

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.24.036

心肌细胞凋亡与 miRNA 调控*

吴泳江¹, 王敬², 王琪², 黄金秀^{2,3}综述, 齐仁立^{2,3△} 审核

(1. 西南大学荣昌校区, 重庆 402460; 2. 重庆市畜牧科学院 402460;

3. 农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460)

[关键词] miRNA; 心肌细胞凋亡; 急性心肌梗死; 缺血再灌注; 氧化应激

[中图分类号] R714.252

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)24-3422-03

目前,我国心血管病患者约为 2.9 亿,病死率占城乡居民总死亡原因的第 1 位,并且发病率呈逐年上升的态势。2016 年发布的《中国心血管病报告 2015》显示,我国每 5 例死亡病例中有 2 例是死于心血管疾病,其中急性心肌梗死患者为 250 万,住院费用为 133.75 亿元,较去年增长 32.02%;次均住院费用为 24 706.0 元,较去年增长 8.72%,在心血管疾病中增速最快。急性心肌梗死可诱发心肌细胞大量凋亡,随后发生的缺血再灌注和氧化应激,进一步扩大心肌细胞凋亡,从而加重心血管疾病和增加病死率。因此,通过控制心肌细胞凋亡的发生可以降低心血管疾病的发病率和病死率,研究表明,微小 RNA (miRNA)在这一过程中发挥重要的调控作用。

1 心肌细胞凋亡与病理诱因

细胞凋亡是由多个基因控制的细胞程序性死亡,是维持细胞数量平衡和生理稳态的重要分子事件。药物、辐射、疾病、氧化损伤等外因或内因都会诱导细胞启动凋亡。心肌细胞凋亡在心血管疾病的发生和发展中起着关键性的作用,而急性心肌梗死、心脏缺血再灌注和氧化应激等病理因素是引起心肌细胞凋亡的重要诱因。冠状动脉急性、持续性缺血缺氧导致线粒体凋亡通路、死亡受体通路凋亡通路和内质网凋亡通路等被激活,引起大量心肌细胞凋亡(即急性心肌梗死),临床上通常采用尽早恢复血流供应来治疗(即再灌注),但这样会进一步加重心肌细胞凋亡,引起缺血再灌注损伤。在急性心肌梗死和缺血再灌注损伤的过程中往往还伴随着氧化应激的发生,而氧化应激到达一定程度也会引起细胞凋亡。

1.1 急性心肌梗死引起心肌细胞凋亡 机体发生急性心肌梗死时,心脏处于缺血缺氧和氧化应激状态,可诱导多种凋亡相关基因、蛋白和通路发生变化,如促凋亡基因 caspase 家族中的 caspase-3 和 caspase-9, Bcl-2 家族中的 Bax^[1] 和 RIP 家族中的 RIP1 和 RIP3 的 mRNA 和蛋白表达升高^[2]; 抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达降低^[1]; 氧化应激有关的锰超氧化物歧化酶(MnSOD)^[3] 和还原型辅酶 II (NADPH)^[4] 活性增强,线粒体活性氧(mitoROS)增多^[4]。一些研究表明,激活 RhoA/ROCK^[1]、MMP-1/JNK^[5] 通路和减少氧化应激可抑制心肌细胞凋亡。

1.2 缺血再灌注引起心肌细胞凋亡 随着医药技术的不断进步,急性心肌梗死可以采用药物溶栓、经皮冠状动脉介入术(PCI)、冠状动脉旁路移植术(CABG)等方法来恢复缺血心肌的血流供应(即缺血再灌注),这在一定程度上降低了急性心肌梗死的病死率。但再灌注是一把双刃剑,它会加重心肌细胞缺

