

MicroRNA 促进心肌细胞再生机制的研究进展

谭海鹏 高金峰 李琦玉 王樵梓 张宁 陈婧 黄浙勇

(上海市心血管病研究所 复旦大学附属中山医院心内科, 上海 200032)

【摘要】急性心肌梗死作为心血管系统最常见的急症之一,其在中国的发病率和死亡率呈逐年上升趋势。为了进一步改善心肌梗死患者预后,成年哺乳动物心肌细胞再生一直是心血管领域研究的热点之一。近年来,microRNA 对心肌细胞再生的调控作用正受到越来越多关注,其外源类似物的应用有望成为改善心肌梗死患者预后的一种全新手段,但其作用机制尚不完全清楚。现围绕 Hippo 信号通路就近年来相关机制的研究进行综述,以探讨 microRNA 应用于改善心肌梗死患者预后的可能性。

【关键词】急性心肌梗死;心肌细胞;再生;MicroRNA;机制;Hippo 信号通路

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.07.007

Mechanism of MicroRNA Promoting Cardiomyocyte Regeneration

TAN Haipeng, GAO Jinfeng, LI Qiyu, WANG Qiaozhi, ZHANG Ning, CHEN Jing, HUANG Zheyong

(Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases; Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Acute myocardial infarction is one of the most common emergencies of the cardiovascular system, and its morbidity and mortality are still increasing year by year in China. In order to further improve the prognosis of patients with myocardial infarction, the cardiomyocyte regeneration of adult mammalian has been one of the hot topics in the field of cardiovascular research. In recent years, the regulatory effect of microRNA on cardiomyocyte regeneration is getting more and more attention. The application of exogenous microRNA analogues is expected to become a potential method to improve the prognosis of patients with myocardial infarction. But the specific mechanism by which it works is not completely clear. This article reviews the potential mechanism around the Hippo signal pathway in recent years to explore the possibility of applying microRNA to improve the prognosis of patients with myocardial infarction.

【Key words】 Acute myocardial infarction; Cardiomyocyte; Regeneration; MicroRNA; Mechanism; Hippo pathway

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 作为一种常见的心血管系统急症,在中国的发病率呈快速上升趋势,尚未迎来拐点^[1]。近年来,虽然介入治疗等积极有效的干预措施已帮助许多 AMI 患者度过急性期,但由于心肌细胞不可再生的特性,部分患者最终仍走向心力衰竭^[2]。因此,过去 20 年里成年哺乳动物心肌细胞再生一直是心血管领域研究的热点之一。大量证据表明,哺乳动物的心肌细胞在胎儿期和产后早期具备明显的再生特性,即使是终末分化的成年哺乳动物心肌细胞也可能具有一定的分裂能力^[3-5]。关于心肌细胞再生机制,早期基于干/祖细胞理论的一系列研究并未取得实质性进展^[6-7]。目前心肌细胞再生研究领域内已基本趋于达成共识:心肌细胞再生是通过分化成熟的心肌细胞重新进入细胞周

期得以实现,而无干/祖细胞的参与^[8]。因此,针对心肌细胞周期调控机制的研究开展得如火如荼,被认为是实现心肌细胞治疗性再生的潜在途径^[9]。

微小核糖核酸 (microRNAs, miR) 是一种由 21 ~ 25 个核糖核苷酸组成的小分子非编码核糖核酸,作为基因转录后的调控因子,在许多生理和病理过程中发挥重要作用^[10]。近年来大量研究表明,microRNA 及其调控通路与 AMI 细胞凋亡及自噬、炎症调节、新生血管生成、心肌纤维化、心室重塑和缺血再灌注损伤等病理生理过程密切相关^[11]。其在心肌细胞再生领域也正受到越来越多的关注^[12]。2012 年,一项全基因组研究发现,一系列 microRNA 能显著诱导新生大鼠和小鼠 AMI 后心肌细胞增殖,其中外源性 miR-590-3p 和 miR-199-3p 甚至可促进成年鼠心肌细胞增殖,

