

· 专家论坛 ·

长链非编码 RNA 调节心脏疾病的作用与分子机制

潘振伟, 杨宝峰*

(哈尔滨医科大学药学院药理教研室, 省部共建生物医药国家重点实验室培育基地, 心血管药物研究教育部重点实验室, 中国医学科学院寒地慢病研究创新单元, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, lncRNAs) 是一类长度大于 200 个核苷酸且不编码蛋白质的 RNA 分子。lncRNAs 通过复杂多样的机制参与了细胞内几乎全部生物学过程的调控。它可以与细胞内的分子如蛋白质、RNA、DNA 相结合, 进而改变相应分子的功能, 影响基因转录、蛋白翻译和分子转运等多个过程。近年的研究表明, lncRNAs 也是心脏疾病的关键调控分子, 参与调节心肌缺血、心律失常、心肌纤维化、心力衰竭等发生发展。本文主要探讨 lncRNAs 调节心脏疾病的作用与相关分子机制, 并对未来的发展加以展望。

关键词: 长链非编码 RNA; 心力衰竭; 心肌缺血; 心律失常; 心肌纤维化; 生物标记物

中图分类号: Q752 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-0773-08

The role and molecular mechanisms of long noncoding RNAs in cardiac diseases

PAN Zhen-wei, YANG Bao-feng*

(The State-Province Key Laboratories of Biomedicine Pharmaceutics of China, Key Laboratory of Cardiovascular Research, Ministry of Education, Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Harbin Medical University, Research Unit of Noninfectious Chronic Diseases in Frigid Zone, Chinese Academy of Medical Sciences, Harbin 150081, China)

Abstract: Long noncoding RNAs (lncRNAs) are a class of RNAs that are more than 200 nucleotides in length with no protein coding property. lncRNAs are involved in almost every cellular process through multiple mechanisms. lncRNAs can directly bind to molecules in cells such as proteins, RNA, and DNA, to regulate cellular functions by influencing processes including transcription, translation, and molecular transporting. Recent researches showed lncRNAs are key regulators of serious cardiac diseases, especially in development and progression of cardiac ischemia, arrhythmia, cardiac fibrosis, and heart failure. This article mainly summarizes the function and mechanism of lncRNAs in cardiac diseases and gives reasonable prospect of lncRNAs in the future.

Key words: long noncoding RNAs; heart failure; cardiac ischemia; arrhythmia; myocardial fibrosis; biomarker

人类基因组 DNA 约 70% 会进行转录, 但只有 2% 的基因组转录本具有编码蛋白质的功能。这些大量不编码蛋白质的转录本即非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA)。以往人们认为这些非编码 RNA 为基因组转录产生的“噪音”或者“垃圾”, 但最近的研究表明它们不

仅是“垃圾”, 还是调节机体生理和病理功能的关键分子。非编码 RNA 种类繁多, 包括 rRNA (ribosomal RNA)、tRNA (transfer RNA)、snRNA (small nuclear RNA)、snoRNA (small nucleolar RNAs) 和 microRNA 等多种已知功能的 RNA 以及许多未知功能的 RNA。过去十几年人们关注的焦点是长约 20 个核苷酸的 microRNA 和长度大于 200 个核苷酸的长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, lncRNAs)^[1]。因为结构简单、作用机制相对单一、保守性高和作用广泛等特

收稿日期: 2020-02-06; 修回日期: 2020-03-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81730012); 中国医学科学院医学科学创新基金 (CIFMS, 2019-I2M-5-078).

*通讯作者 Tel: 86-451-86671354, E-mail: yangbf@ems.hrbmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0099

点, microRNA 一度是生命科学领域的研究热点。MicroRNA 通过影响众多蛋白质功能, 参与生物体病理生理过程, 在人类疾病中发挥重要作用, 基于 microRNA 靶点的治疗药物也已经进入临床研究阶段^[2]。相比较而言, lncRNAs 在哺乳动物中含量丰富, 种类较多, 根据其在基因组上的位置, 可分为正义 lncRNAs、反义 lncRNAs、双向 lncRNAs、内含子 lncRNAs 和基因间 lncRNAs^[3]。lncRNAs 链长且空间结构复杂, 作用广泛, 参与调节基因转录、翻译和翻译后修饰等基因表达调控的所有过程^[4]。lncRNAs 动态表达于不同细胞类型、发育阶段或疾病状态, 在心脏发育、心血管疾病和肿瘤等病理生理过程中都发挥作用^[5]。

1 lncRNA 的生物学特征

1991 年, 科学家发现了第 1 个 lncRNA-H19。虽然 H19 具有许多 mRNA 的特点, 如经由 RNA 聚合酶 II 转录、剪切、3' 加帽和定位于细胞质, 甚至含有 1 个小的开放阅读框, 但是 H19 并不进行翻译^[6]。当时科学家没有对其结构和功能进行深入研究。同年, 另 1 个 lncRNA, 即 X 染色体失活特异转录本 (X-inactive-specific transcript, Xist) 的功能引起了人们的关注, 它可以沉默整条 X 染色体。X 染色体的沉默对于补偿性染色体数量不均等性至关重要, 而 Xist 是 X 染色体失活过程中必不可少的, Xist 结合到将要失活的 X 染色体上, 募集多梳抑制复合体 (polycomb repressive complexes, PRC) 1 和 2 至 X 染色体失活区域, 引发一系列染色体改变, 最终沉默整条染色体^[7]。

