

MicroRNA-1 的心律失常调控作用

廖彩秀, 桂娅君, 肖乾凤, 郭媛, 许丹焰

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 微小 RNA-1; 心律失常; 离子通道

[摘要] 微小 RNA(miRNA)是近年来新发现的一类小分子非编码 RNA,其通过调节靶基因 mRNA 的稳定性或抑制翻译过程而发挥作用。miR-1 在人类心脏中表达最为丰富,与心律失常的发生关系密切,有大量文献报道可通过调节其表达而上调或下调多种心脏电活动相关离子通道或蛋白水平来调控心律失常。本文就 miR-1 调控心律失常的作用机制作一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Regulation Function of MicroRNA-1 for Arrhythmia

LIAO Cai-Xiu, GUI Ya-Jun, XIAO Qian-Feng, GUO Yuan, and XU Dan-Yan

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] MicroRNA-1; Arrhythmia; Ion Channels

[ABSTRACT] MicroRNA (miRNA) is a kind of non-coding small RNA newly discovered in recent years, which function is as regulators by affecting the stability of target genes mRNA or blocking translation. miR-1 is the most abundant miR expressed in the human heart, and is closely associated with arrhythmia. Large numbers of research report show that regulating miR-1 expression levels can control arrhythmia by up-regulation or down-regulation of numerous ion channels and proteins related to cardiac electrical activity. This paper summarizes the mechanism of the regulation function of miR-1 for arrhythmia.

心律失常严重威胁人类健康,其发生的物质基础是心脏离子通道异常、通道缺失或编码通道蛋白的基因缺失,引起心肌兴奋性、传导性和自律性异常。心肌细胞膜表面众多离子通道(诸如 GJA1、KCNJ2、HCN2、HCN4、KCNH2、KCNQ1、KCNE1 等)的协调活动是维持心肌细胞正常电活动的基础,这些离子通道蛋白表达的变化使心肌离子通道电流钠电流(INa)、钙电流(ICa)、瞬时外向钾电流(Ito)、快激活延迟整流钾电流(IKr)、慢激活延迟整流钾电流(IKs)、内向整流钾电流(IK1)发生紊乱,导致动作电位时程的变化,从而影响自律性、传导性及有效不应期等,引起心律失常。

1 miR-1 概述

微小 RNA-1(microRNA-1; miRNA-1, miR-1)是

首个发现与心血管发展相关的 miRNA,特异表达于心肌细胞,直接参与心脏发生、发展和心脏病理过程^[1-3]。miR-1 家族包括 miR-1 亚家族和 miR-206,其中 miR-1 亚家族包括了两个转录本 miR-1-1 和 miR-1-2。在人类,这两个转录本的成熟产物相同,其共同序列为 UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU (www.microrna.org),但其基因分别定位于 2 号染色体和 18 号染色体。miR-1 亚家族表达于心肌和骨骼肌细胞,而 miR-206 只表达于骨骼肌细胞。近来,大量研究证明 miR-1 在诸如心肌肥大、心肌梗死等心脏病理过程中扮演重要角色,并证实其参与调控了这些心肌病理状态下心律失常的发生^[4-8]。

2 miR-1 在心律失常中的重要调控作用

2.1 miR-1 与心脏传导

miR-1 参与调节心脏传导涉及的通路主要包括

[收稿日期] 2014-08-06

[修回日期] 2014-10-13

[基金项目] 国家自然科学基金(81170190,81372117)

[作者简介] 廖彩秀,硕士研究生,研究方向为血脂异常与动脉粥样硬化,E-mail 为 Liaocxhn@126.com。桂娅君,硕士研究生,研究方向为血脂异常与动脉粥样硬化。通讯作者许丹焰,博士研究生导师,研究方向为血脂异常与动脉粥样硬化,E-mail 为 xudanyan02@sina.com。

