

网络出版时间: 2018-8-2 09:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180731.1310.037.html>

microRNA 调控自噬在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展

杨红星¹, 李绍旦² 综述 杨明会² 审校

摘要 心肌缺血再灌注损伤是缺血性心脏病中的治疗难点。在其诸多机制中,近年来自噬引起了研究者的关注。自噬是细胞内一种通过溶酶体降解长寿命蛋白和受损细胞器的代谢途径,在细胞应激过程中起到了重要作用。microRNA 作为近年来广为研究的转录后调控者,其在自噬调控过程中的具体作用和分子机制仍然有待于更多深入研究,该文综述近年来关于 microRNA 通过调控自噬的具体环节从而干预心肌缺血再灌注损伤的研究,为基础与临床研究提供参考。

关键词 microRNA; 自噬; 心肌缺血再灌注损伤

中图分类号 R 34; R 541

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)09-1485-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.037

2018-02-28 接收

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(编号: 2012CB518601)

作者单位: ¹ 北京中医药大学第一临床医学院,北京 100029

² 解放军总医院中医部,北京 100853

作者简介: 杨红星,男,博士研究生;

杨明会,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: ymh9651@sina.com

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)是指在原发或继发的缺血性心脏疾病中恢复心肌缺血部位的血液供应后却加剧了缺血心肌的应激反应和细胞死亡的病理生理过程。导致 MIRI 的具体机制是复杂的,包括营养缺乏、再灌注活性氧应激、线粒体通透性转换孔开放、再灌注导致的钙紊乱、心肌细胞内 pH 值的快速变化^[1]等, MIRI 往往是它们多方面作用的结果。

自噬是高度进化保守的细胞内降解长寿命蛋白和受损细胞器的生理反应。自噬是细胞内依赖溶酶体的“自我消化”行为,能够清除胞质内入侵病毒、大分子异常蛋白和衰老受损细胞器^[2],是细胞内固有的应激反应和防御机制。自噬与心血管或肌肉组织疾病、神经系统疾病、衰老和肿瘤等多种疾病有关。根据包裹物和运输方式不同,可将自噬分为巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)、分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA),以及新发现的 DNA 自噬^[3]和 RNA 自噬^[4],通常所谓的自噬是指巨自噬。心肌细胞通过自噬途

- [22] Li X Y, Wang S S, Han Z, et al. Triptolide restores autophagy to alleviate diabetic renal fibrosis through the miR-141-3p/PTEN/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017; 9: 48-56.
- [23] Wang H, Feng Z, Xie J, et al. Podocyte-specific knockin of PTEN protects kidney from hyperglycemia [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018; 314(6): F1096.
- [24] Sun J, Li Z P, Zhang R Q, et al. Repression of miR-217 protects against high glucose-induced podocyte injury and insulin resistance by restoring PTEN-mediated autophagy pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 483(1): 318-24.
- [25] Wang X M, Yao M, Liu S X, et al. Interplay between the Notch and PI3K/Akt pathways in high glucose-induced podocyte apoptosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 306(2): F205-13.
- [26] Liu X, Zhang Y, Shi M, et al. Notch1 regulates PTEN expression to exacerbate renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy by inhibiting autophagy via interactions with Hes1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 497(4): 1110-6.
- [27] Luo M, Tan X, Mu L, et al. MiRNA-21 mediates the antiangiogenic activity of metformin through targeting PTEN and SMAD7 expression and PI3K/AKT pathway [J]. *Sci Rep* 2017; 7: 43427.
- [28] Dey N, Das F, Mariappan M M, et al. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes [J]. *J Biol Chem* 2011; 286(29): 25586-603.
- [29] Kolling M, Kaucsar T, Schauer C, et al. Therapeutic miR-21 silencing ameliorates diabetic kidney disease in mice [J]. *Mol Ther* 2017; 25(1): 165-80.
- [30] McClelland A D, Herman-Edelstein M, Komers R, et al. miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7 [J]. *Clin Sci (Lond)* 2015; 129(12): 1237-49.
- [31] Gui F, Hong Z, You Z, et al. MiR-21 inhibitor suppressed the progression of retinoblastoma via the modulation of PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. *Cell Biol Int* 2016; 40(12): 1294-302.
- [32] Wang J, Gao Y, Ma M, et al. Effect of miR-21 on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice [J]. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(2): 537-46.
- [33] Zhang L, He S, Yang F, et al. Hyperoside ameliorates glomerulosclerosis in diabetic nephropathy by downregulating miR-21 [J]. *Can J Physiol Pharmacol* 2016; 94(12): 1249-56.
- [34] Fiorentino L, Cavallera M, Mavilio M, et al. Regulation of TIMP3 in diabetic nephropathy: a role for microRNAs [J]. *Acta Diabetol* 2013; 50(6): 965-9.

