肌细胞坏死、细胞核固缩 (见图 1C), 部分肌纤维断续 (见图 1D), 部分地方可见小的心肌坏死灶, 且坏死灶周围伴有炎性浸润 (见图 1E)。补硒组大鼠心肌纤维较对照组轻度肿胀, 但肌纤维排列基本整齐有序 (见图 1F)。

2.3 miRNA 表达差异及聚类分析 基因芯片测序结果显示, 3 组大鼠共 119 个 miRNA 差异表达, 共 8 种变化趋势, 其中低硒组较对照组上调、补硒组与对照组间无差异的 miRNA 共 30 个 (见图 2 趋势 1); 低硒组较对照组下调、补硒组与对照组间无差异的 miRNA 共 10 个 (见图 2 趋势 6), 上述 40 个 miRNA 为硒敏感性 miRNA。

2.4 靶基因功能的显著性分析 GO 功能富集分析结果

显示, 上述 40 种差异表达 miRNA 靶基因功能主要富集于脂代谢、心脏发育、细胞黏附、血管发育、轴突导向、细胞迁移调控、输尿管芽发育、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、细胞分化、有机氮化物反应、棕色脂肪分化、髓系祖细胞分化、细胞-基质黏附、细胞增殖调控、生物钟节律, 见图 3。靶基因投射的 13 条信号转导通路为肾细胞癌、转录调节、多巴胺能突触、焦点黏附、Rap 信号通路、脂代谢、PPAR 信号通路、Ras 信号通路、Oxytocin 信号通路、长期抑制、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、HTLV-1 感染, 见图 4。

表 1 3 组大鼠血清硒和血浆 BNP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of serum selenium level and plasma BNP level in the three groups

组别	只数	硒 (mg/L)	BNP (pg/ml)
对照组	10	0.144 \pm 0.007	894.3 \pm 11.3
低硒组	10	0.026 \pm 0.004 ^a	1 436.4 \pm 121.7 ^a
补硒组	10	0.092 \pm 0.012 ^{ab}	1 174.2 \pm 132.8 ^{ab}
F 值		4.32	3.96
P 值		0.02	0.03

注: BNP= 脑钠肽; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与低硒组比较, ^b $P < 0.05$

2.5 实时荧光定量 PCR 结果 上述 40 个 miRNA 中表达上调最显著的 5 个 miRNA 分别为 miRNA-374、miRNA-16、miRNA-199a-5p、miRNA-195、miRNA-30e*, 表达下调最显著的 3 个 miRNA 分别为 miRNA-3571、miRNA-675、miRNA-450a*。实时荧光定量 PCR 结果显示, 以对照组心肌组织 miRNA 为参照, 补硒组大鼠心肌组织 miRNA-374、miRNA-16、miRNA-199a-5p、miRNA-195、miRNA-30e* 相对表达量低于低硒组, 心肌组织 miRNA-3571、miRNA-675、miRNA-450a* 相对表达量高于低硒组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表 2)。

3 讨论

克山病的病因迄今尚未完全明确, 主要包括微生物地球化学病因和生物病因。目前, 流行病学研究证实, 地方性克山病几乎全部发生在低硒地带, 该地区患者头发和血液中的硒明显低于非病区居民, 故认为克山病的发生与当地饮食中硒元素缺乏有关, 而口服亚硒酸钠后患者病情得到明显缓解, 提示补硒能预防克山病的发生^[3, 8]。本研究采用低硒饲料喂养大鼠以构建低硒模型, 结果显示, 低硒组大鼠血清硒水平低于对照组和补硒组, 提示低硒大鼠模型构建成功。

近期一项前瞻性队列研究结果显示, 血清硒基线水平与急性冠脉综合征患者病死率呈负相关, 且低硒是其独立危险因素^[9]。动物实验结果显示, 低硒与心功能

表2 低硒组和补硒组大鼠心肌组织表达最显著的8种miRNA相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of relative expression quantity of 8 miRNA with the most significant differential expression in myocardium tissue between low-selenium group and selenium supplement group

