

microRNAs 在心肌肥厚中的作用

许旭东综述 秦永文审校

【摘要】 生理或病理性刺激会导致心肌肥厚性生长,表现为心肌细胞增大,蛋白合成增加及胎儿基因的再表达。在心脏中有很多信号分子影响着基因表达、细胞凋亡、细胞因子释放等病理生理过程。利用心肌细胞肥厚模型已经发现病理性心肌肥厚可以被抑制或逆转,这些发现为寻找调控心肌肥厚的因子及信号通路提供了基础。该文着重讨论近年来发现的 microRNAs(miRNAs)在调节心肌肥厚中的作用。

【关键词】 microRNAs; 心肌肥厚; 信号通路; 分子靶点

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2010.06.007

随着人们饮食结构的改变,心血管疾病的发病率呈现逐年上升的趋势,以冠心病、重度心力衰竭为代表的心血管疾病已经成为致死的主要原因^[1,2]。病理性心肌肥厚能够导致心功能受损,是心力衰竭及心源性猝死的主要预测因子^[3]。心肌肥厚是对病理生理状态的适应性反应,如缺血性心脏病、高血压及心力衰竭等^[4],这些疾病通常会导致心肌细胞增大、蛋白合成增多以及肌节结构改变,最终发展为扩张型心肌病、心力衰竭甚至猝死^[5,6]。病理性心肌肥厚在分子水平表现为原癌基因(如 c-jun, c-fos, c-myc)及胎儿期基因,如:心房利钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、 β 肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β MHC)、骨骼肌肌动蛋白(skeletal muscles acting, SKA)的激活^[7-9]。

利用心肌细胞肥厚模型已经发现,病理性心肌肥厚可以被抑制或逆转,这些发现为寻找调控心肌肥厚的因子及信号通路提供了基础。在体外实验中,通过在心肌细胞中过表达或基因敲除 miRNAs 的方法,已发现有一些 miRNAs 参与了心肌肥厚的发生^[10-15]。

1 心肌肥厚的分子基础

心肌肥厚是心力衰竭的独立危险因素^[16]。能够反映心肌细胞肥大的指标主要有原癌基因如 c-jun, c-fos, c-myc 的诱导表达,热休克蛋白基因 HSP70 的表达以及蛋白合成的增加。心肌肥厚的分子基础非常复杂,可能是很多信号转导通路共同作用的结果,神经体液因素刺激或配体与特异性受

体结合后,会激活信号级联通路,最终引起肥厚基因的表达。因此,在心肌肥厚过程中,有很多的细胞外因子以及信号通路参与其中,本文主要介绍 miRNAs 介导的心肌肥厚机制。

2 miRNAs 简介

miRNAs 是近年来发现的一组高度保守的小的非编码 RNA,大小约 18~25 个核苷酸,能在转录后调节基因表达^[18,19]。绝大多数 miRNAs 基因在 RNA 聚合酶 II 的作用下形成较长的茎环结构,称为初级 miRNAs(primary miRNAs, pri-miRNAs)^[20,21]。pri-miRNAs 在 Drosha-DGCR8 复合物的作用下形成长度约 60~70 个核苷酸的发夹状 RNA,称为前体 miRNAs(precursor miRNAs, pre-miRNAs)^[22,23]。随后,pre-miRNAs 在 Exportin-5 复合物的作用下被转运出细胞核,在胞浆中由 Dicer 剪切成为 miRNAs 复合体^[24]。miRNAs 复合体在解螺旋酶的作用下分离,其中一条链装配入 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),与靶 mRNA 的 3' 非翻译区(3'-UTR)结合到位于胞浆的 P-body(processing body)中,通过抑制转录或降解 mRNA 来下调特定 mRNA 的蛋白表达^[24]。如果 miRNAs 与靶 mRNA 匹配完全,则该复合体降解靶 mRNA;若两者序列部分匹配,尤其是 miRNAs 的 5' 端 2~8 个被称为种子序列(seed sequence)的核苷酸与靶 mRNA 匹配完好,则通过抑制靶 mRNA 的翻译来沉默特定基因^[25-27]。此外,某些 miRNAs,如 miR-16 能够特异性地结合到某些基因 3' UTR 的富含 AU 元件(AU-rich element, ARE),指导 Ago2 等组成 RISC 的蛋白与三磷酸胸苷(TTP)结合,从而改变相应 mRNA 的

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院心内科
通信作者:秦永文,Email:QYW2009@163.com