径降解受损的线粒体等细胞器,维持细胞内能量平衡与环境稳定,从而抑制细胞凋亡发生。不少研究均已确定,自噬参与了 MIRI 的病理过程,并发挥着有益或有害的不同效应^[5]。综合性的研究^[6]认为,再灌注期自噬的具体作用可能与缺血期缺血程度、缺血时间、自噬的激活程度、自噬与凋亡之间的交互作用、甚至所用模型和评价自噬的方法等有关。另外,自噬的具体作用还可能与诱发因素有关,营养缺乏、缺氧、感染、活性氧应激等不同的诱发因素,可导致自噬完全不同的作用。显然自噬能够相应地改变缺血再灌注损伤程度并对损伤心肌具有潜在的保护作用。因此深入研究自噬机制和调控通路十分重要。

1 MIRI 中自噬的调控机制

1.1 AMPK 途径 5'-单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 即 AMP 依赖的蛋白激酶,是生物体能量代谢调节的关键分子。心肌缺血缺氧导致 ATP 水平下降,激活 AMPK 而诱导自噬。心肌缺血时以 ATP 为代表的能量水平下降,AMPK 感知能量不足后被激活,诱发 ULK1 活化,启动自噬起始环节^[7]。例如 PL 菌丝体预处理部分地通过增加 AMPK 磷酸化水平上调自噬减少大鼠 MIRI^[8]。

1.2 mTOR 途径 雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是心肌缺血阶段调控自噬的核心蛋白,作为胞内能量感受体,它有两种复合物形式: mTORC1 和 mTORC2,诸多调控方式通过抑制 mTOR 上调自噬缓解 MIRI。例如,升高 miRNA-221 表达量能够通过 mTORC1/p-4EBP1 途径抑制自噬从而缓解缺氧/复氧导致的 H9c2 心肌细胞和新生大鼠心肌细胞损伤^[9]。黄连素降低 mTORC2 磷酸化水平后进而抑制自噬显著提高了 H9c2 心肌细胞存活率,减少了小鼠心肌梗死面积^[10]。

1.3 HIF-1 参与的缺氧诱导自噬调控 缺氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF-1) 是一种核转录因子,能够调节氧稳态,使细胞适应缺氧环境。HIF-1 由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 亚基组成,其中 HIF-1 α 是缺氧期间的调节亚基。缺氧/复氧模型能显著提高 HIF-1 的转录水平和蛋白表达水平。例如 HIF-1 α 过表达或敲低可分别促进或抑制缺氧引起的自噬诱导,从而证实 HIF-1 介导的自噬能够减轻缺氧诱导的 H9c2 细胞活力的降低^[11]。

1.4 活性氧和钙 活性氧自由基 (reactive oxygen

species, ROS) 广泛参与缺血再灌注后的损伤,是 MIRI 最重要的作用机制之一。再灌注期大量的 ROS 干扰线粒体膜极性与膜的完整性,增加线粒体通透性转换孔开放,或对 DNA 造成损伤,导致大鼠心肌细胞凋亡或自噬性死亡增加^[12]。钙和钙调蛋白在 MIRI 中也是诱导自噬的因素, MIRI 中抑制 Na⁺/Ca²⁺ 离子转运蛋白就可以减少线粒体钙超载从而降低过高的自噬水平^[13]。再灌注期细胞膜 Na⁺/Ca²⁺ 交换通道开放增加,使细胞内 Ca²⁺ 浓度升高,通过 mTOR 依赖途径进一步增强自噬。且肌浆网钙泵抑制剂能显著抑制细胞内 Ca²⁺ 浓度从而抑制自噬,表明 Ca²⁺ 浓度可影响再灌注期自噬水平^[14]。

