

综 述

MicroRNAs与心肌细胞肌浆网钙操纵功能调控

崔玉荣 尹盟盟 孙小夕 洪 鲜 罗雪颖 钟彬龙 席姣娅*

(华中科技大学同济医学院基础医学院生理学系, 脑研究所,
药物靶点研究与药效学评价湖北省重点实验室, 武汉 430030)

摘要 肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)钙操纵功能是心肌细胞发生、发育及成熟的重要环节之一, 是心肌收缩维持心脏泵血的功能基础。多种心脏疾病发生发展与SR钙操纵功能的紊乱有关。研究表明, microRNAs(miRNAs)以多种作用途径参与心肌细胞SR钙操纵功能的调节以及心脏疾病的发生发展或者心脏功能的保护。该文主要围绕miRNAs调控心肌细胞SR钙操纵及其机制的研究现状作一综述, 并对miRNAs在心脏疾病的临床诊断和治疗中的运用前景进行展望。

关键词 microRNAs; 心肌细胞; 肌浆网; 钙操纵

MicroRNAs and Its Functional Regulation on Calcium Handling of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum

Cui Yurong, Yin Mengmeng, Sun Xiaoxi, Hong Xian, Luo Xueying, Zhong Binlong, Xi Jiaoya*

(Department of Physiology and Institute for Brain Research, School of Basic Medicine, Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and Technology, the Key Laboratory for Drug Target Researches and
Pharmacodynamic Evaluation of Hubei Province, Wuhan 430030, China)

Abstract The properties of sarcoplasmic reticulum (SR) calcium handling are crucial for differentiation, development and maturation of cardiomyocytes, and are also the basic for cardiac contraction and heart pumping. Lots of heart diseases are related to the dysfunction of SR calcium handling. Accumulated data were amassed showing that microRNAs (miRNAs) participated and played important role in regulating cardiac SR calcium handling, and contributed to some heart diseases or protection of heart function. Here we aimed to review the recent progress on miRNAs regulating calcium handling of cardiac SR and their underlying mechanism, and provide a future perspective for the application of miRNAs studies on the clinical diagnosis and treatment of cardiac diseases.

Keywords microRNAs; cardiomyocyte; sarcoplasmic reticulum; calcium handling

正常成年心肌细胞兴奋时, T管膜上的L型钙离子通道开放, 细胞外 Ca^{2+} 沿此通道进入细胞内, 触发肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)上的Ryanodine受体(Ryanodine receptor, RyR)开放, 大量 Ca^{2+} 从SR释放

入胞质中, 这个过程称为钙触发钙释放(calcium induced calcium release, CICR)^[1]。此时, 细胞内 Ca^{2+} 浓度迅速增高, Ca^{2+} 与细肌丝上的收缩调节蛋白肌钙蛋白C(troponin C, TnC)结合, 触发粗、细肌丝相对滑行,

收稿日期: 2014-12-26 接受日期: 2015-03-26

国家自然科学基金(批准号: 31100828)、湖北省自然科学基金(批准号: 2011CDB363)、教育部留学回国人员科研启动基金(第42批, 席姣娅)资助的课题

*通讯作者。Tel: 027-83692622, E-mail: zhengyall@hotmail.com

Received: December 26, 2014 Accepted: March 26, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31100828), the Natural Science Foundation of Hubei Province (Grant No.2011CDB363) and the Project-sponsored by SRF for ROCS Jiaoya Xi, SEM

*Corresponding author. Tel: +86-27-83692622, E-mail: zhengyall@hotmail.com

网络出版时间: 2015-06-02 17:25 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150602.1725.001.html>

产生心肌收缩。随后,胞质内大量的 Ca^{2+} 被SR钙泵(sarco/endo-plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA)回吸至SR内贮存,受磷蛋白(phospholamban, PLB)通过磷酸化与去磷酸化状态的转变调控SERCA功能,少量 Ca^{2+} 通过细胞膜上的钠钙交换体(sodium-calcium exchanger, NCX)移出细胞外,细胞内钙离子浓度迅速下降, Ca^{2+} 与TnC分开,粗、细肌丝分离复位,心肌舒张^[2-3]。这一过程即为SR的钙操纵过程,其发生除与RyR、SERCA、PLB、NCX、扣钙素(calsequestrin, CSQ)、三合蛋白(triadin, Trd)、连接蛋白(junctin, Jn)、钙调蛋白(calmodulin, CaM)及钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶II(Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase II, CaMKII)等SR钙操纵蛋白的表达和功能状况有关外,还与心肌细胞中T管发育及RyR与L型钙通道的共定位表达密切相关,是心肌细胞发生兴奋收缩耦联进而完成心脏泵血的关键环节^[4]。心肌细胞SR钙操纵功能异常是引起心律失常、心肌肥厚、心功能下降、心肌缺血再灌注损伤、心衰甚至心脏猝死等心脏疾病的重要因素^[5-6]。研究发现,多种心脏疾病患者心肌细胞结构及功能(包括SR钙操纵功能)类似于未成熟的心肌细胞^[6-7],呈现“返祖”现象。近年来,多项研究表明,多种microRNAs(miRNAs)参与心肌细胞SR钙操纵结构及功能的发育、成熟,并且部分miRNAs通过调节心肌细胞SR钙操纵功能,在某些心脏疾病的发生发展或心功能保护中起着至关重要的作用^[8-9]。因此,深入研究miRNAs对SR钙操纵功能的调控将有助于了解心肌细胞发育成熟的过程和心脏疾病发生发展的机制,发现心脏疾病新的治疗靶点的新途径,也有助于推动心脏疾病的细胞替代治疗从实验室走向临床。