从而揭示了 microRNA 在调控哺乳动物心肌再生中的潜力^[13]。后续研究通过基因过表达、转基因技术和外源性靶向递送等方法,进一步证实了 microRNA 在促进成年哺乳动物心肌细胞再生中的作用^[14-16],但其具体机制尚不完全清楚,现围绕 Hippo 信号通路就 microRNA 调控心肌细胞再生的研究进展做一综述。

1 MicroRNA 调控 Hippo 信号通路

1.1 Hippo 信号通路

Hippo 信号通路是影响器官大小和维持组织稳态的一个重要的调控枢纽,在细胞接触抑制、细胞增殖、凋亡和肿瘤发生发展中都起着重要的调控作用。Hippo 信号通路在进化中高度保守,哺乳动物中其核心组成部分包括 TAO 激酶 1/3 (TAO kinase 1/3, TAOK1/3),哺乳动物 STE20 样苏氨酸激酶 (mammalian STE20-like protein kinase 1/2, MST1/2),含 WW 结构域的人同源重组蛋白 1 (salvador homology 1, SAV1)、大抑癌丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (large tumor suppressor serine/threonine protein kinases 1/2, LATS1/2),重组人 MOB 激酶激活因子 (MOB kinase activator 1A/1B, MOB1A/1B),Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP),具有 PDZ 结合模体的转录激活因子 (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ) 和 TEA 结构域转录因子^[17]。Hippo 信号通路的上游激酶 TAOK1/3 磷酸化并激活 MST1/MST2,后者与适配器蛋白 SAV1 协同磷酸化并激活 LATS1/2,活化的 LATS 激酶与 MOB1 共同磷酸化转录调控因子 YAP 和 TAZ,这一磷酸化使两种转录调控因子不能完成有效的核转位,进而在胞质中经后续泛素化途径降解^[18]。因为 YAP 和 TAZ 的入核可促进增殖相关基因的表达,故 Hippo 信号通路活化的最终效应是导致增殖相关基因表达的下调^[19]。近年来大量研究通过运用针对 Hippo 信号通路核心组成部分 MST1/2、SAV1、LATS1/2 和 YAP 等的基因敲除和病毒载体过表达等方法证实了 Hippo 信号通路在心肌细胞再生中的负向调控作用^[20-23]。

1.2 MicroRNA 对 Hippo 信号通路的直接调控

近来研究表明,绝大多数可促进心肌再生的 microRNA 都通过直接下调 Hippo 通路中信号分子的表达来发挥作用^[24]。miR-302/367 簇是最早被发现具有促进心肌细胞再生作用的 microRNA 家族之一。来自宾夕法尼亚大学的一项研究基于胚胎干细胞 miR-302/367 簇敲除后小鼠胚胎心脏发育不良和新生小鼠心脏发育受限的表型,通过对高表达 miR-302/367 簇的小鼠胚胎干细胞 RNA 高通量测序的结果进行分析,发现 Hippo 通路中 MST1、LATS2 和 MOB1A/

1B 是 miR-302/367 簇调节心肌细胞再生的潜在靶点。并以慢病毒过表达 miR-302/367 簇的新生小鼠心肌细胞为模型,证实了上述三个分子的低表达与 miR-302/367 簇的过表达伴随发生,后续短发夹 RNA 选择性抑制 YAP 表达阻断了 miR-302/367 簇促心肌细胞再生的作用。这一系列实验结果证实了 miR-302/367 簇可通过下调 Hippo 信号通路中关键分子的表达促进心肌细胞再生。让人欣喜的是,研究中将细胞模型改为成年鼠心肌细胞后,得到了与上述一致的试验结果^[15]。自 microRNA 被发现具有调控心肌细胞再生的作用以来,miR-199a-3p 一直备受关注。近来有研究通过 AMI 小鼠心肌梗死边缘区心肌内注射携带 miR-199a-3p 的纳米材料,发现 miR-199a-3p 可通过促进心肌细胞增殖显著改善 AMI 小鼠预后^[16]。关于 miR-199a-3p 促进心肌细胞再生的机制,有研究对转染高表达 miR-199a-3p 的新生大鼠心肌细胞进行了总 RNA 测序,进而与 Hippo 信号通路相关基因进行比对,发现 miR-199a-3p 过表达伴随着 TAOK1 和 E3 泛素连接酶- β -转导重复蛋白 (β -TrCP) 表达的下调。继而运用荧光素酶标记的方法证实了 TAOK1 和 β -TrCP 基因表达过程中的信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 是 miR-199a-3p 发挥作用的靶点。而选择性抑制 YAP 表达可阻断 miR-199a-3p 通过靶向 TAOK1 和 β -TrCP 实现的促心肌再生作用。TAOK1 是 Hippo 信号通路的核心激酶之一,而 β -TrCP 则能促进 YAP 泛素化降解。因此,miR-199a-3p 也主要通过抑制 Hippo 信号通路促心肌细胞再生^[25-26]。此外,有研究通过数据库基因筛选和双荧光素酶分析方法发现, LATS1 的 mRNA 是 miRNA-10b 的潜在靶点。并运用外源 microRNA 类似物转染和后续敲除 LATS1 的方法,证实了 miRNA-10b 是通过直接下调 LATS1 增加 YAP 的活性,从而促进心肌细胞再生的^[27]。

