

# 微小 RNA 及心脏表观基因组在心力衰竭机制中的研究策略

马超群 宋晓伟 严振鹏 肖良 赵仙先

**【摘要】** 近年来,对以微小 RNA 为代表的非编码 RNA 以及心脏表观基因组的研究成为心力衰竭机制研究的重要方向。该文主要介绍不同类型靶点的研究方法与进展,如功能缺失模型的建立、高通量染色质构象捕捉技术、内源性竞争 RNA 等,为研究心力衰竭机制提供新思路。

**【关键词】** 心力衰竭;微小 RNA;表观基因组

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.06.006

心力衰竭(心衰)是多种心血管疾病的终末阶段,是全球慢性心血管疾病防治的重要内容。压力超负荷及各种病理因素可以引起心肌肥大,主要表现为细胞体积增大、蛋白合成增加、肌节聚集以及胎儿基因的再次激活,严重的病理性心肌肥大会导致心功能不全和猝死<sup>[1]</sup>。近年来有关心衰发生机制基因水平的研究,为临床治疗提供了新的靶点和思路<sup>[2]</sup>。其中,微小 RNA(miRNA)凭借切割靶 mRNA 或抑制靶基因翻译等重要作用受到广泛关注,在此基础上,发挥“miRNA 海绵”作用的长链非编码 RNA(lncRNA)和环形 RNA(circRNA)也成为心衰机制研究中的新热点<sup>[3]</sup>。此外,对心脏表观基因组的研究也在逐渐深入,新的研究手段层出不穷<sup>[4]</sup>。本文主要介绍在心力衰竭机制研究中,对相关 miRNA 及表观基因组可采用的不同研究方法,即功能缺失模型的建立<sup>[5]</sup>、高通量染色质构象捕捉技术(high-resolution chromosome conformation capture, Hi-C),并对 lncRNA 及 circRNA 围绕 miRNA 开展的竞争性内源 RNA(ceRNA)策略进行简略介绍<sup>[6]</sup>。

## 1 过表达或功能缺失模型研究 miRNA 对心衰的作用

MiRNA 是一类内生的、长度约为 20~24 bp 的非编码 RNA,可以通过 miRNA-RNA 诱导沉默复

合体抑制靶细胞转录本的翻译过程,具有多种重要的调节功能<sup>[7]</sup>。它对靶基因 mRNA 的作用主要取决于其与靶基因转录体序列互补的程度,有 3 种方式:(1)切断靶基因的 mRNA,miRNA 与靶基因完全互补结合,作用方式和功能与小干扰 RNA 非常相似,最后切割靶 mRNA;(2)抑制靶基因的翻译,作用时与靶基因不完全互补结合,阻遏翻译但不影响 mRNA 的稳定性,这种 miRNA 是目前发现最多的种类;(3)结合抑制,具有以上两种作用模式,当与靶基因互补结合时,直接靶向切割 mRNA;当与靶基因不完全结合时,调节基因表达<sup>[8]</sup>。

研究 miRNA 对心衰的作用,首先需要确定研究对象,即何种 miRNA 家族。可通过主动脉缩窄实验构建不同时间段的压力超负荷或心衰模型,通过微阵列探索心衰模型中不同 miRNA 的表达特点,筛选表达上调或下调较为明显的 miRNA 作为研究对象。若实验前通过查阅文献等方式已确定研究对象,可通过微阵列技术描述其在心衰模型中的表达情况,对假设进行初步验证<sup>[9]</sup>。

### 1.1 从细胞水平研究 miRNA 在心衰中的作用

通过用目标 miRNA 过表达的腺病毒转染心肌细胞构建 miRNA 过表达模型,通过反义寡核苷酸下调 miRNA 的表达建立 miRNA 功能缺失模型,然后对模型心肌细胞进行免疫组化、qRT-PCR、Northern blot 等检测,观察目标 miRNA 的表达情况是否符合实验预设要求,测定心肌细胞体积、mRNA 及蛋白质的种类与数量变化情况<sup>[10]</sup>。若作用效果不明显或为使实验结果更全面准确,可对细

基金项目:国家自然科学基金(81570208)

作者单位:200433 上海,海军军医大学长海医院心血管内科(马超群,宋晓伟,赵仙先);200433 上海,海军军医大学海军医学系(严振鹏,肖良)

通信作者:赵仙先,Email:13601713431@163.com

胞进行苯肾上腺素预处理,观察 miRNA 对心肌细胞各指标上调或下调的情况,在苯肾上腺素作用的基础上探究 miRNA 对心衰的作用<sup>[11]</sup>。