本文主要围绕miRNAs调控心肌SR钙操纵功能及其作用机制的研究现状作一综述,并对miRNAs在心脏疾病的临床诊断和治疗中的运用前景进行展望。

1 MiRNAs在心肌细胞中的表达特点

MiRNAs是20世纪末发现的一类长约20~25个碱基的小分子非编码单链RNA。MiRNAs与其他蛋白质一起组成RNA诱导的沉默复合体,与其靶mRNA分子的3'端非编码区域(3'-untranslated region, 3'UTR)结合从而抑制靶mRNA分子的翻译^[10]。MiRNAs在与其靶mRNA结合时,少数碱基之间的互补配对并不是十分严格,因此,一种miRNA可以与多

种mRNA结合;同时,miRNAs在由pri-miRNAs转变成pre-miRNAs再向成熟的miRNAs转变的过程中又受到一些mRNA及其他的miRNAs的影响和一些小分子物质的调节,因此,miRNAs与mRNA之间组成了一个复杂的关系网,精细的调节细胞内基因的表达^[11-12]。MiRNAs在细胞发育的不同阶段动态调节蛋白质的合成,从而使细胞表现出不同的结构和功能状态^[10]。

1.1 组织特异性

组织特异性是miRNAs表达的一个重要特点。目前研究比较深入的与心脏关系密切的miRNAs包括:miR-208、miR-1、miR-133和miR-499。其中,miR-208是唯一在心脏特异性表达的miRNA。其他在心脏高表达的miRNAs还包括miR-24、miR-22和miR-10等^[13]。

这些心肌特异性miRNAs的表达可受心脏细胞内外环境的影响,同时又可参与调控心肌细胞的信号转导蛋白的表达。Mishra等^[14]发现,心脏细胞内的金属蛋白激酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、组织蛋白激酶抑制剂-4(tissue inhibitor of metalloproteinase-4, TIMP-4)和蛋白激酶受体-1(proteinase-activated receptor-1, PAR-1)可以调节心肌细胞内多种miRNAs的表达,其中与心肌细胞SR钙操纵功能相关的有:调节SERCA的miR-1、调节L型电压门控钙通道的miR-26a和调节L型钙离子通道辅助亚基CACNB的miR-30b和miR-181c。这些特异性高表达于心肌细胞的miRNAs对于心肌细胞的发育成熟以及功能的维持起着重要的调节作用。

1.2 时间特异性

MiRNAs在心肌发育过程中呈现时间特异性的表达。不同发育阶段心肌细胞内表达不同的miRNAs或者在心肌细胞发育的不同阶段同一种miRNA表达的量有明显的波动(表1)。

Wilson等^[15]发现,在未分化的人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)上检测不到miR-499的表达,随着分化进程,由hESCs分化而来的心肌细胞(hESCs derived cardiomyocytes, hESC-CMs)中miR-499表达迅速增多;而在新生期心肌细胞中,miR-499表达较前一阶段又有所提高,只是升高幅度较前减小。miR-22在心肌组织中高表达,并且在胚胎期、新生儿期、成年期小鼠心肌细胞中表达持续增加,到第六周达到其表达高峰^[16]。

心肌细胞中有较明显的时间波动性表达的miRNAs还有miR-1、miR-26b、miR-143、miR-let-7a、miR-133a及miR-126。其中, miR-let-7a和miR-26b在人成纤维细胞中也有表达, 为非心肌特异性miRNAs^[17-18]。这些miRNAs的时间特异性表达方式可能对于心肌细胞在分化、增殖、表型的发育及维持等不同阶段起着重要的调节作用。

