

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.002

下调 miRNA-181a 降低寒冷刺激诱导的妊娠高血压小鼠的血压

王琳¹, 史锡岩², 杨建敏³, 薛国勇³

(1. 南阳地质医院妇产科, 河南 南阳 473000; 2. 南阳地质医院内科, 河南 南阳 473000;
3. 南阳市中心医院妇产科, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 检测miRNA-181a在寒冷刺激诱导的妊娠高血压小鼠胎盘组织中的表达, 研究下调miRNA-181a表达后对妊娠高血压小鼠血压的影响, 并探讨初步机制。方法: 尾静脉注射200 nmol/kg miRNA-181a-antagomir, 2 d后, 通过反复寒冷应激刺激方法建立妊娠高血压小鼠模型。颈动脉插管法测量小鼠血压, qPCR检测胎盘组织中miRNA-181a的表达, 使用NO试剂盒测量血清中NO含量, ELISA检测血清中血红素氧合酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)含量, Western印迹法检测胎盘组织中Akt, pAkt, 内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和peNOS蛋白表达。结果: 与对照组相比, 寒冷刺激诱导的妊娠高血压小鼠胎盘组织中miRNA-181a水平显著增加。与模型组相比, 沉默miRNA-181a能够降低孕鼠的血压, 升高血清NO和HO-1水平, 并上调胎盘组织中pAkt和peNOS蛋白表达。结论: miRNA-181a表达可能与寒冷刺激诱导的妊娠高血压的发生发展有潜在关系。

[关键词] 妊娠高血压; miRNA-181a; Akt; 内皮型一氧化氮合酶

Down-regulation miRNA-181a reduces blood pressure in cold-induced pregnant hypertensive mice

WANG Lin¹, SHI Xiyang², YANG Jianmin³, XUE Guoyong³

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Nanyang Dizhi Hospital, Nanyang Henan 473000;
2. Department of Medicine, Nanyang Dizhi Hospital, Nanyang Henan 473000;
3. Department of Obstetrics and Gynecology, Nanyang City Center Hospital, Nanyang Henan 473000, China)

Abstract **Objective:** To examine the expression of miRNA-181a in placenta tissue of cold induced-pregnant hypertensive mice and to explore the effects of and the possible mechanisms of down-regulation miRNA-181a on blood pressure. **Methods:** Mice were injected with 200 nmol/kg miRNA-181a-antagomir via tail vein. Two days later, model of pregnant hypertension was established by cold-stress stimulation method. Blood pressure was measured with direct intubation of carotid. The expressions of miRNA-181a in placenta tissues were examined by qPCR; the levels of serum NO were determined by NO assay kit; the levels of serum heme oxygenase 1 (HO-1) were determined by ELISA assay; The protein expressions of Akt, pAkt, eNOS and peNOS were analyzed by Western blot. **Results:** Compared to control group, the expression of miRNA-181a in placenta tissue of cold induced-

收稿日期 (Date of reception): 2018-07-19

通信作者 (Corresponding author): 王琳, Email: wanglinmed@163.com

pregnant hypertensive mice was significantly increased. Moreover, compared to model group, inhibition of miRNA-181a suppressed the blood pressure, increased the levels of serum NO and HO-1, and further, increased the protein expression of pAkt and peNOS in placenta tissue, respectively. **Conclusion:** MiRNA-181a may be related to the development of cold induced-pregnant hypertension.