H19 和 Xist 的发现为 lncRNAs 的研究揭开序幕, 自此 lncRNAs 的研究进入了快速发展阶段, 人们重新解读这一由基因组转录产生的“噪音”。随着研究的进展, 人们发现了越来越多的具有重要生物学作用的 lncRNAs。2002 年, 日本学者对小鼠全长 cDNA 文库测序, 发现并鉴定了大量 noncoding RNAs (ncRNAs), 是转录本的主要组成^[8,9]。2008 年, Rinn 等^[10]发现 HOTAIR (*HOX* transcript antisense RNA) 能够招募 PRC2 蛋白, 影响其组蛋白修饰过程, 最终导致基因沉默。同年, 科学家报道了一个在阿尔茨海默症中表达上调的 lncRNA-BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1), 研究发现其可以通过正反馈调节 β -分泌酶的表达^[11]。目前, 研究已经表明 lncRNA 几乎参与了机体所有的生理以及病理生理学过程。

1.1 lncRNAs 的作用机制 lncRNAs 的作用广泛, 可以通过多种机制调节机体病理生理过程。lncRNAs 的作用与其细胞定位密切相关, 细胞核中的 lncRNAs 主要通过影响染色质结构、染色质重构、转录调控和核小体调节发挥作用; 细胞质中的 lncRNAs 则更多的是

影响 mRNA 稳定性、蛋白质翻译过程和翻译后修饰过程。lncRNAs 主要通过信号作用、导向作用、诱饵作用和支架作用这四种作用模式发挥调节作用^[12]。

lncRNA 的支架作用是 lncRNAs 最为精准且复杂的作用。当细胞受到外界刺激时, lncRNAs 的这种多通路、共平台特征有利于细胞快速且准确的应答^[13]。lncRNA-GCInc1 (gastric cancer-associated lncRNA 1) 能够影响胃癌细胞增殖、侵袭和转移, 其在胃癌中表达上调且与胃癌的不良预后密切相关。研究表明, GCInc1 结合组蛋白转移酶复合物的一个关键蛋白 WDR5 (WD40 repeat protein 5) 和组蛋白乙酰转移酶 (lysine acetyltransferase 2A, KAT2A), 作为 WDR5 和 KAT2A 的分子支架, 调节它们的位置, 影响包括 SOD2 (superoxide dismutase 2 mitochondrial) 在内的靶基因组蛋白修饰, 最终影响胃癌细胞的生物功能^[14]。

lncRNAs 的作用机制复杂多样, 其核心是 lncRNA 与细胞内多种分子 DNA、RNA、蛋白质等的相互作用。相信随着研究的深入, 新的作用模式将不断涌现, 现有 lncRNAs 的作用模式将更加清晰。lncRNA 也可通过混合作用模式发挥作用, 比如 lncRNA-HOTTIP (*HOXA* transcript at the distal tip) 既可以作为信号分子参与调控, 又作为向导 lncRNAs 影响其他靶蛋白功能。HOTTIP 是 *HOXA* 基因 5' 端启动子区的 lncRNA, 在特定条件下转录后能够促进 *HOXA* 基因的转录^[15]; 同时, HOTTIP 还可以结合组蛋白甲基转移酶 (mixed-lineage leukemia 1, MLL1) 蛋白复合物作用于 *HOXA* 基因簇的 5' 区, 参与组蛋白甲基化和基因转录^[16]。

1.2 lncRNAs 的保守性 lncRNAs 的保守性与其临床应用潜力密切相关。由于大部分研究都是在实验动物上进行的, 动物 lncRNAs 与人的序列同源性很大程度上决定着动物实验的成果对人是否有意义。就目前研究结果来看, 大部分 lncRNAs 的保守性较低, 从动物样本中筛选出的 lncRNAs 或无保守性、或仅在部分物种间保守, 而其中大部分 lncRNAs 序列与人类基因组的同源性都很低。有研究经序列比对发现人和小鼠中 lncRNAs 仅有 20% 的同源基因^[17]。保守性低很大程度上是由于 lncRNAs 自身的局限性。首先, lncRNAs 的长度至少大于 200 个核苷酸, 很多 lncRNAs 长度在几千个核苷酸; 其次, lncRNAs 空间结构复杂, 对于 lncRNAs 的二级结构和更高级结构, 还缺乏有效的检测手段进行分析, 需要进一步对 lncRNAs 的空间结构进行阐述。

1.3 lncRNAs 的编码潜力 随着越来越多具有生物学功能的 lncRNAs 的发现和研究的深入, 人们发现一些 lncRNAs 包含小的开放阅读框并进行翻译, 但是仅有极小的一部分翻译后会形成稳定的且具有功能的短肽。