2 MiRNAs调控心肌细胞SR钙操纵功能的分子机制

2.1 MiR-1与心肌细胞SR钙操纵调控

MiR-1是哺乳动物心脏中含量最丰富的miRNAs, 几乎占成年小鼠心脏中miRNAs的40%, 在心脏发育和凋亡中起着重要的作用^[19]。心律失常、冠心病等心脏疾病患者的miR-1表达明显增加^[20]。亦有研究认为, miR-1在对抗心肌肥大或心衰中扮演了保护性角色^[21]。对于miR-1在心衰患者和动物模型中的表达研究有不同的发现, Thum等^[22]发现, 在心衰时miR-1表达水平升高; Ikeda等^[23]、Sucharov等^[24]发现, 心衰时miR-1表达下降。这种差异产生的原因可能是由于不同实验组所用的动物种属不同、发病原因不同或疾病阶段不同, 基因表达水平确有差异; 也有可能是实验者选用组织的大小不同或者实验条件不同所造成的假阳性等。增加实验样本量、规范统一实验条件可以帮助排除假阳性结果的出现。目前已经证实, miR-1与心肌细胞相关的靶基因有: 与心脏细胞形成有关的*Hand2*和*Notch1a*; 与传导及心律失常相关的*connexin-43*、*Irx2*、钾离子通道亚单位*Kir2.1(KCNJ2)*; 与钙稳态及心肌肥厚相关的*B56a*、*HDAC4*、*CaM*、*IGF-1*、*Mef2a*等^[20,25]。这提示, miR-1通过多个作用靶点影响心肌细胞SR钙操纵功

能、参与心脏疾病的发生, 目前研究比较清楚的机制有以下几种。

2.1.1 MiR-1介导CaMKII依赖性RyR过磷酸化是心律失常发生的分子机制之一 MiR-1过表达可促进心律失常的发生^[19-20]。蛋白磷酸酶2A(protein phosphatases 2A, PP2A)的调节亚基B56a是miR-1的直接作用靶点之一^[26]。B56a和RyR2共定位于心肌细胞, 通过与结合在RyR2上的锚蛋白-B相互作用介导PP2A对RyR2的功能调控^[26]。Terentyev等^[26]发现, 利用腺病毒使成年大鼠心室肌细胞miR-1过表达时, 其靶点B56a的表达明显抑制, 从而导致RyR2的S2814位点被CaMKII过磷酸化, 使舒张期SR漏出Ca²⁺增多, 减少SR内钙贮存, 促进心律失常的发生。值得注意的是, 在发育的不同时期, miR-1的表达量对于SR钙操纵功能可能会有不同的影响。Fu等^[17]观察到, 通过慢病毒使hESC-CMs过表达miR-1时, Jn、Trd和RyR等与钙释放和钙回收有关的蛋白转录水平上调, 明显增强心肌细胞钙瞬变幅度并增大钙波上升速度, 幼稚心肌细胞的SR钙操纵功能得以改善, 但其具体的调节途径和作用靶点尚不清楚, 需进一步研究。

2.1.2 SERCA2a/CaMKK/AKT FoxO3a调控 miR-1对NCX1的抑制作用是心衰时心肌细胞钙操纵功能改变的可能机制之一 SERCA2a功能失常是心衰发生的关键因素^[27]。Lyon等^[28]发现, 心衰后心肌细胞中SERCA2a的表达量及活性下降, 不能及时有效地将胞质内的Ca²⁺泵回到SR中, 细胞内Ca²⁺水平增高, 激活了CaMKK使得AKT FoxO3a磷酸化水平增高, 在高磷酸化状态下核内FoxO3a表达量下降。miR-1的启动子和FoxO3a的转录因子存在共有序列, miR-1的表达随核内FoxO3a表达下降而下降^[29]。

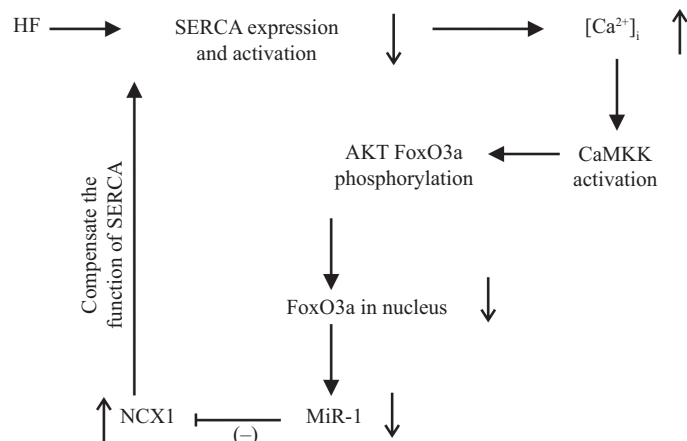
表1 MiRNAs在心肌发育过程中呈时间特异性表达

Table 1 Time specificity of miRNAs expression during cardiac development

MiRNAs	发育阶段 Developmental stages				种属 Species	参考文献 References
	ESCs	ESC-CMs	NCMs	ACMs		
miR-1/133a, miR-499	Undetectable	High expression	Expression ↑	Remain high level	Human	[17-18]
miR-22	Undetectable	Expression	Expression ↑	6 weeks to peak	Mouse	[16]
miR-30b, miR-126	Low expression	Expression ↑	Expression ↑	Remain high level	Human	[17]
miR-let-7a, miR-let-7b, miR-26b, miR-125a	Low expression	Expression ↑	Expression ↑	Remain high level	Human	[17]

ESC: 胚胎干细胞; ESC-CMs: 胚胎干细胞源心肌细胞; NCMs: 新生期心肌细胞; ACMs: 成年期心肌细胞。

ESC: embryonic stem cells; ESC-CMs: embryonic stem cell derived cardiomyocytes; NCMs: neonatal cardiomyocytes; ACMs: adult cardiomyocytes.