半衰期,加速靶 mRNA 降解。尽管 miRNAs 主要是下调基因表达,但某些情况下,它们也可以通过负性调节抑制基因表达来增加目的基因的表达^[28]。实际上,同样的 miRNAs 在不同的细胞类型或不同的疾病状态下可以调控不同的靶点^[29,30]。

已有研究证明,miRNAs 参与了很多病理生理过程,如骨骼肌细胞的增殖与分化、造血干细胞的分化以及肿瘤的发生^[31]。生物信息学分析表明,每个 miRNAs 能够调节上百个不同的靶点,因此,miRNAs 可能参与了所有的生理过程^[32]。

3 miRNAs 在心肌肥厚中的作用

研究表明,基因敲除体内在 miRNAs 成熟过程中必须的 Dicer 酶会导致小鼠发育停滞,敲除斑马鱼体内的 Dicer 酶会导致异常表型^[33]。研究发现,小鼠 Dicer 酶敲除后心脏表型与临床上扩张型心脏病和心力衰竭患者的心脏表型很相似,这证明在动物的发育及部分病理过程中 miRNAs 是必须的。miRNAs 的表达谱分析表明,发生某些心脏病时,特定 miRNAs 的表达水平发生了明显的变化^[13,14]。

通过动物模型对特定 miRNAs 的研究发现,miRNAs 在心脏发育及病理状态下起着不同的作用。在心衰时,一些只在胎儿期表达的 miRNAs 会再次发达,这种胎儿期 miRNAs 的重新激活可能会活化某些基因,导致心肌的病理性变化。对体外培养的心肌细胞研究表明,过表达一些在心力衰竭时明显上调的 miRNAs 会导致心肌肥厚以及一些肥厚分子的表达增加。对心肌肥厚动物模型 miRNAs 的表达谱变化已有多篇报道。van Rooij 等^[14]首先报道了病理性压力负荷导致心肌肥厚时 miRNAs 的表达会发生变化,他们分析了 186miRNAs,发现在胸主动脉缩窄(transverse aortic constriction, TAC)及钙调蛋白 A 转基因小鼠两个模型中,均下调的 miRNAs 有 7 个,均上调的 miRNAs 有 21 个。在培养的乳鼠心肌细胞中选择性的过表达 miRNAs (miR-23a、miR-23b、miR-24、miR-195、miR-199a、miR-214,这些 miRNAs 在心肌肥厚时均上调)能够诱导细胞的肥厚表型变化,过表达 miR-195 能导致病理性心肌重构及心力衰竭。而过表达心肌肥厚时下调的 miR-150 或 miR-181b 能导致心肌细胞表面积的减小。Cheng 等^[10]发现在心脏中有 157 种 miRNAs,其中 64 种有较高表达,包括 miR-1、let-7、miR-133、miR-126-3p、miR-30c 以及 miR-26a。时间-效应分析显示,在胸主动脉缩窄后 7 d,有 102 种

miRNAs 的表达发生明显变化,其中有 50 种上调,52 种下调。尽管由于技术或模型的不同,在这些报道中变化的 miRNAs 不尽相同,但有些 miRNAs 在很多研究中都发现有明显的异常表达,提示它们在心肌肥厚病理过程中可能发挥着明确的作用,如 miR-1、miR-133、miR-29、miR-30、miR-150 在心肌肥厚时下调,而 miR-21、miR-23a、miR-125、miR-195 在心肌肥厚时上调。

3.1 miR-1/miR-133

小鼠胸主动脉缩窄后心肌组织及苯肾上腺素(phenylephrine, PHE)刺激后心肌细胞的 miR-1/miR-133 均下调。在丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)过表达小鼠及运动训练后的野生型小鼠(两种经典的生理性心肌肥厚模型)的心房肌及心室肌中的 miR-1/miR-133 也都下调,提示无论病理性肥厚还是生理性肥厚,miR-1 和 miR-133 都可能在心肌肥大中发挥了作用^[15]。有研究表明^[34-36],心肌细胞通过腺病毒载体过表达 miR-133a-2 能抑制 PHE 导致的心肌细胞肥厚表型变化。在体实验中,给与能够沉默 miR-133 的反义 RNA 寡核苷酸能够导致心肌肥厚,证明 miR-133 确实在介导心肌肥厚中扮演着重要的角色。对 miR-133 的可能作用靶点分析预测显示,细胞分裂周期蛋白 42(Cdc42)、Rho 激酶 A(Rho-A)及沃尔夫-希尔斯豪恩综合征复合体 2(Wolf-Hirschhorn syndrome complex 2, WHSC2/NELF-A)可能是 miR-133 的下游作用分子。Cdc42 和 Rho-A 在细胞生长、肌纤维重排及心肌收缩功能调节中起作用。WHSC2/NELF-A 是一个转录抑制因子,在 RNA 延伸过程中发挥作用。Sayed 等^[11]发现,miR-1 对压力负荷最为敏感,TAC 后 1 d,心肌组织中 miR-1 的表达即降低,7 d 达最低谷,14 d 时恢复到基线水平。

