

综述

微小 RNA 和长链非编码 RNA 作为心脏疾病生物标志物的研究进展

李芳卉、李东泽、张蜀、赵立志综述, 曾锐审校

摘要 人类基因组中有超过 85% 的基因转录为核糖核酸 (RNA), 但只有约 2% 的基因转录成编码蛋白质的信使核糖核酸 (mRNA), 其余均为非编码 RNA (ncRNA)。ncRNA 根据长度分为短链 ncRNA [如微小 RNA (miRNA)] 和长链 ncRNA (lncRNA)。目前研究发现 ncRNA 可以通过不同的机制调节心脏功能, 同时其调节异常与心血管疾病的的发生和发展有很大联系。研究显示, 循环血中某些 ncRNA 稳定性良好, 其表达水平异常变化与心血管疾病的病程进展密切相关, 提示循环血中的 ncRNA 具有作为心脏疾病生物标志物的潜在价值。故本文对循环血液中 miRNA 和 lncRNA 作为心脏疾病生物标志物的进展进行综述。

关键词 综述; 微 RNAs; 长链非编码 RNA; 心血管疾病

非编码 RNA (ncRNA) 是指转录组中不编码蛋白的功能性 RNA 分子, 分为两类: 短链 ncRNA [如微小 RNA (miRNA, 核苷酸数小于 200)] 和长链 ncRNA (lncRNA, 核苷酸数大于 200)。近年来, 在基因组学中发现, 部分 ncRNA 在人类基因调控中发挥着重要作用, 包括心血管疾病的发生和发展^[1, 2]。研究显示, 循环血中某些 ncRNA 稳定性良好, 其表达水平异常变化与心血管疾病的病程进展密切相关, 提示循环血中的 ncRNA 具有作为心脏疾病生物标志物的潜在价值。本文对循环血液中 miRNA 和 lncRNA 在心脏发育中的作用及作为心脏疾病生物标志物的进展进行综述。

1 miRNA 和 lncRNA 概述

1.1 miRNA

miRNA 是一类由内源基因编码的在进化上高度保守的单链非编码小分子 RNA, 长度约为 20~24 nt。miRNA 通过完全或不完全互补配对的方式结合于靶基因, 从而导致靶基因的降解或翻译抑制。人体内已发现 2000 多个 miRNA, 调节 60% 的人类基因^[3]。

大多数 miRNA 在 RNA 聚合酶 II 的作用下转录成初级 miRNA (pri-miRNA)^[4]。在核糖核酸酶 III Drosha 酶与 RNA 结合蛋白协同作用下, pri-miRNA 加工成为具有茎环结构的 pre-miRNA。随后, pre-miRNA 由细胞核转运至细胞质, 在 Dicer 酶和辅助因子 TRBP 协同作用下, pre-miRNA 加工成为成熟 miRNA 双链。双链 miRNA 在解螺旋酶的作用下分离, 一条成为功能性 miRNA, 另一条被降解。

1.2 lncRNA

lncRNA 是长度大于 200 个核苷酸的 ncRNA。人类 lncRNA 数量预计与蛋白质编码基因的数量相似^[5]。根据 lncRNA 与蛋白质编码基因的位置关系, 分为以下几类^[6]: (1) 基因间 lncRNA; (2) 基因内 lncRNA; (3) 双向 lncRNA; (4) 内含子 lncRNA; (5) 正义 lncRNA; (6) 反义 lncRNA。

lncRNA 通常有较长的序列, 经过剪接, 具有 polyA 尾巴与启动子结构, 分化过程中有动态的表达与不同的剪接方式, 可以与靶基因建立核域并且结合蛋白质从而形成 RNA-DNA-蛋白质复合物^[6]。因此, lncRNA 可以通过更多样的机制来抑制或激活基因的表达^[7]。lncRNA 参与调节多种重要的细胞活动, 如基因表达、基因组印记 (H19)、招募染色质修饰物、调节 X 染色体失活 (XIST)、蛋白质活性和蛋白质折叠等^[8]。

2 miRNA

2.1 miRNA 在心脏中的生物学功能

在心脏发育过程中, miRNA 动态表达, 调整了心脏重要基因的表达水平, 在促进心力衰竭, 心肌肥厚, 纤维化和缺血/再灌注损伤的基因表达变化中起着关键作用^[9]。研究发现, Dicer 酶基因敲除小鼠血管新生与形成以及心脏发育均受阻。敲除 Dicer 的小鼠心脏特异性 miRNA 表达普遍下降, 小鼠出生后死于扩张型心肌病和心力衰竭^[10, 11]。这些研究提示 miRNA 对心血管系统的发育和生理功能的维持方面是必不可少的^[12]。