1.5 NF- κ B 参与 NF- κ B 是最初于 B 淋巴细胞中鉴定出的一种核转录因子,能够被感染、ROS 等多种刺激因素诱导入核,上调相关基因表达,调控炎症反应、凋亡与自噬水平。在人脐静脉内皮细胞中发现缺血再灌注损伤能够促进依赖于 p65-Beclin1 的自噬水平升高,而抑制 NF- κ B 可以降低 Beclin1 参与的自噬流活化程度,增加细胞损伤^[15]。

1.6 内质网应激和未折叠蛋白反应 MIRI 过程中,ROS 干扰胞内代谢平衡,扰乱了位于内质网内的蛋白折叠过程,激起内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS),未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 同样参与其中。ERS 和 UPR 能够选择性地减少蛋白质翻译及合成,诱导自噬对已经错误折叠的蛋白质的清理,并能够通过 UPR 三个信号传感器 IRE1、PERK 和 ATF6 将信号 (例如通过真核启动因子 eIF2 α) 传递到细胞核或细胞质引发自噬^[16]。

MIRI 中自噬的调控机制与作用是多方面的,因此在 MIRI 中通过调控自噬处于恰当的水平显示了对 MIRI 的良好治疗前景。在 MIRI 和自噬机制中, microRNA 近年来越来越引起人们的关注。microRNA 是高度保守的长度为 18~24 个核苷酸的内源性单链非编码 RNA,被认为具有与靶 mRNA 的特异性结合位点结合后促进降解或抑制靶 mRNA 翻译来行使转录后调控的作用。microRNA 在细胞生长、增殖、分化、凋亡等方面具有重要的调控作用,而且, microRNA 在心血管系统疾病过程包括 MIRI 中扮演了重要角色。因此,深入探索 microRNA 在 MIRI 中的作用与详细机制具有十分重要的临床意义。目前已报道多种 microRNA 通过调控自噬相关基因 (autophagy related gene, ATG) 或自噬调节因子干预自

噬水平,在 MIRI 中扮演了重要角色。因此本文着重综述 microRNA 通过调节自噬进而缓解 MIRI 的作用与机制。

2 microRNA 调节自噬的不同环节

自噬的具体机制包括自噬的诱发、自噬泡开始形成、自噬泡延伸并识别包裹待降解的胞质成分、自噬泡与溶酶体融合、降解自噬泡内容物以供能量循环利用^[17]。microRNA 能够通过不同途径调控自噬的绝大部分过程。

2.1 自噬的诱发阶段 哺乳动物细胞自噬的发生常见于能量危机或激素、生长因子、钙离子、Bcl-2、ROS 诱导时,始于 mTOR 或 classIIIPI3K 活化,导致 ULK 复合物(包括 Atg1、Atg13、Atg17、Atg101)的激活。有研究^[18]证实,miRNA-21 在 H9c2 心肌细胞中激活 Akt/mTOR 通路,可能通过抑制 ULK 复合物下调缺氧/复氧模型的自噬流而减少细胞凋亡。miRNA-20a 和 miRNA-106b 在 C2C12 成肌细胞中通过抑制 ULK1 的活化下调自噬^[19]。另据报道 miR-93 能够靶向调控 ULK1 并在缺氧条件下降低其蛋白表达水平从而抑制自噬^[20]。

