

· 基础论著 ·

microRNA 在柯萨奇 B3 病毒诱导的心肌微血管内皮细胞凋亡中的差异表达

虞勇 虞莹 王兴冈 邹云增 陈瑞珍

【摘要】 目的 本研究通过体外培养心脏微血管内皮细胞 (CMVECs), 经柯萨奇 B3 病毒 (CVB₃) 感染后, 利用 miRNA 寡核苷酸基因芯片技术筛选差异表达的 miRNAs, 进一步探讨 miRNA 在 CVB₃ 诱导 CMVECs 凋亡中的潜在作用机制。方法 原代分离培养大鼠 CMVECs 细胞, 以 100TCID₅₀ CVB₃ 病毒感染 48 h 后检测 Caspase-3 活性和细胞凋亡; 提取 CMVECs 细胞 RNA, 用 Agilent 大鼠 miRNA 寡核苷酸基因芯片进行检测, 并通过 TargetScan、miranda、mirbase 和 mirdb 数据库选出差异表达明显并与心血管疾病相关的 miRNA, 经 qPCR 对其进行验证, 通过生物信息学分析预测其调控靶基因; 合成 miRNA21 mimics 转染 CMVECs 细胞, 同时合成 miRNA21 inhibitor, 与 CVB₃ 共转染 CMVECs 细胞, 检测各组细胞 Caspase-3 活性变化和细胞凋亡。结果 CVB₃ 感染 CMVECs 细胞 48 h 后与正常对照组比较 Caspase-3 活性显著上调 ($P < 0.01$), 细胞凋亡明显增加; 通过基因芯片检测及生物信息学分析后发现, 与心血管系统疾病密切相关的 miRNA 为 miRNA21, 经 qPCR 验证结果一致, 预测其靶基因为 PDCD4; miRNA21 mimics 转染 CMVECs 细胞后与正常对照组相比 Caspase-3 活性显著上调, 细胞凋亡增加 ($P < 0.05$); 而 miRNA21 inhibitor 与 CVB₃ 共转染 CMVECs 细胞后与 CVB₃ 感染组相比 Caspase-3 活性显著下调, 细胞凋亡明显减少 ($P < 0.05$)。结论 miRNA21 在 CVB₃ 感染的 CMVECs 细胞中的表达有显著变化, 并与 CMVECs 细胞凋亡密切相关, 提示 miRNA21 在 CVB₃ 诱导的病毒性心肌炎发病过程中可能起着重要作用。

【关键词】 柯萨奇 B₃ 病毒; 心脏微血管内皮细胞; miRNA21

Differential expression of microRNA in coxsackievirus B₃ induced cardiac microvascular endothelial cell apoptosis Yu Yong, Yu Ying, Wang Xinggang, Zou Yunzeng, Chen Ruizhen. Key Laboratory of Viral Heart Diseases, Ministry of Public Health, Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Chen Ruizhen, Email: chen.ruizhen@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Objective In the study, we cultured cardiac microvascular endothelial cells (CMVECs) *in vitro* and infected CMVECs with CVB₃ to scan miRNA by miRNAs oligonucleotide microarray technology. Moreover, we explored the effects of miRNA on CVB₃-induced CMVECs apoptosis. **Methods** We cultured primary rat CMVECs and assessed activity of caspase-3 in CMVECs exposure to CVB₃ with 48 hours. RNA was isolated and scanned by miRNAs oligonucleotide microarray. We choosed the miRNA which was expressed significantly different and closely related with cardiovascular diseases, and furtherly validated by qPCR. Additionally, we respectively used miRNA mimics and miRNA inhibitors to transfect CMVEC and detect caspases-3 activity. **Results** CVB₃ significantly up-regulated caspase-3 activity in 48 hours, as compared with control ($P < 0.05$). miRNA21 was increased by CVB₃ and displayed close relation with cardiovascular diseases. Similarly, qPCR also showed miRNA21 levels were significantly raised. The activity of caspase-3 was elevated in miRNA21 mimics+CVB₃ group, which was decreased in miRNA21 inhibitors+CVB₃ group. **Conclusion** Our investigations showed that the expression of miRNA21 was markedly increased by CVB₃ and miRNA21 regulated CMVECs apoptosis,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.21.024

基金项目: 国家自然科学基金 (31070786)

作者单位: 200032 上海, 复旦大学附属中山医院心内科 上海市心血管病研究所 卫生部病毒性心脏病重点实验室

通讯作者: 陈瑞珍, Email: chen.ruizhen@zs-hospital.sh.cn

suggesting miRNA21 had vital roles in CVB₃-induced viral myocarditis.

