

非编码 RNA 在动脉粥样硬化性心脏病中的研究进展

白瑞娜 史大卓 李立志 陈可冀

摘要 哺乳动物基因组存在有大量不编码蛋白质的 RNA 序列,称为非编码 RNA(ncRNA),起初被认为基因组学的暗物质,但近年来研究提示,非编码 RNA 可从多个生物学层面实现对基因表达的调控,并与多种疾病密切相关。小分子 RNA(miRNA)和长链非编码 RNA(lncRNA)是隶属于 ncRNAs 的主要组成部分并成为研究热点,可从炎症反应、细胞增殖等多方面调控动脉粥样硬化性疾病的病理生理进程;二者均可稳定表达于外周血并具有组织表达特异性,是可靠的生物学标志物,可作为疾病诊断、治疗及判断预后的靶点。此外,ncRNAs 或可从基因水平揭示中医证型的物质基础,为中医证型的鉴别和诊断提供客观的证据支持。本文从 ncRNAs 的来源、分类、作用机制、在动脉粥样硬化性心脏病中的研究进展及其作为生物学标志物的临床应用进行综述,以阐释 ncRNAs 在心血管疾病中潜在的生物学机制和应用前景。

关键词 非编码小 RNA 长链非编码 RNA 动脉粥样硬化 研究进展

中图分类号 R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.045

对哺乳动物进行高通量基因组测序显示仅有一小部分 RNA 分子被翻译成为蛋白质,除此之外,还存在有大量不编码蛋白质的 RNA 序列,称为非编码 RNA(non-coding RNA,ncRNA),约占哺乳动物基因组转录产物的 98%,起初被称为基因组学的暗物质^[1]。近年来,诸多研究者对此类物质的生物学功能进行探索,其中小 RNA(miRNA)和长链非编码 RNA(long non-coding RNA)成为近年来研究热点。现有证据提示 ncRNAs 调控多重生物学过程,如细胞分化、转录后调控和表观遗传调控等,与多种疾病的病理生理进程密切相关^[2,3]。心血管疾病是导致全球高病死率和高住院率的疾病之一,也是国家巨额财政支出的主要病种之一,多项研究致力于揭示 ncRNAs 在心血管疾病中的潜在分子生物学机制,试图为心血管疾病的治疗提供新的思路和治疗靶点。差异表达的 ncRNAs 分子在心血管疾病如心肌梗死、心力衰竭和冠心病等疾病中发挥重要作用亦可作为心血管疾病可靠的生物学标志物^[4,5]。笔者将聚焦 miRNAs 和 lncRNAs 在冠状动脉粥样硬化性心脏病中的研究进展。

一、ncRNAs 分类和作用

ncRNAs 主要可以分为两类:结构性 ncRNAs 和调节性 ncRNAs。结构性 ncRNAs 包括核糖体 RNA

(rRNA)和转运 RNA(tRNA),参与编码 RNA 的转运和调控机制。调节性 ncRNAs 根据转录分子大小主要分为两类:小 ncRNAs(miRNAs)和长链 ncRNAs(lncRNAs),在心血管领域研究中研究最多的是 miRNAs。miRNAs 是一类内源性的单链小分子 RNA,包含 20~22 个核苷酸,并通过与靶基因 3'-端非翻译区的完全或不完全结合,引起 mRNA 的降解或翻译抑制来发挥负性调控作用。在心血管疾病的发生和发展过程中 miRNAs 表达谱具有显著差异,并可能作为一种潜在的生物学标志物来诊断冠心病并判断预后,miRNAs 亦有望成为冠心病的新型治疗靶点^[6]。此外,在这些 ncRNAs 分子中 lncRNAs 占据最大数量并具有广泛而强大的生物学功能,被予以基因组学冉冉升起的新星,是一类长度大于 200 个核苷酸的长链 RNA 分子,具有组织和时空表达特异性,其功能较 miRNAs 分子更为强大,主要从表观遗传学、转录调控及转录后调控等多个层面实现对基因表达的调控^[7]。新近研究亦提示 lncRNAs 在心血管疾病的发生发展中发挥新的关键作用,并在不同细胞分化过程中发挥潜在生物学作用^[8]。