血引起的损伤,导致心肌细胞凋亡和进一步的功能障碍。有研究表明,缺血再灌注分别引起(27.9±5.9)%、(51.1±5.8)%、(37.14±4.10)%的心肌细胞凋亡,虽然凋亡率不一致,但都会显著引起心肌细胞凋亡,并且缺血再灌注损伤程度与细胞凋亡呈正相关^[6-8]。与急性心肌梗死诱导心肌细胞凋亡相似,缺血再灌注一方面会引起 caspase-3、caspase-9 和 Bax 等促凋亡基因和蛋白表达升高,活性氧(ROS)和硝基络氨酸含量显著升高;另一方面它会显著降低 Bcl-2 等抑凋亡基因 mRNA 和蛋白表达、Bcl-2/Bax 比值、抗氧化酶 GPx1 和 SOD 的基因表达,但也存在一些差异,如诱导凋亡的程度和通路不同。研究者在激活相关通路抑制缺血再灌注诱导的心肌细胞凋亡方面做了大量的研究,他们发现激活 TLR4/NF-κB、PI3K/Akt/eNOS 和 JAK2/STAT3 信号通路可抑制心肌细胞凋亡^[7,9-10]。

1.3 氧化应激引起心肌细胞凋亡 心肌在发生急性心肌梗死和缺血再灌注时,会产生过量的氧自由基,引起氧化系统与抗氧化系统作用失衡,即处于氧化应激状态,进而引发或加剧心肌细胞凋亡和坏死,导致不可逆的损伤。氧化应激与多种心血管疾病(如急性心肌梗死、缺血再灌注损伤、心衰等)都有牵连,它通过攻击心肌细胞中的 DNA、RNA 和蛋白的局部构象来诱导凋亡,是引起心肌细胞凋亡的主要因素。目前,虽然氧化应激引起心肌细胞凋亡的作用机制还不明晰,但人们在减少氧化应激引起的心肌细胞凋亡方面做了很多研究。Sahu 等^[11]通过分析血清中抗氧化物(GSH、GR、GPx、GST、SOD、CAT、NQO1、HO-1)和凋亡(活性 caspase-3、Bax、Bcl-2、p53、DNA 片段化)相关基因指标发现,提高心肌细胞的抗氧化水平可显著抑制心肌细胞凋亡。更进一步的研究发现,激活雌激素受体 α/β(ERα/β),提高 Akt 磷酸化水平^[12],抑制 MAPK/p53 信号通路可以减少氧化应激引起的心肌细胞凋亡^[13]。Tao 等^[14]研究发现,用 200 μmol/L 的 H₂O₂ 刺激大鼠心肌细胞 6 h 会引发超过 50% 的细胞凋亡,且细胞活率减至(12.4±3.7)% ,作用机制可能是 H₂O₂ 引起的氧化应激导致 Dvl-1、β-catenin 和 c-Myc 基因的 mRNA 和蛋白表达升高, Bcl-2/Bax 降低和 Wnt/frizzled 通路激活等多方面的变化,从而诱发心肌细胞凋亡。

2 miRNA 调控心肌细胞凋亡

miRNA 是一类长约 22 nt 的非编码小 RNA,能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 降解或者抑制其翻译,从而对基因进行转录后表达调控,广泛参与细胞的增殖、分化、病变、修复和凋亡等多种生命活动。研究表明,一些 miRNA 在心肌细胞凋亡中发挥着重要的调控作用,控制 miR-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31302055,31470117);重庆市基本科研业务费(16418)。 作者简介:吴泳江(1990-),在读硕士,主要从事 miRNA 对肌肉和脂肪细胞的调控研究。 △ 通信作者,E-mail:qirenli1982@163.com。