【Key words】 Coxsackie B3 virus; Cardiac microvascular endothelial cells; miRNA21

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是心血管系统常见病,柯萨奇B₃病毒(CVB₃)感染是其常见的病因,CVB₃感染通过消化道及呼吸道黏膜内皮细胞进入外周血,之后随血流进入冠状动脉微血管,穿越心脏微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cells, CMVECs)屏障而感染并损伤心肌细胞,表明CMVECs是心肌细胞最后的保护屏障^[1],病毒感染后心肌细胞的凋亡是其重要的病理生理变化。已有研究报道,CVB₃随血流进入冠状动脉微血管感染CMVECs,损伤微血管内膜后穿越受损微血管进入心肌组织促进了心肌损伤^[2],近期我们的研究还发现CVB₃诱导的CMVECs凋亡在心肌炎后的心肌纤维化进程中起重要作用^[3],然而其详尽机制尚不明确。

miRNA是一类长约21~23个核苷酸序列的内源性非编码RNA,具有多种生物学功能,直接作用于靶基因,参与信号通路的调控,影响细胞的生物学行为。大量研究表明miRNA具有组织特异性,其在心血管系统生理和病理状态下均发挥作用^[4],与血管性疾病、炎症反应性疾病有密切联系,但是关于miRNA在CVB₃诱导的CMVECs凋亡中的作用却研究甚少。因此,本研究将通过筛选CVB₃感染CMVECs后相关miRNA的差异表达,寻找有意义的miRNA,进一步探讨其在病毒感染后CMVECs凋亡中的作用。

材料与方法

1. 主要试剂: DMEM 培养液、胎牛血清(均为美国 GIBCO 公司产品); 内皮细胞生长因子 ECGS(Sciencell 公司); 肝素、胰蛋白酶(均为 Sigma 公司产品); 转染试剂 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司); RNA 抽提试剂盒 mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Ambion 公司); 样品标记及杂交试剂 Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Ambion 公司)、Agilent Rat miRNA Array 寡核苷酸基因芯片 V19.0(覆盖 719 个大鼠相关 miRNA, 根据 microBase 数据库); 软件为 Agilent Scan Control software 及 Agilent Feature Extraction (FE) software version 9.5.3 (均为 Agilent 公司); 2×PCR master mix (Superarray 公司); Caspase-3 荧光检测试剂盒(美

国 Biovision 公司); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (BD 公司产品); miRNA21mimics、miRNA21inhibitor、FAM 标记 miRNAmimics 阴性对照、FAM 标记 miRNAinhibitors 阴性对照均由上海吉玛制药技术有限公司合成; VIII因子(vWF)兔多克隆抗体(SantaCruz 公司产品), TRITC 标记羊抗兔荧光二抗(JACKSON 公司产品国内分装)。

2. 病毒制备与病毒滴度测定: CVB₃ (Nancy 株)由本实验室保存。病毒在 Vero 细胞株上传代复制,微量细胞法滴定 CVB₃ 毒株组织半数致死量(TCID₅₀)^[5]。

