

外泌体 miRNA 在心血管疾病中的研究进展

孙硕¹ 康品方^{1,2} 张恒¹

(1. 蚌埠医学院第一附属医院心血管内科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院心脑血管病研究中心, 安徽 蚌埠 233000)

【摘要】 外泌体是细胞分泌出的含有蛋白质、脂质和 RNA 等多种生物活性物质, 是一种远距离传输生物学信息的载体。miRNA 是内源性非编码 RNA, 与靶 mRNA 结合, 形成翻译阻遏, 实现对基因表达的调控, 从而参与细胞的生长分化、凋亡甚至癌变等病理生理过程。外泌体 miRNA 在疾病诊断和疗效预测等方面具有突出优势, 现将外泌体 miRNA 在心血管疾病中的研究进展进行简要概述。

【关键词】 外泌体; 胞外囊泡; 心肌梗死; 心室重塑

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.03.008

Research Progress of Exosomes miRNA in Cardiovascular Diseases

SUN Shuo¹, KANG Pinfang^{1,2}, ZHANG Heng¹

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, Anhui, China; 2. Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Research Center, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui, China)

【Abstract】 Exosomes, which contain proteins, lipids, RNA and other bioactive substances secreted by cells, are carriers of long-distance biological information transmission. miRNA are endogenous non-coding RNA that combine with target mRNA to form translational repressions to achieve regulation of gene expression, thereby participating in pathophysiological processes such as cell differentiation, apoptosis, and even canceration. Exosome miRNA have outstanding advantages in disease diagnosis and efficacy prediction. This article briefly summarizes the research progress of exosome miRNA in cardiovascular diseases.

【Key words】 Exosomes; Extracellular vesicle; Myocardial infarction; Myocardial remodeling

外泌体 (exosome) 是多数细胞分泌的直径 40~150 nm 的微小囊泡, 具有相对稳定的脂质双层膜结构。近期发现, 外泌体中含有可作为信号因子的特异性蛋白、脂质和核酸等, 影响其他细胞的活性和功能, 参与人体的生理与病理过程^[1], 在心血管疾病的预防、诊断和治疗等多方面发挥重要作用。其主要作用是物质传递与信号转导, 这依赖于其内含丰富的遗传学信息, 包括微小 RNA (miRNA)、竞争性内源 RNA、信使 RNA (mRNA) 和 DNA 等。miRNA 被双层膜状结构包裹, 稳定性更高。前期研究发现外泌体中的 miRNA 较分泌外泌体的体液或细胞的 miRNA 表达水平更高^[2], 因此, 对外泌体中 miRNA 的测序研究具有更高的临床价值。外泌体 miRNA 参与到多种疾病的发生和发展过程中, 包括血管生成、免疫应答、肿瘤增殖侵袭和抗原表达等^[3]。现就外泌体 miRNA 在心血管疾

病病理过程中的最新研究做一概述。

1 外泌体的发现与生成

胞外囊泡的产生是由胞外物质进入胞内摄入一些蛋白质、核酸片段和肽类等活性因子后再被分泌至胞外的一系列过程, 由于目前很难纯化和细分外泌体亚群, 通常得到的是直径 <200 nm 的囊泡, 因此越来越多的人开始称之为小细胞外囊泡。外泌体最早是在研究网织红细胞向成熟红细胞转变时发现的^[4], 1987 年被命名为“exosome”。血小板、T/B 细胞、肥大细胞和树突细胞等均可分泌外泌体进入体液中, 参与胞间通讯, 共同维持机体内环境的稳态。

自 2007 年^[5]首次在外泌体中发现 mRNA 和 miRNA 后, 外泌体 miRNA 和各种疾病的相关性研究便逐年增多。miRNA 是根据碱基互补原则直接调控 mRNA 的稳定性来调控细胞行为的小 RNA 分子。外

