

MicroRNA 作为动脉粥样硬化的诊断生物标志物的研究进展

耿春晖 关秀茹

(哈尔滨医科大学附属第一医院检验科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

【摘要】 动脉粥样硬化是由脂质代谢紊乱和慢性炎症导致的疾病。随着个体化和精准医疗的发展, 早期精确诊断动脉粥样硬化对临床工作开展意义重大。由于小的非编码 RNAs 能调节炎症蛋白含量干扰脂质的形成, 因此研究小的非编码 RNAs 作为生物学标志物给动脉粥样硬化的快速诊断带来了新的希望。整合近年文献, 通过探讨小的非编码 RNAs 对动脉粥样硬化的病理机制的影响, 阐明其作为动脉粥样硬化生物标志物的意义。

【关键词】 动脉粥样硬化; 小的非编码 RNAs; 生物标志物

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.07.008

MicroRNA as a Diagnostic Biomarker for Atherosclerosis

GENG Chunhui, GUAN Xiuru

(Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China)

【Abstract】 Atherosclerosis (AS) is a disease caused by disorders of lipid metabolism and chronic inflammation. With the development of individualization and precision medicine, accurate early diagnosis of AS is of great significance. Small non-coding RNAs (microRNAs) regulate inflammatory protein levels and interfere with lipid formation, thus microRNAs as biomarkers has brought new insights for the early diagnosis for AS. This paper integrates recent literature and explores the significance of microRNAs as a biomarker for AS.

【Key words】 Atherosclerosis; MicroRNAs; Biomarker

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是由脂质代谢紊乱和慢性炎症导致的疾病^[1], 其病理机制复杂涉及一系列病理改变^[2]。AS 导致的心血管疾病是全世界发病率和死亡率增高的主要原因^[3]。近几年越来越多的证据表明, 非编码 RNA 在组织稳态和病理生理状态的调节中起重要作用。其中小的非编码 RNAs (microRNAs) 会干扰不同阶段的基因表达和信号通路。有研究表明, microRNAs 会调节炎症蛋白含量以及干扰脂质的形成^[4]。因此, microRNAs 作为生物学标志物给 AS 的快速诊断带来了新的希望。

1 MicroRNA 作为生物标志物的概述

1.1 MicroRNA 的简介

MicroRNA 是真核生物中长度为 19~25 个核苷酸组成的高度保守的非编码小 RNA 分子, 其参与多种生

物过程, 如细胞增殖、分化、凋亡和转移。MicroRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3' 非编码区结合介导 mRNA 的降解和翻译抑制, 并在转录后水平对基因表达发挥调节作用^[5]。

由于 microRNA 在不同组织、不同发育阶段的水平有显著差异, 并且研究发现 microRNA 的异常表达与人类疾病密切相关, 因此, 深入研究 microRNA 作为疾病的诊断、预后以及靶向治疗的标志物有重要意义^[6]。

1.2 MicroRNA 可作为生物标志物的原因

近年来随着个体化和精准医疗的发展, 精确的早期诊断对临床工作开展意义重大。由于 microRNA 表达谱在疾病状态和正常组织之间存在不同, 并且可以在血浆和血清中稳定表达, 因此, 研究 microRNA 作为

基金项目: 国家自然科学基金 (81672084)

通讯作者: 关秀茹, E-mail: gxr0451@sina.com

生物标志物诊断指标是有意义的^[7]。microRNA 可以作为生物标志物的原因有以下几点: (1) microRNA 在外周血中稳定存在: 细胞通过外泌体和细胞外囊泡分泌 microRNA, 分泌的 microRNA 在体液中保持稳定, 同时 microRNA 还可以与蛋白复合体结合而避免降解^[8]; (2) microRNA 具有高灵敏度和特异性: 与现有的一些蛋白质生物标志物相比, 包括血清肌红蛋白和肌酸激酶、肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 T 在内, microRNA 的检测更有意义。有报道称, microRNA-208A/B 在诊断急性心肌梗死时比肌钙蛋白具有更高的敏感性和特异性。MicroRNA-150、microRNA-132 和 microRNA-186 的组合生物标志物与 4 种经典生物标志物 B 型钠尿肽、超敏肌钙蛋白 I、C 反应蛋白和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的组合相比, 更具诊断意义^[9]; (3) microRNA 具有早期无创性: 在肿瘤诊断以及心血管疾病诊断中, microRNA 与传统的一些有创性检测方法相比, 其简单、无创、早期诊断的特点发挥着优势, 并且 microRNA 可以反映特定类型的肿瘤甚至细胞亚群的起源, 这意味着根据 microRNA 建立的肿瘤分类可以直接应用于临床诊断^[10]。

