

microRNA 与心脏疾病

刘惠彬 沈亚琪 钟照华*

(哈尔滨医科大学微生物学教研室, 哈尔滨 150081)

摘要 microRNA是植物和动物基因组编码的小分子非编码RNA。这种高度保守、长21~25个碱基RNA分子通过与mRNA的3'非编码区结合来调控基因组表达。microRNA通过其转录后调控机制在胚胎发育、细胞增殖、细胞分化、细胞死亡及细胞凋亡中发挥调控作用。近期研究发现, microRNA的异常表达可导致心脏疾病的发生、发展。现对microRNA在心脏发育、心肌肥厚和心肌重构、心力衰竭和心律失常等过程中的作用进行综述。

关键词 microRNA; 心脏病; 心肌肥厚; 心力衰竭; 心律失常

1993年, Lee等^[1]在秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)细胞中发现1个22核苷酸(nt)的小分子非编码RNA, 这个被称为lin-4的小RNA分子能调节线虫细胞发育时序。其后, Reinhart等^[2]在线虫中发现了另一个类似的具有转录后调节功能的小分子RNA (*let-7*)。由于二者均具有时序调节功能, 当时被称为小时序RNA (small temporal RNA, stRNA)。此后许多实验室通过分子克隆及生物信息学分析从拟南芥、线虫、果蝇、家鼠、人类等多种生物中发现了300余种这类小分子RNA, 并将这些非编码小分子RNA统称为微小RNA, 即microRNA或miRNA。

目前发现超过一千个microRNA, 其中只有少数microRNA功能得到了确定。相对于其他生物, 人类microRNA的数量和功能更为复杂。近几年的研究表明, microRNA在一些常见心脏疾病的发生、发展中起了关键作用。

1 microRNA的编码、功能和作用机制

microRNA是内源性的非编码小RNA, 大小约为21~25个碱基的单链小分子。microRNA主要由位于染色体上基因之间非编码区域的序列编码, 经RNA聚合酶II的作用生成pri-microRNA, pri-microRNA被Drosha-DGCR8复合体切割, 形成长约60~70 nt的pre-microRNA^[3-4]。转运到胞质后, 最终在Dicer酶作用下形成一个短双链RNA片段, 其中的一条链生成成熟microRNA, 另一条链则会被降解。也有一定数量的pre-microRNA来自于mRNA的内含子或者外显子序列, 经过类似的加工过程生成成熟的microRNA^[5]。

多数microRNA以核蛋白复合物(ribonucleoprotein

complex, miRNP)的形式与靶mRNA特异性结合, 通过对mRNA的降解或者翻译抑制中的一种方式来使靶基因沉默。如果mRNA与microRNA完全互补, microRNA就指导mRNA在特异性位点断裂。植物中, microRNA与靶mRNA完全或几乎完全互补, 通过RNA干扰机制切割、降解靶mRNA^[6]。在动物细胞中, microRNA与mRNA没有足够的互补性, microRNA通过特异性识别靶mRNA的3'-UTR与之结合, 抑制靶mRNA的翻译^[5,7]。

microRNA是细胞的一种转录后调控机制, 参与生命过程中一系列的重要进程, 包括早期胚胎发育、细胞增殖和细胞死亡、细胞凋亡、脂肪代谢、细胞分化、神经分化、病毒感染机制及肿瘤的发生发展等方面^[5]。microRNA的调控是转录后的精细调控机制^[5]: ①较蛋白质水平调控更节省能量; ②相对于转录调节, microRNA的效果更快而且是可逆的; ③microRNA的转录后调控可以对一些微量蛋白表达进行精细控制, 例如1~2个mRNA拷贝参与表达就足以过量的情况, microRNA可以精确调控蛋白质合成的水平; ④内含子中编码的microRNA是一种细胞内资源的高效利用。

microRNA与siRNA同属非编码小分子RNA, 二者有很大的相似性, 但也存在着明显的区别。microRNA与靶RNA由不同基因组序列编码, siRNA与其靶

收稿日期: 2008-04-07 接受日期: 2008-06-26

中国博士后科学基金会博士后科学基金(No.20060390811)、哈尔滨市科技攻关课题(No.2005AA9CS116-16)、黑龙江省教育厅科研项目(No.11511159)资助