DWORF (dwarf open reading frame) 是由一个肌肉特异的 lncRNAs 编码的含 34 个氨基酸的功能性短肽, 研究表明 DWORF 可以作用于受磷蛋白 (phospholamban, PLN) 而影响 SERCA2a (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) 的功能^[18]。定位于细胞质中的 lncRNAs 存在与单/多核糖体蛋白作用的现象, 但这并不是为了翻译蛋白而更多的是参与了 lncRNAs 的衰减^[19]。

2 lncRNAs 与心脏疾病

心脏疾病是严重危害我国人民健康的常见疾病, 造成沉重的社会和经济负担。目前, 心脏疾病的防治效果并不十分理想, 仍是导致患者死亡的主要原因。因此, 亟需深入探讨心脏疾病的机制与研发新型防治策略。近年的研究表明, lncRNAs 是一类心脏疾病的关键调控分子, 几乎参与了所有心脏疾病如心肌损伤、心律失常、心肌纤维化以及心衰的发生发展。这既加深了人们对心脏疾病发生机制的认识, 也为相应防治药物的研发提出了新思路和新策略。

2.1 lncRNAs 与心肌损伤修复

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是一种缺血性心脏疾病, 由冠状动脉血栓形成导致, 引发心肌组织大面积缺血坏死, 心脏功能降低, 严重时可致猝死。许多 lncRNAs 在心肌缺血损伤过程中发挥重要的调控作用。研究人员通过对 MI 小鼠心肌组织进行芯片分析, 发现了几百个在心脏特异表达并与心脏异常重构和心肌再生相关的长链非编码 RNA^[20]。在小鼠心肌缺血再灌注模型中, 有 151 个 lncRNAs 的表达发生变化, 其中表达上调的 lncRNAs 有 64 个, 表达下调的 lncRNAs 有 87 个^[21]。与假手术组相比, 结扎冠状动脉左前降支 24 h 的小鼠心肌组织中有 20 个 lncRNAs 表达增加, 同时有 10 个 lncRNAs 表达下降, 其中心肌缺血转录本 1 (myocardial infarction-associated transcript 1, MIRT1) 和 2 (myocardial infarction-associated transcript 2, MIRT2) 在缺血心肌中表达稳定上调。这 2 个 lncRNAs 在心肌缺血 24 h 时表达水平达到峰值, 2 天后回落到基础水平^[22]。上述测序结果显示在心肌缺血和再灌注的病理过程中有大量差异表达的 lncRNA, 虽然没有逐一进行研究, 但是足以表明 lncRNA 与心肌损伤修复关系密切。

通过对 lncRNAs 的功能与机制研究, 人们发现 lncRNAs 通过调节心肌细胞坏死、自噬、凋亡以及细胞增殖等环节参与心肌缺血损伤。在心肌缺血损伤过程中, 心肌细胞大量死亡。Fas 相关死亡域蛋白 (Fas-associated protein with death domain, FADD) 是参与心肌细胞坏死的蛋白之一。lncRNA-H19 可以结合 miR-103/107, 抑制其对靶基因 FADD 蛋白的负调控作用, 对抗心肌缺血损伤^[23]。lncRNA-NRF (necrosis related

factor) 通过靶向 miR-873 和受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, RIPK1)/受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, RIPK3) 调节心肌细胞坏死。敲除 lncRNA-NRF 可以减弱 H_2O_2 诱导的心肌细胞坏死反应, 减少 I/R 损伤时心肌梗死面积^[24]。lncRNA-APF (autophagy promoting factor) 可以结合并抑制 miR-188-3p, 从而增加自噬相关蛋白-7 (autophagy related protein 7, ATG7) 的表达, 促进自噬; 敲除 APF 可减少缺血/再灌注小鼠模型中的细胞死亡^[25]。lncRNA-CARL (cardiac apoptosis-related lncRNA) 通过靶向 miR-539 和抗增殖蛋白-2 (prohibitin 2, PHB2) 抑制线粒体分裂和凋亡。PHB2 具有抑制线粒体分裂和凋亡的作用, 可对抗心肌损伤, 其表达受 miR-539 的调节。CARL 可以作为内源性 miR-539 海绵调节 PHB2 的表达、线粒体的分裂和心肌细胞凋亡^[26]。作者课题组发现心肌再生相关的 lncRNA-CAREL (cardiac regeneration-related lncRNAs)。CAREL 在成年小鼠中表达量较乳鼠增加。当敲减 CAREL 后, 小鼠心肌细胞增殖明显增强, 改善心肌梗死后修复与心脏功能。机制研究提示 CAREL 通过与 miR-296 结合而影响心肌增殖^[27]。lncRNA-NR-045363 也被证实可通过调节 miR-216a/蛋白酪氨酸激酶-信号传导及转录激活蛋白 (just another kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK2-STAT3) 通路诱导心肌细胞增殖^[28]。以上 lncRNA 均以 miRNA 分子海绵作用模式调节心肌缺血, 也有研究提示 lncRNA 可直接作用于损伤相关蛋白, 参与心肌损伤修复。如 lncRNA-CAIF (cardiac autophagy inhibitory factor) 可直接与 p53 (肿瘤抑制因子) 蛋白结合, 阻断 p53 介导的心肌蛋白转录, 导致心肌蛋白表达减少, 抑制了心肌自噬并减轻心肌梗死损伤^[29]。作者也发现 lncRNA-DACH1 (dachshund homolog 1) 通过直接结合蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 的催化亚单位, 从而促进 YAP1 (yes-associated protein 1) 磷酸化和减少其入核, 抑制细胞增殖; 敲减 lncDACH1 的表达可以促进心肌损伤修复和心脏再生^[30]。