二、ncRNAs 与动脉粥样硬化性心脏病

随着不同疾病间差异 ncRNAs 表达谱的探索及 ncRNAs 生物学功能的研究,必定为疾病潜在病理生理学机制的揭示、新的治疗靶点提供依据,并为疾病的诊断和预后判断提供可靠、特异的生物学标志物。

1. miRNAs 与动脉粥样硬化性心脏病:miRNAs 与疾病的发生、发展密切相关并可诊断疾病、判

基金项目:国家中医药行业科研专项基金资助项目(201007001)

作者单位:100091 北京,中国中医科学院西苑医院

通讯作者:陈可冀,电子信箱:kjchenvip@163.com

断预后。基因芯片分析显示 miR - 1、miR - 122、miR - 126、miR - 133a、miR - 133b 和 miR - 199a 在冠心病患者外周血中稳定表达,ROC 生存曲线分析表明 miR - 1、miR - 126、miR - 483 - 5p 在稳定型心绞痛的诊断中具有潜在价值,而 miR - 1、miR - 126、miR - 133a 则标志着不稳定型心绞痛,且 miR - 133a 可能作为不稳定型心绞痛的潜在治疗靶点^[9]。miR - 208、miR - 499、miR - 133、miR - 1 被证实在急性心肌梗死(AMI)的诊断、进展和预后中发挥关键作用,其中 miR - 1、miR - 133a 和 miR - 208a 在心肌梗死后 4h 内持续升高,并先于 cTnT 在外周血中检测到;miR - 133a 则与心肌梗死面积、微血管阻塞相关^[10-12]。miR - 208a 在 AMI 患者症状出现后 1~4h 内出现明显升高且在外周血中 100% 高表达,同时特异性的区别于健康人群和非心肌梗死患者,可作为一个潜在的可靠生物学标志物早期诊断 AMI。

动脉粥样硬化与血管壁炎症、脂质沉积、内皮功能紊乱、氧化应激、血小板活化、斑块破裂等均密切相关,microRNAs 分子可参与到这些生物学过程。在动脉粥样硬化发生、发展的病理过程中伴有多个 microRNAs 分子的差异表达。其中,高脂饮食可降低 miR - 33 的表达水平,而 miR - 33 通过结合 RIP1403' 端来降低 IL - 1 β 和 TNF - α 的表达(RIP140 是 NF - κ B 的活化物),因此,动脉粥样硬化组织中由于 miR - 33 表达的降低增加了巨噬细胞分泌的 IL - 1 β 和 TNF - α ,促进了炎症反应,抗 miR - 33 治疗可降低冠状动脉疾病风险^[13]。miR - 155 在动脉粥样硬化组织中高表达,且是免疫系统中的重要调控物质并与急性炎症反应密切相关,主要通过促进 NF - κ B 的转录和活化 NF - κ B 信号通路来发挥促炎功能。miR - 126 在内皮细胞中高表达,可通过降低 VCAM - 1 的表达来负向调控血管壁的炎症反应^[14]。miR - 31 和 miR - 17 亦可通过调控黏附分子的表达来降低血管壁炎症。血小板活化加速了动脉粥样硬化急性事件的发生,microRNAs 分子亦参与其中。miR - 223 在血小板中高度表达,与 P2Y₁₂ 受体的 3' 端结合,从而抑制 P2Y₁₂ 受体基因的表达,减少血小板颗粒的分泌^[15]。囊泡相关膜蛋白 8(VAMP8)是一个与血小板功能、分泌和活化显著相关的抗原,miR - 96 可作用于 VAMP8mRNA 的 3' 端并抑制小板的活化,在动脉粥样硬化性心脏病中发挥有益作用^[16]。斑块破裂导致急性心血管事件的发生,miR - 133 可降低斑块组织 I 型胶原的生成,且 miR - 133a 的高表达与不稳

定斑块密切相关^[17]。miR - 21、miR - 29b、miR - 19 也与胶原合成、纤维帽生成相关。miR - 146a 可上调促炎介质的生成(TNF - α 和 IL - 1 β),并通过抑制 IRAK - 1 和 TRAF - 6 降低人体 MMP - 13 的生成发挥促动脉粥样硬化的作用^[18]。此外,microRNAs 可参与到细胞增殖、血管新生、血管重塑、脂质代谢等相关方面,影响动脉粥样硬化的病理进程。