组别	只数	miRNA-374	miRNA-16	miRNA-199a-5p	miRNA-195	miRNA-30e*	miRNA-3571	miRNA-675	miRNA-450a*
低硒组	10	342.1 ± 41.2	107.2 ± 12.5	72.3 ± 9.6	59.4 ± 8.3	38.1 ± 5.8	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.24 ± 0.03
补硒组	10	87.4 ± 12.8	12.9 ± 1.2	14.7 ± 1.9	5.4 ± 0.9	4.9 ± 0.4	0.76 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.56 ± 0.07
t 值		10.31	8.24	9.02	5.42	4.12	3.92	3.65	5.21
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	0.01	0.02	0.03	0.03	0.01

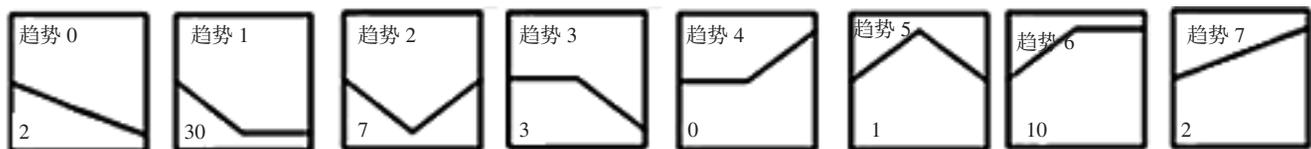
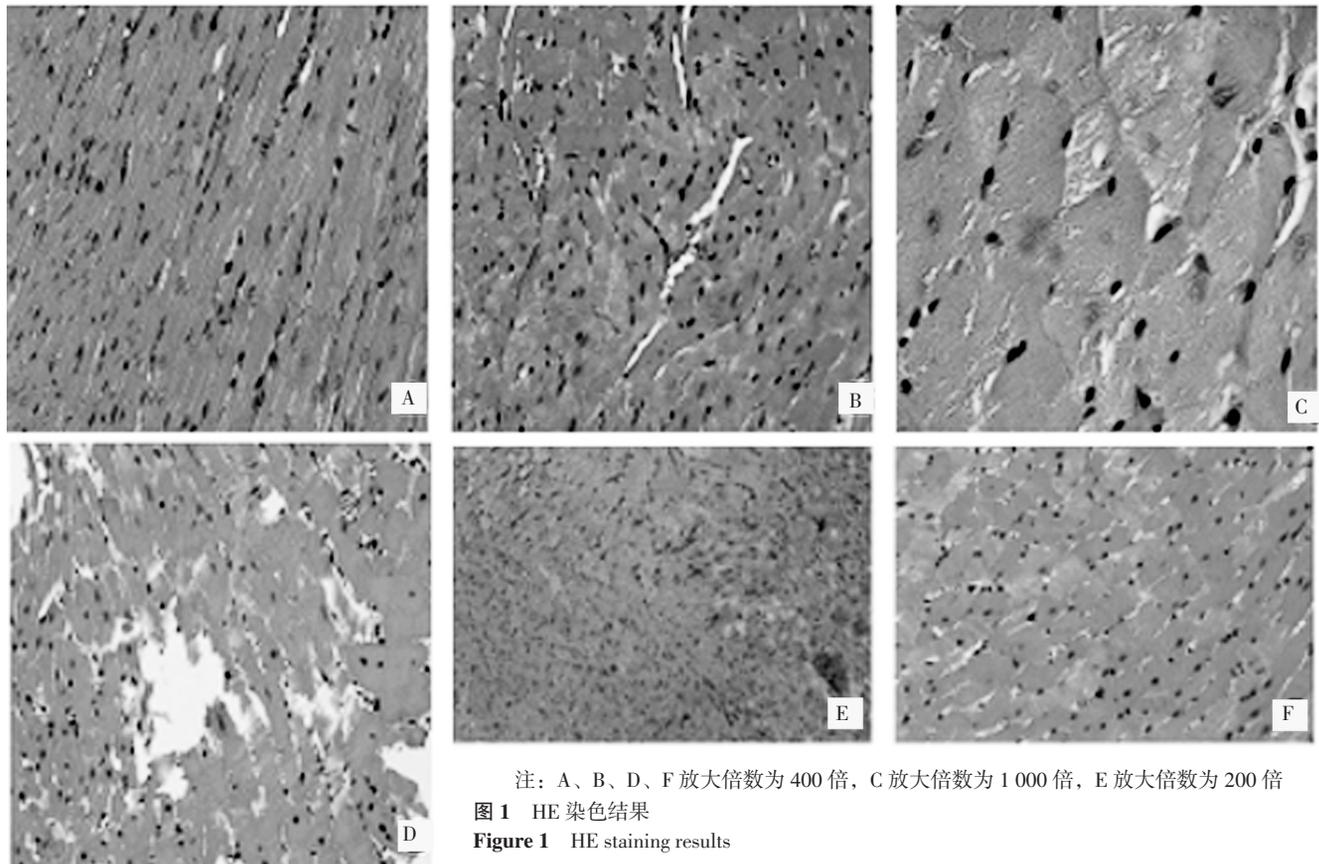