心肌收缩力取决于肌球蛋白重链 (MHC) 基因的表达。MHC 表达从快收缩肌球蛋白 (a 型) 向慢收缩肌球蛋白 (b 型) 的转化是心血管疾病的一个重要标志。miR-208a 和 miR-208b 是心脏特异性表达 miRNA, 分别由 a-MHC (Myh6) 和 b-MHC (Myh7) 的内含子编码。奥尔森实验室对 miR-208 突变型小鼠与野生型小鼠进行比较^[13], 得出 miR-208 通过一种涉及甲状腺激素的机制来特异性增强 b-MHC 的表达, 对心肌肥大信号的表达起着关键作用。

miR-1 和 miR-133 是两个高度保守的、特异性表达于肌肉组织的 miRNA, 成簇存在于同一个多顺反子内, 参与肌肉形成、心脏发育和心肌肥厚的发生^[14]。在心肌肥厚模型中观察到 miR-1 和 miR-133 水平的下降^[15]。miR-1 抑制 HAND2 的表达, 从而抑制心肌细胞增殖, 促进心肌细胞分化, 减轻心肌细胞的肥大^[16]。利用转基因小鼠模型做进一步研究, 发

基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研项目 (16PJ305); 泸州-西南医大联合基金项目 (2016LZXNYD-J04)

作者单位: 610041 四川省成都市, 四川大学华西临床医学院华西医院 急诊科 (李芳卉、李东泽、张蜀), 心脏内科 (曾锐); 西南医科大学第二附属医院 心脑血管科 (赵立志)

作者简介: 李芳卉 住院医师 学士 主要从事心血管疾病基础和临床研究 Email: 551801146@qq.com 通讯作者: 曾锐 Email: zengrui_0524@126.com

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614 (2017) 11-1131-03 doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2017.11.024

现 miR-133 调节 B1 肾上腺素能途径的多个组件并且在心力衰竭时起到保护作用^[17]。miR-1 通过影响钾离子通道亚单位 Kir2.1 和心脏间隙链接通道蛋白 Cx43 而参与心脏电传导的调节^[18]。Vacchi-Suzzi 等^[19]通过对 miRNA 测序, 研究不同物种(大鼠, 狗和猴)的心脏特异性 miRNA, 确定了心脏特殊结构中的保守 miRNA 的特征; 利用原位杂交技术确认了 miR-1, miR-125b-5p 和 miR-204 的表达模式。

2.2 循环 miRNA 的生物标志物作用

血浆中存在大量的核糖核酸酶(RNAses), 当 miRNA 与血浆结合后就会被迅速降解^[20], 然而循环血液中的某些 miRNA 在一定时间内并不受其影响, 仍可保持较好的稳定性和较高的表达量, 提示循环血液中测量到的 miRNA 是通过各种载体而稳定存在的。综合已有的研究分析, 循环 miRNA 可能通过如下途径稳定存在:(1) 胞外囊泡根据大小, 胞外囊泡被分为外泌体(Exosomes)和微泡(Microvesicles)。胞外囊泡的成分包括 DNA、mRNA、ncRNA、蛋白质和脂质。当外周环境变化时, 胞外囊泡的成分也会发生相应的改变^[21]。胞外囊泡通过交换信号分子来介导细胞间的通信。(2) 蛋白质复合物: 对体液 miRNA 进行超速离心法纯化后发现, 部分 miRNA 通过形成 miRNA-蛋白质复合物而免遭破坏。进一步研究得到, miRNA-蛋白质复合物的形成与 argonaute-2(Ago2) 酶有关^[22]。近期研究表明, miRNA 可以主动或被动地从细胞中释放。

对不同的心脏病患者的血液进行检测, 得出 miRNA 的含量水平有所不同。对急性心肌梗死(AMI)中心脏特异性循环 miRNA 进行研究显示, AMI 患者心肌梗死后 1 h 内, 血浆 miR-208a 水平升高; 4h 内, 血浆 miR-1、miR-133 和 miR-499 水平升高; 但在健康对照组、肾梗死患者组、与非 AMI 胸痛患者组的血浆中未发现升高^[23]。因此, miR-208a 是一个具有高度灵敏性和特异性的 AMI 生物标志物。对 miR-208b 进行研究, 显示其在 AMI 患者血浆中增加了 1600 倍^[24]。在对 AMI 患者进行了 3 个月的治疗后, miRNA 峰值发生逆转, 下降至低于检测极限^[25]。以上研究结果表明 miR-1, miR-133a, miR-499, miR-208a 和 miR-208b 具有作为心血管疾病心肌损伤的生物标志物的潜能。