2 AS 检测的应用指标

2.1 AS 临床常规检测的指标

从医学影像学检测来看, 多普勒超声技术可以快速方便地检测颈动脉中层厚度^[11]。该技术无创、简便, 在临床广泛应用, 但是这个技术受角度依赖性、空间分辨率有限等影响也存在一定局限性。从临床实验室检测来看, AS 是脂质代谢紊乱疾病, 而脂蛋白会促进 AS 斑块的形成, 因此实验室的一些检测血脂的指标如脂蛋白 a、低密度脂蛋白等的改变都提示患者可能发生 AS^[12]。C 反应蛋白和超敏 C 反应蛋白都是非特异性炎症标志物, 能够预测 AS 以及心血管疾病发生的风险, 是临床重要的检测指标^[13-15]。实验室的检测指标一般需要联合应用并且受多种疾病影响, 因此也有一定局限。

2.2 AS 生物标志物检测指标

AS 是全世界心血管疾病的主要原因, 在寻找其新的检测和治疗途径时, 已经对 AS 内皮细胞 (EC)、平滑肌细胞 (SMC)、巨噬细胞有很多研究。自从 1993 年在秀丽隐杆线虫中发现 microRNA 以来, 研究者目前在人类基因组中已发现近 2 000 个 microRNA 序列^[16]。有大量证据表明 microRNA 参与 AS 发生的许多病理过程, 目前已经报道了数百种 microRNA 可以调节 EC 和 SMC 的增殖和迁移以及影响 AS 的脂质代谢、炎症的过程。回顾 microRNA 与 AS 斑块不稳定性的现有科学数据, 发现 microRNA-21、microRNA-100、

microRNA-127、microRNA-133、microRNA-143/145、microRNA-211/222、microRNA-494 的含量有显著变化^[17]。有研究通过 microRNA 微阵列技术分析证实了主动脉、颈动脉和股动脉的 AS 斑块中, microRNA-21、microRNA-34a、microRNA-146b-5p 和 microRNA-210 的表达与对照组相比明显上调^[18-19]。而在另一项动物实验中发现, microRNA-34a 和 microRNA-21 在 apoE^{-/-}小鼠中差异表达^[20]。这些研究表明, microRNA 可以作为 AS 的生物标志物, 干扰动脉壁中 microRNA 的表达, 是影响 AS 斑块发展的潜在应用指标。

3 MicroRNA 与 AS 相关联的检测指标

3.1 MicroRNA 与 EC

近几年的研究已经证实, EC 损伤引发的内分泌功能失调在 AS 早期形成和发展阶段的病理生理机制中起关键作用。EC 损伤增加了动脉壁对单核细胞的黏附, 增强了对单核细胞、巨噬细胞和脂蛋白的通透性, 从而促进动脉壁脂质条纹和粥样斑块的形成。对细胞系的研究显示, microRNA-126 在原代人脐静脉 EC 和许多 EC 细胞系, 包括 MS1、HAEC 和 EOMA 细胞系中表达, 其通过抑制 Notch1 抑制剂 δ 样 1 同系物对这些区域的 EC 增殖储备起关键作用。来自野生型小鼠的 EC 在培养的第 4 天和第 6 天中广泛生长, 而在 microRNA-126^{-/-} 小鼠主动脉环中发现内皮生长受损^[21]。在原代人脐静脉 EC 中, microRNA-126、microRNA-31 和 microRNA-17-3p 还通过控制血管细胞黏附分子-1 和细胞间黏附分子-1 表达来调节血管炎症^[22]。据报道, microRNA-17-92 簇其中包括 microRNA-17、microRNA-18a、microRNA-20a、microRNA-19a/b 与肿瘤坏死因子- α 诱导的 EC 凋亡密切相关, 在冠心病患者中显著下调^[23]。这些 microRNA 在 EC 中特异性变化提示它们可以作为监测 AS 发生进程的生物标志物诊断指标。