GJA1/Cx43 通路、KCNJ2/Kir2.1/IK1 通路及 Irx5/KCND2/Kv4.2/Ito 通路等。

缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 主要构成心室肌细胞的心肌缝隙连接通道,是心肌细胞间电信号快速传导的低电阻通道,Cx43 表达异常可导致各种室性心律失常的发生^[9-10]。Yang 等^[11]发现冠心病患者和大鼠心肌缺血模型的 miR-1 表达水平比正常对照组高,并证实了 miR-1 调节的靶基因为 GJA1 和 KCNJ2,miR-1 通过抑制二者的翻译减少其蛋白表达,从而导致 Cx43 和 Kir2.1 (内向整流钾通道)表达降低。Cx43 表达下降可减慢电传导,Kir2.1 表达下降可使 IK1 减弱,延长复极,减慢传导速率,导致病理性折返回路形成,这些均为产生和维持恶性室性心律失常的病理基础;反之,将 miR-1 特异性反义寡聚核苷酸 (anti-miRNA-1 oligonucleotides, AMO-1) 导入缺血心肌时可逆转上述变化。Liu 等^[12]在豚鼠心肌梗死模型中,应用 Ct-A-LIP 技术 (anti-cardiac troponin I antibody modified liposomes loading with AMO-1),不仅将 AMO-1 导入缺血心肌,还证实了 AMO-1 是通过沉默 miR-1 显著下调 miR-1 表达水平,上调 Cx43 和 Kir2.1 蛋白表达,恢复去极化的静止膜电位,从而缓解缺血性心律失常。Zhang 等^[13]通过构建 miR-1 转基因大鼠模型致 miR-1 过表达发现,与野生型大鼠相比,miR-1 转基因大鼠的 Cx43 表达显著下降,能够减慢甚至阻滞房室传导。Curcio 等^[8]研究发现,在压力负荷诱导的大鼠肥厚心肌模型,miR-1 的表达水平下降,Cx43 表达增加,室性期前收缩发生的次数显著增加 (大部分表现为 R-on-T 现象),心室颤动及持续性室性心动过速等发生率明显上升。进一步研究发现,使用缬沙坦可以减少大鼠肥厚心肌发生致命性室性心律失常的可能性,其机制正是通过恢复 (上调) miR-1 的表达水平,从而稳定 (减少) Cx43 的表达,减少室性期前收缩发生的次数,降低其心室颤动及持续性心动过速的发生率。据此可知:miR-1 可通过调节 Cx43 来调控心脏传导,miR-1 表达增加致 Cx43 表达下降,引起传导减慢;miR-1 表达下降则导致 Cx43 表达增加,引起传导加快。

大量研究证明,miR-1 表达增加时,将导致 Kir2.1 表达下降,IK1 电流密度降低,QT 间期 (QT interval) 延长,传导减慢;miR-1 表达降低则出现与上述相反的效应。Yang 等^[11]研究发现,miR-1 表达增加时导致 Kir2.1 表达下降,从而使 IK1 减弱,延长复极,减慢传导速率,导致病理性折返回路形成,增加室性恶性

心律失常发生。Zhang 等^[13]研究也发现,在 miR-1 转基因大鼠,miR-1 过表达导致 IK1 减弱,IK1 电流密度下降,延长了心房、心室肌细胞及希氏束-浦肯野纤维的不应期,从而引起房室传导阻滞。Girmatsion 等^[14]在心房颤动的模型中发现 miR-1 表达下降,并伴随 Kir2.1 的 mRNA 和蛋白表达的上调,从而导致 IK1 电流密度增加。其研究说明,miR-1 表达下降可能通过在转录和转录后水平调控 Kir2.1 的表达而引起电重构,致使心房颤动的发生。Zhao 等^[15]研究发现,去除小鼠的 miR-1-2 基因后,存活的小鼠由于出生后心肌细胞持续分裂而导致心肌肥大并且伴有心律失常;原因为去除小鼠的 miR-1-2 基因后,miR-1-2 的靶基因 Irx5 表达异常增高,从而抑制了 KCND2 (编码瞬时外向钾电流的亚单位 Kv4.2) 基因,使 Kv4.2 表达减少,Ito 电流减弱,心电图出现 QRS 波群宽大畸形的束支传导阻滞图形。