3 lncRNA

3.1 lncRNA 在心脏中的生物学功能

虽然对 lncRNA 功能和作用机制的研究尚处于起步阶段, 但已有的一些研究提示 lncRNA 作为一种新的生物调节模式与心血管疾病有着密切的联系。

心脏发育研究表明, 胚胎在不同发育阶段 lncRNA 的表达存在较大差异, 很可能是参与正常心脏发育的新机制^[26]。在中胚层发现并与小鼠心脏发育相关的两个 lncRNA——Bvht (brave heart) 和 Fendrr (Foxf1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA) 显现出尤为重要的作用。Bvht 在小鼠胚胎干细胞和新生小鼠心肌细胞中高度表达。利用核糖核酸干扰(RNAi) 对小鼠胚胎干细胞中 Bvht 进行敲除, 发现 Bvht 的缺失影响了心肌特异性基因的表达, 改变了心肌细胞的发育。Fendrr 是一个侧中胚层特异性的 lncRNA, 控制着中胚层的分化, 通过连接组蛋白重复合体 PRC2 和 TrxG/MLL 使其分化成为心脏和体壁^[27]。对胚胎细胞中 Fendrr 进行完全敲除, 出现由于心脏功能损伤导致胚胎致死的现象, 同时会影响体壁的发育。进一步的机制研究发现, Fendrr 在表观水平调控许多重要基因

的表达, 例如 GATA-6、PRC2 等^[26]。

几个全基因组研究证实了 lncRNA 和心血管疾病之间的其他联系。lncRNA 心肌梗死相关转录本(MIAT)的改变与心肌梗死的易感性有关^[28]。心肌细胞凋亡相关 lncRNA(CARL)通过“海绵”作用与 miR-539 结合和分离抑制线粒体分裂和凋亡改善心肌缺血-再灌注损伤后的心肌梗死。INK4 基因座反义 lncRNA(ANRIL)与动脉粥样硬化性血管病敏感性有关^[29]。另外, ANRIL 离体敲除系统表示 ANRIL 在葡萄糖和脂肪酸代谢调控基因的表达中起着重要的作用^[30]。肌球蛋白重链相关 RNA 转录子(Myheart 或 Mhrt)位于心肌细胞核, 并在心脏负荷过程中调节病理性心肌肥大和心力衰竭^[31]。心肌肥厚相关因子(CHRF)可以作为一个“分子诱饵”或“miRNA 海绵”来隔绝 miR-489, 其中包括对靶点髓样分化初始应答基因 88(Myd88)进行转录抑制, 调控心肌肥厚。

3.2 循环 lncRNA 的心脏生物标志物作用

lncRNA 可能以胞外囊泡或蛋白质复合物形式进入人体循环系统中, 形成循环 lncRNA 稳定而广泛存在于体液中。新近研究发现, lncRNA 的表达具有组织特异性, 可作为心血管疾病早期诊断的生物标志物。

Kumarswamy 等^[32]对有/无左心室重塑患者血浆样品中的 lncRNA 进行筛查, 发现 lncRNA uc022bqs.1(LIPCAR)是心肌梗死后心肌重塑的相关因素。慢性收缩性心力衰竭患者血浆中 LIPCAR 异常表达, 且与其心血管病死率密切相关, 可以作为一种新型的心肌重塑标志物。另一项研究使用 PCR 技术量化了心肌梗死患者全血样本中五种 lncRNA(aHIF, ANRIL, KCNQ1OT1, MIAT, MALAT1)的水平^[33]。显示, 除 MIAT 失调外, aHIF、KCNQ1OT1 和 MALAT1 增加, ANRIL 减少。lncRNA 的表达谱在 ST 段抬高型和非 ST 段抬高型心肌梗死患者之间也有所不同。

Yang 等^[34]对进展型心衰和行支架手术的左心室组织进行研究, 发现其基因转录本异常表达, 并且与 mRNA 和 miRNA 不同的是, lncRNAs 的表达可以区别不同原因所致的心力衰竭, 在行支架手术后的组织中异常表达更明显。

Xu 等^[35]采集了 20 例心房颤动患者的血液样本, 应用人类 lncRNAs 阵列进行分析, 发现有 153 个 miRNA 和 177 个 lncRNAs 差异性表达, 其中 lncRNAs NONHSAT040387 上调和 NONHSAT098586 下调最为显著, 应用 GO 和 KEGG 信号通路分析, 对 lncRNAs NONHSAT040387 和 NONHSAT098586 在心房颤动的调控功能做进一步探索, 结果发现蛋白质异源二聚体活性和氧转运体活性可能参与心房颤动发病机制, 但与这两个 lncRNAs 表达和功能的关系有待进一步研究。

