doi:10.11659/jjssx.05E016060

大鼠心肌细胞缺氧后 miR-133a-3p 的表达及其下游靶基因预测

刘长召[1],王 玲[1],陈文江[2] (1.恩施土家族苗族自治州中心医院心内科,湖北 恩施 445000;2.广东医学院研究生学院,广东湛江 524023)

[摘 要] **目的** 检测大鼠心肌细胞缺氧后微小 RNA(miRNA,miR)-133a-3p 的表达,并预测其潜在靶基因和进行初步验证。**方法** 分离培养 SD 大鼠乳鼠心肌细胞,给予缺氧(37 ℃,5% CO_2,1% O_2)0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h 和 24 h,采用 qRT-PCR 检测其在上述不同时间点的 miRNA-133a-3p 的表达水平,运用 miRanda、picTar 和 tergetScan 等靶基因预测分析软件及其他生物信息学方法,筛选 miR-133a-3p 潜在调控的靶基因,并对关键候选基因采用 qRT-PCR 和 Western blot 进行初步验证。**结果** 大鼠心肌细胞中 miRNA-133a-3p 的表达在缺氧 4 h 出现高表达,与其他缺氧时间比较差异有统计学意义($P=0.000$);4 h 后,其表达逐渐下降,12 h 后趋于稳定;生物信息学预测发现 miRNA-133a-3p 的靶基因可能为 TGF-β1;荧光定量检测发现在 4 h 时 TGF-β1 的表达较 0 h、24 h 的差异都有统计学意义($P<0.05$);且 4 h 时心肌细胞 TGF-β1 蛋白的表达较 0 h 组和 24 h 组都明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** miRNA-133a-3p 可能参与大鼠心肌细胞的缺氧坏死过程,并且可能通过调控 TGF-β1 而发挥作用。

[关键词] miRNA-133a-3p;心肌细胞;缺氧;TGF-β1;生物信息学
[中图分类号] R541.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-05-26

Preliminary study on miRNA-133a-3p and hypoxia in rat cardiomyocytes

LIU Chang-zhao[1],WANG Ling[1],CHEN Wen-jiang[2] (1.Department of Cardiovascular Medicine,the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture,Enshi Hubei 445000,China;2.Graduate School,Guangdong Medical College,Zhanjiang Guangdong 524001,China)

[通信作者] 陈文江,E-mail:yezi62002413@163.com

macrophages[J]. Oncol Rep,2014,32(1):309-317. doi:10.3892/or.2014.3217.

[4] Bader GD,Hogue CW. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks[J]. BMC Bioinformatics,2003,4(1):2. doi:10.1186/1471.2105-4-2.

[5] Aarts M,Linardopoulos S,Turner NC. Tumour selective targeting of cell cycle kinases for cancer treatment[J]. Curr Opin Pharmacol,2013,13(4):529-535. doi:10.1016/j.coph.2013.03.012.

[6] Sugimasa H,Taniue K,Kurimoto A,et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K upregulates the kinetochore complex component NUF2 and promotes the tumorigenicity of colon cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2015,459(1):29-35. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.043.

[7] Liu Q,Dai SJ,Li H,et al. Silencing of NUF2 inhibits tumor growth and induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2014,15(20):8623-8629.

[8] Huang C,Tang H,Zhang W,et al. Integrated analysis of multiple gene expression profiling datasets revealed novel gene signatures and molecular markers in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2012,21(1):166-175. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0593.

[9] Weisz GM. Dr. Otto heinrich warburg-survivor of ethical storms[J]. Rambam Maimonides Med J,2015,6(1):e0008. doi:10.5041/RMMJ.10183.

[10] Cengiz B,Yumrutas O,Bozgeyik E,et al. Differential expression of the UGT1A family of genes in stomach cancer tissues[J]. Tumour Biol,2015,36(8):5831-5837. doi:10.1007/s13277-015-3253-1.