3.2 MicroRNA 与 SMC

SMC 是血管壁的重要组成部分, 其增殖和迁移是导致血管狭窄的主要原因。SMC 增殖也是导致 AS 发生、发展的重要步骤。SMC 的凋亡还导致多种炎症因子, 如白介素-1、白介素-8、人单核细胞趋化蛋白-1 的释放, 使得斑块内炎症反应加重, 促进巨噬细胞的浸润, 而增加的炎症细胞导致脂核内粥样物质的增多, 使斑块更加不稳定。在血管 SMC 中, microRNA-143/145 是公认的细胞功能调节剂。当小鼠主动脉缩窄时 microRNA-143/145 表达减少, microRNA-143/145 的敲除导致 SMC 收缩性丧失。在 microRNA-143/145 的慢病毒过表达中, AS 斑块总体上得到改善, 斑块变小并且纤维帽的厚度也有所减低^[24-25]。因此 microRNA-143/145 对 AS 斑块中 SMC 的影响使其可以用来检测

AS,其过表达限制 AS 斑块增大也是治疗 AS 新的靶点。基质金属蛋白酶-9 受 microRNA-133a/b 调节, microRNA-133a/b 也可以调节动物模型中人主动脉血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖和凋亡。在一项研究中发现,与无症状 AS 斑块相比,在有症状的斑块中有 5 种 microRNA (microRNA-100、microRNA-127、microRNA-145、microRNA-133a 和 microRNA-133b) 的表达增加^[26-27]。最新的研究发现,在 AS 形成的斑块中观察到肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 和 microRNA-92a 表达水平平行增加,而 ML-7 (MLCK 的抑制剂) 处理的小鼠 VSMC 中, microRNA-92a 表达降低,体外结果表明 microRNA-92a 通过 ROCK/MLCK 信号传导途径促进 VSMC 的增殖和迁移^[28]。MicroRNA 在 SMC 增殖早期就可发生变化,无论 microRNA 表达含量增加还是降低都可以对临床早期诊断有所帮助。

3.3 MicroRNA 与巨噬细胞

巨噬细胞属于单核吞噬细胞系统,其有 M1 和 M2 两种表型。M1 型巨噬细胞在炎症激活后增加胆固醇结晶形成,加速 AS 斑块的进展,而 M2 型巨噬细胞发挥抗炎作用阻碍 AS 斑块的进程。已经有研究证明 microRNA 通过调节巨噬细胞极化、脂质代谢从而在巨噬细胞功能中发挥重要作用^[29]。有研究报道 microRNA-216a 通过 Smad3/NF- κ B 途径激活端粒酶,促进 M1 型巨噬细胞的极化,加速 AS 进展^[30]。另一项研究发现 microRNA-23a-5p 在 AS 小鼠中表达含量显著增加,实验证实 microRNA-23a-5p 促进泡沫细胞形成是促进 AS 斑块发展的关键调节因子^[31]。信号调节蛋白 α 是调节巨噬细胞中炎症反应的重要信号分子。最新的研究报道发现 microRNA-378a 通过调节信号调节蛋白 α 介导的巨噬细胞的吞噬作用和极化,使胆固醇逆向转运,阻碍 AS 的进展^[32]。MicroRNA-21 通过下调 Toll 样受体 4 的表达,减弱十溴二苯醚诱导的 THP-1 巨噬细胞中脂质的累积,从而抑制 AS 的发展^[33]。

3.4 MicroRNA 与脂质代谢

AS 的主要危险因素有性别、年龄、血脂异常和糖尿病等。近年来大量研究证明,氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 所引发的一系列病理生理过程是导致 AS 形成的关键,反应损伤学说认为 ox-LDL 引起血管 EC 功能障碍和 EC 损伤这一作用是诱发 AS 发生的始动环节。已知腺苷三磷酸结合盒转运体 A1 (ABCA1) 对胆固醇转运和肝脏中的高密度脂蛋白发生至关重要,其可以特异性地受到 microRNA 调节。有研究报道, ABCA1 是 microRNA-17-5p 的靶标,抑制 microRNA-