*通讯作者。Tel: 0451-86685122, E-mail: zhonghmu@gmail.com

RNA 序列由相同的基因序列编码^[7]。

2 microRNA 与心脏疾病

microRNA 与人类癌症的发生、发展有密切关系。研究发现在慢性淋巴细胞白血病患者中发现 miR-15 和 miR-16 的表达有缺失或下调现象存在^[8]。在人类肺癌中 Let-7 低量表达^[9]；在肺癌细胞系中 miR-26a 和 miR-99a 低量表达^[10]；在结、直肠肿瘤形成中 miR-143 表达减少^[11]；miR-125b-1 的缺失可导致肺癌、乳腺癌或子宫颈癌^[12]，Sonoki 等^[13]发现 miR-125b-1 与白血病的发生也有关。总之，在一些人类恶性肿瘤中，包括慢性淋巴细胞白血病、儿童 Burkitt 淋巴瘤、胃癌、肺癌和大细胞性淋巴瘤等，microRNA 基因表达均有所改变^[14]。

研究表明^[15-26]，microRNA 在正常和患有心脏疾病小鼠的心脏中有特征性表达，microRNA 参与了心脏发育、心肌重构、心力衰竭和心律失常等发生和发展。

2.1 microRNA 与心脏发育

Zhao 等^[15]发现 miR-1-2 在心肌和骨骼肌组织中大量表达，在心脏发育过程中，过量表达 miR-1 可以显著减少具有扩增能力的心室肌细胞的数量。对靶向剔除 miR-1-2 基因的 C57BL/6 小鼠(miR-1-2-null 小鼠)的观察^[16]发现，50% 的 miR-1-2-null 小鼠断奶后即死亡，miR-1-2-null 小鼠的大体心脏形态仅零星可见心脏变大，但心脏横断面的组织学观察显示，半数的 miR-1-2-null 小鼠有心室穿孔。miR-1-2-null 小鼠的心脏电生理亦异常，表现为心率减缓、心房心室去极化间期缩短、心室去极化显著延缓等。

Hand2 是碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录调控因子，是胚胎期心室肌扩增的关键调控因子。Zhao 等^[15]经过靶点搜寻发现，miR-1 可以靶向作用 Hand2 基因的表达，提示 miR-1 的异常表达可以通过影响 Hand2 的表达而导致胚胎发育初期心肌前体细胞的扩增受限，进而造成心室没有足够心肌细胞而发展为畸形。上述结果证明 miR-1-2 对心脏形态发育具有极为重要的调控作用，miR-1-2 的表达异常可导致先天性心脏病。

2.2 microRNA 与心肌肥厚

成年人心肌细胞由于损伤或牵拉会发生肥厚性生长应答，其特征是细胞增大、蛋白质合成增强、肌原纤维聚集以及胚胎基因再活化，进而导致心肌重构，常以心力衰竭和猝死而告终。为探讨 microRNA

在心肌肥厚和心力衰竭过程的作用，van Rooij 等^[17]用微阵列芯片观察了 2 个心肌肥厚小鼠模型的心肌 microRNA 表达谱，发现用胸主动脉部分缩窄增加后负载的方式诱导建立的心肌肥厚小鼠模型的心肌有 27 种 microRNA 表达上调，而在表达活化钙调神经磷酸酶(activated calcineurin)的转基因心肌肥厚小鼠模型的心肌中有 33 种 microRNA 表达上调，二者有 21 种上调 microRNA 是共同的；相应地，2 个模型心肌中分别有 15 和 14 个 microRNA 表达下调，其中 7 种是共同的。心室肥大通常导致心衰，利用 Northern 印迹检测先天性心衰晚期的人类心肌组织，可见 miR-24、miR-125b、miR-195、miR-199a、miR-214 表达上调，与小鼠模型类似，提示这种异常的 microRNA 表达谱可能是心肌重构的特征性分子变化。

van Rooij 等^[17]进一步体外过表达 miR-23a、miR-23b、miR-24、miR-195 和 miR-214，均导致原代培养的 SD 大鼠心肌细胞发生肥厚变化。利用 α -肌球蛋白重链(α -MHC)启动子体内过表达 miR-24、miR-195 和 miR-214 发现，过表达 miR-195 可导致心肌肥厚，进一步发展为心肌紊乱，并最终导致扩张型心肌病表型。过表达 miR-214 未发现心肌表型异常改变，而过表达 miR-24 则不能获得成活的子代小鼠，推测可能 miR-24 的过表达对胚胎有致死性作用。该研究说明特定 microRNA 在控制病理信号诱导的心肌肥大增生和心室重构中起重要作用，microRNA 可能是心肌肥厚的治疗靶点。