2.2 miR-1 与自动节律

起搏电流 If 是心脏起搏细胞产生自动节律性的关键,由超极化环核苷酸门控阳离子通道 HCN 家族及 MinK 相关蛋白 (K⁺-channel-related protein, MiRP1) 共同调控。miR-1/miR-133 可以通过调节超极化激活 HCN 基因,影响心肌自律性。Xiao 等^[16]应用拟 miRNA 技术,将拟 miR-1/miR-133 片段导入新生大鼠心室肌细胞,发现能够有效抑制 HCN2 和 HCN4 的表达,从而减慢 If 通道的传导性,降低起搏电流密度,致使心肌自律性减低。而利用抗 miRNA 技术通过消除内源性 miR-1/miR-133 对 HCN2/HCN4 表达的抑制作用可以显著增强 HCN2/HCN4 的表达和功能,从而提高 If 通道的传导性,增高自律性。Zhou 等^[17]研究也证明,通过反义寡核苷酸技术减少内源性 miR-1 和 miR-133 可使 HCN2/HCN4 表达有效增加,并提出根据此机制可为生物起搏器的研制提供可能。Luo 等^[7]研究发现,在心肌肥厚大鼠中发现肥厚心肌 miR-1 减少 35%,miR-133 减少 65%,同时发现左心室肥厚心肌中 HCN4 通道蛋白升高 3 倍,HCN2 蛋白升高 1.7 倍,因此导致了心脏异常自律性增高,增加心律失常风险。因此,下调 miRNA-1、miRNA-133 表达水平,可能通过修复受损的窦房结及传导组织,对缓慢性心律失常进行治疗;上调 miRNA-1、miRNA-133 表达水平则有望抑制异位兴奋节点,治疗快速性心律失常。

2.3 miR-1 与心脏复极

IKr 和 IKs 主要参与动作电位复极 3 期,是决定动作电位时程长短的重要影响因素。因此,引起 IKr 和 IKs 发生变化将主要影响心脏复极过程,导致

心律失常。研究发现 miR-1 主要通过影响 IKs 通道蛋白的表达水平从而改变心脏复极时程。Luo 等^[18]研究表明, IKs 通道蛋白 KCNE1 和 KCNQ1 分别为 miR-1 和 miR-133 的调控靶点。miR-1 作用于 KCNE1 的 3' 端非编码区(3' untranslated region, 3' UTR), 而 miR-133 作用于 KCNQ1 的 3' UTR, 分别调控 KCNE1 和 KCNQ1 的表达。最近 Jia 等^[19]通过对新西兰白兔模型持续右心房起搏一星期后发现, miR-1 表达明显上调, 而 KCNE1 和 KCNB2 表达下降, 致使心房 IKs 增加和心房有效不应期缩短; 而利用慢病毒载体转染 miR-1 使其进一步上调后发现, KCNE1 和 KCNB2 表达下降更为显著, 从而证明 KCNE1 和 KCNB2 是 miR-1 的靶基因。miR-1 过表达下调 KCNE1 和 KCNB2, 从而引起显著的 IKs 增加和心房有效不应期缩短, 大大提高了诱发心房颤动的可能性, 并且上述效应能被 AMO-1 逆转。

2.4 miR-1 与心肌钙活动

miR-1 通过调节心肌钙活动调控心律失常涉及的钙循环通路主要包括钙离子释放通道——兰尼碱受体(ryanodine receptor, RyR)、肌质网钙泵 2a(sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a, SERCA2a)及钠钙交换体 1(sodium-calcium exchanger 1, NCX1)。