2.2 lncRNAs 与心律失常

心脏的规律搏动是维持机体正常生理功能的重要保障。心律失常是指心脏的搏动无序, 导致心脏的电活动和机械活动障碍。心律失常的药物防治十分不理想, 仍是本领域的难点问题。大量研究表明 lncRNAs 与心律失常关系密切, 对心律失常的发生发展具有重要调节作用。

房颤 (atrial fibrillation, AF) 是一种心房的节律异常。心房肌细胞快速和异常活动会引起心房电重构或

结构重构,使房颤进一步恶化。2015年,研究者对房颤和非房颤人类样本进行测序,筛选出156个在房颤中表达上调的lncRNAs和63个表达下调的lncRNAs^[31]。研究人员对房颤的风湿性心脏病患者样本和正常窦房结节律患者样本进行分析,发现共有182个差异表达的lncRNAs,其中117个lncRNAs上调和65个lncRNAs下调^[32]。心肌梗死相关转录本lncRNA-MIAT (myocardial infarction associated transcripts)在房颤患者和小鼠模型中表达下调。动物实验表明,敲减MIAT可增加房颤诱导率和持续时间、缩短心房肌细胞动作电位时程(action potential duration, APD)、降低钙离子通道蛋白Cav1.2水平以及引起钾离子和钙离子电流异常。此外,MIAT直接结合转位因子蛋白(translocator protein, TSPO)抑制线粒体膜电位,促进MI小鼠心律失常易感性^[33]。lncRNA-TCONS-00075467是从房颤兔子的右心房组织测序中筛选出的差异表达的lncRNA。利用慢病毒干扰TCONS-00075467的表达缩短了心房的有效不应期、L型钙电流和动作电位时程。机制研究表明,TCONS-00075467作为miR-328的结合海绵,靶向钙通道基因-L型钙离子通道 $\alpha 1C$ 亚基(calcium channel voltage-dependent L alpha 1C subunit, CACNA1C),参与心房电重构^[34]。lncRNA-KCNQ10T1在血管紧张素II诱导的小鼠房颤模型中表达上调。它可以直接结合miR-384,促进CACNA1C的表达,影响心肌细胞有效不应期、房颤发生率和持续时间^[35]。

lncRNA也与室性心律失常密切相关。lncRNA-CCRR (cardiac conduction regulatory RNA)可以影响细胞间缝隙连接结构以及缝隙链接蛋白43 (connexin43, Cx43)调节心脏电传导过程,是一个抗室性心律失常的长链非编码RNA。光学映标测实验显示,下调CCRR水平可减慢正常小鼠的心肌电传导并增加心律失常易感性;过表达CCRR对正常小鼠心脏传导没有影响,但是可以改善心力衰竭小鼠的心肌传导^[36]。lncRNA-Kcna2as通过影响慢激活延迟整流钾电流(I_{ks}),改变动作电位时程和心律失常发生率,参与心衰大鼠的室性心律失常调节^[37]。lncRNA-MALAT1 (lncRNA-metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1)通过抑制心肌瞬时外向钾离子电流(I_{to})参与心律失常。在心律失常大鼠模型中,MALAT1通过miR-200c/HMGB1 (high mobility group box 1)通路发挥作用抑制心肌细胞 I_{to} 、峰电流密度、Kv4.2和Kv4.3的蛋白水平^[38]。此外,KCNQ10T1能够影响QT间期。在三氧化二砷诱导的长QT综合症(long QT syndrome, LQTS)模型中,KCNQ10T1表达减少;抑制KCNQ10T1的表达可以延长离体心肌细胞的APD和诱发实验小鼠LQTS^[39]。

2.3 lncRNAs与心肌纤维化 心肌纤维化是多种心脏疾病伴发的一种病理变化,其特征是细胞外基质沉积、胶原比例失衡和成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,导致心肌组织僵硬、顺应性降低,心功能障碍。因此,深入探究心肌纤维化的细胞分子机制,发现新的干预靶点,对新型心脏疾病防治药物的研发具有重要意义。大量研究证实,lncRNAs广泛参与了心肌纤维化的调节,干预lncRNAs的表达能够对抗心肌纤维化的发生发展。

