

心血管转化研究的若干进展

陆 林, 代 杨, 王晓群, 吴立群, 张瑞岩, 沈卫峰

(上海交通大学医学院附属瑞金医院心内科 上海交通大学医学院心血管病研究所, 上海 200025)

关键词: 心血管疾病; 蛋白质组学; 心肌纤维化; 心房颤动; 高脂血症; 非编码 RNA

中图分类号: R587.1; R605 文献标志码: A 文章编号: 1673-6087(2022)05-0369-04

DOI: 10.16138/j.1673-6087.2022.05.004

转化研究一词演化自 20 世纪 90 年代的转化医学, 其含义是针对临床科学问题, 通过多学科交叉合作, 深入开展基础研究, 并促进研究成果得到快速应用, 实现从“实验室到床边”的转化。继而, 从临床应用中发现新问题, 提出新设想、新思路, 再回到实验室开展更为深入的研究, 使后续研究不断向彻底解决疾病的目标靠拢。转化研究即倡导实验室与临床研究的双向转化, 解决临床实际需求。转化研究概念一经提出, 就引起基础医学、临床医学、预防医学和生物制药界, 以及医学科技规划与管理等领域的极大关注。如今, 转化研究已从概念转化为热门研究模式。在心血管疾病领域, 转化研究取得了显著成果, 不少研究结果被运用于临床实践, 或处于临床试验阶段。本文就其中代表性方面进行论述。

蛋白质组学运用于心血管疾病生物标志物和干预靶点的发现

许多心脑血管疾病和代谢性疾病的心脑血管并发症等都由遗传和环境因素长期共同作用导致。近数十年来, 随着蛋白质组学理论和检测技术的不断成熟, 其在这些疾病的发病机制、发病相关蛋白质检测和干预研究中起重要作用^[1]。如发现对临床诊断心力衰竭(心衰)有重要意义的 N 末端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)和可溶性肿瘤发生抑制蛋白 2(soluble suppression of tumorigenicity 2, sST2)等^[2], 以及反映心血管炎症和损伤指标 C-反应蛋白、半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)和肌钙蛋白等^[3]。蛋白质组学在转化研究中被广泛运用的缘由在于: ①蛋白质是疾病病理生理发展的主体, 其水平改变与基因转录本水平间相关性并不强(10%~30%)^[4], 蛋白水平较多受到翻译后调控的影响; ②疾病机制中许多重要蛋白质分泌入血发挥致病效应, 因此更便于蛋白组学

检测; ③疾病过程中蛋白质翻译后修饰、蛋白质-蛋白质之间的交互作用及蛋白质降解也可通过蛋白质组学技术检测。但是, 其也有不足之处, 由于血浆 3 000 余种蛋白质成分中存在众多高峰蛋白, 如白蛋白、免疫球蛋白和纤维蛋白原等, 使许多低峰度而有研究价值蛋白质的检测较为困难。

目前常用的蛋白质组学检测策略有全体检测(global discovery)、靶点鉴定(targeted proteomics)、靶向检测(targeted discovery)。非靶向全体检测方法是疾病和对照蛋白质样本进行酶学降解后, 用质谱检测样本内所有肽段并定量, 如 shotgun 法。该方法能尽可能多地发现所有蛋白肽段, 但缺乏敏感性, 在检测低峰度蛋白质肽段时有一定困难。靶点鉴定是高敏感性和高特异性的质谱检测手段, 主要检测预知蛋白质肽段的有限位点或片段信息, 如蛋白质位点的翻译后修饰等。靶向检测则是居于靶向和非靶向之间的策略, 目的是以一定通量检测一组靶向蛋白质成分的信息, 如基于抗体富集的芯片阵列蛋白质肽段检测等^[5]。

近年来, 得益于蛋白质组学和 RNA 测序等联合运用来针对不同组织和细胞样本进行检测。发现不少与心血管疾病发生有密切关系的重要基因突变, 以及蛋白质表达水平、交互作用、翻译后修饰等方面的异常, 为心血管疾病检测、预警和干预研究提供了重要帮助。