Tatsuguchi 等^[18]发现抑制内源性 miR-21 或 miR-18b 的表达可促进心肌细胞的肥厚发生，而往心肌细胞外源导入 miR-21 或 miR-18b 则可抑制肥厚发生，再次证明 microRNA 在心肌肥厚的形成过程中起重要作用。该研究还发现抑制剂诱导肥大心肌细胞(agonist-induced hypertrophic cardiomyocyte)和机械超负荷诱导的肥大心肌(pressure overload-induced hypertrophic heart)的 microRNA 表达谱有差异。

miR-1 和 miR-133 来源于同一染色体位点编码的 microRNA 多顺反子。Chen 等^[19]发现同步表达的 miR-1 和 miR-133 在骨骼肌生长和分化过程中起不同的作用。miR-1 以组蛋白脱乙酰基酶 4 (histone deacetylase 4, HDAC4)为靶点，HDAC4 是肌组织基因转录抑制因子，miR-1 作用于 HDAC4 的表达而促进骨骼肌的成肌过程。相比，同源的 miR-133 则是通过抑制血清应答因子(serum response factor, SRF)的表达而增强成肌细胞的增殖。另一研究^[20]在小鼠和

人类心肌肥厚模型中观察到 miR-133 和 miR-1 表达下调, 体外实验发现 miR-133 和 miR-1 过表达可抑制心肌细胞发生肥厚, 相反, 用反义 RNA 抑制 miR-133 则可导致心肌肥厚, 且比诱导物刺激引起的心肌肥厚更显著。单次血液给予 miR-133 反义 RNA, 可引起动物显著而持续的心肌肥厚。该研究发现, miR-133 导致心肌肥厚的靶点是 RhoA、Cdc42 和 Nelf-A/WHSC2 等与心肌发育相关的基因表达。Sayed 等^[21]发现在部分缩窄主动脉制作心肌肥厚小鼠模型过程中, 第 1~7 天都可看到 miR-1 表达下调, miR-1 的过表达将抑制生长相关的 RasGAP、Cdk9、纤连蛋白及 Rheb 等基因的表达和蛋白质合成, 并从而抑制细胞大小, 提示压力超载所致的心肌 miR-1 表达下调通过去除对一些生长相关基因的抑制而促进心肌细胞生长, 进而向心肌肥厚发展。上述证据显示 miR-133 和 miR-1 在心肌肥厚中的调节中可能起着至关重要的作用。

Cheng 等^[22]用微阵列技术观察了部分缩窄主动脉 7、14、21 天后的大鼠心脏的 microRNA 表达谱, 发现在肥大的大鼠心脏中有 19 个 microRNA 有异常表达, 其中的 miR-21 最显著, 在经血管紧张素 II 或苯肾上腺素刺激后肥大的原代培养心肌细胞中也可见 miR-21 上调。用反义 RNA 沉默 miR-21 后可明显抑制心肌细胞的肥大, 表明 microRNA 在心脏肥大形成过程中发挥作用, 可能是高血压、缺血性心脏病、心瓣膜病和内分泌病等发展为心肌肥厚的重要机制。

并不是所有的心脏异常表达的 microRNA 都与疾病发生发展有关。Thum 等^[23]发现人类心脏疾病时有 24 种 microRNA 表达上调, 上调最高的是 miR-214, 但是 van Rooij 等^[17]证明 miR-214 在小鼠心脏过表达不会导致心脏表型的改变。