Keywords pregnant hypertensive; miRNA-181a; Akt; eNOS

妊娠高血压综合征 (pregnancy induced hypertension syndrome, PH) 以高血压、水肿、蛋白尿为特征, 可伴全身多器官功能损害或功能衰竭, 严重者发展为子痫, 出现抽搐、昏迷等症状^[1]。目前PH的治疗主要采用硫酸镁解痉, 必要时予降压、利尿, 但由于硫酸镁的安全窗小, 容易中毒。因此, 研究PH发生发展的机制具有重要的现实意义。

MicroRNA(miRNA)是一类长度约22个碱基的非编码RNA, 在细胞增殖、分化和凋亡等多种生物学进程中发挥重要作用。近年来研究^[2]表明: 某些miRNA在小鼠和人的胎盘组织中表达异常变化。MiRNA-181a是miRNA-181家族成员多功能miRNA^[3-4]。有研究^[5]采用基因芯片技术检测, 结果显示miRNA-181a在子痫前期孕妇和正常孕妇的外周血呈高表达。此外, 报道^[6]指出miRNA-181a的表达在重度子痫前期显著上调。Liu等^[7]研究发现miRNA-181a通过TGF- β 通路令脐带和蜕膜来源的骨髓间充质干细胞高表达。而妊娠高血压的发生与气温骤变密切相关^[8]。因此, 本研究通过建立寒冷刺激诱导的妊娠高血压小鼠模型, 观察沉默miRNA-181a后对寒冷刺激诱导的妊娠高血压小鼠的血压的影响, 并初步讨论其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康癌症研究所 (Institute of Cancer Research) 小鼠60只, 雌性40只, 雄性20只, 购自南京医科大学实验动物中心, 合格证号SCXK(苏)2013-0004, 置于(23 \pm 2) °C环境中饲养, 正常饮食, 进行为期1周的适应性饲养。

1.1.2 主要试剂

Negative control antagomir, miRNA-181a-antagomir由上海吉玛制药技术有限公司合成; 一步法RNAeasy试剂盒购自荷兰Qiagen公司; TaqMan Micro分析试剂盒购自美国Thermo公司; NO测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 血红素氧

合酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)ELISA试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司; Akt和pAkt抗体购自美国CST公司; eNOS和peNOS抗体购自美国BD公司; 其他试剂购自国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 寒冷刺激诱导妊娠高血压小鼠模型

随机选取健康成年小鼠于每天20:00以雌雄2:1合笼, 每日上午8:00对雌鼠进行检查, 发现阴栓者确定为妊娠第0天。将妊娠小鼠每天8:00~12:00置于4 °C环境, 此后置于25 °C环境, 反复刺激18 d^[9]。颈动脉插管法测量血压, 以最大收缩压与平均动脉压与正常对照组小鼠相比达到显著差异作为造模成功的标准。

1.2.2 实验分组

实验共分为4组, 每组10只雌性小鼠: 正常对照组(control组), 确定妊娠后正常饮食, 不做任何干预措施; 妊娠高血压组(PH组), 进行寒冷刺激诱导妊娠高血压建模; 阴性对照antagomir组(NC-antagomir组), 尾静脉注射negative control antagomir(200 nmol/kg), 2 d后进行妊娠高血压建模; miRNA-181a-antagomir组, 尾静脉注射miRNA-181a-antagomir(200 nmol/kg), 2 d后进行妊娠高血压建模。在建模后, 妊娠高血压组小鼠有1只小鼠死亡, 其他各组小鼠均未出现死亡, 共纳入39只小鼠进行统计。各组小鼠于妊娠第19天剖腹取胎, 待胎盘完全剥离后, 连同脐带周围组织剪下, 用PBS冲洗干净, 置于-80 °C冰箱中保存。分离颈总动脉, 每只小鼠取血1 mL备用。

1.2.3 颈动脉插管法测量血压

麻醉各组小鼠, 固定, 沿颈部正中切口, 左颈总动脉远心端结扎, 近心端上动脉夹。在远心端用探头前端针刺口, 用探头插入。待小鼠清醒后, 每10 min测1次, 连续测10次血压, 取稳定的血压求平均值。