以上研究均表明 lncRNA 在心血管疾病的发病机制中有着重要的作用, 但是其具体的作用机制还需进一步的研究来阐明。

4 总结与展望

循环 microRNA 水平与人类心血管疾病的关联很大, 但是循环 lncRNA 作为生物标志物的研究才刚刚起步。目前对于 ncRNA 功能研究方法学较为成熟, 能够对其在心血管疾病中的功能进行系统研究, 但是作为生物标志物, 需要更多的大样本临床研究进行验证, 同时能否解决循环中 ncRNA 的快速检测等问题, 也将影响 ncRNA 作为心血管疾病诊断和评估预后的高效生物标志物的临床运用。

参考文献

- [1] TaftRJ, Pang KC, Mercer TR, et al. Non-coding RNAs: Regulators of disease. *Pathol*, 2010, 220: 126-139.
- [2] Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*, 2012, 482: 339-346.
- [3] Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19: 92-105.
- [4] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 509-524.
- [5] KapustaA, Feschotte C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. *Trends Genet*, 2014, 30: 439-452.
- [6] Devaux Y, Zangrando J, Schroen B, et al. For the cardioline n. 2015. Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12: 415-425.
- [7] 刘岗, 黄晓红. 长链非编码核糖核酸在心脏发育及心血管疾病中的作用研究进展. *中国循环杂志*, 2014, 29: 312-314.
- [8] Hung T, Chang HY. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol*, 2010, 7: 582-585.
- [9] Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, et al. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: Role for miR-499. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3: 426-435.
- [10] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking microRNA-1-2. *Cell*, 2007, 129: 303-317.
- [11] Chen JF, Murchison EP, Tang R, et al. Targeted deletion of dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105: 2111-2116.
- [12] Kataoka M, Wang DZ. non-coding RNAs including microRNAs and lncRNAs in cardiovascular biology and disease. *Cells*, 2014, 3: 883.
- [13] van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 2007, 316: 575-579.
- [14] 唐宇宁, 彭瑜, 张钰. 微小核糖核酸在急性心肌梗死诊断和治疗中作用的研究进展. *中国循环杂志*, 2015, 30: 1018-1020.
- [15] Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42: 1137-1141.
- [16] Sayed D, Hong C, Chen IY, et al. microRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 2007, 100: 416-424.
- [17] Castaldi A, Zaglia T, Di Mauro V, et al. microRNA-133 modulates the b1-adrenergic receptor transduction cascade. *Circ Res*, 2014, 115: 273-283.
- [18] Yang B, Lin H, Xiao J, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*, 2007, 13: 486-491.
- [19] Vacchi-Suzzi C, Hahne F, Scheubel P, et al. Heart structure-specific transcriptomic atlas reveals conserved microRNA-mRNA interactions. *PLoS ONE*, 2013, 8: e52442.
- [20] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105: 10513-10518.
- [21] Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. microRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*, 2012, 13: 358-369.
- [22] Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, et al. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 7223-7233.
- [23] D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart*, 2010, 31: 2765-2773.
- [24] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3: 499-506.
- [25] Akat KM, Moore-McGriff DV, Morozov P, et al. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proc Natl Acad Sci*, 2014, 111: 11151-11156.
- [26] Grote P, Wittler L, Hendrix D, et al. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell*, 2013, 24: 206-214.
- [27] Leung A, Trac C, Jin W, et al. Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2013, 113: 266-278.
- [28] Ishii N, Ozaki K, Sato H, et al. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet*, 2006, 51: 1087-1099.
- [29] McPherson R, Pertsemlidis A, Kavazlar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*, 2007, 316: 1488-1491.
- [30] Bochenek G, Hasler R, Mokhtari NE, et al. The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Hum Mol Genet*, 2013, 22: 4516-4527.
- [31] Han P, Li W, Lin CH, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*, 2014, 514: 102-106.
- [32] Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res*, 2014, 114: 1569-1575.
- [33] VausortM, Wagner DR, Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circ Res*, 2014, 115: 668-677.
- [34] Yang KC, Yamada KA, Patel AY, et al. Deep RNA sequencing reveals dynamic regulation of myocardial noncoding RNA in failing human heart and remodeling with mechanical circulatory support. *Circulation*, 2014, 129: 1009.
- [35] Xu Y, Huang R, Gu J, et al. Identification of long non-coding RNAs as novel biomarker and potential therapeutic target for atrial fibrillation in old adults. *Oncotarget*, 2016, 7: 10803-10811.

(收稿日期:2017-04-06)

(编辑:王宝茹)