1.3 MicroRNA 对 Hippo 信号通路的间接调控

近年来研究发现,细胞骨架动力学因素与 YAP/TAZ 的活化程度及其核转位密切相关^[28-30]。一些细胞体外培养技术和纳米仿生学研究也证明了细胞骨架动力学对心肌再生的调控作用^[31-32]。最新研究通过数据库基因筛选和小干扰 RNA 下调基因表达等方法发现,miR-199a-3p、miR-1825、miR-302d 和 miR-373 可直接或间接下调丝切蛋白 2 等细胞骨架动力学相关因子的表达,提高细胞肌动蛋白骨架聚合程度,从而增加 YAP 活化和促进其核转位以促进心肌细胞再生^[25]。此调节通路的发现对 microRNA 通过抑制 Hippo 信号通路促进心肌细胞再生的机制无疑是一个意义重大的补充。

2 其他通路

除 Hippo 信号通路以外,近年来的研究还揭示了以下通路可能在 microRNA 调控心肌细胞再生的过程中发挥了重要作用。miR-17-92 家族和 miR-214 可通过促进抑癌基因家族的 PTEN 蛋白的表达,抑制 PI3K/AKT 通路,而促进心肌细胞再生^[14,33]。miR-708 可通过抑制丝裂原活化蛋白激酶信号通路促进心肌细胞重新进入细胞周期^[34]。miR-294 可通过细胞周期蛋白依赖性蛋白 1-细胞周期蛋白 B1 轴促进心肌细胞重新进入细胞周期^[35]。miR-216a 则可通过调控 JAK2-STAT3 通路促进心肌细胞增殖^[36]。这些研究仍然以基因敲除和基因过表达技术作为主要的实验验证手段。一系列实验结果无疑为 microRNA 调控心肌细胞再生机制的研究打开了许多新的思路。

3 结语与展望

综上所述,大量的研究主要通过对基因数据库相关基因进行筛选,得出目的基因,然后运用基因敲除和基因过表达技术进行验证的模式,为 microRNA 促进心肌再生机制的研究描绘出了一个初步的框架。这个框架主要围绕 Hippo 信号通路的抑制进行搭建,最终通过促进 YAP/TAZ 完成核转位上调细胞增殖相关基因表达来促进心肌细胞再生。而其他潜在机制同样充满研究前景。值得注意的是,miRNA 对心肌细胞再生的促进是一个多向打靶的过程,即一个 microRNA 可同时下调多个靶基因的表达,同一个靶基因又可同时受到多个 microRNA 的调控。例如:miR-199a-3p 可下调 TAOK1 使 YAP 保持活化状态,也可下调 β -TrCP 以减少 YAP 的降解,还可下调丝切蛋白 2 调节细胞肌动蛋白骨架促进 YAP 活化。还有研究表明其对胚胎心肌细胞增殖也有重要的调控作用^[37]。近期一系列的应用性研究成果为 microRNA 促进心肌细胞再生的临床应用增添了更多的信心。但与此同时,基因相关疗法的安全性始终是一个不容忽视的问题。例如,在猪心肌梗死模型中,使用病毒载体驱动 miR-199a 持续高表达,短期内可观察到明显的心肌细胞增殖效应,但在后期的随访过程中,有接受治疗的猪因突发恶性心律失常死亡^[38]。其潜在机制可能在于梗死后过载的心脏中,Hippo 信号通路的持续抑制会导致增殖的心肌细胞无法有效分化为功能成熟的心肌细胞^[39]。与持续性高表达相比,探索合适的 microRNA 使用剂量和疗程,有利于促进心肌细胞再生,同时具备更好的安全性^[16,35]。总而言之,相信随着 microRNA 调控心肌细胞再生相关机制的进一步阐明,一定会为外源性干预心肌细胞再生打开一些新的视角,同时也将为 microRNA 应用于改善心肌梗死患