3. 心脏微血管内皮细胞培养和病毒感染: 使用植块法分离培养原代大鼠心脏微血管内皮细胞^[6]。选用 100~120 g 体重 SD 雄性大鼠(购自复旦大学实验动物部), 1%戊巴比妥钠(1 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉,无菌操作打开胸腔取出心脏,放入无菌、4℃预冷的 D-Hanks 缓冲液中冲洗去除心脏内血液。剪取左心室肌,剪碎成 2 mm³ 见方的小块。收集组织块,滴加 1 ml 胎牛血清,均匀接种于培养瓶中,倒扣培养瓶于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱内 4 h,使组织块贴壁。4 h 后加入 DMEM 完全培养液[含终浓度为 100 mg/L 的内皮细胞生长因子(ECGS)、10 000 U/ml 肝素、10% FBS 的低糖 DMEM 基],小心翻转培养瓶,使培养液浸没组织块。约 48 h 后组织块周围有星形细胞长出,3~4 d 后去除组织块,待细胞汇合铺满瓶底后,用含 0.25% 胰酶-0.05% EDTA 的消化液消化细胞传代。取第三代细胞进行后续实验。将细胞传代接种于细胞培养板孔内,待细胞达到 90% 融合,撤去原培养基,加入无血清低糖 DMEM 培养基过夜。弃去培养孔内的培养基,用无菌 PBS 洗一次,加入 100TCID₅₀ 的 CVB₃ 病毒液,置 37℃细胞培养箱内 2 h; 弃去培养孔内的病毒液,加入含 10% FBS、肝素和内皮细胞生长因子的低糖 DMEM 培养液 48 h 进行后续实验。

4. 免疫组化法鉴定心肌微血管内皮细胞,步骤如下: (1)取培养细胞融合 70% 的心脏微血管内皮细胞以 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min; (2)4% 多聚甲醛固定细胞 20 min; (3)PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min; (4)PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;

(5) 0.1% Triton-X-100 处理 30 min; (6) PBS 缓冲液洗 3 次, 每次 5 min; (7) 5% BSA 室温封闭 30 min; (8) 加入 VIII 因子一抗 (1:50 稀释), 4 °C 湿盒过夜; (9) PBS 缓冲液洗 3 次, 每次 5 min; (10) 加入 TRITC 标记羊抗兔荧光二抗 (1:1 000, 红色荧光), 避光室温孵育 60 min, PBS 缓冲液洗 3 次后置于荧光显微镜下观察, 拍照。

5. 细胞凋亡检测: 各组细胞 Caspase-3 活性检测按相关试剂盒说明书进行; 流式细胞仪检测各组细胞凋亡按 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行。

6. 荧光标记探针与芯片杂交: mirVana™ miRNA Isolation Kit 提取各组细胞总 RNA, 计算其纯度及定量, 再分离出 miRNA; 用 Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kit 对各组细胞提取的总 RNA 进行荧光探针标记, 标记好的样品在 2 h 内进行芯片杂交。将 12.5 μl 荧光探针标记的 RNA 样品与 90 μl 杂交缓冲液及 77.5 μl 无核酸酶缓冲液共计 180 μl 杂交样品在标准条件下进行芯片杂交 (芯片杂交、后续结果分析在上海康成生物有限公司技术部完成)。

7. 生物信息学分析: 检索数据库 TargetScan、miranda、mirbase 和 mirdb 选取与心血管疾病相关的 miRNA 并进行靶点预测, 挑选出来的靶基因至少出现在两个预测软件中。

8. 实时荧光定量 PCR 检测验证芯片结果: 根据 miRNA 芯片检测和生物信息学分析结果, 对表达上调的 rno-miRNA-21 进行实时定量荧光 PCR 验证, 以 U6 为内参照。引物序列分别为: U6, 5'-CGC TTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'; rno-miRNA-21, 5'-GTCGTATCCAGTGC GTGTCGTGGAGTCGGCA ATTGCACTGGATACGACTCAACAT-3'。逆转录反应条件: 16 °C 30 min, 42 °C 40 min, 85 °C 5 min。反应结束后将合成的 cDNA 置于冰上待用。PCR 反应体系: 2×Master Mix 5 μl (购于 Superarray 公司), 10 μmol/L PCR 特异引物 1 μl, 2 μl cDNA, 加水至总体积为 10 μl。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

