

AntimiR34a 纳米颗粒靶向小鼠 心肌梗死后心肌修复

刘龙梅 王仲朝 柴照琴 杨艳艳 韩学斌

(山西省心血管病医院 / 研究所, 山西医科大学附属心血管病医院 太原 030024)

摘要: 目的: 探讨 RNA 纳米技术在心肌梗死靶向治疗中的应用。选取 antimiR34a 纳米颗粒, 观察其心肌靶向效应及在心肌修复中的作用。方法: 将 C57BL/6J 小鼠随机分为三组: 假手术组、心肌梗死组、心肌梗死 +antimiR34a 纳米颗粒组。通过病理学检查、超声心动图评估心梗情况, 通过小动物活体成像观察 antimiR34a 纳米颗粒在小鼠体内的分布情况, 通过测量梗死面积、检测射血分数、TNF- α 和 caspase 3 水平评估心梗后心肌修复情况。结果: antimiR34a 纳米颗粒主要分布在小鼠心肌组织; 与假手术组相比, 心梗组小鼠结扎部位心肌变薄, 局部运动减弱, 射血分数明显减低 ($P < 0.05$), TNF- α 和 caspase 3 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与心肌梗死组相比, 心肌梗死 +antimiR34a 纳米颗粒组的射血分数明显提升 ($P < 0.05$), TNF- α 和 caspase 3 水平显著降低 ($P < 0.05$), 但跟假手术组相比仍然偏高。结论: AntimiR34a 纳米颗粒可以靶向心肌并改善心功能, 调低 TNF- α 和 caspase 3 水平, 发挥对心肌梗死小鼠的心肌修复作用。

关键词: 纳米颗粒; 小鼠心肌梗死; 心肌修复; antimiR34a

中图分类号: R542.2 文献标识码: A 文章编号: 2832-9317 (2023) 02-0041-04

DOI: 10.12424/HA.2023.026 本文链接: <https://www.oc-press.com/HA-202302-041.html>

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 严重威胁人类生命健康。常规通过药物和心血管介入治疗, 可以有效打开冠脉血管, 改善 MI 预后。然而 MI 后的心肌修复方式与机制, 仍然有待进一步研究。有研究表明, miR34a 在小鼠 MI 后心脏修复和再生中发挥重要作用。RNA 纳米技术作为一种新兴技术, 在 MI 靶向治疗中鲜有应用。选取搭载有 antimiR34a 的纳米颗粒 (Nanoparticles, NP), 观察其在小鼠 MI 后心肌修复中的作用。

一、材料与方法

(一) 材料: 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,

体重 (25 ± 2) g, 购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。AntimiR34a 纳米颗粒购自美国 Nanobio Delivery Pharmaceutical 公司。

(二) 小鼠心肌梗死动物模型的建立: 给予戊巴比妥钠 (50mg/kg) 腹腔麻醉, 脱毛膏脱净胸部和颈部毛发, 75% 乙醇消毒, 冷光灯照射直视下将 22G 套管针送入气管, 重建气道, 小动物呼吸机调整呼吸频率为 100 次 / 分。取左侧胸骨正中线, 垂直肋骨剪开皮肤, 逐层分离胸肌, 用开胸器撑开并固定心前区肋骨, 暴露心脏, 剪开心包膜, 眼科线结扎左前降支, 造成心肌缺血, 关闭缝合胸腔及皮肤,

基金项目: 山西省重点研发计划 (指南) 项目国际科技合作方面项目 (项目编号: 201803D421052); 山西省心血管病医院科研激励计划项目 (项目编号: XYS20170204)。