2. lncRNAs 与动脉粥样硬化性心脏病:通过全基因组关联研究(genome - wide association study, GWAS)发现的 ANRIL 为冠心病相关的最早出现的 lncRNA 分子,位于冠心病易感区域——9p21 染色体区域,ANRIL 基因携带者较非携带者具有更显著的心肌梗死风险^[19]。ANRIL 可导致 ANRIL/PRC 介导的 INK4 位点的基因沉默,促进血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和动脉粥样斑块形成^[20,21]。此外,ANRIL 存在于外周血单核细胞及动脉粥样硬化斑块中,其转录水平的升高与动脉粥样硬化的严重性直接相关。因此推测,ANRIL 的差异表达或可影响冠心病的发生、发展,ANRIL 或可成为动脉粥样硬化新的诊断标志物。新近的基础研究显示 lincRNA - p21 可发挥调控细胞增殖和凋亡的生物学功能,并在动脉粥样硬化过程中发挥关键作用,apoE^{-/-} 小鼠和冠心病患者均显示 lincRNA - p21 的差异表达,体外功能学研究亦证实了 lincRNA - p21 的生物学功能,可通过抑制细胞增生、促进巨噬细胞凋亡发挥保护血管的作用,因此,lincRNA - p21 或可作为动脉粥样硬化治疗的新靶点^[22]。

基因芯片为发现差异表达的 lncRNAs 的主要方式,Liu 等^[23]对心肌梗死缺血再灌注损伤心肌进行基因芯片分析,结果显示多个 lncRNA 和 mRNA 的异常表达,并通过 GO 分析和 Pathway 分析显示 lncRNA 和 mRNA 的生物学功能,且多与免疫、代谢、细胞因子活化等生理病理过程相关,并同时引起了多种与心肌缺血再灌注损伤相关的信号通路的显著变化,如信号因子受体信号通路,提示 lncRNAs 在心肌缺血再灌注早期发挥了关键作用。人体 lncRNAs 研究结果显示,lncRNA MIAT(myocardial infarction - associated transcript, MIAT),是心肌梗死的敏感位点并增加患者心肌梗死风险。冠心病是导致心力衰竭的主要病因,而心力衰竭是心血管疾病的终末阶段,其发生率和病死率均较高,因此心力衰竭的早期诊断具有重要意义。心肌梗死后心力衰竭患者的 lncRNAs 表达研究显示心室重塑患者可以 LIPCAR 的表达水平来鉴

别,对心肌梗死后患者 LIPCAR 表达水平的研究提示 LIPCAR 的表达水平随着心室重塑逐渐上调,并发展至心力衰竭,LIPCAR 或可作为独立危险因素预测心血管死亡^[24]。

三、ncRNAs 调控网络及 ceRNAs

尽管 microRNAs 和 lncRNAs 在心脏和血管病理生理过程中均发挥重要作用,但 ncRNAs 的网络调控机制及其在心血管病理生理过程中的相互作用仍属未知。最新的理论提出 RNA 之间通过 ceRNA(竞争性内源 RNA)进行对话,几乎所有类型的 RNA 分子彼此均能竞争性的结合 microRNA,从而进行大规模的网络调控,lncRNA 亦具有 microRNA 的结合位点,从而调控 microRNA 的生物学功能,干扰 ceRNA 及其调控网络均可导致疾病发生^[25]。因此,针对 microRNA、mRNA、lncRNA 三者的相互作用关系进行 ceRNA 分析,将所有类型的 RNA 分子作为一个整体进行研究或可从不同层面阐释疾病进程和疾病的复杂性,为疾病提供潜在的治疗靶点。

四、ncRNAs 在中医药领域中的应用

近年来,ncRNAs 在中医药领域中也渐受重视,已有研究报道了 microRNAs 分子作为冠心病血瘀证的生物学标志物及 microRNAs 在冠心病血瘀证中的分子机制,揭示了冠心病血瘀证潜在的物质基础和 microRNAs 分子在血瘀证中发挥的生物学机制,为中医证型的客观化提供了可靠证据^[26]。miR-146b-5p、miR-199a-5p、CALR 和 TP53 可作为不稳定型心绞痛血瘀证患者的生物学标志物,miR-363-5p、miR-668、RIPK2 和 STK4 可作为不稳定性心绞痛痰浊证患者的生物学标志物,并从 microRNA 及其靶基因表达层面揭示了“同病异证”和“异病同证”的生物学基础^[26]。