9. 脂质体介导 miRNA21mimics/miRNA21inhibitor 转染 CMVECs: 取 200 μl 不含血清和抗生素的 DMEM 培养基稀释 300 pmol miRNA21mimics 或 miRNA21inhibitor, 然后取 10 μl Lipofectamine 2000 转染试剂稀释至 200 μl 不含血清和抗生素的 DMEM 培养基中, 混匀后置室温 5 min; 将稀释的

Lipofectamine 2000 与稀释的 miRNA21mimics 或 miRNA21inhibitor 混合均匀后置室温孵育 20 min 形成转染复合物。将复合物加入相应的 6 孔细胞培养孔内, 十字形摇动混匀, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度细胞培养箱内孵育过夜, 次日更换含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 48 h, 进行后续实验。同时转染相同浓度 FAM 标记的 miRNA 阴性对照和 FAM 标记的 miRNAinhibitors 阴性对照, 荧光显微镜下观察转染效率。

10. 统计学分析: 用 SPSS 13.0 软件进行数据统计分析。统计分析采用两样本均数比较 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CMVECs 分离培养及鉴定: 倒置显微镜下观察, CMVECs 刚从组织块中迁移生长出来时呈星形、短梭形, 48 h 后可在组织块周围见到大量细胞克隆, 3~4 d 后可去除贴壁组织块, 7~10 d 细胞铺满培养瓶底部, 形状为多角形和少量梭形; 内皮细胞标志物 VIII 因子染色, 胞质呈红色荧光阳性反应, 随机选取 5 个视野进行细胞计数, 90% 以上的培养细胞呈现抗 VIII 因子免疫组化阳性染色, 证明成功分离培养 CMVECs, 见图 1。

2. CVB₃ 诱导 CMVECs 凋亡: CVB₃ 感染 CMVECs 48 h 后检测 Caspase-3 活性, 结果发现, 与正常对照组比较, CVB₃ 感染组细胞 Caspase-3 活性显著上调 ($P < 0.01$), 细胞凋亡明显增加, 见图 2。

3. miRNA 芯片杂交信号扫描: 基因芯片扫描获得的原始信号图中, Hy3 荧光扫描信号呈绿色, 信号强度较强且均一, 背景噪点较低, 表示芯片实验结果较好。Agilent Feature Extraction (FE) software version 9.5.3 软件读取数据, GenePix pro V6.0 分析数据, 删除弱点, 原始值减去背景值修正数据, 采用中位数归一法分别计算两种样本中 miRNA 的标准值及比值, 以 CVB₃ 感染组与正常对照组 miRNA 标准值的比值 ≥ 2 为表达上调, 比值 ≤ 0.5 为表达下调^[7]。结果分析显示, 与正常对照组相比, CVB₃ 感染组一共得到 94 个 miRNA 差异表达信息, 经检索生物信息数据库, 与心血管系统相关的差异表达的 miRNA 有 13 个, 其中表达上调的 miRNA 7 个 (表 1), 表达下调的 miRNA 6 个 (表 2)。利用 Cluster 3.0 软件根据 miRNA 在不同组之间的表达情

表1 芯片杂交实验对 CVB₃ 组较正常对照组表达上调的 miRNA 检测结果 (倍数>2)

组别	rno-miR-125b-3p	rno-miR-24-1*	rno-let-7d	rno-miR-551b*	rno-miR363*	rno-miR-21	rno-miR-145
正常对照组	0.065	0.306	0.194	0.238	0.224	7.396	0.194
CVB ₃ 组	0.221	0.903	0.820	0.566	1.086	84.201	0.560
倍数	3.43	2.95	4.24	2.38	4.84	11.38	2.90

注: 倍数表示 CVB₃ 组比正常对照组

表2 芯片杂交实验对 CVB₃ 组较正常对照组表达下调的 miRNA 检测结果 (倍数<0.5)

组别	rno-miR-653*	rno-miR-328b-3p	rno-miR-210	rno-miR-222	rno-miR-22	rno-miR-143
正常对照组	0.716	1.293	0.592	0.272	21.249	5.376
CVB ₃ 组	0.201	0.086	0.006	0.124	4.778	0.499
倍数	0.280	0.066	0.01	0.46	0.22	0.09