[11] Tang W,Fu YP,Figueroa JD,et al. Mapping of the UGT1A locus identifies an uncommon coding variant that affects mRNA expression and protects from bladder cancer[J]. Hum Mol Genet,2012,21(8):1918-1930. doi:10.1093/hmg/ddr619.

[12] Koneru M,O'Cearbhaill R,Pendharkar S,et al. A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16(ecto) directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer[J]. J Transl Med,2015,13:102. doi:10.1186/s12967-015-0460-x.

[13] Andergassen U,Kölbl AC,Zebisch M,et al. Detection and characterisation of disseminated tumour cells in bone marrow of breast cancer patients by immunostaining of Her-2 and MUC-1 in combination with Thomsen-Friedenreich(CD176)[J]. Histol Histopathol,2014,29(7):913-923.

[14] Hsin LJ,Kao HK,Chen IH,et al. Serum CXCL9 levels are associated with tumor progression and treatment outcome in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. PLoS One,2013,8(11):e80052. doi:10.1371/journal.pone.0080052.

[15] Li J,Zhang XS,Xie D,et al. Expression of immune-related molecules in primary EBV-positive Chinese nasopharyngeal carcinoma: associated with latent membrane protein 1(LMP1) expression[J]. Cancer Biol Ther,2007,6(12):1997-2004.

[16] Ma LJ,Lee SW,Lin LC,et al. Fibronectin overexpression is associated with latent membrane protein 1 expression and has independent prognostic value for nasopharyngeal carcinoma[J]. Tumour Biol,2014,35(2):1703-1712. doi:10.1007/s13277-013-1235-8.

(编辑:周小林)

Abstract: **Objective** To study the relationship of miRNA-133a-3p and hypoxia in rat cardiomyocytes, and to detect the expression of the probable target genes. **Methods** SD rats cardiomyocytes were cultivated, and treated in hypoxia condition (37 ℃, 5% CO_2, 1% O_2) for 0 hour, 4 hours, 8 hours, 12 hours, 16 hours, 20 hours and 24 hours. The miRNA-133a-3p level was detected by qRT-PCR, and its biological information and target genes were predicted by targetScan picTar and miRanda, etc. Then we carried out qRT-PCR and Western blot to detect the expression of the probable target genes. **Results** miRNA-133a-3p expression was much higher in 4 hours hypoxia ($P=0.000$), then its expression gradually declined, and stabilized after 12 hours hypoxia. Bioinformatics prediction found that TGF-β1 may be its target. The mRNA expression of TGF-β1 was obviously higher in 4 hours hypoxia than those in 0 hour and 24 hours ($P<0.05$). And the protein expression of TGF-β1 was significantly higher in 4 hours hypoxia ($P<0.05$). **Conclusion** miRNA-133a-3p may participate in cardiomyocytes necrosis in rats through regulating TGF-β1.

Keywords: miRNA-133a-3p; cardiomyocytes; hypoxia; TGF-β1; bioinformatics

心血管疾病已经成为各种疾病的首要死因,且心血管疾病的病死率呈现逐年上升趋势,其主要原因是缺血性心脏病病死率上升,尤其是急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)所占比例较大[1-2]。2013年农村地区AMI病死率明显升高(66.62/10万),而城市地区平均病死率为51.45/10万[1],由此可见,AMI已成为重大的公共卫生问题。AMI的病理生理机制主要是在冠状动脉粥样硬化的基础上发生冠状动脉血供急剧减少或中断而导致的心肌细胞坏死[3-4],其防治关键是针对其发病机制。目前关于AMI的诊治主要依据临床表现、心电图和心肌标志物。近年来关于其发病机制和生物标志物的研究较多,尤其是发现了一些微小RNA(microRNA, miRNA)可能参与其发病。目前发现,miRNA-1、miRNA-122、miRNA-126、miRNA-133a、miRNA-133b、miRNA-19a、miRNA-197、miRNA-208a、miRNA-223、miRNA-328、miRNA-375、miRNA-499、miRNA-663b、miRNA-1291等参与了AMI的发生发展,部分miRNA分子有望成为其生物标志物[5-13]。心肌细胞缺氧是AMI的共同病理生理过程,而且缺氧时间的长短也会影响心肌细胞的状态及其相关因子、基因和蛋白的表达情况。因此,本研究拟探讨在不同时间缺氧条件下SD大鼠心肌细胞中miRNA-133a-3p的表达,并对其可能靶基因进行预测、筛选和初步验证。