## 1.2 从整体动物水平研究 miRNA 在心衰中的作用

整体动物水平研究主要是建立基因敲除动物模型,在用限制性核酸内切酶敲除目标基因的同时必须保证其他转录序列(包括增强子、外显子)的完整性,通过同源杂交得到杂合子及纯合子目标 miRNA 敲除的动物模型。之后进行 Southern blot 测定转基因动物的 DNA 水平,RT-PCR 检测目标 miRNA 及相关 RNA 的变化<sup>[12]</sup>。根据具体 miRNA 对于关键蛋白调控的预测,从整体动物水平进行验证,例如对钙离子通道相关靶基因的研究,可通过行心脏超声、整体与离体心功能测定、心肌细胞钙离子测定等,明确该基因的整体作用<sup>[13]</sup>。同理,若作用效果不明显或为使实验结果更全面准确,可用苯肾上腺素对实验动物进行预处理,观察各指标的变化情况。

## 2 Hi-C 研究表观基因组变化在心衰中的作用

Hi-C 是以高通量测序为手段的染色质构象捕捉(chromosome conformation capture, 3C)技术,主要步骤是先制备适合 Hi-C 的 3C 模板,采用限制酶切割后,在其末端连接生物素标记的核苷酸,经钝端连接后,用 DNA 纯化剪切,进行生物素拉下实验(pull-down assay),以保证只有连接的部分用于分析。将特定的读长定位到基因组上,当发现这一对读长出现在不同片段上时,对这些片段进行相应评分,从而构建一个包含基因组所有片段的连接矩阵<sup>[4]</sup>。通过 Hi-C 试验,研究者发现核内存在特定的染色质区隔,染色质和异染色质位于不同的区域(Open 区和 Close 区)。总之,Hi-C 方法是在全基因组范围内,不限制特定互作蛋白,利用高通量测序(二代或三代)进行的基于“全对全”模式的染色质互作构象分析方法<sup>[14]</sup>。

表观遗传修饰作用于细胞内的 DNA 和其包装蛋白、组蛋白,调节基因组功能,表现为 DNA 甲基化和组蛋白的翻译后修饰,这些分子标志影响了染色体的架构、完整性和装配,同时也影响了 DNA 接近它的调控元件,以及染色质与功能型核复合物的相互作用能力<sup>[15]</sup>。心血管疾病与心脏表观基因组的变化有关,但是心肌细胞染色质组的内在结构尚不明确,因此通过 Hi-C 技术研究心脏中表观基因

组的变化有利于探究心衰发生机制<sup>[16]</sup>。

## 2.1 借助染色质结构蛋白验证染色质结构变化参与心衰发生

构建特异性敲除心肌细胞染色质结构蛋白的转基因动物模型,观察其是否发生心衰,并进行相应指标的测定,以探索这种蛋白在染色质结构和心脏表型中的作用<sup>[17]</sup>。对心功能不全患者行左室辅助装置治疗,在减轻心脏机械负荷后检测结构蛋白的表达情况,进一步验证染色质结构变化与心衰发生、发展的关系<sup>[4]</sup>。

## 2.2 病理状态下全基因组水平染色质构象捕捉与 DNA 测序

首先,通过染色质结构分析心肌细胞染色质内与染色质间的相互作用,确定合适的分辨率,为心脏表观基因组研究提供信息基础<sup>[18]</sup>。为研究心衰发展过程中心脏表观基因组的功能变化机制,可对压力超负荷诱导或者特异性敲除心肌细胞染色质结构蛋白的心肌肥大细胞,进行全基因组水平的染色质构象捕捉与 DNA 测序。研究发现拓扑关联结构域与分区结合强度发生变化,表明心衰致病基因与周围染色质相互作用的稳定性降低;压力超负荷或去除染色质结构蛋白会改变心脏增强子的远程作用,导致局部染色质与这些功能元件的相互作用发生变化<sup>[19]</sup>。

## 3 ceRNA 策略研究 lncRNA、circRNA 对心衰的作用

lncRNA 是长度>200 bp 的非编码 RNA。研究表明,lncRNA 能够调控基因上游启动子区的转录,抑制 RNA 聚合酶 II 或者介导染色质重构以及组蛋白修饰,影响下游基因的表达,在剂量补偿效应、表观遗传调控、细胞周期调控和细胞分化调控等活动中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。CircRNA 是由非经典剪接方式经过反向剪接形成的,不具有 5'末端帽子和 3'末端 poly(A)尾巴,是以共价键形成环形结构的非编码 RNA。研究发现心脏存在 circRNA,其可以发挥内源性 miRNA 分子海绵的作用,阻断和抑制相应 miRNA 的活性,该类 circRNA 称为心脏相关的 circRNA (heart related circular RNA, HRCR)<sup>[21]</sup>。