NA 的表达可以影响心肌细胞凋亡进程,这为人类和动物心血管疾病的预测、诊断与治疗提供了新的思路。

2.1 miRNA 的合成与作用机制 大多数 miRNA 在不同物种间高度保守,它们的表达具有时序性和组织特异性。目前对 miRNA 的生物合成研究得较为清晰,在其合成过程中所产生的一些中间体是判断 miRNA 的标识物。经典的 miRNA 形成途径如下:(1)核内编码 miRNA 的基因在 RNA 聚合酶 II 作用下转录生成几百个核苷酸长度的初始 miRNA(pri-miRNA)。(2)pri-miRNA 在核内被 RNase III 核酸酶 Drosha 和伴侣蛋白 DGCR8 组成的微处理器复合体加工成长约 70 nt 的发夹状前体 miRNA(pre-miRNA)。(3)pre-miRNA 在 Ran-GTP 依赖的核质/细胞质转运蛋白 exportin5 的作用下,由核内转运到胞质中。(4)胞质中的 pre-miRNA 在 RNase III 核酸酶 Dicer 的作用下,被切割形成约 20nt 的双链 miRNA。(5)最后在解旋酶的作用下,双链 RNA 解链为单链 RNA,即形成成熟 miRNA。

miRNA 成熟体与特定的核糖核蛋白 AGO(Argonaute)结合形成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC),然后以 miRNA 5' 端第 2~8 个核苷酸为“种子序列(seed region)”与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 或 ORF 区进行互补配对,若二者完全互补配对则指导 RISC 对靶基因 mRNA 进行切割降解,若二者只是种子序列完全互补其他部位部分互补则指导 RISC 抑制靶基因 mRNA 翻译。通常,一个 miRNA 可以靶向调控多达数百个靶基因,而一个基因也可能同时受到多个 miRNA 的影响。

2.2 miRNA 调控急性心肌梗死引起的心肌细胞凋亡 在机体正常的生理状态下,适量表达的心肌特异性 miRNA 维持着机体有序的生命活动。在心脏发生急性心肌梗死时,心肌特异性 miRNA 会表达异常,它所靶向作用的细胞凋亡相关基因和分子信号通路也会产生相应变化。有些 miRNA 发挥着抑制心肌细胞凋亡的作用。Dong 等^[15]发现,小鼠急性心肌梗死早期,miRNA-21 在梗死区域内的表达明显下调,在梗死区周围则明显升高,过表达 miRNA-21 能抑制促凋亡基因 PDCD4 和 AF-1,从而显著降低急性心肌梗死小鼠的心肌细胞凋亡数量。Wang 等^[16]在大鼠和小鼠急性心肌梗死模型中发现,miRNA-499 可通过上调 CnA α 和 CnA β 的表达,激活钙依赖磷酸酶的活性,减少线粒体分裂蛋白聚集并阻碍由它介导的线粒体裂解,进而发挥抑制心肌细胞凋亡的作用。有学者向大鼠心肌梗死区域移植 miRNA-1 高表达的胚胎干细胞后,与对照组相比,发现心肌磷酸化 Akt 蛋白水平显著升高,原因可能是 miRNA-1 激活了 Akt-caspase-3 通路,从而抑制了心肌细胞凋亡^[17-18]。

2.3 miRNA 调控缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡 缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡是造成缺血再灌注损伤的重要因素,这一过程比较复杂,其触发机制尚不清楚。一些 miRNA 可以促进缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡。Yeh 等^[19]进行大鼠心脏的缺血再灌注实验发现,用 miRNA-27a 前体转染心肌细胞会降低白细胞介素(interleukin,IL)10 和核因子(NF)- κ B 的表达,进而激活 caspase-3 并促进心肌细胞凋亡。有些 miRNA 也可以发挥抑制心肌细胞凋亡的作用。Wang 等^[20]研究表明,在大鼠缺血/再灌注模型中 miRNA-494 水平显著上调,它通过作用于促凋亡基因(PTEN、ROCK1 和 CaMKII δ)和抗凋亡基因(FGFR2 和 LIF)最终达到抑制心肌细胞凋亡的效果。Huang 等^[21]发现在 miRNA-21-P TEN/AKT-P-P38-caspase-3 和 miRNA-146a-TRAF6-p-p38-caspase-3 信号通路的协同作用

下 miRNA-21 和 miRNA-146a 具有更强的抑制作用。Wang 等^[22]研究发现,过表达 miRNA-125b 可降低心肌细胞中 caspase-3/7 和 caspase-8 的活性,抑制 p53 和 Bak1 的蛋白表达,最终减少心肌细胞凋亡。