生物信息学预测 Ras 蛋白三磷酸鸟苷酶活化蛋白(Ras GTPase-activating protein, RasGAP)、细胞周期蛋白依赖激酶 9(cyclin-dependent kinase 9, Cdk9)、脑富集的 Ras 蛋白同源体(Ras homolog enriched in brain, Rheb)及纤连蛋白(fibronectin)可能是 miR-1 的靶基因。实验也证明,心肌细胞过表达 miR-1 能有效抑制细胞的肥厚性生长及 RasGAP、Cdk9、Rheb、fibronectin 的基因表达。

3.2 miR-21

很多研究都报道了心肌肥厚时 miR-21 表达增加。Cheng 等^[10]发现 miR-21 是 TAC 后 7 d 升高

幅度最大的 miRNAs。TAC 1 周以后, miR-21 的表达逐渐下降, 21 d 时基本达到基线水平。Tatsuguchi 等^[12]也发现 TAC 后 14 d miR-21 的表达增加, 28 d 时表达下降。然而, Sayed 等^[11]及 van Rooij 等^[14]发现 TAC 后 14 d 及 21 d miR-21 表达都升高, 小鼠过表达钙神经素后 miR-21 的表达也增加。另外, 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 及 PHE 干预心肌细胞后也能使 miR-21 的表达增加, 而沉默 miR-21 可以抑制细胞的肥厚性生长及胎儿基因的表达。这些实验结果都有力的证明了 miR-21 在心肌肥厚病理过程中起着很重要的作用^[10]。实验证明, 转化生长因子 β 受体 (transforming growth factor- β receptor, TGF- β R) 及程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 可能是 miR-21 的作用靶点^[13]。

3.3 miR-195

心肌细胞或转基因的小鼠心脏中过表达 miR-195 能促进肥厚, 导致扩张型心肌病或心力衰竭的发生^[14], 提示心肌肥厚时上调的 miR-195 在病理进程中发挥了作用。miR-195 属于 miR-15 家族, 包括 miR-15、miR-16、miR-195、miR-424、以及 miR-497。

miR-15a 和 miR-16-1 在大部分慢性淋巴细胞白血病患者中是下调的, 而抗凋亡蛋白 Bcl2 是上调的^[37]。miR-15 及 miR-16 导致的 Bcl2 下调能够促进肿瘤细胞的凋亡^[38]。在心脏中, 参与心肌细胞凋亡的 Bcl2 也能调节心肌衰竭及缺血再灌注损伤等很多病理变化^[39]。因此, miR-15 家族介导的 Bcl2 抑制而导致的心肌细胞凋亡可能与 miR-195 转基因动物心脏扩张表型变化有关。

3.4 miR-208

Olson 等^[14]发现, 在 miR-208 基因敲除的小鼠, TAC 后心脏没有明显增大, β MHC 也没有明显增加, 而其他压力敏感基因如 ANP 及脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 的基因表达水平增加, 提示 miR-208 在压力负荷介导 β MHC 表达及心脏重构中发挥着关键性的作用。研究还发现, miR-208 在甲状腺素导致的 α 肌球蛋白重链 (α -myosin heavy chain, α MHC) 及 β MHC 表达变化中发挥着重要的调节作用。对 miR-208 的靶基因研究发现, 甲状腺素受体相关蛋白 1 (thyroid hormone receptor-associated protein 1, THRAP1) 在 miR-208 敲除的小鼠中表达增加, 可能是其作用靶点。

长期的训练导致的生理性心肌肥厚也表现为

心脏体积的增大^[40]。然而, 对生理性心肌肥厚中 miRNAs 的功能研究还比较少, 有限的报道提示肌肉特异性 miR-1 及 miR-133 在生理性心肌肥厚时下调。这些结果提示不管在病理性心肌肥厚还是生理性心肌肥厚, 一些特异的 miRNAs 有着共同的促肥厚通路。

寻找特异性 miRNAs 的目的基因对于了解心肌肥厚分子的发生机制是必须的。然而, 到目前为止, 只发现有为数不多的 miRNAs 的靶点^[41]。miRNAs 模拟物及 miRNAs 抑制剂在 miRNAs 的功能研究中将会扮演重要的角色。miRNAs 及 miRNAs 靶点的研究将为今后新的心脏病治疗药物的开发提供新的选择。