CaMKK: 钙/钙调蛋白依赖的蛋白激酶; HF: 心衰; NCX: 钠钙交换体; SERCA: 肌浆网钙泵。

CaMKK: Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase; HF: heart failure; NCX: sodium-calcium exchanger; SERCA: sarco/endo-plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.

图1 心衰时SR钙操纵功能改变的可能机制示意图

Fig.1 Schematic representation of the possible mechanism of SR calcium manipulation change in heart failure

Kumarswamy等^[30]发现, 活体内导入*SERCA2α*基因可以降低心律失常的发生、改善心衰患者的心功能, 还可使原本在心衰模型动物低表达的miR-1表达上调; 他们还发现, *NCX1* 3'UTR与miR-1存在多个保守序列结合位点, miR-1过表达可以使细胞中NCX1表达下降60%以上, 抑制miR-1的表达可以使细胞内钙离子快速排出细胞, 推断NCX1是miR-1的一个作用靶点。

由此推测, 心衰时SR钙操纵功能改变的可能机制之一是心衰时*SERCA2α*表达下降, 细胞内钙离子水平增高, 激活了CaMKK使得AKT/FoxO3a磷酸化水平增高, 核内FoxO3a表达下降, miR-1表达随之下降。miR-1对NCX1的抑制作用减弱, NCX1表达增多, 帮助细胞内的钙离子转出细胞, 从而对*SERCA2α*下降的功能进行补偿(图1)。

2.1.3 MiR-1靶向调控Sorcin(Sri)表达调节心肌细胞内钙稳态 Sri是21.6 kDa的 Ca^{2+} 通道结合蛋白, 与RyR2共定位于SR与T管连接处, 呈钙离子浓度依赖性、可逆性地结合在RyR2上^[31]。它可能是通过增加NCX1活性或者抑制RyR2或L型钙通道的功能来抑制自发钙通道和钙电流触发的电活动, 从而有效地调节细胞内钙离子浓度及CICR功能, 保证细胞有效的兴奋收缩耦联^[32]。Ali等^[33]发现, Sri是miR-1的直接作用靶点之一, miR-1与Sri的3'UTR有保守的结合位点, 与之结合后直接抑制mRNA的翻译, 从而抑制蛋白Sri的表达。在小鼠动物模型中用三苯氧胺敲除心肌特异性Dicer时, 可抑制miR-1的表达, 解除其对Sri的抑制作用, 导致Sri表达明显增多, 出现心

肌射血分数下降、收缩期缩短、舒张末期心血容量下降等心功能变化; 而在敲除Dicer早期心衰动物模型中导入Sri的siRNA抑制Sri的表达可以解除其早期心脏收缩功能下降的表现^[33]。由此可见, miR-1可通过抑制Sri的表达来调节心肌细胞钙操纵功能进而调节心肌细胞的收缩功能。Ali等^[33]还发现, 在心衰小鼠和患者心肌细胞内miR-1表达均下降, 对其靶基因的抑制作用减弱, 这与早期心肌缺血性疾病模型小鼠以及心脏病患者Sri表达水平增高相符, 可能是miR-1参与缺血性心肌病发生的一个作用靶点, 其具体机制尚不明确。

2.1.4 MiR-1可能通过负性调控L型钙离子通道β2亚单位参与心肌肥厚的发生 Wu等^[21]在研究异丙肾上腺素所致心肌肥厚动物模型时发现, 心肌细胞表面积增大, miR-1表达明显下降, L型钙离子通道β2亚单位(L-type calcium channel β2 subunit, Cavβ2)表达水平增高; 而转染miR-1模拟物上调miR-1后Cavβ2表达下降, 心肌细胞表面积明显减小。提示miR-1可以负性调控Cavβ2, 降低细胞内钙浓度, 减轻心肌肥厚。

2.1.5 糖尿病性心肌病时miR-1对Jn抑制作用减小导致细胞内钙循环紊乱 Jn作为RyR2的组成元件, 是参与心肌细胞肌浆网钙循环和心肌收缩的重要因素。Yildirim等^[34]研究发现, Jn是miR-1的靶基因; 在糖尿病性心肌病大鼠心肌氧化应激状态下, miR-1表达下降, 其靶基因Jn表达升高, 导致RyR2结构及功能异常, 心肌细胞内钙循环紊乱, 心肌细胞收缩力下降, 心功能受损; 用N-乙酰半胱氨酸进行抗氧化治疗