作者简介: 刘龙梅, 女, 硕士, 主任技师, 研究方向: 分子生物学技术、心肌修复。

王仲朝, 男, 医学博士, 主任医师, 研究方向: 结构性心脏病学、心肌修复。

柴照琴, 女, 主管技师, 研究方向: 微生物、分子生物学技术。

杨艳艳, 女, 技师, 研究方向: 微生物、实验动物学技术。

韩学斌, 男, 主任医师, 研究方向: 冠心病介入、心肌修复。

呼吸机维持 30 分钟，清醒后撤机。

(三) 实验动物分组：采用随机数表将其分为 3 组：假手术组 (Sham 组) 6 只、心肌梗死组 (MI 组) 7 只、心肌梗死 + 纳米颗粒组 (MI+NP 组) 7 只。Sham 组仅打开胸腔，不进行左前降支的结扎。MI+NP 组于造模前一周每天通过尾静脉注射 antimiR34a 纳米颗粒入体内。

(四) 小动物活体成像：注射 antimiR34a 纳米颗粒后，使用远红外二区成像监测体内分布情况。

(五) TTC 染色测定心肌梗死面积：取术后 24h 的小鼠心脏冷冻 1h 后取出，用预冷刀片沿左室长轴将心脏 2mm 切片，置于 2%TTC 中，室温孵育 15 分钟后取出，PBS 漂洗，平整到 4% 甲醛中固定。其中红色为未梗死区，白色为梗死区。每一切面的 $MI\% = \text{梗死区内外周长均值} / \text{左心室内外周长均值}$ ，总 $MI\% = \text{各切面 } MI\% \text{ 的算术平均值}$ 。

(六) 心功能检测：使用富士 Vevo 3100LT 小动物超声仪进行小鼠左心室收缩功能的检测，尤其是射血分数 (ejection fraction, EF) 的检测。

(七) Western blot 检测相关蛋白表达：使用组织蛋白提取液，加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，4℃ 组织匀浆，取上清，BSA 法定量，10%SDS-PAGE 电泳后转膜，5% 脱脂奶粉封闭 1h，加一抗 anti-TNF- α 抗体、anti-caspase3 抗体和内参 anti-GAPDH 抗体 4℃ 摇床过夜，1×TBST 洗膜 3 次后加入二抗，再次 1×TBST 洗膜 3 次后，ECL 发光，凝胶成像系统曝光，imageJ 分析条带灰度值。

(八) 统计学分析：所有数据使用“均数 ± 标准差”来表示。率的比较采用卡方检验。组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

二、结果

(一) antimiR34a 纳米颗粒靶向 MI 小鼠心肌组织，并下调 MI%，改善心功能

1. 在 MI+NP 组中发现 antimiR34a 纳米颗粒的表达在小鼠心肌组织的比例较高 (75.94 ± 2.53) %，显著高于在骨骼肌中的比例 (20.42 ± 4.82) % 和非肌肉组织中的比例 (3.64 ± 0.43) %，P < 0.01，差

异均有统计学意义。提示 antimiR34a 纳米颗粒具有靶向 MI 小鼠心肌组织的特性。

2. Sham 组的 MI% 为 0，MI 组 MI% 为 (30.25 ± 4.74) %，MI+NP 组 MI% 为 (23.11 ± 6.54) %。跟 sham 组相比，MI 组和 MI+NP 组的 MI% 均增大 (P < 0.05)，提示 MI 造模成功；与 MI 组相比，MI+NP 组的 MI% 略有缩小 (P < 0.05)，提示 antimiR34a 纳米颗粒具有下调心梗的作用。

3. Sham 组的 EF 值为 (78 ± 4) %，MI 组 EF 值为 (41 ± 2) %，MI+NP 组 EF 值为 (50 ± 5) %。跟 sham 组相比，MI 组的 EF 值明显缩小 (P < 0.05)，差异有统计学意义；而 MI+NP 组的 EF 值则略有提升 (P > 0.05)，差异无统计学意义。跟 MI 组相比，MI+NP 组的 EF 值有显著提升，P < 0.05，差异有统计学意义。提示 MI 导致 EF 下调及心功能受损，而 antimiR34a 纳米颗粒具有改善心功能的作用。