1.2.4 qPCR 检测 miRNA-181a 表达

按照一步法RNAeasy试剂盒说明书方法萃取各组小鼠胎盘组织中总RNA, 按照TaqMan Micro分

析试剂盒进行PCR反应, 反应体系如下: miRNA-181a引物: 上游5'-AACATTCAACGCTGTGCGGT-G-3', 下游5'-AGCCATAGGGTACAATCAACGG-3'; 内参U6引物: 上游5'-CGCTTCGGCAGCACATATA-C-3', 下游5'-TTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3', 95 °C, 10 min预变性, 95 °C 10 s, 60 °C 45 s, 共35个循环, 实验结果在荧光定量操作系统中进行分析对比, 目标基因的相对定量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.2.5 血清中 NO 含量的检测

各组小鼠颈总动脉血以4 000 r/min离心10 min, 取上清液按照NO测定试剂盒说明书测量血清中NO的含量。

1.2.6 ELISA 法检测血清中 HO-1 的含量

各组小鼠颈总动脉血以4 000 r/min离心10 min, 取上清液备用。于预包被抗HO-1特异性抗体的酶标板上, 每孔加入100 μ L标准品和待测血清, 37 °C温育2 h, 弃去液体, 加入100 μ L生物素标志的抗体工作液, 37 °C温育1h, 洗涤, 加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的抗生素蛋白链菌素, 37 °C温育1 h, 弃去液体, 洗板, 轻轻吸干水分, 每孔加入90 μ L底物溶液, 37 °C避光温育20 min, 加入50 μ L终止液, 于450 nm波长处酶标仪读数OD值。

1.2.7 Western 印迹法

取各组小鼠胎盘组织, 加入RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂, 冰上裂解30 min, 离心, BCA蛋白定量, 各组样品加入5 \times 上样缓冲液进行SDS-PAGE电泳, 电泳完成后转移将蛋白至PVDF膜, 加入5%脱脂牛奶, 室温放置2 h, TBST洗涤, 加入相应一抗4 °C孵育过夜, 加入对应二抗, 室温放置1 h, TBST洗涤3次, 在BIO-RAD成像系统中发光成像, 进行灰度扫描。

1.3 统计学处理

本试验所有数据均采用SPSS 15.0统计软件进行分析, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 各组间均数的比较采用单因素方差分析, 进一步的两两比较采用SNK-q检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组孕鼠造模前后收缩压和舒张压

与control组相比, 妊娠第18天, PH组、NC-antagomir组和miR-181a-antagomir组孕鼠的收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP)显著高于0天($P<0.05$), miR-181a-antagomir组孕鼠的上升幅度显著小于PH组和NC-antagomir组($P<0.05$, 表1)。

2.2 各组小鼠胎盘组织中 miRNA-181a 表达

qPCR结果显示: 与control组相比, PH组和NC-antagomir组小鼠胎盘中miRNA-181a表达显著升高($P<0.05$), PH组和NC-antagomir组之间差异无统计学意义($P>0.05$); 与PH组相比, miR-181a-antagomir组小鼠胎盘中miRNA-181a表达显著降低($P<0.05$, 图1)。

2.3 血清中 NO 与 HO-1 含量水平的变化

与control相比, PH组和NC-antagomir组小鼠血清中NO含量与HO-1蛋白含量显著降低($P<0.05$), PH组和NC-antagomir组之间差异无统计学意义($P>0.05$); 与PH组相比, miR-181a-antagomir组小鼠血清中NO含量与HO-1蛋白含量显著上升($P>0.05$, 表2)。

表1 各组孕鼠的收缩压和舒张压变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes of SBP and DBP in pregnant mice of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	第0天		第18天	
		SBP/mmHg	DBP/mmHg	SBP/mmHg	DBP/mmHg
Control组	10	116.48 \pm 4.48	85.47 \pm 3.08	119.83 \pm 4.06	86.24 \pm 3.42
PH组	9	119.73 \pm 3.86	82.47 \pm 2.98	146.57 \pm 2.97 ^{*#}	100.83 \pm 3.72 ^{*#}
NC-antagomir组	10	117.23 \pm 3.79	83.61 \pm 2.56	143.82 \pm 3.81 ^{*#}	102.84 \pm 4.05 ^{*#}
miR-181a-antagomir组	10	116.43 \pm 4.18	84.51 \pm 3.17	125.43 \pm 3.71 ^{*#&}	92.88 \pm 3.61 ^{*#&}

与control相比, ^{*} $P<0.05$; 与PH组相比, [&] $P<0.05$; 与第0天相比, [#] $P<0.05$ 。

Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$; compared with the PH group, [&] $P<0.05$; compared with Day 0, [#] $P<0.05$.