源性 RNA 传递是一种有效的细胞信号传递方法,这一过程也必然会影响受体细胞的生物学功能,因此,某些 miRNA 可能作为生物标志物,对疾病的诊断、治疗和转归提供信息^[6]。随着高通量测序方法的逐渐成熟,大量的基因片段测序成为可能,也使得外泌体和基因组学的结合成为近年的研究热点。外泌体自身的组分会随着胞内物质的释放和内环境的变化而发生特异性的改变,这些特征为其作为疾病的诊断工具提供了可能性。此外,近年研究发现各种干细胞、血小板和内皮细胞(endothelial cells, ECs)等衍生的外泌体在促进血管再生和修复受损心脏等方面发挥着重要的作用^[7]。

2 外泌体和心血管疾病

2.1 外泌体 miRNA 和动脉粥样硬化

血管钙化在高血压、动脉粥样硬化、慢性肾脏病和糖尿病等疾病中常见,血管壁僵硬和顺应性下降可显著增加心肌缺血、斑块破裂和心力衰竭等风险。目前有研究证实胞外囊泡是病理性血管钙化的新参与者,调节平滑肌的分化和钙磷代谢,促进血管钙化^[8]。成骨相关基因的表达上调加速血管平滑肌细胞向成骨样细胞的表型转变,是血管钙化的重要病理过程^[9]。研究发现,高级糖基化终产物牛血清白蛋白通过抑制 miR-146a,增加了硫氧还蛋白互作蛋白的表达,从而促进活性氧的产生和血管平滑肌的钙化,糖基化终产物牛血清白蛋白预处理或 miR-146a 转染骨髓间充质干细胞产生的外泌体可通过下调硫氧还蛋白互作蛋白基因来部分抑制血管平滑肌的钙化^[10]。ECs 外泌体携带的 miR-195 过度表达 5-羟色胺转运蛋白调控大鼠颈动脉平滑肌细胞的增殖,氟西汀(5-羟色胺转运蛋白抑制剂)干预可抑制大鼠颈动脉内膜新生物的形成^[11]。在正常状态下,外泌体发挥生理功能,维持稳态,但在病理环境中,由于细胞骨架方向的改变或囊泡运输和货物装载过程中的损伤,某些小囊泡产生了促进分化的潜能^[12]。

ECs 的外泌体可能是动脉粥样硬化斑块中破坏微钙化稳态的重要介质。粥样硬化起源于 ECs 损伤,先后合并脂质沉积、纤维增生和钙质沉着等,最终导致动脉管壁增厚变硬,管腔缩小^[13]。ECs 衍生微粒 miR-19b 可通过调控细胞因子信号抑制因子 3,激活血管周围脂肪组织低水平促炎状态,促进 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化^[14]。有些外泌体的 miRNA 通过介导 ECs 与平滑肌细胞之间的信息交换,活跃在动脉粥样硬化的各个阶段。Zernecke 等^[15]发现 ECs 衍生的小囊泡通过富集 miR-126 向附近细胞传递警报信号,靶向抑制负调节因子 G 蛋白信号调节子 16,使趋化因子 12“解锁”,从而驱动趋化因子受体 4 的表达。同时,miR-126

可调节 ECs 对血管内皮生长因子的反应来调控血管的完整性和侧支血管生成,具有动脉粥样硬化保护作用。

暴露在层流中的 ECs 经历高度的剪切应力形成湍流,通常靠近弯道和分叉处,会产生较低的内皮剪切应力,促进动脉粥样硬化的形成。Krüppel 样转录因子 2 在这一过程起重要作用。Krüppel 样转录因子 2 诱导外泌体富集 miRNA(主要为 miR-143/145),转移到平滑肌细胞中,降低靶基因表达,抑制动脉粥样硬化进程^[16]。Pan 等^[17]发现与小鼠 ECs 相比,细胞钙化模型的外泌体中显著上调和下调 miRNA 分别有 987 和 92 个。差异 miRNA 的靶基因参与了多种生物学过程,如发育、代谢、细胞成分和生物发生,以及蛋白激酶 B 等多种信号通路。综上所述,外泌体在 ECs 钙化过程中主要发挥信使作用。