2.2 自噬泡的形成与延伸 初始自噬膜的形成需要 PtdIns3K 复合物的活化,它由 PtdIns3K、Vps34、Vps15、Atg14 和 Atg6/Vps30(哺乳动物中的同系物 Beclin1)组成。自噬泡的成核涉及包含 PIK3C3/VPS34-PIK3R4/VPS15(磷酸肌醇-3-激酶)-BECN1-ATG14 的磷脂酰肌醇-3-激酶(PtdIns3K)复合物^[21]。PtdIns3K 复合物产生 PtdIns3P(3-磷酸-磷脂酰肌醇),并募集多个自噬蛋白如 Atg18、Atg20、Atg21 和 Atg24(100,105,141)而成核,进而募集两个泛素样蛋白酶 Atg12-Atg5-Atg16 和 Atg8(在哺乳动物中的同系物就是 LC3 蛋白,是自噬活化的标记蛋白)-PE,促进自噬小体的膜伸长和扩大^[22]。其中值得重点关注的是 Atg8 也就是 LC3 蛋白的羧基末端被蛋白酶 Atg4B 切割后形成胞质蛋白形式 LC3-I,LC3-I 进一步被磷脂酰乙醇胺脂化成为 LC3-II 形式,后者可被募集到自噬泡膜上。通常由 LC3-II 与 LC3-I 的比值可以评价自噬的活化程度。miRNA-30a、miRNA-376b^[23] 和 miRNA-519a^[24] 抑制 Beclin1 从而抑制自噬泡初期的成核作用。miRNA-93 能够阻止 LC3-I 向 LC3-II 的转化,阻止它们被募集到自噬泡膜上从而起到抑制自噬体膜延伸的作用^[20]。有研究^[25]显示,一种被称为 ARC 的抗自噬蛋白的靶标是 Beclin1,而 miR-325 能够通过抑制 ARC 进而抑制

Beclin1 下调自噬。Atg14 是 PtdIns3(磷脂酰肌醇)激酶 3 复合物之一的特异性亚单位,能够将 PtdIns3 复合物靶向对标自噬体形成的可能位点,因此对自噬初始阶段成核作用十分重要。有研究^[26]认为抑制 miRNA-130a 能够上调 Atg14 水平,激活自噬而缓解新生 SD 大鼠心肌细胞的缺氧/复氧损伤。miRNA-181a 和 miRNA-374a^[24] 通过抑制 Atg5 下调自噬。miRNA-375^[27] 通过负性调控 Atg7 抑制两个泛素蛋白酶系统介导的自噬泡的延伸。类似地,miRNA-630 通过抑制 Atg12,阻止泛素蛋白酶系统形成 Atg12-Atg5-Atg16 复合物,抑制自噬膜的延展^[24]。

2.3 自噬体与溶酶体的融合 自噬体成熟后,其双层膜的外膜和溶酶体膜融合为一,内膜以及自噬体内容物一起被溶酶体酶降解——所得的单层膜囊泡被称为自噬溶酶体。这种融合依赖于细胞内微管,由 Rab7-SNARE、SKD1 等蛋白以及溶酶体膜蛋白 LAMP1/2 参与。此外 UVRAG 可与 PtdIns3K 复合物结合,激活 GTPaseRAB7 后,促进自噬体与溶酶体的融合^[22]。研究^[28]显示成熟自噬体膜上存在一种被称为 syntaxin 17 的 SNARE,通过与 SNAP29 和 SNARE VAMP8 相互作用促进了自噬溶酶体的形成。目前尽管没有发现直接作用于自噬体和溶酶体融合阶段的 miRNA,但 miRNA-98、miRNA-124、miRNA-130、miRNA-142、miRNA-204 等可能通过抑制 LAMP1/2 和 V-SNARE 蛋白和囊泡相关膜蛋白 7(VAMP7),对自噬起负调控作用。例如,最新证实 miRNA-33 的直接靶标即包含溶酶体相关膜蛋白 LAMP1 并能降低其表达,从而显示出抑制自噬的作用^[29]。此外,UVRAG 作为一种促自噬蛋白,能够通过调控 Vps 复合体,使 RAB7 活性增强,促进自噬溶酶体的形成,miRNA-630 和 miRNA-374 能够调控 UVRAG,则可推测该 2 个 miRNA 在促进自噬体与溶酶体的融合过程中扮演了重要角色^[30]。

3 结语

近年来自噬研究呈明显增加的趋势,从自噬的诱发到自噬体与溶酶体融合过程中不断有新的自噬基因被鉴别出来,自噬的调控因素也不断被深入研究。microRNA 作为转录后调控的重要形式,在各类细胞自噬中举足轻重。虽然 microRNA 直接参与自噬体与溶酶体融合过程中的研究尚有不足,但是很多 microRNA 通过更广泛的间接调控干预自噬。随着人们对 microRNA 调控自噬机制研究的不断深