lncRNA-Meg3 (maternally expressed 3)是利用测序技术筛选出来的成纤维细胞富集的长链非编码RNA。研究发现,对主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction, TAC)小鼠注射GapmeR Meg3并沉默Meg3后,破坏了Meg3与p53的结合,促进p53与金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)基因启动子区结合,增强其转录。沉默Meg3后,细胞外基质中MMP-2含量下降,细胞外基质沉积减少,抑制了心肌纤维化,小鼠心脏功能得到改善^[40]。lncRNA-WISPHER (Wisp2 super-enhancer-associated RNA)是从小鼠MI组织测序中鉴定出的成纤维细胞富集的lncRNA,使用WISPHER的反义寡核苷酸治疗MI小鼠,能够减少胶原蛋白和心脏应激标记物的表达、抑制组织重构、改善心脏功能和增加存活率。在临床主动脉瓣狭窄的患者组织样本中,WISPHER的表达增加,其与心肌梗死后心室不良重构和心肌纤维化的发展密切相关^[41]。作者团队研究发现了一组在心肌纤维化中起关键调控作用的lncRNAs,如lncRNA-PFL (pro-fibrotic lncRNA)、lncRNA-30245、MIAT (myocardial infarction associated transcripts)、AK081284以及lncRNA-PCFL (pro-cardiac fibrotic lncRNA)。PFL在MI时表达上调,它可以通过分子海绵作用结合let-7d,促进心肌缺血时纤维化过程。过表达PFL可以促进小鼠成纤维细胞的增殖、成纤维细胞向肌成纤维细胞转化和纤维生成;敲减PFL可以改善TGF- β 诱导的纤维化症状^[42]。lncRNA-30245作用于过氧化物酶增殖体激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)参与MI过程中成纤维的增殖和胶原分泌^[43]。PCFL通过分子海绵作用吸附miR-378,影响生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor bound protein 2, GRB2)蛋白水平,促进纤维化^[44]。lncRNA-MALAT1通过miR-145增强TGF- β (transforming growth factor beta)活性,促进MI后心肌纤维化和损伤小鼠心脏功能^[45]。lncRNA-AK081284在高糖刺激的成纤维细胞中表达上调,过表达lncRNA-AK081284促进成纤维细胞分泌胶原和TGF- $\beta 1$,从而参与糖尿病心肌纤维化的发生^[46]。作者经在体和离体

实验表明, 敲减 MIAT 可以恢复纤维化相关基因表达, 发挥抗梗死后纤维化的作用^[47]。LncRNF7 (lncRNA ring finger protein 7) 由大鼠心肌纤维化组织测序筛选而来, RNF7/miR-543 可以影响 TGF- β 活性, 沉默 RNF7 可以对抗异丙肾上腺素和血管紧张素 II 诱导的心肌纤维化^[48]。心肌纤维化相关的 lncRNA 并不都在成纤维细胞中富集。有研究发现心肌细胞缺氧刺激后可分泌细胞外囊泡, 囊泡携带的 lncRNA-ENSMUST00000122745 和 Neat1 可以作用于成纤维细胞, 影响心肌纤维化^[49]。

2.4 LncRNAs 与心力衰竭 心力衰竭 (heart failure, HF) 是多种心血管疾病如冠心病、高血压、瓣膜病等的终末阶段, 表现为心脏的泵功能减弱, 严重时可致患者死亡。心肌肥厚是心脏对刺激或损伤的一种适应性反应, 病理性心肌肥厚如不及时干预往往会发展为心力衰竭。心力衰竭一直是本领域的研究焦点, 人们试图通过对其分子机制的解析发现新的调节靶点, 从而研发新型治疗药物, 改善防治水平。LncRNAs 参与了心力衰竭的发生发展, 既包括结构上的调节, 如心肌细胞肥大, 也包括功能上的调节, 如心肌细胞收缩功能障碍。

作者团队发现对心肌细胞收缩具有直接调节作用的 2 个 lncRNAs: Zfas1 (zinc finger antisense 1) 和 lncDACH1。SERCA2a 是调节正常细胞内 Ca^{2+} 处理过程的关键蛋白, 通过介导心肌中 Ca^{2+} 再摄取进入内质网, 从而调节心肌收缩功能。作者发现 lncRNA-Zfas1 是一种内源性 SERCA2a 抑制剂, 通过与 SERCA2a 蛋白结合抑制其细胞内水平与活性, 导致心肌梗死后心肌收缩功能障碍^[50]。另外, lncDACH1 在心衰时表达上调。在 TAC 诱导的小鼠心力衰竭模型中, 干扰 lncDACH1 可以改善小鼠的心脏功能, 显著升高射血分数和短轴缩短率。机制研究显示, lncDACH1 与 SERCA2a 蛋白直接结合, 促进其泛素化降解, 影响心肌细胞收缩^[51]。

2.5 LncRNAs—心脏疾病的血浆标志物 有些 lncRNAs 的表达具有组织特异性和在血浆中稳定表达等特点, 这使 lncRNAs 作为心脏疾病的血浆标志物成为可能。现已发现一些可作为心脏疾病血浆标志物的 lncRNAs。

作者团队对 103 名急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 患者、149 名非 AMI 和 95 名健康志愿者的血样进行分析, 从 15 个可能与心脏疾病相关的 lncRNAs 中, 筛选出 2 个表达差异显著的 Zfas1 和 CDR1AS (cerebellar degeneration-related protein 1 antisense), 进一步的敏感性与特异性分析表明这 2 个 lncRNAs 单独或是联合应用可以作为 AMI 的诊断标志物^[52]。LncRNA-UCA1 (urothelial carcinoma-associated