(二) antimiR34a 纳米颗粒下调 TNF- α 和 caspase3 蛋白水平表达

1. 与 sham 组的 (0.20 ± 0.02) 相比，MI 组的 TNF- α /GAPDH 灰度值比值为 (3.02 ± 0.16)，P < 0.05，提示 TNF- α 表达显著提高，MI 手术致炎症因子水平的增高，可能加重 MI 后心肌重构，导致心功能下降。加入 antimiR34a 纳米颗粒后，MI+NP 组的 TNF- α /GAPDH 比值为 (2.41 ± 0.25)，与 MI 组相比，表达下降，P < 0.05，提示 antimiR34a 纳米颗粒具有下调炎症因子 TNF- α 的作用，减少 MI 后心肌重构的发生，保护心功能。与 sham 组相比，MI+NP 组的 TNF- α /GAPDH 比值仍然较高，提示 MI 造成的炎症因子水平升高并非一过性的，antimiR34a 纳米颗粒通过携带 antimiR34a 可能无法完全控制 MI 致 TNF- α 诱导的炎症风暴。

2. 与 sham 组的 (0.13 ± 0.01) 相比，MI 组的 caspase3/GAPDH 灰度值比值为 (1.98 ± 0.32)，P < 0.05，提示 caspase3 表达显著提高，而 MI 手术致凋亡因子水平的增高，可能加重 MI 后心肌凋亡的发生，导致心功能下降。加入 antimiR34a 纳米颗粒后，MI+NP 组的 caspase3/GAPDH 比值为 (1.14 ± 0.38)，与 MI 组相比有所降低，P < 0.05，提示 antimiR34a

纳米颗粒具有下调凋亡因子 caspase 3 的作用, 规避 MI 后心肌凋亡的发生, 保护心功能。然而, MI+NP 组的 caspase 3/GAPDH 比值依然比 sham 组的高, $P < 0.05$, 提示 MI 造成了心功能的永久性损伤, antimiR34a 纳米颗粒无法完全逆转凋亡损伤。

三、讨论

纳米颗粒的构建、制备与纯化, 本身就是一种挑战。首先就是安全评估。研究表明, antimiR34a 纳米颗粒在动物体内具有较好的亲和性, 不易导致动物因异物或免疫而死亡。作为医工结合研究的热点之一, 纳米材料的选择需要做大量的基础实验工作才能获得进一步的应用。本实验结果发现, 作为一种新型的纳米颗粒, antimiR34a 纳米颗粒具有心肌靶向作用, 的确能够呈递药物直接到达心肌组织, 这与前面的研究结果不谋而合。

同时, 由于该纳米颗粒搭载了 antimiR34a, 具备了抵抗 miR34a 的心脏毒性作用。Boon 等发现, 抑制 miR34a 具有调节心脏衰老和心脏功能的作用, 特别是在急性 MI 的情况下。本实验通过研究发现, antimiR34a 纳米颗粒靶向 MI 小鼠心肌组织, 通过减少梗死范围, 增强 EF, 从而改善心功能, 进一步佐证了 Boon 文献的可靠性与科学性。

然而, 之前的研究多关注于 miR34a 下游基因和蛋白的表达, 主要集中在蛋白磷酸酶 1 核目标亚基 (protein phosphates 1 nuclear targeting subunit, PNUTS)、沉默调节蛋白 1 抗体 (sirtuin type1, SIRT1) 等。之前研究表明, miR34a 在 AMI 后明显升高, 并且可以直接通过抑制靶基 PNUTS 引起心肌细胞 DNA 损伤, 端粒耗损, 从而进一步引起细胞凋亡。研究表明, SIRT1 依赖烟碱腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 的 III 类组蛋白去乙酰化酶, 在心肌细胞中, SIRT1 通过去乙酰化相关因子增强细胞抵抗氧化应激的能力, 减少细胞凋亡, 减轻炎症反应。本实验通过直接评估炎症因子 TNF- α 蛋白水平表达和凋亡因子 caspase 3 蛋白水平, 发现搭载 antimiR34a 的纳米颗粒干预后的 MI 小鼠心肌组织