1 材料与方法

1.1 SD大鼠乳鼠心肌细胞获取、培养和处理

取1~3 d SD大鼠乳鼠20只(获得恩施土家族苗族自治州中心医院实验动物中心伦理委员会批准)经过75%乙醇浸泡消毒后,剪下心尖组织,快速放入预冷的含有双抗的D-Hanks液中浸泡10 min,然后用不含双抗的D-Hanks液清洗2遍,将心肌组织剪成约1 mm^3的碎块;采用酶消化法(1% Ⅰ型胶原酶:0.05% EDTA:胰酶=1:1)进行消化;将上清液以1 000 g离心5 min,并用含10%胎牛血清的DMEM培养基制成细胞悬液,以适当密度接种于培养瓶内,放入培养箱(37 ℃, 5% CO_2)中培养;最后利用心肌细胞与成纤维细胞差速贴壁的特点分离心肌细胞,以适当的密度接种于6孔培养板内进行培养;2 d后观察心肌细胞的形态和搏动频率;待搏动频率和细胞形态正常后,进行缺氧处理:将获取的心肌细胞置于低氧培养箱(37 ℃, 5% CO_2, 1% O_2)中进行培养,按照不同缺氧时间分为0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h、24 h等7组。各个组的细胞在达到缺氧时间后立即取出加入Trizol(Invitrogen,美国)试剂和RIPA细胞裂解液(碧云天,中国),并按照相应说明书提取总RNA和总蛋白,以备后续实验。

1.2 miRNA-133a-3p生物信息学预测

本文采用生物信息学在线软件targetScan、picTar、RNA22、PITA、miRanda对miRNA-133a-3p的靶基因进行预测,以筛选候选靶基因及初步了解其生物学功能[14-18];并采用starBase(http://starbase.sysu.edu.cn)预测长链非编码RNA(long non-coding, lncRNA)和环状RNA(Circular RNA, circRNA)[19-20]。

1.3 miRNA-133a-3p和mRNA实时荧光定量检测

将上述提取的心肌细胞总RNA按照逆转录试剂盒(miRNA和mRNA不同类型试剂盒,宝生物工程大连有限公司)说明书分别进行逆转录,然后按照荧光定量试剂盒(宝生物工程大连有限公司)说明书进行miRNA-133a-3p和转移生长因子-β1(transforming growth factor-beta 1, TGF-β1)的检测。miRNA-133a-3p(MIMAT0000427, UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG)及内参U6、TGF-β1(NM_021578.2,上游引物:CACTCCCGTGGCTTCTAGTG;下游引物:GGACTGGCGAGCCTTAGTTT;扩增片段长度:145 kb)及内参β-actin引

物均由宝生物工程大连有限公司设计合成。荧光定量检测条件,miRNA-133a-3p:94 ℃变性 2 min;PCR 循环中模板 94 ℃变性 20 s;60 ℃退火、延伸 34 s;共 30 个循环;TGF-β1:95 ℃预变性 30 s ;95 ℃扩增、延伸 15 s;60 ℃退火 30 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta Ct}$ 相对定量:ΔCt(实验组) = Ct(实验组目标基因) - Ct(实验组内参基因);ΔCt(对照组) = Ct(对照组目标基因) - Ct(对照组内参)。