1) 是一个在肿瘤中发现的 lncRNA, 其尿液样本中的含量可作为膀胱癌的标志物, 在血浆样本中可作为肺癌的标志物。UCA1 在成年人心脏中表达丰富, 研究人员检测了其在 AMI 患者血浆样本中的表达水平, 结果显示 UCA1 在 AMI 早期表达下降, 约 3 天后表达开始增加, 提示 UCA1 可作为 AMI 诊断/预后的标志物^[53]。

LncRNA-LIPCAR (long intergenic noncoding RNA predicting cardiac remodeling) 是一种新的心肌重构标志物, 独立于其他与心血管死亡相关的危险指标, 可作为心力衰竭患者的生存率参考指标^[54]。作者团队对 72 名心衰患者和 60 名非心衰健康人血液样本中 13 个已知与心血管疾病相关的 lncRNA 的表达进行检测, 结果显示 NRON (ncRNA repressor of the nuclear factor) 和 MHRT (myosin heavy chain related RNA transcript) 在心衰样本中表达显著高于对照组, 进一步研究证实其循环中表达量的增加可预测心衰, 是心衰的新的生物标志物^[55]。

为了寻找冠心病 (coronary artery disease, CAD) 的血浆标志物, 研究人员对 CAD 患者和正常人血液样本进行测序, 发现有 265 个 lncRNAs 表达发生变化, 进一步筛查发现 lncRNA-CoroMarker 在血浆中表达稳定, 是 CAD 敏感且特异的生物标志物^[56]。此外, 一项利用 CAD 患者循环外周血单细胞样本进行 CAD 生物标志物筛查的研究也发现, CoroMarker 可以作为 CAD 的生物标志物^[57]。研究人员对冠状动脉疾病患者和正常人血浆样本中 lncRNA-GAS5 (growth arrest-special transcript 5) 的表达进行检测, 发现血浆 lncRNA-GAS5 在冠状动脉疾病患者中表达下降, 并证实其可作为冠心病的血浆生物标志物^[58]。经对 36 例正常人的血浆样本和 90 例先天性心脏病患者的血浆 (其中包括 36 例心房间隔缺损、23 例心室间隔缺损和 31 例动脉导管未闭) 样本中 HOTAIR 的检测, 发现其在先天性心脏病患者血浆中表达显著上调, 可作为先天性心脏病的生物诊断标志物^[59]。

3 展望

虽然 lncRNAs 最早的报道出现在 20 世纪 90 年代, 但 lncRNAs 具有生物学作用、参与机体的发育和疾病的研究近年才引起人们的重视。关于 lncRNAs 的研究近期迅速增加, 一度成为科学研究领域的热点。随着越来越多的新鉴定出的 lncRNAs 在心脏疾病中的作用被揭示, 以及已知的 lncRNAs 在心脏疾病中的新作用被发现, 人们对心脏疾病的认识更加深入, 也有希望基于这些发现研发新型防治药物。

尽管 lncRNA 研究的潜力与价值很大, 但也面临着很大的挑战。① 如何解决 lncRNA 的保守性低的

问题? 目前多数动物实验中获得的 lncRNA 很难直接匹配到人的同源序列, 这大大限制了临床前成果的转化。另外, lncRNAs 存在不同种属间作用不同的现象, 这更增加了 lncRNA 临床前成果转化的难度。虽然 lncRNA 很少有全长同源序列, 但是有些 lncRNAs 存在启动子同源和二级结构保守等特征, 这可能是解决保守性这一问题的方向之一; ② LncRNA 数量巨大, 其确切调控机制如何? NONCODE 数据库显示人类有 9 万多 lncRNA 基因, 已经完成功能学研究的 lncRNA 数量相对较少, 有大量的 lncRNA 功能有待阐明; 另外, lncRNA 的作用机制极为复杂, 可同时与 DNA、RNA 和蛋白质相结合, 如何阐明其确切调控网络与时空特征是人们面临的巨大难题; ③ LncRNA 的应用潜力如何? 现有研究提示 lncRNA 在疾病的发生发展过程中具有重要调控作用, 未来有很好的应用前景, 但目前还没有进入临床试验的 lncRNAs 药物或基因疗法。具体限制因素包括: lncRNAs 的链长且具有复杂空间结构, 这为寻找有效的药物形式或者包装载体增加了难度; lncRNAs 不稳定, 进入人体后可能会在发挥作用前被降解或因其他反应消耗而影响作用效果; lncRNAs 的作用广泛, 这降低了其靶向性。尽管 lncRNA 作为治疗药物或治疗靶点存在着许多局限性, 其作为临床诊断和预后标志物的潜力巨大, 基于 lncRNA 的诊断试剂盒将是未来十分有前景的研究防线, 这也是临床医生和基础科学家十分关注的领域, 有望取得突破性进展。