CeRNA 策略的依据是 lncRNA、circRNA 能够竞争性结合 miRNA,削弱 miRNA 对目的基因转录和翻译的抑制作用,从而促进 mRNA 翻译成蛋白质<sup>[22]</sup>。研究 lncRNA、circRNA 对心衰的作用,首先

要确定研究的目的基因或者已知的对心衰发生发展有作用的 miRNA<sup>[23]</sup>。下面以 lncRNA 为例,说明该策略的具体方法。

### 3.1 MiRNA、mRNA 和 lncRNA 的获取与鉴定

首先通过构建主动脉缩窄实验等方法建立病理性心肌梗大或心衰模型,对样本进行微阵列芯片分析,对比正常动物,获得 3 种 RNA 的表达特点,根据与 ceRNA 的作用关系,初步筛选出几种待研究对象<sup>[24]</sup>。在此基础上,用荧光素酶检测技术验证基因和 miRNA 的结合关系,通过表型实验,利用细胞体积及心衰相关蛋白表达等指标,探究或验证目的基因及 mRNA 对心衰的作用,最终确定有研究价值的 miRNA、mRNA 和 lncRNA<sup>[25]</sup>。

### 3.2 验证 lncRNA 与 miRNA 的相互结合作用及基因调控作用

在验证 miRNA 与目的基因之间相互作用以及目的基因对机体表型的影响后,通过 Luciferase 实验等方法,验证 lncRNA 与 miRNA 的相互结合作用<sup>[20]</sup>。之后,在心肌细胞中过表达或者敲减 lncRNA,观察细胞表型(如细胞大小)的变化,检测 miRNA、目的基因 mRNA 及蛋白的变化情况,从而证实 lncRNA 的过表达或者敲减是否影响细胞表型。

在细胞水平实验验证的基础上,建立 lncRNA 基因敲除的转基因动物模型,进一步验证 lncRNA 通过 miRNA 影响心衰相关目的基因的表达,及对心肌细胞和整体动物的心功能的影响<sup>[26]</sup>。

综上所述,miRNA 等非编码 RNA 和心脏表观基因组等领域的发现为心衰研究提供了新方向。然而,上述靶点和相互作用只涉及心衰基因调控机制的一小部分,例如,除了“miRNA 海绵”作用,lncRNA 与 circRNA 还可发挥直接调控基因表达和蛋白质功能、编码蛋白质的作用。因此,对于两种非编码 RNA 的研究方法并不局限于 ceRNA 策略。另外,现有基因水平上的靶点研究普遍局限于单信号通路水平,尚不能形成各条通路相互联系的整体网络,且对钙离子通道等深层次的机制阐述尚不明确。因此,基因水平上的心衰机制研究需要进一步的深入和扩展。

### 参 考 文 献

[1] Gedela M, Khan M, Jonsson O. Heart Failure[J]. S D Med, 2015, 68(9):403-405, 407-409.  
[2] Di Mauro V, Barandalla-Sobrados M, Catalucci D. The noncoding-RNA landscape in cardiovascular health and