microRNAs 亦可作为药物作用的新靶点,或可从 microRNAs 调控多个靶基因的层面揭示中医药的多靶点治疗和其作用机制,因此有研究针对中医药对 microRNAs 分子的调控作用来探索中医药的疗效。人参皂苷 Rg1 预处理的人脐静脉内皮细胞可显著下调 miR-214 的表达,根据 GO 分析和 Pathway 分析显示 eNOS 为其靶基因,揭示了人参皂苷 Rg1 通过调控 miR-214 的表达来调节 eNOS 的表达发挥促血管生成的作用。通心络胶囊可通过抑制 Akt1 诱导的 microRNA-155 的表达在动脉粥样硬化的防治中发挥抗炎作用。三七皂苷 R1 能显著降低 ApoE^{-/-}小鼠血脂混合炎性因子,并显著增加斑块组织中 miR-

26a、miR-21、miR-126a、miR-133 等的表达;麝香通心滴丸亦可减弱 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块,并降低了主动脉 miR-21a、miR-132、miR-126a、miR-155 并且增加 miR-20a 的表达。

五、展 望

尽管 ncRNAs 在心血管疾病诊断、治疗和预后的研究中取得了巨大进展,但临床中仍需要进一步研究能够降低心血管疾病事件的新的诊断和预后干预的生物学标志物。愈来愈多的证据显示 ncRNAs 可作为早期诊断和判断预后生物学标志物。此外,ncRNAs 影响心血管疾病发生、发展过程,对 ncRNAs 的生物学功能进行深入探索或可为寻找心血管疾病新的治疗靶点提供依据。因此,进一步研究 ncRNAs 在心血管系统病理生理过程中的特异性表达和作用非常必要。

在中医药领域中 microRNAs 的研究已取得较多成果,其不仅可以作为中医不同证型的生物学标志物,同时还可以作为中药药物干预的新靶点,从分子水平揭示中医药作用机制及中医证型的物质基础,但目前研究仍不够深入亦未从大规模人群中进行验证,因此,microRNAs 作为中医证型生物学标志物的研究仍任重而道远。除此之外,药物对 microRNAs 的药物干预研究虽部分揭示了中药的作用机制但多集中在体外研究和动物实验中,中医药对不同疾病人群干预后 microRNAs 分子的表达亦需进一步探索。中医药对功能更为广泛和强大的 lncRNAs 研究尚未出现,lncRNAs 亦可作为可靠的生物学标志物,并可通过 ceRNA 机制与 microRNAs 结合发挥复杂的网络调控体系,其在心血管领域 lncRNAs 的研究具有更大的价值,若能寻找中医证型特异性表达的 lncRNAs,或许对中医证型客观化和中医药药理作用提供更为切实可靠的物质基础。

参考文献

- 1 Alexander RP, Fang G, Rozowsky J, et al. Annotating non-coding regions of the genome[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(8): 559-571
- 2 Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation[J]. Nat Struct Mol Biol, 2013, 20(3): 300-307
- 3 Esteller M. Non-coding RNAs including miRNAs and lncRNAs in cardiovascular biology and disease[J]. Cells, 2014, 3(3): 883-898
- 4 Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology[J]. Nature, 2011, 469(7330): 336-342
- 5 Fiedler J, Thum T. MicroRNAs in myocardial infarction[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(2): 201-205

(下转第 165 页)

ting transcription factor 3 predicts a dominant role for miRNAs in immediate early gene regulation[J]. PLoS Comput Biol, 2014,10(5): e1003597

19 Groenendyk J, Sreenivasiah PK, Kim DH, *et al.* Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. Circ Res, 2010,107(10): 1185 – 1197

20 Brooks AC, Guo Y, Singh M, *et al.* Endoplasmic reticulum stress – dependent activation of ATF3 mediates the late phase of ischemic preconditioning[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014,76:138 – 147

21 Hasin T, Elhanani O, Abassi Z, *et al.* Angiotensin II signaling up – regulates the immediate early transcription factor ATF3 in the left but not the right atrium[J]. Basic Res Cardiol, 2011,106(2):175 – 187