总之, lncRNAs 的研究时间相对较短, 人们对 lncRNAs 的了解还不够全面, 需要完善和发展的地方还有很多。比如: ① 还需发现和定义新的具有生物学功能或参与病理过程的 lncRNAs, 诠释 lncRNAs 发挥作用的具体机制; ② 开发新的适用于 lncRNAs 的实验技术, 深入分析 lncRNAs 的序列信息, 解析 lncRNAs 的高级结构, 更新和开发有助于 lncRNAs 与分子作用的机制研究的实验技术; ③ 深入研究 lncRNAs 在人类疾病中的作用, 为药物研发和临床治疗提供新的靶点, 寻找可以将 lncRNAs 稳定有效携带入人体的载体, 促进 lncRNAs 进入临床应用。相信随着科学的发展和科学技术手段的进步, lncRNAs 在心脏疾病的临床应用上会有所突破。

References

- [1] St Laurent G, Wahlestedt C, Kapranov P. The Landscape of long noncoding RNA classification [J]. *Trends Genet*, 2015, 31: 239-251.
- [2] van der Ree MH, van der Meer AJ, van Nuenen AC, et al. Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 43: 102-113.
- [3] Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2018, 172: 393-407.
- [4] Chen LL. Linking long noncoding RNA localization and function [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41: 761-772.
- [5] Viereck J, Thum T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury [J]. *Circ Res*, 2017, 120: 381-399.
- [6] Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene [J]. *Nature*, 1991, 351: 153-155.
- [7] Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome [J]. *Nature*, 1991, 349: 38-44.
- [8] Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60 770 full-length cDNAs [J]. *Nature*, 2002, 420: 563-573.
- [9] Bu D, Yu K, Sun S, et al. NONCODE v3.0: integrative annotation of long noncoding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D210-215.
- [10] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human *HOX* loci by noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2007, 129: 1311-1323.
- [11] Wong PC. Translational control of BACE1 may go awry in Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 2008, 60: 941-943.
- [12] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs [J]. *Mol Cell*, 2011, 43: 904-914.
- [13] Bar C, Chatterjee S, Thum T. Long noncoding RNAs in cardiovascular pathology, diagnosis, and therapy [J]. *Circulation*, 2016, 134: 1484-1499.
- [14] Sun TT, He J, Liang Q, et al. LncRNA GCIncl promotes gastric carcinogenesis and may act as a modular scaffold of WDR5 and KAT2A complexes to specify the histone modification pattern [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6: 784-801.
- [15] Wang F, Tang Z, Shao H, et al. Long noncoding RNA HOTTIP cooperates with CCCTC-binding factor to coordinate *HOXA* gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500: 852-859.
- [16] Wang KC, Yang YW, Liu B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression [J]. *Nature*, 2011, 472: 120-124.
- [17] Johnsson P, Lipovich L, Grandér D, et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840: 1063-1071.
- [18] Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle [J]. *Science*, 2016, 351: 271-275.