2.2 外泌体 miRNA 和心肌损伤及坏死

当冠状动脉狭窄到一定程度,心肌供需平衡被打破,血流量不能满足心肌代谢的需要,引起心肌缺血即心绞痛和心律失常等症状,持续的严重心肌缺血可引起心肌梗死。斑块中细胞释放的炎症物质会破坏纤维帽的完整性,管腔内压力或心肌搏动产生的剪切应力等均可能造成血栓脱落或斑块破裂,阻塞下游血管,引起急性心绞痛或心肌梗死。心肌损伤可诱导心肌细胞凋亡,外泌体通过运输包括 miRNA 和蛋白质等细胞质成分,促进细胞间通信^[18]。

既往研究表明血液循环中外泌体 miRNA 谱的改变有助于心肌损伤及修复的发生和发展,是心脏微环境的重要组成部分。缺氧会刺激心脏 ECs 分泌富含 miR-126 和 miR-210 的外泌体,通过激动 PI3K/Akt 途径增强心脏祖细胞对低氧应激的抵抗力^[19]。低氧状态下的心脏祖细胞外泌体含有较丰富的 miRNA,如 miR-17、miR-292 和 miR-199a 等,能诱导 ECs 的毛细血管样结构形成,降低结缔组织生长因子、波形丝蛋白、I 型胶原和 III 型胶原水平,增强修复作用^[20]。某些 miRNA,如 miR-29b、miR-323-5p、miR-455 和 miR-466 等,在心肌细胞的外泌体中高度富集,调节了糖尿病心脏组织中基质金属蛋白酶 9 的表达^[21],促进 ECs 的增殖及毛细血管样结构的形成,保护氧化损伤的心肌细胞。miR-144 则在缺血再灌注损伤心肌细胞中下调,心肌细胞内 miR-144 含量可被远距离缺血调节所调控^[22]。miR-144 通过激活 PI3K/Akt 和 p44/p42 MAPK 信号,缓解雷帕霉素对心肌细胞的损伤,刺激细胞自噬来增强心脏保护作用^[23]。

也有研究发现急性心肌梗死时,心肌细胞分泌外泌体可介导局部炎症反应。Zhang 等^[24]发现心肌梗死

组来源 H9c2 细胞,与心肌缺血再灌注损伤模型组和假手术组相比,miR-203 水平显著降低,而过表达 miR-203 可通过增加 B 细胞淋巴瘤/白血病-2,降低 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白,裂解胱天蛋白酶-3 和胱天蛋白酶-9 来减弱梗死诱导的细胞凋亡,明显改善心肌梗死后大鼠心功能,缩小梗死面积。miR-203 还可通过调节蛋白酪氨酸磷酸酯酶 1B 来阻止心肌细胞梗死后的凋亡过程,具有减轻急性缺血对心肌组织的损伤,减少线粒体介导的凋亡的作用,可能是急性心肌梗死治疗的潜在靶点。肌钙蛋白是目前临床常用的检测心肌细胞损伤的指标,但并不是特异性指标,也可在慢性肾功能衰竭、肺栓塞和非心脏手术等多种病理状态下高表达。在急性心肌梗死中,有些 miRNA 在血液中迅速出现,其中 miR-1、miR-133a/b、miR-208a 和 miR-499 表达尤为特异^[25]。这表明心肌细胞来源的外泌体可能较肌钙蛋白更早在血液中被检测,有希望作为急性心肌梗死早期诊断的标志物。

2.3 外泌体 miRNA 和心肌重构

在心肌肥厚的代偿过程中,心肌细胞、胶原纤维网和胞外基质等均发生相应的变化,即心室重塑,是心力衰竭发生和发展的基本病理机制。外泌体可通过调节细胞增殖,改变局部微环境,促进局部微血管网络的形成和再生来修复受损的心肌组织。Yang 等^[26]发现低氧可诱导 miR-30a 上调,并向外泌体富集,抑制 miR-30a 可增加心肌细胞自噬相关因子 beclin-1、Atg 12 和 LC3-II/LC3-I 的表达,从而增强缺氧后心肌细胞的自噬反应。低氧心肌细胞外泌体通过旁分泌方式转运 miR-30a 来调节心肌细胞的自噬。Yang 等^[27]发现,在大鼠心肌纤维化模型中,心肌细胞衍生外泌体 miR-208a 显著上调。