图2 3组大鼠miRNA变化趋势图
 Figure 2 miRNA change trends in the three groups

恶化及心肌肥厚有关,其水平可伴心脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性降低而下降^[10]。本研究结果显示,低硒组大鼠血浆BNP水平高于对照组和补硒组,补硒组大鼠血浆BNP水平高于对照组,提示低硒大鼠存在心功能损伤。

近年来,miRNA在心血管疾病领域的研究报道日益增多,其在高血压、先天性心脏病、冠心病的发生发

展中发挥着重要作用^[8, 11]。本研究通过基因芯片测序筛选出40个硒敏感性miRNA,包括30个表达上调的miRNA和10个表达下调的miRNA;进一步行GO功能富集分析结果显示,上述40种差异表达miRNA靶基因功能主要富集于脂代谢、心脏发育、细胞黏附、血管发育、轴突导向、细胞迁移调控、输尿管芽发育、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路、细胞分化、有机氮化物反应、

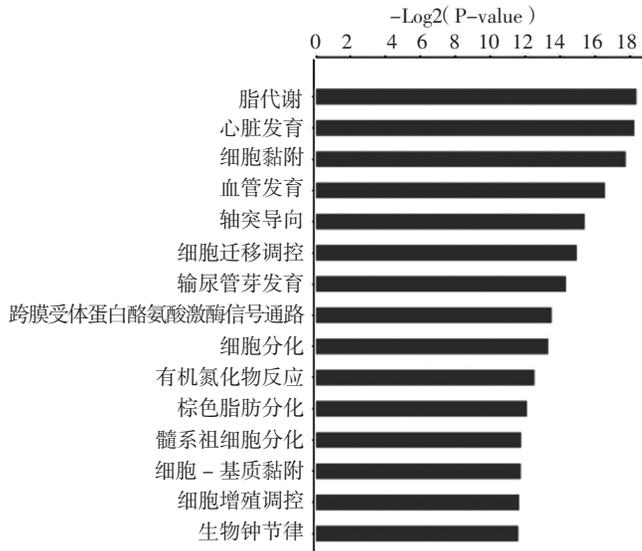


图3 差异表达 miRNA 靶基因 GO 功能富集分析结果
 Figure 3 Gene ontology functional enrichment analysis results of target gene of miRNA with differential expression