心肌纤维化的检测和治疗

心衰发生的病理生理过程中, 纤维化起关键作用。广义心肌纤维化是指心肌细胞间质中基质过度积累, 按病理生理机制划分为修复性纤维化和反应性纤维化。修复性纤维化发生在心肌梗死(心梗)的坏死组织区域。当炎症细胞清除坏死组织后, 在促纤维化因子的作用下启动纤维化过程, 成纤维细胞

增殖、迁移、转变为肌纤维细胞,用以替代坏死的心肌,心肌梗3~6周后梗死区胶原含量达到最高。反应性纤维化发生在非缺血性心肌间质或血管周围,如高血压、衰老和射血分数保留性心衰(heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF)中,由于受炎性、氧化应激、肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)及其旁分泌、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等因素作用而发生的一种长期适应性病理过程,也是心肌重构的表现之一。疾病进程中,纤维化处于动态转变过程,受下述因素影响:①成纤维细胞动员并向肌纤维细胞转变;②细胞间质纤维化参与蛋白的翻译后修饰等^[4]。

心衰中,心肌纤维化病理过程不会自行终止,反而持续进展。这与病因和诱因的复杂性和持续性有关,从而造成全身和局部炎症持续存在,成纤维细胞持续增殖和激活,心肌纤维细胞凋亡降低。目前,关于心肌纤维化有3个问题有待进一步探究:①对不同心衰病理机制下心肌纤维化进行定义,概念及基本病理生理机制有待进一步深化。②需要有与纤维化特点相关联的生物标志物和影像学技术。血清学指标如Ⅲ型前胶原N端前肽(N-terminal procollagen Ⅲ propeptide, PⅢNP)、半乳凝素3(galectin-3)、Ⅰ型前胶原C端前肽(procollagen type Ⅰ C-terminal propeptide, C1TP)、ST2、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)等。研究显示除PⅢNP和C1TP外,循环血中纤维化标志物与组织中纤维化程度并不平行。对心肌纤维化的影像学检测主要依靠超声心动图和心脏磁共振。磁共振T1扫描可对心肌细胞外容积(extracellular volume, ECV)进行定量,这对细胞间隙纤维化、水肿、蛋白降解或聚集、脂质积累、铁或淀粉沉积等均有反映。③对心肌纤维化病理过程的干预手段^[4]。

以往研究和转化研究发现,RAS抑制剂、醛固酮受体拮抗剂可减少纤维化。TIMP对纤维化的疗效有限。在干预上游元素的临床试验中,如TGF- β 抑制剂吡非尼酮(pirfenidone)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)抑制剂、内皮素受体阻断剂、胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)抑制剂等。吡非尼酮能降低TGF- β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等促纤维化因子,对心脏

负荷过重或高血压等纤维化有效,可降低心律失常发生。CTGF具有上调TGF- β 、骨形态生成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、Wnt、血管生长因子、细胞因子和整合素等作用。CTGF单抗pam-revlumab(FG-3019)对400例糖尿病肾病、胰腺癌、原发性肺纤维化和肝纤维化患者使用后安全。半乳凝素-3与固有免疫炎症有关,心衰时受炎性细胞诱导后增高,促进心肌纤维化。用于干扰小RNA(small interfering RNA, siRNA)或小分子抑制半乳凝素-3能有效抑制组织器官纤维化。半乳凝素-3抑制剂在临床试验中。

非编码RNA中,微RNA(microRNA, miRNA)-21抑制剂在Ⅱ期临床试验中显示能够干预肾纤维化,miR-29b更具心脏特异性,其抑制剂对心衰心肌纤维化的影响正在临床试验中。