2.3 microRNA 与心力衰竭

miR-208 是心脏特异的 microRNA, 由 α -MHC 基因的一个内含子编码。van Rooij 等^[24]发现 miR-208 缺失能够阻止小鼠心肌细胞在受到甲状腺素或血流动力学负荷过重刺激时发生肥大, 抑制 α -MHC 表达上调, 避免心肌纤维化, 提示 miR-208 是心力衰竭发展过程中连接应激信号与下游基因和蛋白质表达的关键信号节点, α -MHC 基因除编码心肌收缩的主要蛋白外, 还通过表达 miR-208 来调控应激和激素作用下心肌生长和基因表达。该实验室还发现甲状腺素诱导性心脏重构的一种介质甲状腺素受体相关蛋白 1 (THRAP1) 的编码基因启动子区可与 miR-208 结

合, 提示二者间存在某种联系。因此, 控制 microRNA 表达可是治疗心力衰竭的潜在策略。

2.4 microRNA 与心律失常

Yang 等^[25]发现冠心病患者和心肌梗死(心脏病发作)大鼠模型心脏中有高丰度 miR-1, 而且 miR-1 在缺血区的表达量比非缺血区高。将 miR-1 转染到正常大鼠心脏会引发心律失常; 将 miR-1 转染心律失常模型大鼠, 发现大鼠心律失常加重; 如果给予大鼠 miR-1 的反义核苷酸链, 则心律失常则明显减轻; 如果在转染 miR-1 的同时给予 miR-1 反义核苷酸链, 同样会减少大鼠心律失常的发生。上述结果表明 miR-1 是心律失常的致病因子, 并且会使心律失常加重。该研究进一步发现 miR-1 导致心律失常的靶点是负责心肌细胞间电导的间隙连接蛋白 43 (connexin 43) 和调节钾电流以维持心脏静息膜电位的钾通道亚单位 Kir2.1, 这两种蛋白质在心肌梗死的大鼠的心脏中含量下降, 体外和体内实验均证实 miR-1 以这两种蛋白质的转录本为靶标。用 RNAi 分别沉默间隙连接蛋白 43 和 Kir2.1 的表达, 均导致缺血心脏心律不齐。

此外, Xiao 等^[26]发现糖尿病兔模型心脏里 miR-133 显著过表达, 将外源 miR-133 注入家兔肌细胞可导致 ether-a-go-go 相关基因(ether-a-go-go-related gene, ERG)转录后抑制和 ERG 蛋白水平的下调。ERG 在心肌细胞中编码快速激活的延迟整流钾通道 (IKr) 的 α 亚基, IKr 表达抑制可导致长 QT 综合征。给予 miR-133 反义 RNA 可以消除 ERG 表达的抑制。推测在糖尿病心脏中 miR-133 抑制 ERG 的表达, 降低 IKr 合成并造成缓慢去极化, 造成心律失常。

张莹等^[27]应用芯片技术分析了犬心房纤颤(atrial fibrillation, AF)心脏的 microRNA 表达谱差异, 结果 AF 模型组的 microRNA 表达谱中有 10 个 microRNA 差异表达, 其中 4 个上调, 6 个下调, 提示 microRNA 参与了持续性 AF 的调节作用。潘振伟等^[28]检测大鼠心肌缺血预适应模型心肌组织中小 RNA 的表达谱, 结果显示缺血再灌区心肌有 4 个 microRNA 上调, 5 个下调; 缺血预适应组非缺血再灌区有 23 个 microRNA 上调, 其中 3 个与肌肉特异表达相关(mir-1、mir-133 和 mir-206), 有 9 个 microRNA 表达下调。这些 microRNA 在缺血预适应介导的抗心律失常的作用有待进一步考评。