1.4 Western blot 检测

首先将提取心肌细胞的蛋白质采用 BCA 试剂盒(碧云天,中国)测量蛋白浓度,然后计算上样量,上样、蛋白电泳、转膜、剪膜、脱脂奶粉封闭、大鼠 TGF-β1 一抗(稀释比例 1∶500,武汉博士德)孵育过夜(至少 16 h),次日复温 1 h 后孵育二抗 2 h 后进行胶片显影曝光,用 β-actin 作为内参(稀释比例 1∶1 000,武汉博士德)。采用 Image J 分析灰度值,以目的条带灰度值/内参条带灰度值进行统计分析。

1.5 统计分析

本文用 GraphPad Prism 5(GraphPad Software Inc, CA,USA)进行数据分析和作图,数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验和单因素方差分析(One-way ANOVA)进行比较分析,组间两两比较采用 Tukey 法,$P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著性统计学意义。

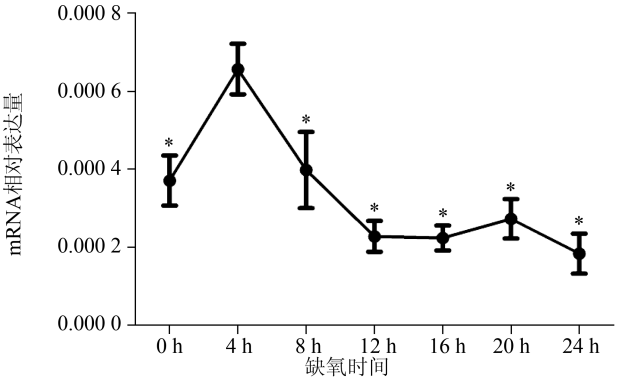
2 结果

2.1 miRNA-133a-3p 生物信息学预测结果

通过 targetScan、picTar、RNA22、PITA、miRanda 5 个生物信息学在线软件对 miRNA-133a-3p 预测发现,miRNA-133a-3p 主要在心肌细胞(55.17%)、脑垂体(6.9%)、前列腺(27.59%)和甲状腺(6.9%)等表达;至少有上述 4 个软件预测得到一致结果的靶基因有 69 个,包括 TGFβ1、TGFβR1、CLTA、EIF4A1、PCGF2、SESN1、POU4F1、PREX1、SGPP1、MAP3K3、MYH9、BCL2L2、MTMR4、SOX4、UBE2Q1、TIMM17A、SACM1L、CRK、SMARCD1、PPP2CB、PPP1R9B、SEC61B、TRAM2 等;综合预测结果和文献报道[5],本文选取 TGFβ1(TGF-β1)作为候选基因进行进一步研究。

2.2 miRNA-133a-3p 实时荧光定量结果

采用 qRT-PCR 对缺氧 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h和 24 h 的 SD 大鼠心肌细胞的 miRNA-133a-3p 定量分析,结果发现大鼠心肌细胞中 miRNA-133a-3p 的表达在缺氧 4 h 出现高表达,与其他缺氧时间比较,差异有统计学意义($P=0.000$);在 4 h 后,其表达逐渐下降,在 12 h 后趋于稳定,12 h 后各个观察点 miRNA-133a-3p 的表达差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。

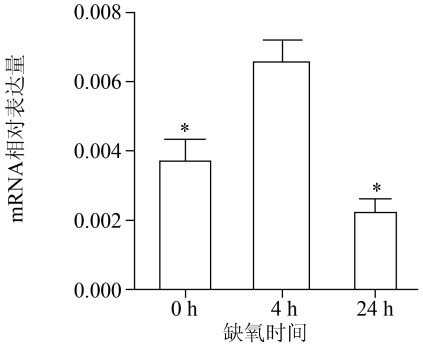


*:与 4 h 比较,$P<0.01$

图 1 miRNA-133a-3p 实时荧光定量结果

2.3 TGF-β1 mRNA 水平表达结果

有研究证实心肌梗死或者缺氧后心肌组织 TGF-β1 的表达会升高,而且本研究通过生物信息学预测发现 TGF-β1 可能为 miRNA-133a-3p 的靶基因[7]。通过对缺氧心肌细胞 TGF-β1 mRNA 的定量检测发现,在 4 h 时 TGF-β1 的表达量(0.006 6 ± 0.000 6,$n=6$)较 0 h(0.003 7 ± 0.000 6,$n=6$)、24 h(0.002 2 ± 0.000 4,$n=6$)的表达都明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