入 通过 microRNA 与自噬机制作为直接或间接药物靶点或干预策略将越来越清晰地展现出其临床应用前景。

参考文献

- [1] Hausenloy D J, Yellon D M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 92–100.
- [2] Dupont N, Leroy C, Hamaï A, et al. Long-lived protein degradation during autophagy [J]. *Methods Enzymol*, 2017, 588: 31–40.
- [3] Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes [J]. *Autophagy*, 2013, 9(8): 1167–71.
- [4] Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 403–9.
- [5] Lekli I, Haines D D, Balla G, et al. Autophagy: an adaptive physiological countermeasure to cellular senescence and ischaemia/reperfusion-associated cardiac arrhythmias [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(6): 1058–72.
- [6] Chen-Scarabelli C, Agrawal P R, Saravolatz L, et al. The role and modulation of autophagy in experimental models of myocardial ischemia–reperfusion injury [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2014, 11(4): 338–48.
- [7] Zhong Y, Zhong P, He S, et al. Trimetazidine protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by promoting AMP-activated protein kinase-dependent autophagic flux [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 69(6): 389–97.
- [8] Su H H, Chu Y C, Liao J M, et al. *Phellinus linteus* mycelium alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury through autophagic regulation [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8(4): 175.
- [9] Chen Q, Zhou Y, Richards A M, et al. Up-regulation of miRNA-221 inhibits hypoxia/reoxygenation-induced autophagy through the DDIT4/mTORC1 and Tp53inp1/p62 pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474(1): 168–74.
- [10] Huang Z, Han Z, Ye B, et al. Berberine alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in cardiomyocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 762(5): 1–10.
- [11] Gui L, Liu B, Lv G. Hypoxia induces autophagy in cardiomyocytes via a hypoxia-inducible factor 1-dependent mechanism [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6): 2233–9.
- [12] Wang Y, Yuan Y, Wang X, et al. Tiliarin post-conditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via mitochondrial protection and inhibition of apoptosis [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 4490–9.
- [13] Webster K A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species [J]. *Future Cardiol*, 2012, 8(6): 863–84.
- [14] Przyklenk K, Dong Y, Undyala V V, et al. Autophagy as a therapeutic target for ischaemia/reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 197–205.
- [15] Zeng M, Wei X, Wu Z, et al. Simulated ischemia/reperfusion-induced p65-Beclin 1-dependent autophagic cell death in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 18(6): 37448.
- [16] Zhang C, Syed T W, Liu R, et al. Role of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and inflammation in cardiovascular disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 12(4): 29.
- [17] Gatica D, Chiong M, Lavandero S, et al. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system [J]. *Circ Res*, 2015, 116(3): 456–67.
- [18] Huang Z, Wu S, Kong F, et al. microRNA-21 protects against cardiac hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive autophagy in H9c2 cells via the Akt/mTOR pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(3): 467–74.
- [19] Wu H, Wang F, Hu S, et al. miR-20a and miR-106b negatively regulate autophagy induced by leucine deprivation via suppression of ULK1 expression in C2C12 myoblasts [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(11): 2179–86.
- [20] Li W, Yang Y, Ba Z, et al. microRNA-93 regulates hypoxia-induced autophagy by targeting ULK1 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 2709053.
- [21] Feng Y, Yao Z, Klionsky D J. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(6): 354–63.
- [22] Parzych K R, Klionsky D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460–73.
- [23] Korkmaz G, le Sage C, Tekirdag K A, et al. miR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1 [J]. *Autophagy*, 2012, 8(2): 165–76.
- [24] Huang Y, Guerrero-Preston R, Ratovitski E A. Phospho-ΔNp63α-dependent regulation of autophagic signaling through transcription and micro-RNA modulation [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(6): 1247–59.
- [25] Bo L, Su-Ling D, Fang L, et al. Autophagic program is regulated by miR-325 [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(6): 967–77.
- [26] Liu H, Huan L, Yin J, et al. Role of microRNA-130a in myocardial hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(2): 759–65.
- [27] Chang Y, Yan W, He X, et al. miR-375 inhibits autophagy and reduces viability of hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions [J]. *Autophagy*, 2012, 143(1): 177–87.
- [28] Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes [J]. *Cell*, 2012, 151(6): 1256–69.
- [29] Ouimet M, Koster S, Sakowski E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(6): 677–86.
- [30] 秦正红. 自噬: 生物学与疾病基础卷 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社 2015: 145.