可逆转miR-1表达恢复到正常水平,提示miR-1可能是治疗糖尿病性心脏病的新靶点。

2.2 MiR-24与心肌细胞SR钙操纵调控

MiR-24可表达于包括心肌细胞在内的多种细胞内,根据生物信息系统分析,miR-24与多种蛋白的mRNA存在保守的互补序列,可抑制相应蛋白的表达,其中与心肌细胞肌浆网钙操纵功能相关的蛋白主要是Junctophin-2(JP2)^[35]。T管膜上的L型钙通道DHPR和SR上RyR的共定位表达是心肌细胞SR钙操纵功能成熟的结构基础,而JP2是将SR上RyR锚定于T管使得RyR与DHPR实现共定位表达的结构蛋白^[36]。在JP2的3'UTR有两个miR-24的结合位点,miR-24与任一位点结合都可以抑制JP2的表达^[37]。心衰时miR-24表达增多,抑制了JP2的表达,导致心肌细胞中T管与SR排列不规则,DHPR与RyR不能实现共区域化,使心肌细胞的SR钙操纵功能低下,ECC结构及功能受损^[36]。

Li等^[35]发现,在主动脉狭窄致心肌肥厚的小鼠模型中定期注入针对miR-24的化学修饰反义寡核苷酸antagomir来下调miR-24的表达后,JP2表达上调,可以维持心肌细胞ECC的超微结构,保护RyR与DHPR之间的信号传导功能,使心肌细胞的钙瞬变处于正常状态,改善心肌收缩功能,防止代偿性心肌肥厚向失代偿期转变,提示miR-24可作为心肌肥厚疾病的新治疗靶点。

2.3 心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, IR)损伤时miR-214可抑制NCX1的表达,起到保护心肌细胞的作用

MiR-214可见于心肌之外的其他组织细胞,在小鼠胚胎早期大量表达,随着胚体发育成熟其表达下降,直至成年其表达一直保持低水平,而在IR损伤、心肌肥厚或心衰时miR-214表达上调;使用生物信息检索系统TargetScan检索发现,NCX1是miR-214的一个靶基因并受miR-214负性调控^[38]。在正常心肌细胞舒张期,NCX1将部分细胞内钙排出细胞外,以维持心肌收缩后正常的舒张功能。而在多种原因导致的心肌超负荷以及在IR损伤24 h内,NCX1表达增高并且以相反的模式工作,将细胞外钙泵回到细胞内,使细胞内钙浓度增高^[39]。细胞内高钙既可以诱发细胞凋亡又可以通过激活CaMKII,改变多种SR钙操纵蛋白(如PLB、RyR、DHPR)的表达及活性,导致心肌细胞收缩功能紊乱^[40]。

Auraro等^[38]发现,在心肌IR损伤模型中,心肌缺血45 min后,miR-214表达上调;在IR损伤7 d后,NCX1表达量下降到正常水平以下。而敲除miR-214后,心肌IR模型中NCX1表达上调,且在IR损伤7 d后NCX1并无明显下降。此时,NCX1将大量细胞外钙移至心肌细胞内,引起大量心肌细胞功能损伤甚至死亡,细胞内高钙还可以通过异常钙火花钙释放引发心律失常。病理检测发现,敲除miR-214小鼠心肌纤维化面积较大,单个心肌细胞面积相对于未敲除miR-214小鼠心肌细胞面积小。这些表现提示,在miR-214敲除小鼠模型中,IR损伤诱发心肌纤维化及心脏功能下降后,心肌细胞凋亡在持续并加重。由此作者推测,在心肌IR损伤24 h内,miR-214可能通过抑制NCX1的表达降低心肌细胞内钙负荷,从而减少心肌细胞的凋亡及心律失常的发生,起到保护心脏功能的作用^[38]。