disease[J]. Noncoding RNA Res, 2018, 3(1):12-19.  
[3] 刘博,秦永文.与心脏相关的 miRNA 研究[J].国际心血管病杂志,2009,36(1):1-3.  
[4] Rosa-Garrido M, Chapski DJ, Schmitt AD, et al. High-resolution mapping of chromatin conformation in cardiac myocytes reveals structural remodeling of the epigenome in heart failure[J]. Circulation, 2017, 136(17):1613-1625.  
[5] Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults; executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines[J]. J Am Soc Hypertens, 2018, 12(8):579. e1-579. e73.  
[6] 杜艳丽,蒋金法.长链非编码 RNA 在心血管疾病中的研究进展[J].国际心血管病杂志,2017,44(4):199-202.  
[7] Ambros V. The functions of animal microRNA[J]. Nature, 2004, 431(7006):350-355.  
[8] 许旭东. microRNA 在心肌梗厚中的作用[J].国际心血管病杂志,2010,37(6):342-345.  
[9] Tang GL, Yan J, Gu YY, et al. Construction of short tandem target mimic (STTM) to block the functions of plant and animal microRNA[J]. Methods, 2012, 58(2):118-125.  
[10] Heggermont WA, Papageorgiou AP, Quaegebeur A, et al. Inhibition of microRNA-146a and overexpression of its target dihydrolipoyl succinyltransferase protect against pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction[J]. Circulation, 2017, 136(8):747-761.  
[11] Sassi Y, Avramopoulos P, Ramanujam D, et al. Cardiac myocyte miR-29 promotes pathological remodeling of the heart by activating Wnt signaling[J]. Nat Commun, 2017, 8(1):1614.  
[12] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2[J]. Cell, 2007, 129(2):303-317.  
[13] 吴扬,郭媛媛,张元媛,等. H<sub>2</sub>S 对大鼠心肌梗大与 miRNA-113a 和 Ca<sup>2+</sup>/CaN/NFATc4 信号通路的影响[J].中国应用生理学杂志,2018,34(1):29-34.  
[14] Dekker J, Mirny L. The 3D genome as moderator of chromosomal communication[J]. Cell, 2016, 164(6):1110-1121.  
[15] Wang K C, Chang H Y. Epigenomics: technologies and applications[J]. Cir Res, 2018, 122(9):1191-1199.  
[16] Liu M, Aaron D. Metagenomic chromosome conformation capture (3C): techniques, applications, and challenges [J]. F1000Res, 2015, 4:1377.  
[17] Okamoto R, Li Y, Noma K, et al. FHL2 prevents cardiac hypertrophy in mice with cardiac-specific deletion of ROCK2 [J]. Faseb Journal, 2013, 27(4):1439-1449.

- subunit remodeling in a canine heart failure model [J]. Cardiovasc Res, 2005, 66(3):472-481.
- [15] Li N, Csepe TA, Hansen BJ, et al. Molecular mapping of sinoatrial node HCN channel expression in the human heart [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2015, 8(5):1219-1227.
- [16] Schweizer PA, Yampolsky P, Malik R, et al. Transcription profiling of HCN-channel isoforms throughout mouse cardiac development[J]. Basic Res Cardiol, 2009, 104(6):621-629.
- [17] Hu YF, Dawkins JF, Cho HC, et al. Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block [J]. Sci Transl Med, 2014, 6 (245):245ra94.
- [18] Vedantham V, Galang G, Evangelista M, et al. RNA sequencing of mouse sinoatrial node reveals an upstream regulatory role for Islet-1 in cardiac pacemaker cells[J]. Circ Res, 2015, 116(5):797-803.
- [19] Liang X, Zhang Q, Cattaneo P, et al. Transcription factor ISL1 is essential for pacemaker development and function[J]. J Clin Invest, 2015, 125(8):3256-3268.
- [20] Dorn T, Goedel A, Lam JT, et al. Direct nkx2-5 transcriptional repression of isl1 controls cardiomyocyte subtype identity[J]. Stem Cells, 2015, 33(4):1113-1129.
- (收稿:2018-05-04 修回:2018-09-02)  
(本文编辑:胡晓静)
- 
- (上接第 343 页)
- [18] Sizer AJ, Martin KA. Respecting boundaries: CTCF, chromatin structural organization, and heart failure[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(12):4889-4892.
- [19] Heinz S, Romanoski CE, Benner C, et al. The selection and function of cell type-specific enhancers[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16(3):144-154.
- [20] Li XL, Wu ZQ, Fu X, et al. LncRNA: insights into their function and mechanics in underlying disorders[J]. Mutat Res Rev Mutat Res, 2014, 762:1-21.
- [21] 廉瑞, 宋春莉, 留志贤, 等. 环状 RNA 与心血管疾病研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2017, 44(2):93-95.
- [22] 王霖, 刘洁. 竞争性内源核糖核酸的研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2017, 34(6):967-971.
- [23] Wang K, Long B, Liu F, et al. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223 [J]. Eur Heart J, 2016, 37 (33): 2602-2611.
- [24] Wang K, Liu F, Zhou L, et al. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489 [J]. Circ Res, 2014, 114(9):1377-1388.
- [25] Viereck J, Thum T. Long noncoding RNAs in pathological cardiac remodeling [J]. Circulation Research, 2017, 120 (2):262.
- [26] Han P, Li W, Lin CH, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy[J]. Nature, 2014, 514(7520):102-106.
- (收稿:2018-03-27 修回:2018-10-08)  
(本文编辑:丁媛媛)