注: 倍数表示 CVB₃ 组比正常对照组

况制作聚类分析图, 红色表示高表达, 绿色表示低表达, 见图3。

4. 生物信息学分析和靶点预测: 通过检索数据库 TargetScan、miranda、mirbase 和 mirdb, 上述异常表达谱中 miRNA21 与心血管疾病相关, 并进行靶点预测, 挑选出来的靶基因至少出现在两个预测软件中。miRNA21 靶基因主要包括 eNOS、HSP70、HSF-1、PDCD4、PTEN、Spry1 等。其中与细胞凋亡相关的靶点是 PDCD4^[8], 其他靶点与冠心病预适应、心肌缺血-再灌注损伤、心力衰竭有关^[9-11]。

5. 实时荧光定量 PCR 验证: CVB₃ 感染 CMVECs 后选取 12 h、24 h、48 h 三个时间点分别收集细胞检测 miRNA21 表达。与正常对照组相比, 三个时间点上 miRNA21 的表达均有显著差异 ($P < 0.05$), 其中 48 h 时最高, 达到 3.65 倍, 见图 4。

6. CMVECs 过表达 miRNA21 及 miRNA21 inhibitor 干预: FAM 标记的 miRNA 阴性对照和 FAM 标记的 miRNA inhibitors 阴性对照转染心脏微血管内皮细胞 48 h 后, 荧光显微镜下观察可见细胞胞质内表达绿色荧光, 证明转染成功, 见图 5; miRNA21 mimics 转染 CMVECs 后检测 Caspase-3 活性, 发现与正常对照组相比转染组细胞 Caspase-3 活性显著上调、细胞凋亡增加 ($P < 0.05$), 见图 6; miRNA21 inhibitor 干预组与 CVB₃ 感染对照组相比 Caspase-3 活性显著下调、CMVECs 凋亡明显下降 ($P < 0.05$) (图 7, 8), 提示抑制 CVB₃ 诱导的 miRNA21 异常表达对细胞具有保护作用。

讨 论

既往病毒性心脏病的研究主要集中于病毒感染心肌细胞后引起的死亡/凋亡或免疫应激, 忽略了 CMVECs 对 CVB₃ 病毒的易感性以及病毒感染后的

病理生理学变化。我们之前的研究发现, CMVECs 也是 CVB₃ 重要的靶细胞, 病毒能诱导其产生一系列的生物学改变、从而参与损伤心脏的结构和功能。那么 CVB₃ 感染后通过何种调控途径导致心脏微血管内皮细胞凋亡呢? 近年的诸多研究表明: 作为一类重要的调节因子, miRNAs 可通过降解、翻译抑制或激活目标 RNA 调节其目标基因的表达^[12], 参与心血管系统的发育、分化和病理过程^[13], 其在心血管疾病中的调控作用日益受到重视。

miRNA 是一类非编码调控型 RNA, 是真核生物机体内自身产生的单链小分子 RNA, 主要通过与其靶基因 mRNA 序列 3' 非翻译区 (3'-UTR) 配对结合, 进而实现其对基因表达的转录后调控^[14], 参与细胞增殖、凋亡、分化、代谢发育等生理过程以及心血管疾病、肿瘤转移等病理过程。miRNA 虽仅占人类基因组的 1%, 却调控近 30% 的基因表达, 已有大量研究表明 miRNA 与心血管疾病的关系十分密切。Xu^[15] 等发现, miRNA1 通过抑制靶基因热休克蛋白 (HSP60) 及 HSP70 发挥促细胞凋亡的功能而 miR133 则抑制半胱天冬酶-9 (caspase-9) 发挥抗细胞凋亡功能; Harris 等^[16] 发现, miRNA126 调控血管黏附细胞因子 1 (VCAM-1) 黏附至内皮细胞, miR126 表达减少增加了肿瘤坏死因子 (TNF) α 刺激的 VCAM-1 表达, 从而增加了白细胞在内皮的附着; Roy 等^[17] 证实 miR21 在鼠缺血再灌注损伤所致的心脏重构期间心肌纤维化中发挥了主导作用。因此, miRNA 可能在心血管系统疾病尤其是细胞凋亡、炎症的发生发展中起重要作用。