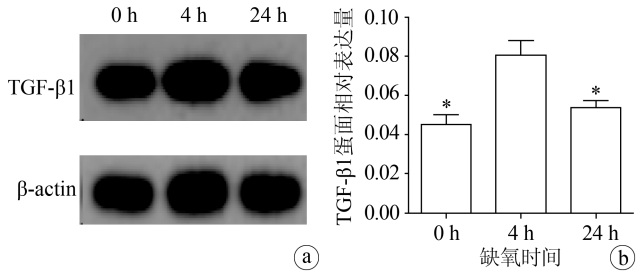


*:与 4 h 比较,$P<0.01$

图 2 TGF-β1 mRNA 表达结果分析

2.4 TGF-β1 蛋白表达结果

由于在 mRNA 水平发现 TGF-β1 在 0 h、4 h 和 24 h呈差异性表达,而 mRNA 一般会对基因相应蛋白水平进行调控,因此本研究对 0 h、4 h 和 24 h 3 组细胞中 TGF-β1 蛋白的表达进行了检测,发现 4 h 时心肌细胞 TGF-β1 蛋白的表达(0.080 7 ± 0.007 4,$n=6$)较 0 h(0.045 4 ± 0.004 8,$n=6$)和 24 h(0.053 9 ± 0.003 5,$n=6$)高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。



a:蛋白印记图;b:蛋白印记图灰度值统计结果 *:与4 h比较,$P<0.05$

图3 TGF-β1蛋白表达及统计分析结果

3 讨论

全国目前约有心血管病患者2.9亿,其中AMI患者大约250万,而且其病死率呈逐年上升趋势。经过最近几十年的研究,关于AMI的防治目前取得一定效果。然而由于β受体阻滞剂和血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂应用不足等原因,AMI患者院内病死率相比10年前并未显著降低,故其防治还任重道远。关于AMI发病机制的研究较多,发现其发病可能与遗传、环境、性别、高血压、糖尿病等心血管危险因素有关[1,4],而近几年研究发现,miRNA可能与AMI的发病关系密切[21-25],因而miRNA与AMI的研究成为近几年研究热点。本研究通过采用SD大鼠心肌细胞缺氧模型模拟AMI的病理生理过程,对缺氧0 h、4 h、8 h、12 h、16 h、20 h和24 h后的大鼠心肌细胞的miRNA-133a-3p定量分析发现,miRNA-133a-3p在缺氧4 h出现高表达,与其他缺氧时间比较有统计学差异,该结果提示大鼠心肌细胞miRNA-133a-3p在缺氧4 h内迅速升高,并在4 h达高峰,于4 h后开始下降,表明miRNA-133a-3p在大鼠心肌细胞缺氧过程中确有改变,可能参与心肌缺氧坏死的病理生理过程,并且根据其变化规律推测其有可能具有作为心肌缺氧坏死标志物的可能,而且其可能比目前临床应用的肌钙蛋白Ⅰ(cTnⅠ)或T(cTnT)更早达到峰值,可能更有利于AMI的早期诊治,但是其特异性及灵敏度还需要进一步动物模型及人群样本研究。