由心肌细胞衍生的外泌体 miRNA 可通过靶向下游 mRNA 来调节心脏功能^[28],介导心肌修复和修复后的细胞间通讯,如 let-7i-5p、miR-21-5p、miR-27a、miR-28-3p、miR-34a、miR-143、miR-222 和 miR-378-3p 等。Qiao 等^[29]给急性心肌梗死模型小鼠心肌内注射正常供体心脏来源外泌体,可改善心脏结构和功能,而注射心力衰竭供体来源外泌体则加重了心功能的恶化和左心室重塑,进一步研究发现 miR-21-5p 通过 PTEN/Akt 途径促进血管生成和心肌细胞存活。miR-21* 在心肌结构和功能的组织中起重要作用,抑制血管紧张素 II 所致心肌肥厚。小鼠 miR-21* 水平可延缓心肌细胞的肥大生长^[30]。为了加速心肌细胞损伤恢复,心脏成纤维细胞可分泌含有 miR-21、miR-208a 和 miR-499 等的外泌体,使心肌代偿性肥厚,稳定心脏泵血功能^[31]。但因缺乏适当的控制,这些外泌体的过度产生也可能

会促进心肌肥大的发展。通过对心房颤动和窦性心律患者血浆外泌体进行高通量测序,Wang 等^[32]发现 4 种差异血浆外泌体 miRNA,即 miR-483-5p、miR-142-5p、miR-223-3p 和 miR-483-5p,与心房颤动独立相关,这些 miRNA 及其靶基因影响心房功能和结构,参与氧化应激和纤维化途径,对心肌细胞重塑具有重要作用。

由心脏祖细胞衍生的外泌体可刺激 ECs 迁移,这可能有助于心脏修复和梗死心脏组织的新生血管化,也有研究表明外泌体也能通过促进 ECs 迁移、增殖和单核细胞活化达到内皮修复的目的^[6]。对缺血性心脏病和慢性心力衰竭患者,这些发现有望发展新的治疗策略。

3 结语

心血管疾病占全世界人口死因 1/3 左右。鉴于死亡率高,需采取新的预防和干预心血管疾病的策略。外泌体含有多种信号分子,通过结合、融合或内吞参与细胞间物质的传递和信息交换^[5]。外泌体介导靶细胞的基因表达,调节细胞的病理和生理过程,在各种疾病的发生和发展中发挥关键作用。因此,外泌体 miRNA 在心血管疾病诊疗方面有广阔的前景。

参考文献

- [1] Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, et al. Extracellular miRNAs: from biomarkers to mediators of physiology and disease[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(4):656-673.
- [2] Chen L, Wang Y, Pan Y, et al. Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(3):566-571.
- [3] Yu H, Wang Z. Cardiomyocyte-derived exosomes: biological functions and potential therapeutic implications[J]. *Front Physiol*, 2019, 10:1049.
- [4] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(19):9412-9420.
- [5] Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):654-659.
- [6] 张维,张恒,康品方.外泌体在心血管疾病中的研究进展[J].*心血管病学进展*, 2019, 40(5):818-821.
- [7] de Giusti CJ, Santalla M, Das S. Exosomal non-coding RNAs (Exo-ncRNAs) in cardiovascular health[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 137:143-151.
- [8] Kapustin AN, Shanahan CM. Emerging roles for vascular smooth muscle cell exosomes in calcification and coagulation[J]. *J Physiol*, 2016, 594(11):2905-2914.
- [9] Yang W, Zou B, Hou Y, et al. Extracellular vesicles in vascular calcification[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 499:118-122.
- [10] Wang Y, Ma W, Zhu Y, et al. Exosomes derived from mesenchymal stromal cells pretreated with advanced glycation end product-bovine serum albumin inhibit calcification of vascular smooth muscle cells[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9:524.
- [11] Gu J, Zhang H, Ji B, et al. Vesicle miR-195 derived from endothelial cells inhibits expression of serotonin transporter in vessel smooth muscle cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:43546.