为了明确不同 miRNA 在病毒感染后微血管内皮细胞凋亡中的作用, 我们利用 Agilent Rat miRNA Array 寡核苷酸基因芯片 V19.0 对正常培养的 CMVECs 和 CVB₃ 感染的 CMVECs 进行差异 miRNA

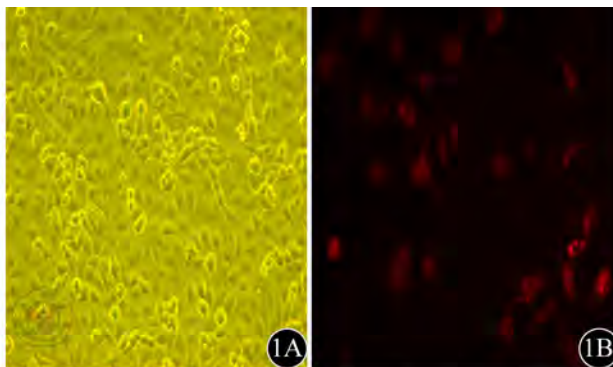


图1 1A: 相差倒置显微镜(×200); 1B: VIII因子表达(×200)

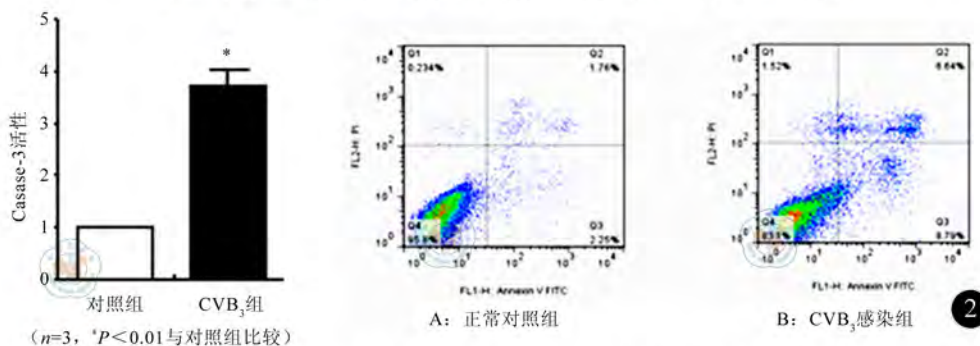


图2 CVB₃诱导心脏微血管内皮细胞Caspase-3活性上调、CMVECs凋亡增加

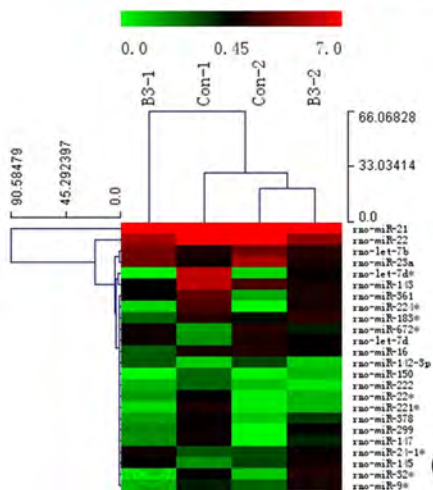


图3 miRNA芯片检测聚类图