对于miRNA的研究,多数要筛选有效靶基因,而针对靶基因的研究多是先通过生物信息学预测,再进行验证。本研究通过targetScan、picTar、RNA22、PITA和miRanda等软件进行生物信息学预测发现TGF-β1可能为其靶基因并可能受其调控。本研究采用qRT-PCR和Western blot从TGF-β1的mRNA水平和蛋白水平进行检测,发现缺氧后心肌细胞TGF-β1的mRNA定量在4 h时的表达较0 h、24 h都有明显差异,且4 h时心肌细胞TGF-β1蛋白的表达也较0 h组和24 h组升高,因此,从靶基因预测结果、荧光定量分析和蛋白表达分析可以认为大鼠心肌细胞中TGF-β1的表达受到miRNA-133a-3p的调控,其可能为后者的靶基因。

本研究在对miRNA-133a-3p进行生物信息学分析靶基因时,还对其lncRNA和circRNA都进行了预测,因为最近研究显示lncRNA和circRNA都可能稳定存在于各种组织中并参与各种疾病的发生机制[26-27],尤其是circRNA,由于其可在组织中稳定、特异、高丰度的表达,可以作为疾病标志物研究。预测结果发现其lncRNA有HCG18、SENP3-EIF4A1、RP11-15H20.6、MAP3K14、RP11-1055B8.4、RP11-834C11.4、RP11-156E6.1、DCP1A、CTC-459F4.3、RP11-186B7.4、PPP1R9B、XXbac-BPG32J3.20、SLC38A3、FGD5-AS1;而其circRNA主要有HIST1H1D_hsa_circ_001532、NFX1_hsa_circ_001612、RNF19B_hsa_circ_000044、ASH1L_hsa_circ_000064、SAFB_hsa_circ_001762、C2orf29_hsa_circ_000665、KLHL24_hsa_circ_000385、C5orf25_hsa_circ_001525、ADAM9_hsa_circ_001197、KIAA1586_hsa_circ_001439、MYB_hsa_circ_001864等。

AMI的防治还任重道远,近几年关于miRNA与AMI的研究较多,提出的观点也可能因为实验条件、模型、样本人群的差异等而有所不同,有待继续深入研究进行相关验证。本研究发现miRNA-133a-3p可能参与大鼠心肌细胞的缺氧坏死过程,并通过调控TGF-β1而发挥作用;然而,本研究只是细胞水平的单一研究,还有待后续从动物模型和大规模人群样本研究进行验证。由于miRNA与靶基因可能并非单一的点对点调控,可能呈现“一对多”、“多对一”和“多对多”等模式,也可能与circRNA、lncRNA和mRNA等都有交互调控作用,因此,后续研究从miRNA、circRNA、lncRNA、mRNA和蛋白等多个水平对AMI的发病机制进行研究,有可能多角度对AMI的发病机制进行详细阐述,从而为其防治提供新途径。

[参考文献]

[1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.中国心血管病报告2014概要[J].中国循环杂志,2015,30(7):617-622. doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2015.07.001.

[2] 高润霖.中国心血管病报告2014(心血管病危险因素部分)[J].中华医学信息导报,2015,30(16):15. doi:10.3760/cma.j.issn.1000-8039.2015.16.010.

[3] 隋 辉,陈伟伟,王 文.中国心血管病报告2014要点介绍[J].中华高血压杂志,2015,23(7):627-629. doi:10.16439/j.cnki.1673-7245.2015.07.012.

[4] Zhou M,Wang H,Zhu J,et al. Cause-specific mortality for 240 causes in China during 1990-2013:a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. Lancet,2016,387(10015):251-272. doi:10.1016/S0140-6736(15)00551-6.

[5] 陈文江,陈 灿.微RNA与心房颤动发病机制的研究进展[J].医学综述,2015,21(5):801-803. doi:10.3969/j.issn.1006-2084.2015.05.013.

[6] Zhong J,He Y,Chen W,et al. Circulating microRNA-19a as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction[J]. Int J Mol Sci,2014,15(11):20355-20364. doi:10.3390/ijms151120355.

[7] Wang F,Long G,Zhao C,et al. Plasma microRNA-133a is a new marker for both acute myocardial infarction and underlying coronary artery stenosis[J]. J Transl Med,2013,11:222. doi:10.1186/1479-5876-11-222.