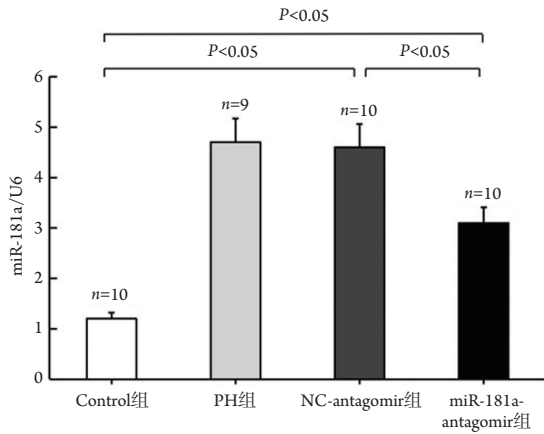


图1 各组胎盘组织中miRNA-181a相对表达量($\bar{x} \pm s$)
Figure 1 Relative expressions of miRNA-181a in placental tissue of each group ($\bar{x} \pm s$)

2.4 Akt, pAkt, eNOS 和 peNOS 蛋白表达的变化

与control组相比, PH组和NC-antagomir组小鼠胎盘组织中pAkt和peNOS蛋白表达显著下降($P < 0.05$), PH组和NC-antagomir组之间差异无统

表2 各组孕鼠血清中NO含量与HO-1蛋白含量水平的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of serum NO levels and HO-1 protein levels in pregnant rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	HO-1/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Control组	10	27.94 \pm 3.47	1.48 \pm 0.15
PH组	9	16.75 \pm 3.16*	0.84 \pm 0.08*
NC-antagomir组	10	17.83 \pm 2.67*	0.82 \pm 0.09*
MiR-181a-antagomir组	10	22.42 \pm 3.09*#	1.13 \pm 0.12*#

与control相比, * $P < 0.05$; 与PH组相比, # $P < 0.05$ 。

Compared with the control group, * $P < 0.05$; compared with the PH group, # $P < 0.05$.

计学意义($P > 0.05$); 与NC-antagomir组相比, miR-181a-antagomir组小鼠胎盘组织中pAkt和peNOS蛋白表达显著上升($P < 0.05$), 各组Akt与eNOS的蛋白表达无明显变化(图2)。