Terentyev 等^[20]发现, miR-1 靶向作用于蛋白磷酸酯酶 2A(protein phosphatase-2A, PP2A)的调节亚基 B56, 增加依赖钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)的 RyR2 的磷酸化, 致使 RyR2 对钙敏感性增加, 肌质网内钙向胞质大量释放, 从而导致心律失常的发生。miR-1 的上述效应可被 CaMK II 的抑制剂 KN93 完全逆转。Belevych 等^[21]研究发现, 与正常对照组比较, 心力衰竭患者心肌细胞中成熟的 miR-1 和 miR-133 的水平明显升高, PP2A 的调节亚基 B56 α 和 B56 δ 及催化亚基 PP2AC 表达水平显著降低, 心力衰竭患者中 PP2A 从兰尼碱受体复合体上解离下来导致了兰尼碱受体依赖 CaMK II 的高度磷酸化和钙循环严重的紊乱, 从而引起心律失常; 他们的研究表明, 在慢性心力衰竭患者, miR-1 和 miR-133 的表达水平上升导致了异常的心肌钙循环, 而其机制为位点特异性 PP2A 磷酸酶活性的破坏。

Kumarswamy 等^[22]研究指出, 肌质网钙泵基因疗法通过依赖蛋白激酶/叉头蛋白亚家族(protein kinase B/forkhead box group O, Akt/FoxO3A)的通路恢复(增加)了 miR-1 的表达, 同时也恢复(减少)了 NCX1 的表达, 由此改善了心肌功能。miR-1 的表达水平在大鼠心力衰竭心脏中是下降的, 但是在腺病

毒转染 SERCA2a 后逆转了心室重构, 也使 miR-1 的表达恢复了正常。在活体大鼠心力衰竭心肌中, Akt 和 FoxO3A 被高度磷酸化, 腺病毒转染 SERCA2a 后使其正常化, 其负性调节 miR-1 的水平, 从而恢复(增加)了 miR-1 的水平。

Kumarswamy 等^[22]研究还发现, 在心力衰竭心脏中表达增强的 NCX1 在 SERCA2a 基因疗法后也恢复了正常, 并断定 NCX1 为 miR-1 一个新的靶作用蛋白; 在人工培养的心肌细胞中, miR-1 过表达沉默了 NCX1 的蛋白表达, 从而证实其为 miR-1 的直接靶作用蛋白。最近, Tritsch 等^[23]研究通过体内外操纵 miR-1 的表达水平及定点诱变也证明了 NCX1 为 miR-1 的靶蛋白; 他同时还提出, 膜联蛋白 A5(annexin A5, AnxA5)的 mRNA 也是 miR-1 的靶基因; 同样, 他们在小鼠 AnxA5 的 3' UTR 确认了一个 miR-1 的结合位点。AnxA5 是一种与 NCX1 相互作用的钙离子结合蛋白, 在心力衰竭患者中表达增加。miR-1 在大鼠胚胎心肌细胞和新生小鼠心肌细胞过表达, 在蛋白质水平抑制 AnxA5 表达, 而 Anti-miR-1 在新生小鼠心肌细胞上调了其表达, 因其阻止了 miR-1 与 AnxA5 的 3' UTR 结合, 解除了 miR-1 的抑制效应。

3 前景和展望

目前发现了许多抗心律失常药抗心律失常作用的新机制。研究发现, 普萘洛尔可通过抑制 β -受体-环腺苷酸-蛋白激酶 A 信号通路和血清反应因子(serum response factor, SRF)表达而下调 miR-1 表达水平, 从而上调 Kir2.1/IK1 通道和 Cx43 表达水平, 发挥减轻心肌缺血损伤及抗心律失常作用^[24]。丹参酮 A 能够恢复由缺血引起的 IK1 下降及其蛋白表达下调, 通过抑制 SRF 而影响 miR-1 上调, 发挥其治疗心律失常及预防猝死的作用^[25]。这些发现提示, miR-1 为抗心律失常药物的间接靶点, 各抗心律失常药通过调节 miR-1 发挥抗心律失常作用, 此为开发新的抗心律失常药物提供了切入点。同时, 越来越多的研究通过使用转染 miR-1 技术及 AMO-1 导入技术上调或下调 miR-1 表达量来调控其靶蛋白的表达, 最终使疾病状态得以恢复。此类技术的应用提示 miR-1 可以作为抗心律失常的直接靶点, 但如何高效靶向导入载体尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Zhao Y, Samal E, Srivastava D, et al. Serum response factor regu-