上述研究表明, microRNA 是心律失常的致病因子, 并且加重心律失常。

3 展望

microRNA在细胞基因表达和蛋白质翻译过程中发挥转录后调控作用,这种机制的异常可导致疾病的发生。近年关于microRNA在疾病发生、发展的研究报告急剧增加,在心脏疾病领域的相关研究有助于我们理解心脏疾病的分子发病机制。尽管对一些microRNA的作用和机制有所了解,但还有许多异常表达的microRNA在心脏疾病发生、发展过程中的作用不清楚,这些microRNA的靶分子也不清楚,搜寻microRNA靶分子的工作需要大量的实验研究,因为microRNA既可与靶mRNA序列严格配对而降解靶mRNA,也可与靶mRNA序列不完全配对而抑制靶mRNA, microRNA可能有许多不同的靶mRNA,如何找到靶分子,需要新的研究策略和技术。另一方面, microRNA在不同组织和细胞的表达动态过程也是一个重要研究方向,在同一刺激下不同细胞的microRNA表达谱可能不一致,其生理和病理意义何在,需要大量研究才有可能明确这些问题。

microRNA和其靶mRNA的表达调控是另一个重要的研究方向。只有掌握了microRNA和靶mRNA表达调控机制,才有可能为心脏疾病的治疗提供新的药物靶点和研发新的药物。

参考文献(References)

- [1] Lee RC *et al. Cell*, 1993, **75**: 843
- [2] Reinhart BJ *et al. Nature*, 2000, **403**: 901
- [3] Lee Y *et al. EMBO J*, 2002, **21**: 4663
- [4] Lee Y *et al. EMBO J*, 2004, **23**: 4051
- [5] Bartel DP. *Cell*, 2004, **116**: 281
- [6] Zhang B *et al. Dev Biol*, 2006, **289**: 3
- [7] Aravin A *et al. FEBS Lett*, 2005, **579**: 5830
- [8] Calin GA *et al. Leuk Res*, 2006, **30**: 653
- [9] Caldas C *et al. Nat Med*, 2005, **11**: 712
- [10] Williams AE *et al. Dev Dyn*, 2007, **236**: 572
- [11] Nakagawa Y *et al. Bioorg Med Chem*, 2007, **15**: 5620
- [12] Scott GK *et al. J Biol Chem*, 2007, **282**: 1479
- [13] Sonoki T *et al. Leukemia*, 2005, **19**: 2009
- [14] Croce CM *et al. Cell*, 2005, **122**: 6
- [15] Zhao Y *et al. Nature*, 2005, **436**: 214
- [16] Zhao Y *et al. Cell*, 2007, **129**: 303
- [17] van Rooij E *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 18255
- [18] Tatsuguchi M *et al. J Mol Cell Cardiol*, 2007, **42**: 1137
- [19] Chen JF *et al. Nat Genet*, 2006, **38**: 228
- [20] Carè A *et al. Nat Med*, 2007, **13**: 613
- [21] Sayed D *et al. Circ Res*, 2007, **100**: 416
- [22] Cheng Y *et al. Am J Pathol*, 2007, **170**: 1831
- [23] Thum T *et al. Circulation*, 2007, **116**: 258
- [24] van Rooij E *et al. Science*, 2007, **316**: 575
- [25] Yang B *et al. Nat Med*, 2007, **13**: 486
- [26] Xiao J *et al. J Biol Chem*, 2007, **282**: 12363
- [27] 张莹等. *哈尔滨医科大学学报*, 2007, **41**: 92
- [28] 潘振伟等. *哈尔滨医科大学学报*, 2007, **41**: 95

MicroRNAs and Heart Diseases

Hui-Bin Liu, Ya-Qi Shen, Zhao-Hua Zhong*

(Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract MicroRNAs are small non-coding RNA molecules encoded in the genomes of plants and animals. These highly conserved 21–25 mer RNAs regulate the expression of genes by binding to the 3' untranslated regions of specific mRNAs. MicroRNAs modulate the processes of embryonic development, cell proliferation, cell differentiation, cell death, and apoptosis by post-transcriptional regulation mechanism. Recently researches demonstrated that abnormal expressions of microRNAs may cause the initiation and progress of heart diseases. The role of microRNAs in heart development, myocardial remodeling, heart failure, and arrhythmia was reviewed.

Keywords microRNA; heart disease; myocardial hypertrophy; heart failure; arrhythmia

Received: April 7, 2008 Accepted: June 26, 2008

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (No.20060390811), the Science and Technology Foundation of Harbin (No.2005AA9CS116-16), and the Department of Education of Heilongjiang Province (No.11511159)

*Corresponding author. Tel: 86-451-86685122, E-mail: zhonghmu@gmail.com