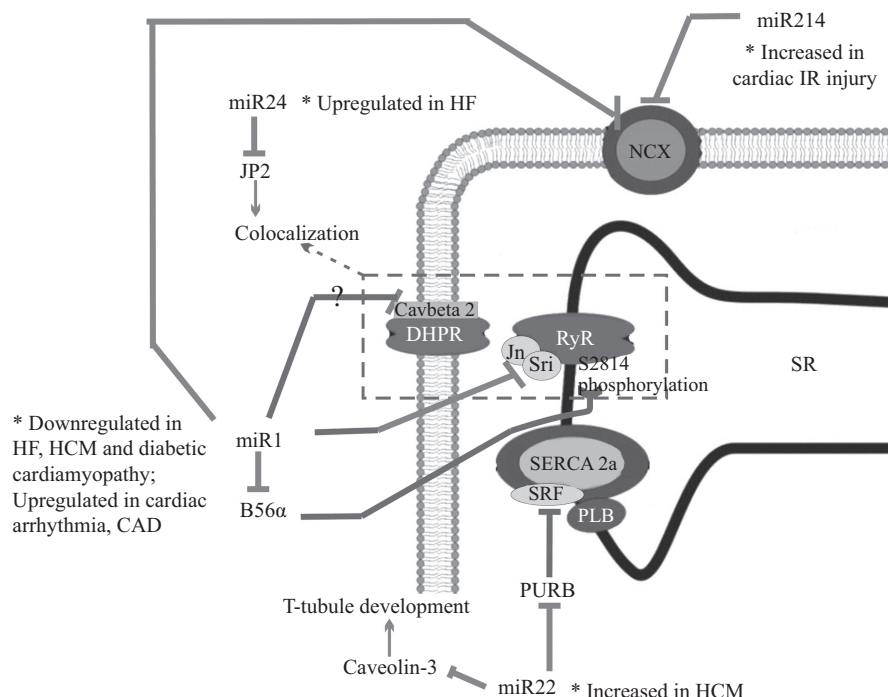
2.4 MiR-22通过影响SR钙操纵蛋白功能参与心肌肥厚疾病的发生与发展

MiR-22在心肌中高表达。Gurha等^[41]发现,敲除miR-22的小鼠心肌中SERCA表达量及活性下降,SR钙储存量减少。其作用机制可能是:miR-22通过抑制富嘌呤元素相关蛋白PURB表达,解除对血清反应因子(serum response factor, SRF)的表达抑制,SRF与SERCA基因的起始序列结合,对SERCA蛋白的表达有直接的促进作用^[42]。故敲除miR-22可通过抑制SERCA蛋白的表达来影响SERCA的功能。在应力性心肌肥厚和心室重构的小鼠模型中miR-22表达水平增高,一方面它可能通过以上SR钙操纵蛋白影响心肌细胞钙稳态参与代偿性心肌肥厚,另一方面也可能是心肌功能进一步恶化的因素之一^[42]。

生物信息学分析显示,miR-22与T管生物起源关键蛋白caveolin-3的基因3'UTR有高度保守的结合序列,可能对T管的发育有一定的影响。本课题组发现,葛根素可以抑制miR-22在小鼠ESC-CMs中的表达从而促进其中T管的发育,加速ESC-CMs结构及功能的成熟^[43]。但是,miR-22在心肌细胞中表达的影响因素以及miR-22对T管发育的具体作用尚待进一步研究。

2.5 其他

MiR-208是目前已知的唯一一个只在心脏组织中表达的miRNA,它可以通过提高SERCA、PLB和RyR的表达及磷酸化水平,同时抑制磷酸二酯酶4D



CAD: 冠状动脉疾病; CICR: 钙触发钙释放; DHPR: L型钙离子通道; HCM: 心肌肥厚; HF: 心衰; IR: 缺血再灌注; JP2: Junctophin-2; NCX: 钠钙交换体; PLB: 受磷蛋白; PURB: 富嘌呤元素相关蛋白; RyR: 雷诺定受体; SERCA: 肌浆网钙泵; SRF: 血清反应因子; SR: 肌浆网; “*”: 提示miRNA表达变化; “?”: 机制不明。

CAD: coronary artery disease; CICR: calcium induced calcium release; DHPR: L-type calcium channel; HCM: hypertrophic cardiomyopathy; HF: heart failure; IR: ischemia reperfusion; JP2: junctophin-2; NCX: sodium-calcium exchanger; PLB: phospholamban; PURB: rich purine elements related proteins; RyR: ryanodine receptor; SERCA: sarco/endo-plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; SRF: serum response factor; SR: sarcoplasmic reticulum; “*”: indicated the expression changes of miRNA; “?”: mechanism is unknown.

图2 miRNAs调控SR钙操纵功能的分子机制小结

Fig.2 Overview of the possible mechanism of miRNAs regulating calcium handling of cardiac SR

和钙调磷酸酶的磷酸化水平,影响心肌细胞的SR钙操纵过程而引起心脏病患者心律失常、心脏猝死等不良事件的发生^[44]; miR-152可以抑制SERCA2 α 的表达,参与心肌细胞收缩功能损伤机制^[45]; miR-133a可以负性调节L型钙通道亚基 α_{1C} 的表达,降低细胞内钙离子浓度,抑制心肌细胞肥大的发生; miR-133a还可以下调SRF的表达及活性,而SRF又可以调节miR-1、SERCA以及与心肌肥厚相关的多种基因的表达^[42,46]。以上miRNAs对SR钙操纵功能调控的分子机制尚不清楚,仍需进一步研究。

有关miRNAs调控SR钙操纵功能的分子机制的小结如图2所示。

3 MiRNAs在心脏疾病诊断治疗应用中的研究现状及前景展望

3.1 MiRNAs在心脏疾病诊治应用中的研究现状

在病人血浆和血清中可以高灵敏度高特异性的检测到miRNAs的表达状况,这提示可以通过检

测血液循环中miRNAs的表达状况,帮助心肌缺血等疾病的早期诊断。如血清中miR-1/133a水平增高提示心肌损伤^[47], miR-208可以作为药物引起的心脏中毒诊断的生物标记^[48]。人们希望通过有效调节miRNAs的表达使心肌细胞的结构与功能恢复到正常状态,从而改善心血管疾病的治疗现状。目前研究比较深入的基因治疗方法有拟miRNAs和抗miRNAs技术,即通过人工合成一段与靶miRNAs完全一致或互补的寡核苷酸序列,经过一定的化学修饰后导入机体从而补偿下调或抑制上调的miRNAs对相应基因的调控作用, miR-Mask和多靶点抗miRNAs还可以针对多靶位序列同时作用,以达到协同调节的目的。一些miRNAs在心脏疾病中的治疗作用已经得到证实。Luo等^[49]已经证明,导入外源性miR-133、miR-1可抑制肥大心肌细胞HCN2、HCN4蛋白表达的异常增高,逆转心肌肥厚从而防止心律失常的发生。Hu等^[50]也尝试通过注入鸡尾酒式miRNAs(miRNA cocktail miR-21、miR-24和miR-221)来提高用于替