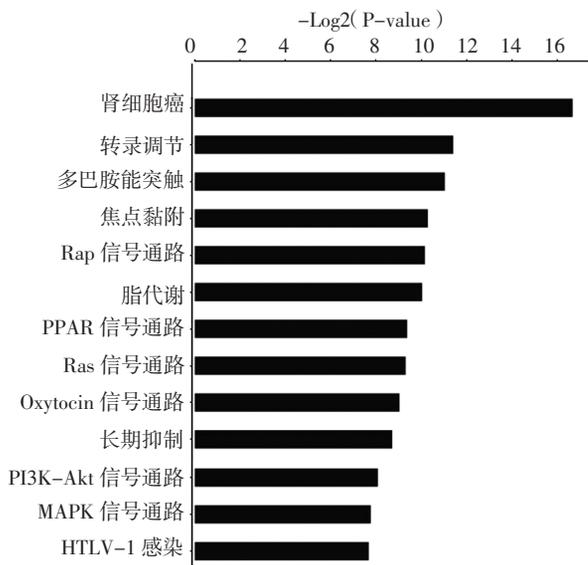


图4 靶基因投射的信号转导通路
 Figure 4 Target gene projected signal transduction pathways

棕色脂肪分化、髓系祖细胞分化、细胞-基质黏附、细胞增殖调控、生物钟节律，且靶基因主要投射 13 条信号转导通路。为了验证基因芯片测序结果，本研究选取 8 个表达显著的 miRNA，结果提示基因芯片测序结果与实时荧光定量 PCR 结果相一致。既往研究表明，miRNA 在低硒所致克山病的发生发展中发挥着重要作用，其可能的作用机制为 miRNA 通过影响某种信号转导通路而导致心脏结构或功能异常，最终发展为心力衰竭^[12]。

综上所述，低硒会导致大鼠心功能损伤，低硒大鼠心肌组织中存在多个差异表达的 miRNA，主要涉及 15 种生物学功能和 13 条信号转导通路，这些差异表达的 miRNA 可能参与克山病的发生发展。但本研究存在以

下不足：（1）低硒大鼠模型并不能完全模拟和反映克山病的自然病程；（2）实验大鼠数量较少；（3）芯片基因筛选时采用了样本混合方法，以节约成本，但可能降低研究结论的可靠性。

作者贡献：高登峰、牛小麟进行文章的构思与设计，对文章整体负责，监督管理；高登峰进行研究的实施与可行性分析；冯雁京进行数据收集、整理、分析；邢玉洁进行结果分析与解释；高登峰、冯雁京负责撰写论文。本文无利益冲突。

参考文献

- [1] 相有章. 我国克山病防治现状与对策 [J]. 中国地方病防治杂志, 2008, 23 (5) : 339-342.
- [2] PRABHU K S, LEI X G. Selenium [J]. Adv Nutr, 2016, 7 (2) : 415-417.
- [3] 周慧慧, 王铜. 克山病病因研究进展 [J]. 中国地方病学杂志, 2015, 34 (6) : 466-468. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4255. 2015.06.023.
- [4] HIRAOKA Y. Association between function of selenium and heart disease [J]. Nihon Rinsho, 2016, 74 (7) : 1192-1198.
- [5] MCKEAG N A, MCKINLEY M C, HARBINSON M T, et al. Dietary Micronutrient Intake and Micronutrient Status in Patients With Chronic Stable Heart Failure: An Observational Study [J]. J Cardiovasc Nurs, 2017, 32 (2) : 148-155. DOI: 10.1097/JCN.0000000000000322.
- [6] XING Y, GAO D, LIU Z, et al. MicroRNAs in heart failure [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127 (18) : 3328-3334.
- [7] DUAN L, XIONG X, LIU Y, et al. miRNA-1: functional roles and dysregulation in heart disease [J]. Mol Biosyst, 2014, 10 (11) : 2775-2782. DOI: 10.1039/c4mb00338a.
- [8] 刘昕, 杨光, 王立新, 等. 潜在型克山病患者长期跟踪随访及进展危险因素分析 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2016, 47 (3) : 398-400.
- [9] HU X F, ECCLES K M, CHAN H M. High selenium exposure lowers the odds ratios for hypertension, stroke, and myocardial infarction associated with mercury exposure among Inuit in Canada [J]. Environ Int, 2017, 102: 200-206. DOI: 10.1016/j.envint.2017.03.002.
- [10] LYMBURY R S, MARINO M J, PERKINS A V. Effect of dietary selenium on the progression of heart failure in the ageing spontaneously hypertensive rat [J]. Mol Nutr Food Res, 2010, 54 (10) : 1436-1444. DOI: 10.1002/mnfr.201000012.
- [11] JAMALUDDIN M S, WEAKLEY S M, ZHANG L, et al. MiRNAs: roles and clinical applications in vascular disease [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2011, 11 (1) : 79-89. DOI: 10.1586/erm.10.103.
- [12] ZHANG G, SHI H, WANG L, et al. MicroRNA and transcription factor mediated regulatory network analysis reveals critical regulators and regulatory modules in myocardial infarction [J]. PLoS One, 2015, 10 (8) : e0135339. DOI: 10.1371/journal.pone.0135339.

(收稿日期: 2018-06-26; 修回日期: 2018-08-12)
 (本文编辑: 谢武英)