2.4 miRNA 调控氧化应激引起的心肌细胞凋亡 氧化应激会造成心肌细胞、肾脏细胞、肝细胞等不同类型细胞的凋亡。心肌梗死和缺血再灌注过程中也伴随着一定程度的心肌细胞氧化应激,进而诱导或加剧心肌细胞凋亡,在这过程中,有些 miRNA 会加剧心肌细胞凋亡。崔燕^[23]研究结果表明,H₂O₂ 通过激活心肌细胞线粒体凋亡途径损伤心肌细胞,在氧化损伤过程中 miRNA-135a 被激活,其靶向作用于下游的 Bcl-2 基因,进一步加重了 H₂O₂ 诱导的心肌细胞氧化损伤及线粒体凋亡途径的活化;抑制 miRNA-135a 可以释放对 Bcl-2 的靶向抑制作用,从而减轻了 H₂O₂ 诱导的心肌细胞氧化损伤。Wang 等^[24]报道,下调 miRNA-181a 能够释放其对谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPX1)的靶向抑制作用,从而显著抑制氧化应激诱导的细胞凋亡、ROS 产生、线粒体结构的破坏以及关键信号蛋白在线粒体凋亡途径的活化。杨宝锋等^[25]研究发现,miRNA-1 和 miRNA-133 对氧化应激导致细胞(鼠心室肌细胞)凋亡产生相反的作用,miRNA-1 促进凋亡,miRNA-133 则抑制凋亡,在氧化应激中 miRNA-1 的水平显著上升,它作用于 HSP60 和 HSP70 基因 3'非翻译区(3'UTR)的单独位点;miRNA-133 作用于 caspase-9 基因全序列的多个位点;miRNA-1 可抑制 HSP60 和 HSP70 蛋白表达,但不影响它们的转录过程,miRNA-133 与之相反,从蛋白和 mRNA 水平两方面抑制 caspase-9 的表达。

3 小结与展望

急性心肌梗死等心血管疾病伴随着大量心肌细胞凋亡,研究并控制心肌细胞凋亡的起始和发展对于治疗心血管疾病具有极大的帮助。一些 miRNA 及其靶基因对心肌细胞凋亡发挥重要调控作用,它们在心血管疾病中会异常表达和功能失调。这些 miRNA 通过协同或拮抗作用促进或抑制了心肌细胞凋亡的启动和发展。在不同病理因素下同一个功能基因可能受到不同 miRNA 调控(如 PTEN 受到 miRNA-214、-21、-494 的调控),同一个 miRNA 也可能同时调控促凋亡基因和抑凋亡基因(如 miRNA-1 调控 HSP60、HSP70、Akt),最终对心肌细胞凋亡发挥不同的作用。

目前在人类心脏组织已发现有 200 多种 miRNA 稳定表达,但是参与心肌细胞凋亡调控的 miRNA 的研究主要集中在动物模型和体外培养的心肌细胞上,并且其详细作用机制尚不清楚。随着研究的深入,人们也提出了许多利用 miRNA 来预测、诊断、治疗心肌细胞凋亡的思路,例如,应用反义寡核苷酸、海绵技术、屏蔽技术沉默呈高表达并起癌基因作用的 miRNA,借助 miRNA 模拟技术补偿呈低表达的 miRNA,运用差异性表达的 miRNA 来预测和诊断心肌细胞凋亡是否发生等。要将这些思路付诸实践,需要进一步明晰 miRNA 调控心肌细胞凋亡的机制,完善技术体系,以期对心血管疾病的治疗提供有力支撑。

参考文献

- [1] 宋占春,白静慧,汪琦,等.瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的拮抗作用及可能机制[J].中华医学杂志,2015,95(45):3695-3700.