- lates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 214-220.
- [2] Kwon C, Han Z, Olson EN, et al. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling[J]. *PNAS*, 2005, 102(52): 18 986-991.
- [3] Karakikes I, Chaanine AH, Kang S, et al. Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(2): e000 078.
- [4] Liu M, Li M, Sun S, et al. The use of antibody modified liposomes loaded with AMO-1 to deliver oligonucleotides to ischemic myocardium for arrhythmia therapy[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(11): 3 697-707.
- [5] Belevych AE, Somsom SE, Terentyeva R, et al. MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28 324.
- [6] Xu HF, Ding YJ, Shen YW, et al. MicroRNA-1 represses Cx43 expression in viral myocarditis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 362(1-2): 141-148.
- [7] Luo X, Lin H, Pan Z, et al. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20 045-052.
- [8] Curcio A, Torella D, Iaconetti C, et al. MicroRNA-1 downregulation increases connexin 43 displacement and induces ventricular tachyarrhythmias in rodent hypertrophic hearts [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70 158.
- [9] Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, et al. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin 43[J]. *Circ Res*, 2001, 88(3): 333-339.
- [10] Greener ID, Sasano T, Wan X, et al. Connexin 43 gene transfer reduces ventricular tachycardia susceptibility after myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(12): 1 103-110.
- [11] Yang B, Lin H, Xiao J, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2[J]. *Nat Med*, 2007, 13(4): 486-491.
- [12] Liu M, Li M, Sun S, et al. The use of antibody modified liposomes loaded with AMO-1 to deliver oligonucleotides to ischemic myocardium for arrhythmia therapy[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(11): 3 697-707.
- [13] Zhang Y, Sun L, Zhang Y, et al. Overexpression of microRNA-1 causes atrioventricular block in rodents[J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(5): 455-462.
- [14] Girmatsion Z, Biliczki P, Bonauer A, et al. Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation [J]. *Heart Rhythm*, 2009, 6(12): 1 802-809.
- [15] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 303-317.
- [16] Xiao J, Yang B, Lin H, et al. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(2): 285-292.
- [17] Zhou YF, Yang XJ, Li HX, et al. Mesenchymal stem cells transfected with HCN2 genes by Lenti V can be modified to be cardiac pacemaker cells[J]. *Med Hypotheses*, 2007, 69(5): 1 093-097.
- [18] Luo X, Xiao J, Lin H, et al. Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of IKs-encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(2): 358-367.
- [19] Jia X, Zheng S, Xie X, et al. MicroRNA-1 accelerates the shortening of atrial effective refractory period by regulating KCNE1 and KCNB2 expression: an atrial tachypacing rabbit model[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e85 639.
- [20] Terentyev D, Belevych AE, Terentyeva R, et al. miR-1 overexpression enhances Ca²⁺ release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56 alpha and causing CaMK II-dependent hyperphosphorylation of RyR2[J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 514-521.
- [21] Belevych AE, Terentyeva R, Ho HT, et al. MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28 324.
- [22] Kumarswamy R, Lyon AR, Volkmann I, et al. SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(9): 1 067-075.
- [23] Tritsch E, Mallat Y, Lefebvre F, et al. An SRF/miR-1 axis regulates NCX1 and annexin A5 protein levels in the normal and failing heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 98(3): 372-380.
- [24] Lu Y, Zhang Y, Shan H, et al. MicroRNA-1 downregulation by propranolol in a rat model of myocardial infarction: a new mechanism for ischaemic cardioprotection[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 84(3): 434-441.
- [25] Shan H, Li X, Pan Z, et al. Tanshinone II A protects against sudden cardiac death induced by lethal arrhythmias via repression of microRNA-1[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(5): 1 227-235.

(此文编辑 曾学清)