17-5p 可减少炎症和脂质蓄积^[34]。MicroRNA-33a 和 microRNA-33b 通过调节 SREBP2 和 SREBP1 基因,进而影响人和小鼠细胞中的胆固醇和脂肪酸代谢。ABCA1 的翻译过程被 microRNA-33 直接抑制导致胆固醇流出减弱,并且当 microRNA-33 在 AS 小鼠模型中遗传缺失时,斑块体积和脂质含量降低。MicroRNA-155 调节 AS 斑块的发展、脂质摄取和单核细胞、巨噬细胞的炎症反应导致泡沫细胞形成^[35]。在其作用机制中,该 microRNA 充当 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症反应中的负反馈调节剂,抑制巨噬细胞炎症细胞因子的释放^[36]。除以上 microRNA 外,有报道称 microRNA-486、microRNA-92a 与高密度脂蛋白的成份相结合在冠心病血清中表达增高,而 microRNA-24、microRNA-33a、microRNA-103a、microRNA122 在冠心病患者的外周血单核细胞中显著增加^[37]。

4 小结与展望

随着研究进展,已经发现 microRNA 与 AS 发生、发展过程中每个环节都有密切联系。有些 microRNA 可以通过影响细胞水平的变化起到促 AS 的作用,有些则起到抑制作用。目前研究发现的 microRNA 在 AS 进展中特异性的升高和降低是其作为 AS 诊断指标的依据。随着基因测序技术的不断进步,已经发现了许多 microRNA,并且深入探讨了其影响 AS 的调控机制和信号通路。一项临床试验发现在 AS 患者的血浆外泌体中检测到 microRNA-30e 的高表达^[38],临床试验的研究提示多个 microRNA 都具有潜力成为 AS 诊断以及预后判断的无创分子标志物。MicroRNA 作为诊断标志物的研究在其他疾病,尤其是肿瘤领域中也有一定成效。有研究报道将 microRNA 与 CA199 结合诊断胆管癌,发现灵敏度增加至 89.7%^[39]。虽然 microRNA 以其独特的优势有望成为诊断 AS 的生物标志物,然而也有一些问题有待解决。目前 microRNA 的测定主要是通过 PCR 技术进行,通过计算其是否有显著差异从而判断它对 AS 的影响。但是该方法并不能进行特定核酸序列绝对含量的测定,标准化 microRNA 分离和定量是目前亟待解决的。

综上所述,microRNA 在器官和细胞的特异性表达使其具有巨大潜力成为 AS 的诊断生物标志物,深入研究其机制有望使其从科研走向临床,为 AS 的诊断提供新的依据。

参考文献

- [1] Zhang PY, Xu X, Li XC. Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection [J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2014, 18(20): 3091-3096.
- [2] Gistera A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis [J]. *Nat Rev Neph-*