代治疗的心肌前体细胞的存活及功能, Dicer等也被证明直接参与心衰等疾病的调节。

3.2 MiRNAs技术临床应用面临的挑战

由于miRNAs调节机制极为复杂, 目前人们对于miRNAs的认识还不够全面和深入, 难以制定一个稳定的临床诊断标准及治疗规范。因此, 在miRNAs广泛应用于临床疾病的治疗前, 充分了解miRNAs在细胞不发育同阶段的作用和正常表达量、在病理状态下miRNAs表达及调节的具体机制十分必要。其次, 寻求安全、特异性的基因导入方法也是一个重要的环节。目前认为, 改良的慢病毒载体既可以避免直接注入导致的组织损伤, 又可以避免载体带来的病毒感染, 具有较好的应用前景, 但其临床安全性仍需进一步验证和改进。

总之, 对于心脏特异性miRNAs的充分认识和深入研究有助于对心血管疾病的深入了解以及推动心肌细胞替代治疗的发展, 而miRNAs广泛应用于临床仍面临巨大的挑战。

参考文献 (References)

- Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245(1): C1-14.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415(6868): 198-205.
- Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985; 85(2): 247-89.
- Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B. Elevated cytosolic Na^+ decreases mitochondrial Ca^{2+} uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res* 2006; 99(2): 172-82.
- Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001; 88(11): 1159-67.
- Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res* 2012; 94(2): 168-80.
- Ruiz-Meana M, Fernandez-Sanz C, Garcia-Dorado D. The SR-mitochondria interaction: A new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res* 2010; 88(1): 30-9.
- Lorenzen JM, Batkai S, Thum T. Regulation of cardiac and renal ischemia-reperfusion injury by microRNAs. *Free Radic Biol Med* 2013; 64: 78-84.
- Dai Y, Khaidakov M, Wang X, Ding Z, Su W, Price E, *et al.* MicroRNAs involved in the regulation of postischemic cardiac fibrosis. *Hypertension* 2013; 61(4): 751-6.
- Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- Iekushi K, Seeger F, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Regulation of cardiac microRNAs by bone marrow mononuclear cell therapy in myocardial infarction. *Circulation* 2012; 125(14): 1765-73, S1-7.
- Matkovich SJ, Hu Y, Dorn GW. Regulation of cardiac microRNAs by cardiac microRNAs. *Circ Res* 2013; 113(1): 62-71.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12(9): 735-9.
- Mishra PK, Metreveli N, Tyagi SC. MMP-9 gene ablation and TIMP-4 mitigate PAR-1-mediated cardiomyocyte dysfunction: A plausible role of dicer and miRNA. *Cell Biochem Biophys* 2010; 57(2/3): 67-76.
- Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, Fu JD, Sun N, Abilez OJ, *et al.* Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: Role for miR-499. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3(5): 426-35.
- Huang ZP, Chen J, Seok HY, Zhang Z, Kataoka M, Hu X, *et al.* MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circ Res* 2013; 112(9): 1234-43.
- Fu JD, Rushing SN, Lieu DK, Chan CW, Kong CW, Geng L, *et al.* Distinct roles of microRNA-1 and -499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 2011; 6(11): e27417.
- 陈斐, 陈忠炎, 杨黄恬. microRNA在胚胎干细胞分化的心肌细胞中的表达变化. *生理学报* (Chen Fei, Chen Zhongyan, Yang Huangtian. Expression profile of microRNAs in the cardiomyocytes derived from mouse embryonic stem cells. *Acta Physiologica Sinica*) 2014; 66(6): 702-8.
- Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, *et al.* Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2009; 105(6): 585-94.
- Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007; 13(4): 486-91.
- 吴扬, 耿鹏, 王玉琴, 刘艳. miRNA-1在心肌肥大中对L-型钙通道 β_2 亚基的负性调控作用. *中国应用生理学杂志* (Wu Yang, Geng Peng, Wang Yuqin, Liu Yan. Effects of microRNA-1 on negatively regulating L-type calcium channel β_2 subunit gene expression during cardiac hypertrophy. *Chinese Journal of Applied Physiology*) 2012; 28(4): 304-8.
- Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, *et al.* MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007; 116(3): 258-67.
- Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, *et al.* Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 2007; 31(3): 367-73.
- Sucharov C, Bristow MR, Port JD. miRNA expression in the failing human heart: Functional correlates. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(2): 185-92.
- Ikeda S, He A, Kong SW, Lu J, Bejar R, Bodyak N, *et al.* MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol* 2009; 29(8): 2193-204.
- Terentyev D, Belevych AE, Terentyeva R, Martin MM, Malana