- [2] Liu YR, Xu HM. Protective effect of necrostatin-1 on myocardial tissue in rats with acute myocardial infarction [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2): 1-8.
- [3] Luo S, Gu X, Ma F, et al. ZYZ451 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis via enhancing Mn-SOD and STAT3 interaction [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 92(S1): 1-14.
- [4] Yu B, Meng F, Yang Y, et al. NOX2 antisense attenuates Hypoxia-Induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocyte [J]. *Int J Med Sci*, 2016, 13(8): 646-652.
- [5] Li T, Wei X, Evans CF, et al. Left ventricular unloading after acute myocardial infarction reduces MMP/JNK associated apoptosis and promotes FAK Cell-Survival signaling [J]. *Ann Thorac Surg*, 2016, 7(1): 4-7.
- [6] Guo C, Zeng X, Song J, et al. A soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in rat cardiomyocytes via the mitochondrial pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 11923-11940.
- [7] He F, Xu BL, Chen C, et al. Methylophipogonanone a suppresses ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis in mice via activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(6): 763-771.
- [8] Wang Y, Zhang H, Chai F, et al. The effects of escitalopram on myocardial apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 during myocardial ischemia/reperfusion in a model of rats with depression [J]. *BMC Psychiatry*, 2014, 14(1): 349.
- [9] Guo X, Jiang H, Yang J, et al. Radioprotective 105 kDa protein attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis and autophagy by inhibiting the activation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(3): 885-893.
- [10] Jiang X, Guo CX, Zeng XJ, et al. A soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion via the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(8): 1033-1047.
- [11] Sahu BD, Kuncha M, Rachamalla SS, et al. Lagerstroemia speciosa L. attenuates apoptosis in isoproterenol-induced cardiotoxic mice by inhibiting oxidative stress; possible role of Nrf2/HO-1 [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2015, 15(1): 10-22.
- [12] Liu B, Zhang J, Liu W, et al. Calycosin inhibits oxidative stress-induced cardiomyocyte apoptosis via activating estrogen receptor- α/β [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(1): 181-185.
- [13] Thandavarayan RA, Giridharan VV, Arumugam S, et al. Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119214.
- [14] Tao J, Chen BD, Ma YT, et al. FrzA gene protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced oxidative stress through restraining the Wnt/Frizzled pathway [J]. *Lipids Health Dis*, 2015, 14(1): 1-10.
- [15] Dong S, Cheng Y, Yang J, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(43): 29514-29525.
- [16] Wang JX, Jiao JQ, Li Q, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1 [J]. *Nat Med*, 2011, 17(1): 231-243.
- [17] Glass C, Singla DK. MicroRNA-1 transfected embryonic stem cells enhance cardiac myocyte differentiation and inhibit apoptosis by modulating the PTEN/Akt pathway in the infarcted heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(5): H2038-H2049.
- [18] Glass C, Singla DK. ES cells overexpressing microRNA-1 attenuate apoptosis in the injured myocardium [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357(1/2): 135-141.
- [19] Yeh CH, Chen TP, Wang YC, et al. MicroRNA-27a regulates cardiomyocyte apoptosis during cardioplegia-induced cardiac arrest by targeting interleukin 10-related pathways [J]. *Shock*, 2012, 38(6): 607-614.
- [20] Wang X, Zhang X, Ren XP, et al. MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury [J]. *Circulation*, 2010, 122(13): 1308-1318.
- [21] Huang W, Tian SS, Hang PZ, et al. Combination of microRNA-21 and microRNA-146a attenuates cardiac dysfunction and apoptosis during acute myocardial infarction in mice [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5(3): e296.
- [22] Wang X, Ha T, Zou J, et al. MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6 [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(3): 385-395.
- [23] 崔燕. MicroRNA-135a 在 H₂O₂ 诱导大鼠心肌细胞凋亡中的作用及其机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [24] Wang L, Huang H, Fan Y, et al. Effects of downregulation of microRNA-181a on H₂O₂-induced H9c2 cell apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014(5): 960362.
- [25] 杨宝峰, 许超千, 张勇, 等. microRNAs: 调控心肌细胞凋亡及诱发恶性心律失常导致心源性猝死的重要调质 [C]. 昆明: 第七届海峡两岸心血管科学研讨会论文集, 2009: 4-5.