- rol, 2017, 13(6):368-380.
- [3] Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis [J]. *J Cardiol*, 2019, 73(1):22-27.
- [4] Martens CR, Bansal SS, Accornero F. Cardiovascular inflammation: RNA take the lead [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 129:247-256.
- [5] Ojha R, Nandani R, Pandey RK, et al. Emerging role of circulating microRNA in the diagnosis of human infectious diseases [J]. *Cell Physiol*, 2019, 234(2):1030-1043.
- [6] Fan R, Xiao C, Wan X, et al. Small molecules with big roles in microRNA chemical biology and microRNA-targeted therapeutics [J]. *RNA Biol*, 2019, 16(6):707-708.
- [7] Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology [J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(1):3-11.
- [8] van de Vrie M, Deegens JK, Eikmans M, et al. Urinary microRNA as biomarker in renal transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2017, 17(5):1160-1166.
- [9] Paiva S, Agbulut O. MiRroring the multiple potentials of microRNAs in acute myocardial infarction [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4:73.
- [10] Lin J, Ma L, Zhang D, et al. Tumour biomarkers-Tracing the molecular function and clinical implication [J]. *Cell Proliferation*, 2019, 52(3):e12589.
- [11] Zhang X, Ang Q, Wang W. Application research on ultrasonic blood flow velocity measurement [J]. *Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi*, 2014, 38(1):53-56.
- [12] Orso E, Schmitz G. Lipoprotein(a) and its role in inflammation, atherosclerosis and malignancies [J]. *Clin Res Cardiol Suppl*, 2017, 12(Suppl 1):31-37.
- [13] Xu W, Chen B, Guo L, et al. High-sensitivity CRP: possible link between job stress and atherosclerosis [J]. *Am J Ind Med*, 2015, 58(7):773-779.
- [14] Morrison M, van der Heijden R, Heeringa P, et al. Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFkappaB in vivo [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 233(1):149-156.
- [15] Yoshida M, Higashi K, Kobayashi E, et al. Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(2):475-479.
- [16] Liu J, Yang B, Ai J. Advance in research of microRNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(5):994-1000.
- [17] Koroleva IA, Nazarenko MS, Kucher AN. Role of microRNA in development of instability of atherosclerotic plaques [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2017, 82(11):1380-1390.
- [18] Hung J, Miscianinov V, Sluimer JC, et al. Targeting non-coding RNA in vascular biology and disease [J]. *Front Physiol*, 2018, 9:1655.
- [19] Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, et al. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(1):211-217.
- [20] Han H, Qu G, Han C, et al. MiR-34a, miR-21 and miR-23a as potential biomarkers for coronary artery disease: a pilot microarray study and confirmation in a 32 patient cohort [J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47:e138.
- [21] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2):261-271.
- [22] Suarez Y, Wang C, Manes TD, et al. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation [J]. *J Immunol*, 2010, 184(1):21-25.
- [23] Tang Y, Zhang YC, Chen Y, et al. The role of miR-19b in the inhibition of endothelial cell apoptosis and its relationship with coronary artery disease [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:15132.
- [24] Elia L, Quintavalle M, Zhang J, et al. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice; correlates with human disease [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(12):1590-1598.
- [25] Lovren F, Pan Y, Quan A, et al. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2012, 126(11 Suppl 1):S81-90.
- [26] Torella D, Iaconetti C, Catalucci D, et al. MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo [J]. *Circ Res*, 2011, 109(8):880-893.
- [27] Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans [J]. *Stroke*, 2011, 42(9):2556-2563.
- [28] Wang J, Zhang C, Li C, et al. MicroRNA-92a promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration through the ROCK/MLCK signalling pathway [J]. *Cell Mol Med*, 2019, 23(5):3696-3710.
- [29] Wei Y, Zhu M, Schober A. Macrophage microRNAs as therapeutic targets for atherosclerosis, metabolic syndrome, and cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6):1756.
- [30] Yang S, Li J, Chen Y, et al. MicroRNA-216a promotes M1 macrophages polarization and atherosclerosis progression by activating telomerase via the Smad3/NF-kappaB pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(7):1772-1781.
- [31] Yang S, Ye ZM, Chen S, et al. MicroRNA-23a-5p promotes atherosclerotic plaque progression and vulnerability by repressing ATP-binding cassette transporter A1/G1 in macrophages [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 123:139-149.
- [32] Chen W, Li X, Wang J, et al. MiR-378a Modulates Macrophages Phagocytosis and Differentiation through Targeting CD47-SIRPalpha Axis in Atherosclerosis [J]. *Scand J Immunol*, 2019, 90(1):e12766.
- [33] Zhi H, Yuan N, Wu JP, et al. microRNA-21 attenuates BDE-209-induced lipid accumulation in THP-1 macrophages by downregulating Toll-like receptor 4 expression [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 125:71-77.
- [34] Tan L, Liu L, Jiang Z, et al. Inhibition of microRNA-17-5p reduces the inflammation and lipid accumulation, and up-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in atherosclerosis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(4):280-288.
- [35] Horie T, Baba O, Kuwabara Y, et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice [J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(6):e003376.
- [36] Huang RS, Hu GQ, Lin B, et al. MicroRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages [J]. *J Invest Med*, 2010, 58(8):961-967.
- [37] Zhang Y, Zhang L, Wang Y, et al. MicroRNAs or long noncoding RNAs in diagnosis and prognosis of coronary artery disease [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(2):353-366.
- [38] Wang Z, Zhang J, Zhang S, et al. MiR30e and miR92a are related to atherosclerosis by targeting ABCA1 [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4):3298-3304.
- [39] Li L, Masica D, Ishida M, et al. Human bile contains microRNA-laden extracellular vesicles that can be used for cholangiocarcinoma diagnosis [J]. *Hepatology*, 2014, 60(3):896-907.

收稿日期:2019-05-02