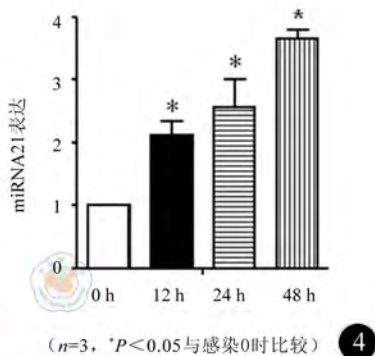


图4 qPCR验证芯片筛选结果

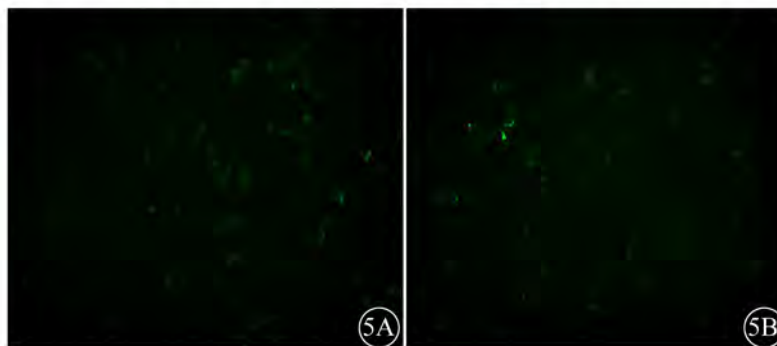


图5 5A: FAM-miRNAmimics-NC(×200); 5B: FAM-miRNAinhibitors-NC(×200)

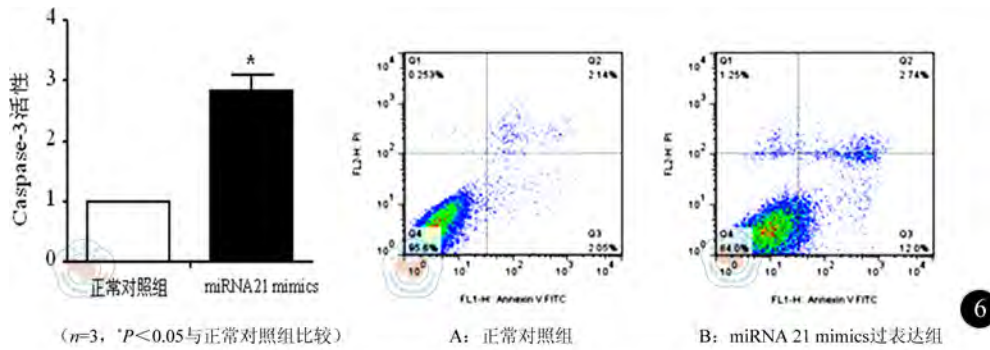
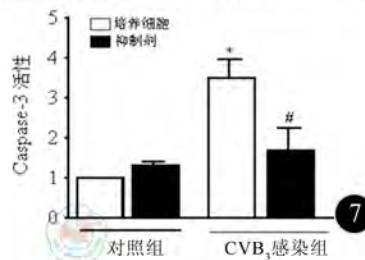


图6 心脏微血管内皮细胞过表达miRNA21后Caspase-3活性上调、细胞凋亡增加



($n=3$, * $P<0.05$ 与细胞对照组比较, # $P<0.05$ 与细胞+CVB₃感染对照组比较)