心房颤动机制的认识和干预

心房颤动(房颤)是老年人群和心血管疾病患者中常见的合并疾病,阵发性、持续性或永久性房颤的发病机制有显著差别。射频消融进行肺静脉隔离手术治疗房颤的疗效和长期预后差别很大^[5]。近年研究发现促发房颤的一些病理生理方面重要因素,如Ca²⁺介导的异位兴奋性增高使心电冲动产生异常,基础疾病或心外膜脂肪代谢异常引起的心肌纤维化、心房重构,细胞间传导的离子连接蛋白(connexin)功能失调和Na⁺通道功能异常等导致基质病变,导致兴奋冲动传导异常,心电不应期异常等,这些均有利于房颤发生和折返环的建立。另外,还发现不少房颤的促进因素,包括Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱ(calmodulin-dependent protein kinase-Ⅱ, Ca²⁺/CaMKⅡ)和NLRP3(NACHT、LRR、PYD domain-containing protein 3)-炎性小体途径促发和维持折返机制与慢性房颤发生和持续有重要关系。此外,运用全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)和候选基因策略发现与房颤有关的致病相关转录因子基因(PRRX1、ZFHX3、GATA、TBX5、Pitx2、NFAT等),以及miRNA(miR-1、miR-26、miR-133等)经改变Ca²⁺处理,降低传导、缩短有效不应期诱发促发和折返^[6]。

基于上述发现,临床转化方向在于抑制全身/局部组织炎症和氧化应激;降低心肌细胞和成纤维细胞中Ca²⁺水平;寻找异位冲动产生、传导异常机制中的重要致病基因和通路,并进行干预;抑制

RAS、PDGF、CTGF、TGF 和各种促进心血管纤维化的危险因素;纠正引发传导异常有关的遗传异常和重构的连接蛋白等。

高脂血症强效抑制剂:基础研究到临床转化的范例

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)是低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)代谢过程中的重要调节元素。LDL 是动脉粥样硬化的重要病因。生理情况下, LDL 与肝脏细胞表面的 LDL 受体(LDL receptor, LDLR)结合, 内吞入细胞中, 与溶酶体融合后 LDL 被降解。而 LDLR 则再循环返回肝脏细胞表面继续实施结合 LDL 功能, 即血清 LDL 的生理性代谢过程。生理情况下, PCSK9 在肝脏、小肠和肾脏细胞中合成后分泌入细胞间质和循环中, 其功能在于与肝脏细胞表面 LDLR 结合后, 一起内吞, 在溶酶体中降解 LDLR, 调节 LDLR 水平, 从而维系血脂稳态。

转化研究在家族性高胆固醇血症研究中发现, PCSK9 功能获得性突变患者存在高脂血症, 而功能缺失性突变则终身低胆固醇血症, 动脉粥样硬化性心脑血管病的风险低。动脉粥样硬化研究认为, 循环血 PCSK9 是反映动脉粥样硬化发病和冠状动脉病变危重度的生物学标志物。在一项 161 例遗传性家族性高脂血症研究中, 发现血清 PCSK9 水平与冠状动脉钙化积分显著相关^[7]。在另一项经冠状动脉造影确诊冠心病的研究中发现, 循环血中 PCSK9 水平与冠状动脉内超声检测脂质斑块核心容量组分呈正相关。在挪威开展的一项随访 11 年的人群研究中发现, 1 488 例心梗患者和 31 819 例非冠心病对照中 PCSK9 最高四分位水平组较最低四分位水平组的心梗危险高 47%^[8]。另外, 在 2 030 例造影证实的急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者中, 血浆 PCSK9 水平与炎症水平、调脂疗效和临床 ACS 表现相关^[9]。

正因为 PCSK9 与高脂血症和动脉粥样硬化的关系, 临床转化中运用 PCSK9 单抗[如依洛尤单抗(evolocumab)、阿利西尤单抗(alirocumab)]、siRNA(如 inclisiran)、反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)、PCSK9 疫苗(AT04A)等策略来下调或抑制 PCSK9。PCSK9 单抗临床使用起步最早, 在已服用他汀类药物的纯合子和杂合子家族性高脂