中 TNF- α 和 caspase 3 蛋白水平均有所下调, 提示通过抑制 miR34a 的确具有减少凋亡、减轻炎症反应的效果, 间接证明与前人文献结果相同。

综上所述, 通过 antimiR34a 纳米颗粒的心肌靶向修复作用, 减轻了 MI 小鼠的心肌细胞凋亡, 减轻心肌炎症, 提高射血分数, 保护心功能。

参考文献

- [1] Claus U Niemann, Fengyun Xu, Soojinna Choi, et al. *Short Passive Cooling Protects Rats During Hepatectomy by Inducing Heat Shock Proteins and Limiting the Induction of Pro-Inflammatory Cytokines* [J]. *Journal of Surgical Research*, 2010,158:43-52.
- [2] Dongchoon Ahn, Linda Cheng, Chanil Moon, et al. *Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice* [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004,286: H1201-H1207.
- [3] Fengmei Pi, Daniel W. Binzel, Tae Jin Lee, et al. *Nanoparticle Orientation to Control RNA Loading and Ligand Display on Extracellular Vesicles for Cancer Regression* [J]. *Nat Nanotechnol*, 2018,13(1):82-89.
- [4] NIU Yayan, ZHOU Tiantian. *Establishment of animal model for acute myocardial infarction and assessment of cardiac function* [EB/OL]. Sciencepaper Online [2018-11-05]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201811-12>.
- [5] Reinier A Boon, Kazuma Iekushi, Stefanie Lehner, et al. *MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function* [J]. *Nature*, 2013, 495(3):107-111.
- [6] Sergio Mateos, José Lifante, Chunyan Li, et al. *Instantaneous In Vivo Imaging of Acute Myocardial Infarct by NIR-II Luminescent Nanodots* [J]. *Small*, 2020, 16(29):1907171.
- [7] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein C. *J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008,105:13421-13426.
- [8] Yang Y, Cheng HW, Qiu Y, et al. *MicroRNA-34a plays a key role in cardiac repair and regeneration following myocardial infarction* [J]. *Circ Res*, 2015,117(5):450-459.

AntimiR34a Nanoparticles Target Myocardial Repair after Myocardial Infarction in Mice

Liu Longmei Wang Zhongchao Chai Zhaoqin Yang Yanyan Han Xuebin

Abstract: Objective To explore the application of RNA nanotechnology in targeted therapy for myocardial infarction. The antimiR34a nanoparticles were selected to observe their myocardial targeting effect and their role in myocardial repair. Methods C57BL/6J mice were randomly divided into three groups: sham group, myocardial infarction group, and myocardial infarction+antimiR34a nanoparticles group. The infarction was assessed by immunohistochemistry and echocardiography, the distribution of antimiR34a nanoparticles in mice was observed by small animal live imaging system, and post-infarction myocardial repair was assessed by measuring infarct area, testing ejection fraction, detecting TNF- α and caspase 3 levels. Results AntimiR34a nanoparticles were mainly distributed in the myocardial tissue of mice; compared with the sham group, the myocardium at the ligation site of mice in the infarct group became thinner, with reduced local motion and significantly reduced ejection fraction ($P<0.05$), and the levels of TNF- α and caspase 3 were significantly increased ($P<0.05$); compared with the myocardial infarct group, the myocardial infarction + antimiR34a nanoparticles group showed a significant increase in ejection fraction ($P<0.05$) and a significant decrease in TNF- α and caspase 3 levels ($P<0.05$), but they were still high compared with the sham group. Conclusion AntimiR34a nanoparticles target the myocardium and improve cardiac function, lowering TNF- α and caspase 3 levels, and exerting myocardial repair effects in mice with myocardial infarction.

Key words: nanoparticles; myocardial infarction; myocardial repair in mice; antimiR34a