图7 miRNA21抑制剂下调 CVB₃感染的CMVECs Caspase-3活性

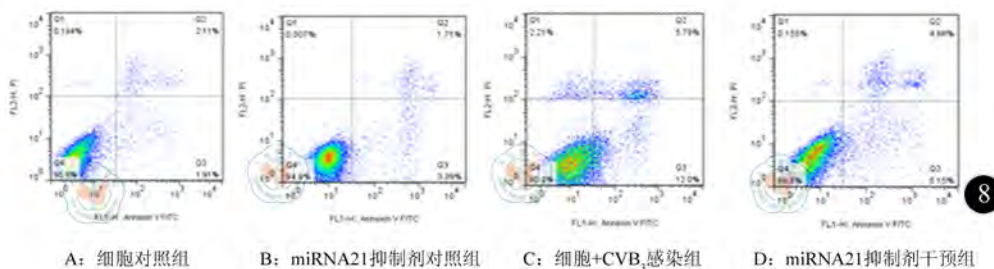


图8 miRNA21抑制剂减少CVB₃诱导的心脏微血管内皮细胞凋亡

的筛选, 得到 13 个与心血管系统相关的差异表达的 miRNA, 其中表达上调的 miRNA 7 个, 表达下调的 miRNA 6 个, 经生物信息学分析, 确定 miRNA 异常表达谱中 miRNA21 与心血管疾病密切相关。经实时荧光定量 PCR 对表达上调的 miRNA21 分别在 CVB₃ 感染 12 h、24 h、48 h 收集细胞进行验证, 结果发现三个时间点 miRNA21 的表达均较对照组有显著差异 ($P<0.05$), 与芯片结果一致。进一步在细胞内过表达 miRNA21 mimics, 发现 Caspase-3 活性显著上升, 细胞凋亡增加 ($P<0.05$, 与正常培养细胞比较); 而 CVB₃ 感染引起的细胞 Caspase-3 活性上升、凋亡增加能被相应的 miRNA21 inhibitor 抑制 ($P<0.05$, 与 CVB₃ 感染对照组相比)。上述结果提示, CVB₃ 诱导的心脏微血管内皮细胞凋亡可能与 miRNA21 的异常表达密切相关。

miRNA通过作用于靶基因来发挥生物学功能, 因此, 识别和验证miRNA的靶基因对全面认识miRNA功能及其在心血管疾病诊疗中的应用前景显得尤为重要^[18]。我们对miRNA21进行靶点预测, 发现与心血管疾病相关的有6个作用靶基因, 其中靶基因PDCD₄与细胞凋亡密切相关。但其在病毒性心肌炎发病中的作用及信号转导通路有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wei L, Yin Z, Yuan Y, et al. A PKC-beta inhibitor treatment reverses cardiac microvascular barrier dysfunction in diabetic rats[J]. Microvascular Research, 2010, 80(1): 158-165.
- [2] Zanone MM, Favaro E, Conaldi PG, et al. Persistent infection of human microvascular endothelial cells by coxsackie B viruses induces increased expression of adhesion molecules[J]. Journal of Immunology, 2003, 171 (1): 438-446.
- [3] YQ Xie, JQ Liao, MH Li, et al. Impaired cardiac microvascular endothelial cells function induced by coxsackievirus B3 infection and

- its potential role in cardiac fibrosis[J]. *Virus Research*, 2012, 169(1): 188-194.
- [4] Lajos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 735-739.
- [5] 杨英珍. 病毒性心脏病[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 308-315.
- [6] 宁艳霞, 王新红, 金惠铭, 等. 用基因芯片研究培养的大鼠心肌微血管内皮细胞特征[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(12): 2295-2300.
- [7] 王家祥, 胡清, 刘秋亮, 等. 肾母细胞瘤细胞株与正常肾细胞株微小RNA表达谱的差异分析[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(26): 1845-1848.
- [8] Cheng Y, Liu X, Zhang S, et al. MicroRNA-21 protects against the H(2)O(2)-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009, 47(1): 5-14.
- [9] Salloum FN, Yin C, Kukreja RC. Role of microRNAs in cardiac preconditioning[J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2010, 56(6): 581-588.
- [10] Roy S, Khanna S, Hussain SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloproteinase-2 via phosphatase and tensin homologue[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(1): 21-29.
- [11] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. *Nature*, 2008, 456(7224): 980-984.
- [12] Pushparaj PN, Aarathi JJ, Kumar SD, et al. RNAi and RNAa—the jin and yang of RNAome[J]. *Bioinformatics*, 2008, 2(6): 235-237.
- [13] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 214-220.
- [14] Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells[J]. *Trends in genetics*: TIG, 2007, 23(5): 243-249.
- [15] Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes[J]. *Journal of Cell Science*, 2007, 120 (Pt 17): 3045-3052.
- [16] Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(5): 1516-1521.
- [17] Roy S, Khanna S, Hussain SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloproteinase-2 via phosphatase and tensin homologue[J]. *Cardiovascular Research*, 2009, 82(1): 21-29.
- [18] Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease[J]. *Cardiovascular Research*, 2008, 79(4): 562-570.

(收稿日期: 2014-06-30)

(本文编辑: 戚红丹)

虞勇, 虞莹, 王兴冈, 等. microRNA 在柯萨奇 B3 病毒诱导的心肌微血管内皮细胞凋亡中的差异表达 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8 (21): 3850-3856.

中华医学会