- GE, Kuhn DE, *et al.* miR-1 overexpression enhances Ca^{2+} release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2. *Circ Res* 2009; 104(4): 514-21.
- 27 Periasamy M, Huke S. SERCA pump level is a critical determinant of Ca^{2+} homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(6): 1053-63.
- 28 Lyon AR, Bannister ML, Collins T, Pearce E, Sepehrpour AH, Dubb SS, *et al.* SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011; 4(3): 362-72.
- 29 Elia L, Contu R, Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, *et al.* Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation* 2009; 120(23): 2377-85.
- 30 Kumarswamy R, Lyon AR, Volkmann I, Mills AM, Bretthauer J, Pahuja A, *et al.* SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. *Eur Heart J* 2012; 33(9): 1067-75.
- 31 Meyers MB, Fischer A, Sun YJ, Lopes CM, Rohacs T, Nakamura TY, *et al.* Sorcin regulates excitation-contraction coupling in the heart. *J Biol Chem* 2003; 278(31): 28865-71.
- 32 Fowler MR, Colotti G, Chiancone E, Higuchi Y, Seidler T, Smith GL. Complex modulation of L-type Ca^{2+} current inactivation by sorcin in isolated rabbit cardiomyocytes. *Pflugers Arch* 2009; 457(5): 1049-60.
- 33 Ali R, Huang Y, Maher SE, Kim RW, Giordano FJ, Tellides G, *et al.* miR-1 mediated suppression of Sorcin regulates myocardial contractility through modulation of Ca^{2+} signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52(5): 1027-37.
- 34 Yildirim SS, Akman D, Catalucci D, Turan B. Relationship between downregulation of miRNAs and increase of oxidative stress in the development of diabetic cardiac dysfunction: Junctin as a target protein of miR-1. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(3): 1397-408.
- 35 Li RC, Tao J, Guo YB, Wu HD, Liu RF, Bai Y, *et al.* *In vivo* suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice. *Circ Res* 2013; 112(4): 601-5.
- 36 Zhang HB, Li RC, Xu M, Xu SM, Lai YS, Wu HD, *et al.* Ultrastructural uncoupling between T-tubules and sarcoplasmic reticulum in human heart failure. *Cardiovasc Res* 2013; 98(2): 269-76.
- 37 Xu M, Wu HD, Li RC, Zhang HB, Wang M, Tao J, *et al.* Mir-24 regulates junctophilin-2 expression in cardiomyocytes. *Circ Res* 2012; 111(7): 837-41.
- 38 Aurora AB, Mahmoud AI, Luo X, Johnson BA, van Rooij E, Matsuzaki S, *et al.* MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca^{2+} overload and cell death. *J Clin Invest* 2012; 122(4): 1222-32.
- 39 Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003; 75(2): S644-8.
- 40 Anderson ME. Calmodulin kinase signaling in heart: An intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. *Pharmacol Ther* 2005; 106(1): 39-55.
- 41 Gurha P, Abreu-Goodger C, Wang T, Ramirez MO, Drumond AL, van Dongen S, *et al.* Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. *Circulation* 2012; 125(22): 2751-61.
- 42 Pipes GC, Creemers EE, Olson EN. The myocardin family of transcriptional coactivators: Versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* 2006; 20(12): 1545-56.
- 43 Wang L, Cui Y, Tang M, Hu X, Luo H, Hescheler J, *et al.* Puerarin facilitates T-tubule development of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34(2): 383-92.
- 44 Rochira JA, Kunitomo Y, Terentieva R, Roder K, Wang DZ, Elton TS, *et al.* Muscle-specific microRNA miR-208 regulates calcium handling release in cardiomyocytes by targeting phosphodiesterase 4D and calcineurin. *Biophys J* 2013; 104(2): 606A.
- 45 Karakikes I, Hajjar RJ, Lebeche D. MicroRNA-152 represses SERCA2a and contributes to the impairment of cardiomyocyte contractile function. *Circulation* 2009; 120(18): S874.
- 46 Miano JM. Serum response factor: Toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(6): 577-93.
- 47 Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, *et al.* Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; 4(4): 446-54.
- 48 Nishimura Y, Kondo C, Morikawa Y, Tonomura Y, Torii M, Yamate J, *et al.* Plasma miR-208 as a useful biomarker for drug-induced cardiotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2015; 35(2): 173-80.
- 49 Luo X, Lin H, Pan Z, Xiao J, Zhang Y, Lu Y, *et al.* Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem* 2008; 283(29): 20045-52.
- 50 Hu S, Huang M, Nguyen PK, Gong Y, Li Z, Jia F, *et al.* Novel microRNA pro-survival cocktail for improving engraftment and function of cardiac progenitor cell transplantation. *Circulation* 2011; 124(11): S27-34.