- [19] Noh JH, Kim KM, McClusky WG, et al. Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018, 9: e1471.
- [20] Ounzain S, Micheletti R, Beckmann T, et al. Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36: 353-368a.
- [21] Liu Y, Li G, Lu H, et al. Expression profiling and ontology analysis of long noncoding RNAs in post-ischemic heart and their implied roles in ischemia/reperfusion injury [J]. *Gene*, 2014, 543: 15-21.
- [22] Zangrando J, Zhang L, Vausort M, et al. Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 460.
- [23] Wang JX, Zhang XJ, Li Q, et al. MicroRNA-103/107 regulate programmed necrosis and myocardial ischemia/reperfusion injury through targeting FADD [J]. *Circ Res*, 2015, 117: 352-363.
- [24] Wang K, Liu F, Liu CY, et al. The long noncoding RNA NRF regulates programmed necrosis and myocardial injury during ischemia and reperfusion by targeting miR-873 [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23: 1394-1405.
- [25] Wang K, Liu CY, Zhou LY, et al. APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by targeting miR-188-3p [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6779.
- [26] Wang K, Long B, Zhou LY, et al. CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 downregulation [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3596.
- [27] Cai B, Ma W, Ding F, et al. The long noncoding RNA CAREL controls cardiac regeneration [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72: 534-550.
- [28] 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.
- [29] Liu CY, Zhang YH, Li RB, et al. LncRNA CAIF inhibits autophagy and attenuates myocardial infarction by blocking p53-mediated myocardin transcription [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 29.
- [30] Cai B, Ma W, Wang X, et al. Targeting LncDACH1 promotes cardiac repair and regeneration after myocardium infarction [J]. *Cell Death Differ*, 2020. DOI:10.1038/s41418-020-0492-5.
- [31] Ruan Z, Sun X, Sheng H, et al. Long non-coding RNA expression profile in atrial fibrillation [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 8402-8410.
- [32] Mei B, Liu H, Yang S, et al. Long non-coding RNA expression profile in permanent atrial fibrillation patients with rheumatic heart disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22: 6940-6947.
- [33] Zhang Y, Du W, Yang B. Long non-coding RNAs as new regulators of cardiac electrophysiology and arrhythmias: molecular mechanisms, therapeutic implications and challenges [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 203: 107389.
- [34] Li Z, Wang X, Wang W, et al. Altered long non-coding RNA expression profile in rabbit atria with atrial fibrillation: TCONS_00075467 modulates atrial electrical remodeling by sponging miR-328 to regulate CACNA1C [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 108: 73-85.
- [35] Shen C, Kong B, Liu Y, et al. YY1-induced upregulation of lncRNA KCNQ1OT1 regulates angiotensin II-induced atrial fibrillation by modulating miR-384b/CACNA1C axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505: 134-140.
- [36] Zhang Y, Sun L, Xuan L, et al. Long non-coding RNA CCRR controls cardiac conduction via regulating intercellular coupling [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 4176.
- [37] Long QQ, Wang H, Gao W, et al. Long noncoding RNA Kcna2 antisense RNA contributes to ventricular arrhythmias via silencing Kcna2 in rats with congestive heart failure [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6: e005965.
- [38] Zhu P, Yang M, Ren H, et al. Long noncoding RNA MALAT1 downregulates cardiac transient outward potassium current by regulating miR-200c/HMGB1 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 10239-10249.
- [39] Jiang Y, Du W, Chu Q, et al. Downregulation of long non-coding RNA Kcnq1ot1: an important mechanism of arsenic trioxide-induced long QT syndrome [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45: 192-202.
- [40] Piccoli MT, Gupta SK, Viereck J, et al. Inhibition of the cardiac fibroblast-enriched lncRNA Meg3 prevents cardiac fibrosis and diastolic dysfunction [J]. *Circ Res*, 2017, 121: 575-583.
- [41] Micheletti R, Plaisance I, Abraham BJ, et al. The long noncoding RNA Wisper controls cardiac fibrosis and remodeling [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9: eaa19118.
- [42] Liang H, Pan Z, Zhao X, et al. LncRNA PFL contributes to cardiac fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of let-7d [J]. *Theranostics*, 2018, 8: 1180-1194.
- [43] Zhuang Y, Li T, Zhuang Y, et al. Involvement of lncR-30245 in myocardial infarction-induced cardiac fibrosis through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated connective tissue growth factor signalling pathway [J]. *Can J Cardiol*, 2019, 35: 480-489.
- [44] Sun F, Zhuang Y, Zhu H, et al. LncRNA PCFL promotes cardiac fibrosis via miR-378/GRB2 pathway following myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133: 188-198.
- [45] Huang S, Zhang L, Song J, et al. Long noncoding RNA MALAT1 mediates cardiac fibrosis in experimental postinfarct myocardium mice model [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 2997-3006.
- [46] Zhang Y, Zhang YY, Li TT, et al. Ablation of interleukin-17 alleviated cardiac interstitial fibrosis and improved cardiac function via inhibiting long non-coding RNA-AK081284 in diabetic mice

- [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 115: 64-72.
- [47] Qu X, Du Y, Shu Y, et al. MIAT is a pro-fibrotic long non-coding RNA governing cardiac fibrosis in post-infarct myocardium [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42657.
- [48] Ouyang F, Liu X, Liu G, et al. Long non-coding RNA RNF7 promotes the cardiac fibrosis in rat model *via* miR-543/THBS1 axis and TGFbeta1 activation [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12: 996-1010.
- [49] Kenneweg F, Bang C, Xiao K, et al. Long noncoding RNA-enriched vesicles secreted by hypoxic cardiomyocytes drive cardiac fibrosis [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 363-374.
- [50] Zhang Y, Jiao L, Sun L, et al. LncRNA ZFAS1 as a SERCA2a inhibitor to cause intracellular Ca²⁺ overload and contractile dysfunction in a mouse model of myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2018, 122: 1354-1368.
- [51] Cai B, Zhang Y, Zhao Y, et al. Long noncoding RNA-DACH1 (dachshund homolog 1) regulates cardiac function by inhibiting SERCA2a (sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2a) [J]. *Hypertension*, 2019, 74: 833-842.
- [52] Zhang Y, Sun L, Xuan L, et al. Reciprocal changes of circulating long non-coding RNAs ZFAS1 and CDR1AS predict acute myocardial infarction [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22384.
- [53] Yan Y, Zhang B, Liu N, et al. Circulating long noncoding RNA UCA1 as a novel biomarker of acute myocardial infarction [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 8079372.
- [54] Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure [J]. *Circ Res*, 2014, 114: 1569-1575.
- [55] Xuan L, Sun L, Zhang Y, et al. Circulating long non-coding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21: 1803-1814.
- [56] Yang Y, Cai Y, Wu G, et al. Plasma long non-coding RNA, CoroMarker, a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 129: 675-685.
- [57] Cai Y, Yang Y, Chen X, et al. Circulating 'lncRNA OTTHUMT00000387022' from monocytes as a novel biomarker for coronary artery disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 112: 714-724.
- [58] Yin Q, Wu A, Liu M. Plasma long non-coding RNA (lncRNA) GAS5 is a new biomarker for coronary artery disease [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 6042-6048.
- [59] Jiang Y, Mo H, Luo J, et al. HOTAIR is a potential novel biomarker in patients with congenital heart diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 2850657.