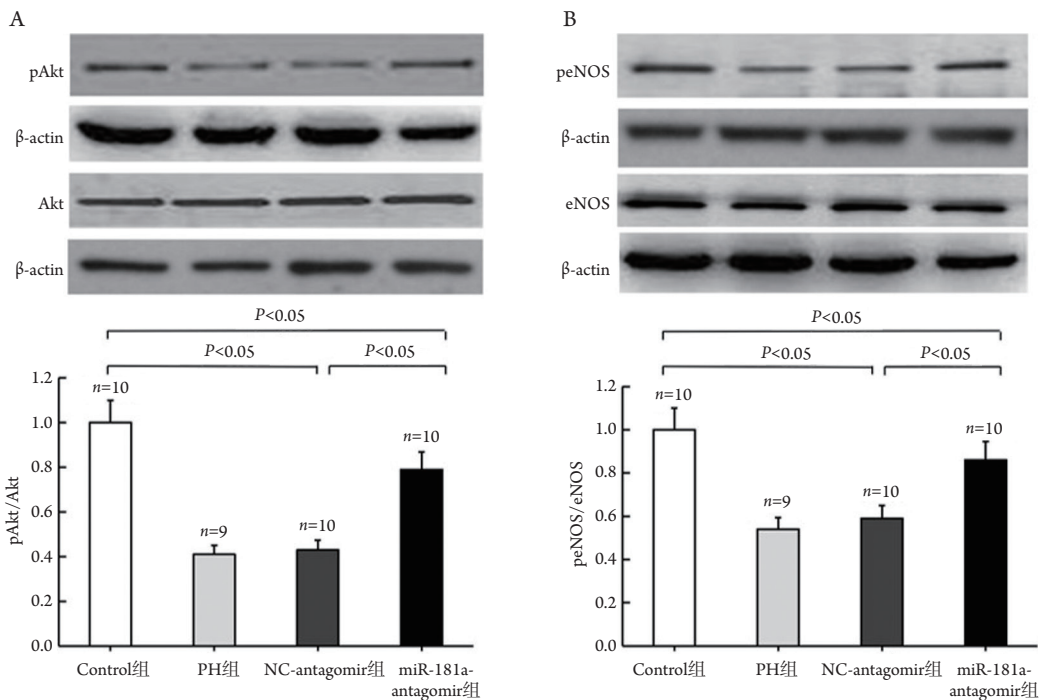


图2 各组胎盘组织中Akt, pAkt, eNOS和peNOS蛋白表达的变化($\bar{x} \pm s$)

Figure 2 Changes of the expressions of Akt, pAkt, eNOS and peNOS in placental tissues of each group ($\bar{x} \pm s$)

(A) Akt和pAkt蛋白表达的变化; (B) eNOS和peNOS蛋白表达的变化。

(A) Changes of the protein expressions of Akt and pAkt; (B) Changes of the protein expressions of eNOS and peNOS.

3 讨论

MiRNA181家族共有miRNA-181a, miRNA-181b, miRNA-181c和miRNA-181d四个成员, 分别与多个靶mRNAs互补, 通过抑制结合的mRNA或激活其介导的复合体, 在降解靶mRNA的过程中发挥重要的调节作用。本研究通过对比妊娠高血压小鼠与正常妊娠小鼠发现: miRNA-181a在寒冷刺激诱导的妊娠高血压小鼠的胎盘组织中呈高表达, 与前人研究^[6]结果相似。Zhu等^[10]研究发现miRNA-181a在子痫前期患者的胎盘组织中的表达特异性增强。

HO-1具有舒张血管、抗氧化与抗细胞凋亡的作用^[11]。HO-1的表达上升可减轻血管紧张素II引起的内皮细胞损伤, 对血管损伤的修复具有保护作用^[12], 并可能与PH发病有关^[13]。本研究发现沉默miRNA-181a后, 血清中HO-1的含量显著上升, 提示miRNA-181a可能通过调节HO-1影响妊娠小鼠的血压。胎盘是产生NO的主要部位之一, 而NO对胎儿提供足够的血液供应具有重要作用^[14]。NO由血管平滑肌产生, 是一种血压调节因子。此外, 研究^[15]表明胎盘合体滋养细胞、干绒毛血管平滑肌细胞与内皮细胞有eNOS mRNA的表达, 是妊娠基础状态下内皮源性NO合成的主要来源。eNOS磷酸化介导的细胞内信号转导途径是NO生物利用度降低的一个重要因素, 当eNOS磷酸位点Ser1777磷酸化后可导致eNOS最大程度地活化^[16]。Akt的激活在eNOS^{Ser1777}磷酸化的过程中起重要作用。本研究还发现: 沉默miRNA-181a能够激活妊娠高血压小鼠胎盘组织中的pAkt, 从而上调peNOS的蛋白表达, 增加内皮源性NO的释放, NO量的增多, 进而舒张血管, 起降低血压的作用, 由此推测miRNA-181a可能是寒冷刺激诱导的妊娠高血压小鼠的一个基因靶点。

综上所述, miRNA-181a可能是寒冷刺激诱导的妊娠高血压治疗的一个有效靶点, 可能通过调控eNOS, AKT磷酸化介导的信号通路和调控HO-1表达来调节妊娠高血压进展, 至于具体的机制还需进一步研究。

参考文献

1. Rhoads SJ, Serrano CI, Lynch CE, et al. Exploring implementation of m-health monitoring in postpartum women with hypertension[J]. *Telemed J E Health*, 2017, 23(10): 833-841.

2. Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, et al. Profiling of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNA expression in umbilical cord blood in gestational hypertension, preeclampsia and fetal growth restriction[J]. *Int J Cardiol*, 2017, 249: 402-409.
3. Nabih ES, Andrawes NG. The association between circulating levels of miRNA-181a and pancreatic beta cells dysfunction via SMAD7 in type 1 diabetic children and adolescents[J]. *J Clin Lab Anal*, 2016, 30(5): 727-731.
4. Niu J, Xue A, Chi Y, et al. Induction of miRNA-181a by genotoxic treatments promotes chemotherapeutic resistance and metastasis in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2016, 35(10): 1302-1313.
5. Wu L, Zhou H, Lin H, et al. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies[J]. *Reproduction*, 2012, 143(3): 389-397.
6. Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, et al. Cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs are dysregulated in placental tissues affected with gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138383.
7. Liu L, Wang Y, Fan H, et al. MicroRNA-181a regulates local immune balance by inhibiting proliferation and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(8): 1756-1770.
8. Hlimi T. Association of anemia, pre-eclampsia and eclampsia with seasonality: a realist systematic review[J]. *Health Place*, 2015, 31: 180-192.
9. 俞丽丽, 李力, 陈鸣, 等. 寒冷刺激诱发孕鼠妊娠高血压综合征动物模型研究[J]. *第三军医大学学报*, 2001, 23(4): 419-421.
YU Lili, LI Li, CHEN Ming, et al. Cold-stress stimulates pregnancy-induced hypertension syndrome in pregnant rats[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2001, 23(4): 419-421.
10. Zhu XM, Han T, Sargent IL, et al. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2009, 200(6): 661.e1-661.e7.
11. Mishina K, Shinkai M, Shimokawaji T, et al. HO-1 inhibits IL-13-induced goblet cell hyperplasia associated with CLCA1 suppression in normal human bronchial epithelial cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 448-453.
12. Shi J, Zhang M, Zhang L, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates microcystin-LR-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells through activation of the NRF2/HO-1 pathway[J]. *Environ Pollut*, 2018, 239: 466-472.
13. Wong RJ, Zhao H, Stevenson DK. A deficiency in haem oxygenase-1 induces foetal growth restriction by placental vasculature defects[J]. *Acta Paediatr*, 2012, 101(8): 827-834.

14. Wang Y, Huang M, Yang X, et al. Supplementing punicalagin reduces oxidative stress markers and restores angiogenic balance in a rat model of pregnancy-induced hypertension[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2018, 22(4): 409-417.
15. Ramirez-Vélez R, Bustamante J, Czerniczyniec A, et al. Effect of exercise training on eNOS expression, NO production and oxygen metabolism in human placenta[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80225.
16. Zheng Z, Yu S, Zhang W, et al. Genistein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by activating PI3K/Akt/eNOS signaling[J]. *Histol Histopathol*, 2016, 32(1): 35-41.

本文引用: 王琳, 史锡岩, 杨建敏, 薛国勇. 下调miRNA-181a降低寒冷刺激诱导的妊娠高血压小鼠的血压[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(11): 2292-2297. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.002

Cite this article as: WANG Lin, SHI Xiyan, YANG Jianmin, XUE Guoyong. Down-regulation miRNA-181a reduces blood pressure in cold-induced pregnant hypertensive mice[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(11): 2292-2297. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.002