[8] Li C,Pei F,Zhu X,et al. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial Infarction[J]. Clin Biochem,2012,45(10-11):727-732. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.04.013.

[9] Huang S,Chen M,Li L,et al. Circulating MicroRNAs and the occurrence of acute myocardial infarction in Chinese populations[J]. Circ Cardiovasc Genet,2014,7(2):189-198. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000294.

[10] Lv P,Zhou M,He J,et al. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. Int J Mol Sci,2014,15(4):5774-5788. doi:10.3390/ijms15045774.

[11] Sayed AS,Xia K,Salma U,et al. Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases[J]. Heart Lung Circ,2014,23(6):503-510. doi:10.1016/j.hlc.2014.01.001.

[12] Peng L,Chun-guang Q,Bei-fang L,et al. Clinical impact of circulating miR-133,miR-1291 and miR-663b in plasma of patients with acute myocardial infarction[J]. Diagn Pathol,2014,9:89. doi:10.1186/1746-1596-9-89.

[13] Romaine SP,Tomaszewski M,Condorelli G,et al. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians[J]. Heart,2015,101(12):921-928. doi:10.1136/heartjnl-2013-305402.

[14] Agarwal V,Bell GW,Nam JW,et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J]. Elife,2015,4:e05005. doi:10.7554/eLife.05005.

[15] Betel D,Wilson M,Gabow A,et al. The microRNA.org resource: targets and expression[J]. Nucleic Acids Res,2008,36(Database issue):D149-D153. doi:10.1093/nar/gkm995.

[16] Chen K,Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data[J]. Nature Genetics,2006,38(12):1452-1456. doi:10.1038/ng1910.

[17] Miranda KC,Huynh T,Tay Y,et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes[J]. Cell,2006,126(6):1203-1217. doi:10.1016/j.cell.2006.07.031.

[18] Wong N,Wang X. miRDB:an online resource for microRNA target prediction and functional annotations[J]. Nucleic Acids Res,2015,43(Database issue):D146-D152. doi:10.1093/nar/gku1104.

[19] Li JH,Liu S,Zhou H,et al. starBase v2.0:decoding miRNA-ceRNA,miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data[J]. Nucleic Acids Res,2014,42(Database issue):D92-D97. doi:10.1093/nar/gkt1248.

[20] Yang JH,Li JH,Shao P,et al. starBase:a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data[J]. Nucleic Acids Res,2011,39(Database issue):D202-D209. doi:10.1093/nar/gkq1056.

[21] Hsu A,Chen SJ,Chang YS,et al. Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction[J]. Bio Med Res Int,2014,2014(1):418628. doi:10.1155/2014/418628.

[22] Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases[J]. Bio Med Res Int,2014,2014(52):985408. doi:10.1155/2014/985408.

[23] Rognoni A,Cavallino C,Lupi A,et al. Novel biomarkers in the diagnosis of acute coronary syndromes: the role of circulating miRNAs[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther,2014,12(9):1119-1124. doi:10.1586/14779072.2014.953483.

[24] Wang F,Long G,Zhao C,et al. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction[J]. PLoS One,2014,9(9):e105734. doi:10.1371/journal.pone.0105734.

[25] Liang J,Bai S,Su L,et al. A subset of circulating microRNAs is expressed differently in patients with myocardial infarction[J]. Mol Med Rep,2015,12(1):243-247. doi:10.3892/mmr.2015.3422.

[26] Jeck WR,Sorrentino JA,Wang K,et al. Circular RNAs are abundant,conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA,2013,19(2):141-157. doi:10.1261/rna.035667.112.

[27] Brosnan CA,Voinnet O. The long and the short of noncoding RNAs[J]. Curr Opin Cell Biol,2009,21(3):416-425. doi:10.1016/j.ceb.2009.04.001.

(编辑:杨 颖)