22 Zhou H, Shen DF, Bian ZY, *et al.* Activating transcription factor 3 deficiency promotes cardiac hypertrophy, dysfunction, and fibrosis induced by pressure overload[J]. PLoS One, 2011,6(10):e26744

23 Koren L, Elhanani O, Kehat I, *et al.* Adult cardiac expression of the activating transcription factor 3, ATF3, promotes ventricular hypertrophy[J]. PLoS One, 2013,8(7):e68396

24 Lin H, Li HF, Chen HH, *et al.* Activating transcription factor 3 protects against pressure – overload heart failure via the autophagy molecule Beclin – 1 pathway[J]. Mol Pharmacol, 2014,85(5):682 – 691

(收稿日期:2015 – 01 – 30)

(修回日期:2015 – 02 – 05)

(上接第 161 页)

6 Sayed AS, Xia K, Yang TL, *et al.* Circulating microRNAs: a potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction[J]. Dis Markers, 2013,35(5): 561 – 566

7 Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J]. Cell, 2013,152(6):1298 – 1307

8 Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, *et al.* Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment[J]. Cell, 2013,152(3):570 – 583

9 D'Alessandra Y, Carena MC, Spazzafumo L, *et al.* Diagnostic potential of plasmatic microRNA signatures in stable and unstable angina[J]. PLoS One, 2013,8(11):e80345

10 Sayed AS, Xia K, Yang TL, *et al.* Circulating microRNAs: a potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction[J]. Dis Markers, 2013,35(5):561 – 566

11 Liebetrau C, Mollmann H, Dorr O, *et al.* Release kinetics of circulating muscle – enriched microRNAs in patients undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy[J]. J Am Coll Cardiol, 2013,62(11): 992 – 998

12 Eitel I, Adams V, Dieterich P, *et al.* Relation of circulating MicroRNA – 133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST – elevation myocardial infarction[J]. Am Heart J, 2012,164(5):706 – 714

13 Ho PC, Chang KC, Chuang YS, *et al.* Cholesterol regulation of receptor – interacting protein 140 via microRNA – 33 in inflammatory cytokine production[J]. FASEB J, 2011,25(5):1758 – 1766

14 Harris TA, Yamakuchi M, Kondo M, *et al.* Ets – 1 and Ets – 2 regulate the expression of microRNA – 126 in endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010,30(10):1990 – 1997

15 Stakos DA, Gatsiou A, Stamatelopoulous K, *et al.* Platelet microRNAs: From platelet biology to possible disease biomarkers and therapeutic targets[J]. Platelets, 2013,24(8):579 – 589

16 Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, *et al.* VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet

microRNA[J]. J Thromb Haemost, 2010,8(2):369 – 378

17 Castoldi G, Di Gioia CR, Bombardi C, *et al.* MiR – 133a regulates collagen 1A1: potential role of miR – 133a in myocardial fibrosis in angiotensin II dependent hypertension[J]. J Cell Physiol, 2012,227(2): 850 – 856

18 Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, *et al.* Expression of microRNA – 146a in osteoarthritis cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2009,60(4): 1035 – 1041

19 Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, *et al.* ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS[J]. FASEB J, 2011,25(2): 444 – 448

20 Motterle A, Pu X, Wood H, *et al.* Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells[J]. Hum Mol Genet, 2012,21(18):4021 – 4029

21 Congrains A, Kamide K, Oguro R, *et al.* Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B[J]. Atherosclerosis, 2012,220(2):449 – 455

22 Wu G, Cai J, Han Y, *et al.* LincRNA – p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis and atherosclerosis by enhancing p53 activity[J]. Circulation, 2014,130(17): 1452 – 1465

23 Liu Y, Li G, Lu H, *et al.* Expression profiling and ontology analysis of long noncoding RNAs in post – ischemic heart and their implied roles in ischemia/reperfusion injury[J]. Gene, 2014,543(1):15 – 21

24 Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, *et al.* Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure[J]. Circ Res, 2014,114(10):1569 – 1575

25 Salmena L, Poliseno L, Tay Y, *et al.* A ceRNA hypothesis: the Rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. Cell, 2011,146(3):353 – 358

26 王阶, 虞桂. MicroRNA 与冠心病中医证候研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012,32(11):1562 – 1565

(收稿日期:2015 – 01 – 07)

(修回日期:2015 – 01 – 20)