血症患者中约降低 50% LDL 水平^[10]。PCSK9 siRNA 通过抑制 PCSK9 的 mRNA 翻译来降低蛋白水平, 其作用时间明显长于 PCSK9 单抗, 一次用药 180 d 后 LDL 水平平均降低 53%^[11]。此外, 相对于单抗仅结合并干预循环中 PCSK9 的作用机制, PCSK9 siRNA 能降低肝脏组织和循环中 PCSK9 水平。PCSK9 疫苗 AT04A 已研制成功。小鼠实验中, AT04A 能降低 53% LDL 水平, 抑制炎症, 动脉粥样硬化斑块面积下降 64%^[12]。以上措施在抑制 PCSK9 同时还能下调 25%~30% 脂蛋白(a)水平达, 并升高 HDL 水平^[7]。

PCSK9 抑制剂的效应得到临床试验的有力支持。在入选 27 564 例动脉粥样硬化性心脏病患者的随机对照试验 FOURIER 中, 依洛尤单抗使用后 48 周时 LDL 水平降低 59%, 由 2.39 mmol/L(92 mg/dL)降至 0.78 mmol/L(30 mg/dL)。随访 26 个月后发现, 非致死性心梗、脑卒中和再血管化手术等一级终点事件下降 1.5%^[13]。亚组分析显示, 以往心梗患者和外周血管疾病患者经 PCSK9 抑制治疗后终点事件的发生率均明显降低。另外, OSLER1、OSLER2 和 ODYSSEY 研究也证实 PCSK9 抑制剂对 LDL 水平的降低和心血管预后的改善^[13]。

非编码 RNA 与心血管疾病

人类基因组中 99% 核苷酸序列都不编码蛋白质, 其中相当部分非编码 RNA 的主要功能是调控蛋白质的结构和功能。非编码 RNA 包括 miRNA、siRNA 和长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)。研究发现, 非编码 RNA 与心血管系统的生理学调节及疾病发生有密切关系, 其中一些可被转化用于疾病诊断和干预手段^[14]。

miRNA 调控心梗后心肌损伤和重构。心肌缺血后 miR-15 家族成员水平上调, 诱导心肌细胞凋亡, 而用抗 miRNA 来抑制 miR-15 成员可下调 Bcl-2、沉默信息调节因子 1(silence information regulator 1, SIRT1), 从而降低小鼠心肌梗死面积。心梗后 miR-34 家族成员表达升高, 抑制 miR-34 家族能增强心梗后心脏恢复。抑制 miR-15 和 miR-92a 能增加心梗后血管新生, 改善心脏功能。另外, 发现一些 miRNA 与小鼠动脉粥样硬化发生有关。miR-126 能保护血管内皮, 剔除 miR-126-5p 削弱血管内皮对高脂血症的抵抗, 促进动脉粥样硬化发生。巨噬细胞在动脉粥样硬化发生中起重要作用, miR-155 能促进炎症, 诱导巨噬细胞向 M1 极化, 下调胆固醇

逆转运,促进动脉粥样硬化发生^[15]。血浆中高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL)通过 ABCA1 和 ABCG1 这 2 个原件实施脂质逆转运,保护血管,抑制动脉粥样硬化。miR-33a/b、miR-19b、miR-144、miR-148a 均能结合 ABCA1 的 3' 非翻译区(3'-untranslated region,3'UTR),干扰该脂质逆转运原件^[14]。

与 miRNA 相似,LnRNA 失调与心功能不全有关,LnRNA 中的心脏肥大相关因子(cardiac hypertrophy-associated transcript,CHAST)与小鼠和人心肌肥厚有关,抑制 CHAST 可减少心肌重构和心衰。另外,INK4 位点反义非编码 RNA (antisense non-coding RNA in the INK4 locus,ANRIL)调控与细胞增加黏附基因表达有关,也与动脉粥样硬化严重程度相关^[16]。