心肌肥厚是一个复杂的病理过程, 对其机制的探索还有很长的路要走, 将已有的基础研究成果转化为有效的药物治疗具有重大意义。

参考文献

- [1] Frey N, Katus HA, Olson EN, et al. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? [J] Circulation, 2004, 109(13): 1580-1589.
- [2] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, et al. Prognosis implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study[J]. N Engl J Med, 1990, 322(22): 1561-1566.
- [3] McKinsey TA, Olson EN. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 538-546.
- [4] Ho YL, Wu CC, Lin LC, et al. Assessment of the coronary artery disease and systolic dysfunction in hypertensive patients with the dobutamine-atropine stress echocardiography: effect of the left ventricular hypertrophy [J]. Cardiology, 1998, 89(1): 52-58.
- [5] Dorn GW, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation[J]. Circ Res, 2003, 92(11): 1171-1175.
- [6] Aaronson KD, Sackner-Bernstein J. Risk of death associated with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure[J]. JAMA, 2006, 296(12): 1465-1466.
- [7] Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, et al. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure [J]. Circ Res, 2003, 92(2): 139-150.
- [8] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction [J]. N Engl J Med, 2001, 344(23): 1750-1757.
- [9] Passier R, Zeng H, Frey N, et al. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo[J]. J Clin Invest, 2000, 105(10): 1395-1406.

- [10] Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart; do they play a role in cardiac hypertrophy? [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(6):1831-1840.
- [11] Sayed D, Hong C, Chen IY, et al. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2007, 100(3):416-424.
- [12] Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6):1137-1141.
- [13] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart; a clue to fetal gene reprogramming in heart failure[J]. *Circulation*, 2007, 116(3):258-267.
- [14] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(48):18255-18260.
- [15] Carè A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5):613-618.
- [16] Sadoshima J, Takahashi T, Jahn L, et al. Roles of mechanosensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(20):9905-9909.
- [17] Chien KR. Genomic circuits and the integrative biology of cardiac diseases[J]. *Nature*, 2000, 407(6801):227-232.
- [18] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms; growth, death, fat, stress, and timing [J]. *Cell*, 2003, 113(6):673-676.
- [19] Farh KK, Grimson A, Jan C, et al. The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution[J]. *Science*, 2005, 310(5755):1817-1821.
- [20] Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs; a developing story[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(2):200-205.
- [21] Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors[J]. *Mol Cell*, 2004, 16(6):861-865.
- [22] Lee Y, Jeon K, Lee JT, et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization[J]. *EMBO J*, 2002, 21(17):4663-4670.
- [23] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. *Nature*, 2003, 425(6956):415-419.
- [24] Bartel DP. MicroRNAs; genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [25] Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinak S, et al. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation[J]. *Cell*, 129(6):1141-1151.
- [26] Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation[J]. *Cell*, 2005, 122(4):553-563.
- [27] Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, et al. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47):16961-16966.
- [28] Scalbert E, Bril A. Implication of microRNAs in the cardiovascular system[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(2):181-188.
- [29] Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(5):515-524.
- [30] Bauersachs J, Thum T. MicroRNAs in the broken heart[J]. *Eur J Clin Invest*, 2007, 37(11):829-833.
- [31] Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development[J]. *Nat Genet*, 2003, 35(3):215-217.
- [32] Krek A, Grün D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(5):495-500.
- [33] Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish[J]. *Science*, 2005, 308(5723):833-838.
- [34] Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame; a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res*, 2006, 98(6):730-742.
- [35] Ke Y, Wang L, Pyle WG, et al. Intracellular localization and functional effects of P21-activated kinase-1 (Pak1) in cardiac myocytes. *Circ Res*, 2004, 94(2):194-200.
- [36] Mariotti M, Manganini M, Maier JA. Modulation of WHSC2 expression in human endothelial cells. *FEBS Lett*, 2000, 487(2):166-170.
- [37] Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(13):5166-5171.
- [38] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(39):13944-13949.
- [39] Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium [J]. *Curr Probl Cardiol*, 2006, 31(3):181-264.
- [40] Catalucci D, Latronico MV, Ellingsen O, et al. Physiological myocardial hypertrophy; how and why? [J] *Front Biosci*, 2008, 13:312-324.
- [41] Callis TE, Wang DZ. Taking microRNAs to heart[J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(6):254-260.

(收稿:2010-07-19 修回:2010-10-14)

(本文编辑:丁媛媛)