者预后增添更多的可能性。

参考文献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2016》概要[J]. 中国循环杂志,2017,32(6):521-530.
- [2] Anderson JL, Morrow DA. Acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2017, 376(21):2053-2064.
- [3] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans [J]. Science, 2009, 324(5923):98-102.
- [4] Senyo SE, Steinhilber ML, Pizzimenti CL, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes[J]. Nature, 2013, 493(7432):433-436.
- [5] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart[J]. Science, 2011, 331(6020):1078-1080.
- [6] Menasche P. Cell therapy trials for heart regeneration—Lessons learned and future directions[J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(11):659-671.
- [7] Li Y, He L, Huang X, et al. Genetic lineage tracing of nonmyocyte population by dual recombinases[J]. Circulation, 2018, 138(8):793-805.
- [8] Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al. Cardiomyocyte regeneration: a consensus statement[J]. Circulation, 2017, 136(7):680-686.
- [9] Galdos FX, Guo Y, Paige SL, et al. Cardiac regeneration: lessons from development[J]. Circ Res, 2017, 120(6):941-959.
- [10] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease [J]. Physiol Rev, 2011, 91(3):827-887.
- [11] 马天雪,赵玉娟.长链非编码 RNA 及相关调控通路与急性心肌梗死的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2019, 40(8):1099-1103.
- [12] Hodgkinson CP, Kang MH, Dal-Pra S, et al. MicroRNAs and cardiac regeneration[J]. Circ Res, 2015, 116(10):1700-1711.
- [13] Eulalia A, Mano M, Dalferro M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration[J]. Nature, 2012, 492(7429):376-381.
- [14] Chen J, Huang ZP, Seok HY, et al. miR-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts [J]. Circ Res, 2013, 112(12):1557-1566.
- [15] Tian Y, Liu Y, Wang T, et al. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice [J]. Sci Transl Med, 2015, 7(279):279ra38.
- [16] Lesizza P, Prosdocimo G, Martinelli V, et al. Single-dose intracardiac injection of pro-regenerative microRNAs improves cardiac function after myocardial infarction [J]. Circ Res, 2017, 120(8):1298-1304.
- [17] Kwon Y, Vinayagam A, Sun X, et al. The Hippo signaling pathway interactome [J]. Science, 2013, 342(6159):737-740.
- [18] Flinn MA, Link BA, O'Meara CC. Upstream regulation of the Hippo-YAP pathway in cardiomyocyte regeneration [J]. Semin Cell Dev Biol, 2020, 100:11-19.
- [19] Ardestani A, Lupse B, Maedler K. Hippo signaling: key emerging pathway in cellular and whole-body metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(7):492-509.
- [20] von Gise A, Lin Z, Schlegelmilch K, et al. YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(7):2394-2399.
- [21] Lin Z, von Gise A, Zhou P, et al. Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model [J]. Circ Res, 2014, 115(3):354-363.
- [22] Monroe TO, Hill MC, Morikawa Y, et al. YAP partially reprograms chromatin accessibility to directly induce adult cardiogenesis in vivo [J]. Dev Cell, 2019, 48(6):765-779. e7.