目前,已运用于临床或处于转化前期试验中的非编码 RNA 众多。如纳米携带 siRNA 抑制 PCSK9 下调 LDL 水平,从而干预动脉粥样硬化;miR-92a 抑制心肌缺血后损伤及促进血管内膜损害后再内皮化;siRNA 抑制 Ca²⁺调节因子受磷蛋白(phospholamban),干预心衰;siRNA 抑制单核细胞趋化因子受体 2 (chemokine C-C motif receptor 2,CCR2),干预动脉粥样硬化等。

综上,近数十年来,心血管疾病的转化研究受到极大关注。本文所论述的这些热点涉及蛋白质组学在心血管疾病诊断和干预中的运用,心肌纤维化的检测和治疗,房颤机制的认识和干预,高脂血症的强效抑制剂,非编码 RNA 与心血管疾病发生与干预等。相信随着研究深入和转化的不断推进,基础研究成果将被更多地运用于临床实践,造福患者。

[参考文献]

- [1] Lam MP, Ping P, Murphy E. Proteomics research in cardiovascular medicine and biomarker discovery[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(25): 2819-2830.
- [2] Castiglione V, Aimò A, Vergaro G, et al. Biomarkers for the diagnosis and management of heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2022, 27(2): 625-643.
- [3] Kullo IJ, Cooper LT. Early identification of cardiovascular risk using genomics and proteomics [J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(6): 309-317.
- [4] de Boer RA, De Keulenaer G, Bauersachs J, et al. Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure[J]. Eur Heart J, 2019, 21(3): 272-285.
- [5] Atienza F, Martins RP, Jalife J. Translational research in atrial fibrillation[J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2012, 5(6): 1207-1215.
- [6] Nattel S, Heijman J, Zhou L, et al. Molecular basis of atrial fibrillation pathophysiology and therapy[J]. Circ Res, 2020, 127(1): 51-72.
- [7] Alonso R, Mata P, Muñoz O, et al. PCSK9 and lipoprotein (a) levels are two predictors of coronary artery calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolemia[J]. Atherosclerosis, 2016, 254: 249-253.
- [8] Laugsand LE, Åsvold BO, Vatten LJ, et al. Circulating PCSK9 and risk of myocardial infarction[J]. JACC Basic Transl Sci, 2016, 1(7): 568-575.
- [9] Shapiro MD, Tavori H, Fazio S. PCSK9: from basic science discoveries to clinical trials[J]. Circ Res, 2018, 122(10): 1420-1438.
- [10] Shapiro MD, Fazio S, Tavori H. Targeting PCSK9 for therapeutic gains[J]. Curr Atheroscler Rep, 2015, 17(4): 499.
- [11] Fitzgerald K, Simon A, White S, et al. A subcutaneously administered investigational RNAi therapeutic (ALN-PCSSc), targeting PCSK9 for the treatment of hypercholesterolemia: initial phase I study results[C/OL]. http://www.pcsk9forum.org/wp-content/uploads/aln_pcssc_phase_I_data.pdf.
- [12] Landlinger C, Pouwer MG, Juno C, et al. The AT04A vaccine against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces total cholesterol, vascular inflammation, and atherosclerosis in APOE*3Leiden[J]. Eur Heart J, 2017, 38(32): 2499-2507.
- [13] Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease[J]. N Engl J Med, 2017, 376(18): 1713-1722.
- [14] Poller W, Dimmeler S, Heymans S, et al. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives[J]. Eur Heart J, 2018, 39(29): 2704-2716.
- [15] Ravi S, Mitchell T, Kramer P, et al. Mitochondria in monocytes and macrophages-implications for translational and basic research[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 53: 202-207.
- [16] 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.

(收稿日期:2022-09-05)

(本文编辑:王朝晖)