- [12] New SEP, Aikawa E. Role of extracellular vesicles in de novo mineralization; an additional novel mechanism of cardiovascular calcification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(8):1753-1758.
- [13] Chen NX, Moe SM. Vascular calcification; pathophysiology and risk factors [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2012, 14(3):228-237.
- [14] Li C, Li S, Zhang F, et al. Endothelial microparticles-mediated transfer of microRNA-19b promotes atherosclerosis via activating perivascular adipose tissue inflammation in apoE(-/-) mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(2):1922-1929.
- [15] Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(100):ra81.
- [16] Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(3):249-256.
- [17] Pan W, Liang J, Tang H, et al. Differentially expressed microRNA profiles in exosomes from vascular smooth muscle cells associated with coronary artery calcification [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 118:105645.
- [18] Kaur A, Mackin ST, Schlosser K, et al. Systematic review of microRNA biomarkers in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(6):1113-1124.
- [19] Ong SG, Lee WH, Huang M, et al. Cross talk of combined gene and cell therapy in ischemic heart disease; role of exosomal microRNA transfer [J]. *Circulation*, 2014, 130(11 suppl 1):S60-S69.
- [20] Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary S, et al. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology [J]. *Circ Res*, 2015, 116(2):255-263.
- [21] Chaturvedi P, Kalani A, Medina I, et al. Cardiosome mediated regulation of MMP9 in diabetic heart; role of mir29b and mir455 in exercise [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(9):2153-2161.
- [22] Li J, Rohailla S, Gelber N, et al. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning [J]. *Basic Res Cardiol*, 2014, 109(5):423.
- [23] Li J, Xuan W, Yan R, et al. Remote preconditioning provides potent cardioprotection via PI3K/Akt activation and is associated with nuclear accumulation of β -catenin [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 120(10):451-462.
- [24] Zhang J, Pan J, Yang M, et al. Upregulating microRNA-203 alleviates myocardial remodeling and cell apoptosis through downregulating protein tyrosine phosphatase 1B in rats with myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74(5):474-481.
- [25] Li C, Pei F, Zhu X, et al. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial infarction [J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(10-11):727-732.
- [26] Yang Y, Li Y, Chen X, et al. Exosomal transfer of miR-30a between cardiomyocytes regulates autophagy after hypoxia [J]. *J Mol Med*, 2016, 94(6):711-724.
- [27] Yang J, Yu X, Xue F, et al. Exosomes derived from cardiomyocytes promote cardiac fibrosis via myocyte-fibroblast crosstalk [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12):4350-4366.
- [28] Zhang J, Ma J, Long K, et al. Overexpression of exosomal cardioprotective miRNAs mitigates hypoxia-induced H9c2 cells apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 18(4):711.
- [29] Qiao L, Hu S, Liu S, et al. microRNA-21-5p dysregulation in exosomes derived from heart failure patients impairs regenerative potential [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(6):2237-2250.
- [30] Cervio E, Barile L, Moccetti T, et al. Exosomes for intramyocardial intercellular communication [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015:482171.
- [31] Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(5):2136-2146.
- [32] Wang S, Min J, Yu Y, et al. Differentially expressed miRNAs in circulating exosomes between atrial fibrillation and sinus rhythm [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(10):4337-4348.

收稿日期:2020-01-05

(上接第 223 页)

- [21] Parthenakis FI, Patrianakos A, Prassopoulos V, et al. Relation of cardiac sympathetic innervation to proinflammatory cytokine levels in patients with heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *Am J Cardiol*, 2003, 91(10):1190-1194.
- [22] Zhang D, Ezekiel UR, Chang SW, et al. Gene expression profile in dilated cardiomyopathy caused by elevated frequencies of mitochondrial DNA mutations in the mouse heart [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2005, 14(2):61-69.
- [23] Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, et al. Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy; amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of TO-2 hamsters [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(2):901-906.
- [24] 匡歆, 王玉瑶, 聂宇, 等. 应用 CRISPR/Cas13b 编辑技术治疗 TNNT2R141W 转基因小鼠的扩张型心肌病 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(1):49-60.
- [25] 许霏, 王永明, 沈雳, 等. CRISPR/Cas9 技术在遗传性心肌疾病研究中的进展 [J]. *心血管病学进展*, 2019, 40(9):1229-1232.

收稿日期:2020-02-20