(下转第 718 页)

- Assess Coronary Stenosis Relevance; Results of ADVISE II International, Multicenter Study (ADenosine Vasodilator Independent Stenosis Evaluation II) [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2015, 8(6):824-833.
- [33] Nijjer SS, Sen S, Petraco R, et al. The instantaneous wave-free ratio (iFR) pullback: a novel innovation using baseline physiology to optimise coronary angioplasty in tandem lesions [J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2015, 16(3):167-171.
- [34] Nijjer SS, Sen S, Petraco R, et al. Pre-angioplasty instantaneous wave-free ratio pullback provides virtual intervention and predicts hemodynamic outcome for serial lesions and diffuse coronary artery disease [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2014, 7(12):1386-1396.
- [35] Nijjer SS, Sen S, Petraco R, et al. Improvement in coronary haemodynamics after percutaneous coronary intervention: assessment using instantaneous wave-free ratio [J]. *Heart*, 2013, 99(23):1740-1748.
- [36] Jeremias A, Davies JE, Maehara A, et al. Blinded physiological assessment of residual ischemia after successful angiographic percutaneous coronary intervention: the DEFINE PCI Study [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2019, 12(20):1991-2001.
- [37] Ihsdayhid AR, Koh JS, Ramzy J, et al. The role of fractional flow reserve and instantaneous wave-free ratio measurements in patients with acute coronary syndrome [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2019, 21(12):159.
- [38] Indolfi C, Mongiardo A, Spaccarotella C, et al. The instantaneous wave-free ratio (iFR) for evaluation of non-culprit lesions in patients with acute coronary syndrome and multivessel disease [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 178:46-54.

收稿日期:2019-12-12

(上接第 700 页)

- [23] Leach JP, Heallen T, Zhang M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction [J]. *Nature*, 2017, 550(7675):260-264.
- [24] Diez-Cunado M, Wei K, Bushway PJ, et al. miRNAs that induce human cardiomyocyte proliferation converge on the Hippo pathway [J]. *Cell Rep*, 2018, 23(7):2168-2174.
- [25] Torrini C, Cubero RJ, Dirks E, et al. Common regulatory pathways mediate activity of microRNAs inducing cardiomyocyte proliferation [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(9):2759-2771. e5.
- [26] Zhao B, Li L, Tumaneng K, et al. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(β-TCP) [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(1):72-85.
- [27] Xie Y, Wang Q, Gao N, et al. MicroRNA-10b promotes human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte proliferation via novel target gene LATS1 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 19:437-445.
- [28] Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction [J]. *Nature*, 2011, 474(7350):179-183.
- [29] Chang L, Azzolin L, di Blasio D, et al. The SWI/SNF complex is a mechanoregulated inhibitor of YAP and TAZ [J]. *Nature*, 2018, 563(7730):265-269.
- [30] Lee JY, Dominguez AA, Nam S, et al. Identification of cell context-dependent YAP-associated proteins reveals β1 and β4 integrin mediate YAP translocation independently of cell spreading [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):17188.
- [31] Lee J, Manoharan V, Cheung L, et al. Nanoparticle-based hybrid scaffolds for deciphering the role of multimodal cues in cardiac tissue engineering [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11):12525-12539.
- [32] Judd J, Lovas J, Huang GN. Defined factors to reactivate cell cycle activity in adult mouse cardiomyocytes [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):18830.
- [33] Li X, He X, Wang H, et al. Loss of AZIN2 splice variant facilitates endogenous cardiac regeneration [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(12):1642-1655.
- [34] Deng S, Zhao Q, Zhen L, et al. Neonatal heart-enriched miR-708 promotes proliferation and stress resistance of cardiomyocytes in rodents [J]. *Theranostics*, 2017, 7(7):1953-1965.
- [35] Borden A, Kurian J, Nickoloff E, et al. Transient introduction of miR-294 in the heart promotes cardiomyocyte cell cycle reentry after injury [J]. *Circ Res*, 2019, 125(1):14-25.
- [36] Wang J, Chen X, Shen D, et al. A long noncoding RNA NR_045363 controls cardiomyocyte proliferation and cardiac repair [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 127:105-114.
- [37] Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, et al. Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation [J]. *Dev Cell*, 2010, 19(3):450-459.
- [38] Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs [J]. *Nature*, 2019, 569(7756):418-422.
- [39] Ikeda S, Mizushima W, Sciarretta S, et al. Hippo deficiency leads to cardiac dysfunction accompanied by cardiomyocyte dedifferentiation during pressure overload [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2):292-305.

收稿日期:2020-01-14