

分类号：
UDC：

密级：
学号：401442418067

南昌大学硕士研究生
学位论文

从血管新生方向探讨 miR-221-3p 对心肌梗死保护
作用的机制研究

Investigating the protective mechanism of miR-221-3p against
myocardial infarction: from the perspective of angiogenesis

杨 青

培养单位（院、系）：南昌大学第一附属医院

指导教师姓名、职称：郑振中 教授 主任医师

申请学位的学科门类：医学

学科专业名称：内科学（心血管）

论文答辩日期：2021 年 6 月 2 日

答辩委员会主席：辛洪波

评阅人：盲审

盲审

2021 年 6 月

摘要

目的:

通过建立心肌梗死大鼠模型,观察 miR-221-3p 在心肌梗死大鼠心肌组织的表达情况和 miR-221-3p 在心肌梗死急性期心肌组织表达的细胞类型;诱导 HCMEC 缺氧,观察不同缺氧时间对 HCMEC miR-221-3p 表达水平的影响;探讨 miR-221-3p 在心肌缺血时对 HCMEC 血管新生的调控及机制。

方法:

1、建立心肌梗死大鼠模型,将大鼠分为心肌梗死急性期组(心肌梗死后 12h 处死大鼠)和心肌梗死慢性期组(心肌梗死后 4 周处死大鼠)。qPCR 检测大鼠心肌组织 miR-221-3p 的表达水平,免疫荧光共染色观察 miR-221-3p 在心肌梗死急性期心肌组织中表达的细胞类型。

2、诱导 HCMEC 缺氧 1h、2h、4h、8h、12h、24h, qPCR 检测各时间点 miR-221-3p 的表达水平。转染 miR-221-3p 模拟物和抑制剂,分为 5 组:(1)空白对照组;(2) mimic 组;(3) mimic NC 组(4) inhibitor 组;(5) inhibitor NC 组,各组均在转染后缺氧 4 小时。采用 Ang-2 质粒过表达 Ang-2 蛋白。qPCR、Western-blot 检测 Ang-2、CD34、IGF1R、IGF2、VEGFR2 mRNA 及蛋白的表达,CCK-8 检测细胞增殖,成管实验检测 HCMEC 在体外的成管能力。

结果:

1、qPCR 结果显示:与对照组比较,大鼠心肌梗死后 12h 心肌组织中 miR-221-3p 的表达水平明显升高 ($P < 0.01$);与非梗死区比较,梗死周边区心肌组织中 miR-221-3p 上调 ($P < 0.01$);与对照组比较,心肌梗死 4 周时梗死组心肌组织中 miR-221-3p 的表达水平降低 ($P < 0.05$)。

2、免疫荧光共染色结果显示:在大鼠心肌梗死急性期 miR-221-3p 在心肌细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞中都有表达。

3、qPCR 结果显示,HCMEC 缺氧 4 小时 miR-221-3p 表达水平升高,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4、CCK-8 实验结果显示:在缺氧条件下 miR-221-3p mimic 组 OD 值在 12~72h 均较对照组低,差异有统计学意义(其中 72h $P < 0.05$,其余时间点 P

<0.01)。在缺氧条件下 miR-221-3p inhibitor 组 OD 值在 12~72h 均较对照组高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

5、细胞成管实验结果显示: 在缺氧条件下过表达 miR-221-3p 导致 HCMEC 管腔形成数减少, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。在缺氧条件下转染 miR-221-3p 抑制剂后导致 HCMEC 管腔形成数增多, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

6、Western-blot 结果显示: 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 可致 HCMEC CD34、IGF1R、IGF2、VEGFR2、Ang-2 蛋白表达水平减少, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。缺氧条件下转染 miR-221-3p 抑制剂后 HCMEC CD34、IGF1R、IGF2、VEGFR2、Ang-2 蛋白表达水平升高, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

7、qPCR 及 Western-blot 结果显示, 缺氧条件下过表达 Ang-2 导致 HCMEC CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 mRNA 和蛋白的表达水平升高, 与对照组及 mimic NC 组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

结论:

1、大鼠心肌梗死急性期心肌组织 miR-221-3p 表达水平升高, 心肌梗死慢性期心肌组织 miR-221-3p 表达水平降低。在大鼠心肌梗死急性期 miR-221-3p 在心肌细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞中都有表达。

2、缺氧条件下 miR-221-3p 可能靶向 Ang-2 抑制心脏微血管内皮细胞向尖端细胞转化。

3、心肌梗死急性期 miR-221-3p 的上调对心肌梗死是有保护作用的, 其机制可能是 miR-221-3p 靶向 Ang-2 抑制心肌梗死后的异常血管新生, 从而减轻血管渗漏和微血管灌注不足。

关键词: miR-221-3p、心肌梗死、血管新生、血管生成素 2

ABSTRACT

Objective:

The experimental model of myocardial infarction rats was used to observe the expression of miR-221-3p in the myocardial tissue of rats with MI and the cell types of miR-221-3p expression in the myocardial tissue of rats with MI in the early stage. By inducing hypoxia in HCMEC, the effects of different hypoxia time on the expression level of miR-221-3p in HCMEC under hypoxia condition were observed. To investigate the regulation and mechanism of miR-221-3p on HCMEC angiogenesis during myocardial ischemia.

Methods:

1. We divided rats randomly into acute MI group (the rats were sacrificed 12 hours after MI) and chronic MI group (the rats were sacrificed 4 weeks after MI). qPCR was used to detect the expression level of miR-221-3p in the myocardial tissue of rats. Immunofluorescence co-staining was applied to observe the cell types expressed by miR-221-3p in the myocardial tissue of the acute stage of MI.

2. Hypoxia was induced in HCMEC for 1h, 2h, 4h, 8h, 12h and 24h, and the expression level of miR-221-3p at each time point was detected by qPCR. miR-221-3p mimics and inhibitors were transfected into 5 groups: (1) control group; (2) mimic group; (3) mimic NC group; (4) inhibitor group; (5) inhibitor NC group. Each group of cells was induced hypoxic for 4 h after transfection. Ang-2 protein was overexpressed by Ang-2 plasmid. qPCR and Western-blot was applied to detect mRNA and protein expressions of Ang-2, CD34, IGF1R, IGF-2, and VEGFR2. Cell proliferation was detected by CCK-8 and the ability of HCMECs to form tubes in vitro was detected by tubular test.

Results:

1. qPCR results showed: compared with control group, expression level of miR-221-3p in rat myocardial tissue 12h after MI significantly increased ($P < 0.01$); Compared with non-infarction area, miR-221-3p was upregulated in the cardiac

tissues around infarction ($P < 0.01$); Compared with control group, the expression level of miR-221-3p was decreased in the myocardial tissue of the infarction group at 4 weeks. ($P < 0.05$).

2. Immunofluorescence co-staining results showed that miR-221-3p was expressed in cardiomyocytes, fibroblasts, smooth muscle cells and endothelial cells during the acute stage of MI in rats.

3. qPCR results showed: compared with the control group, expression level of miR-221-3p in HCMEC after 4 hours of hypoxia was significant increased ($P < 0.05$).

4. The results of CCK-8 showed: compared with control group, OD value of miR-221-3p mimic group was significantly lower under hypoxia (At 72h, $P < 0.05$, and at the other time points, $P < 0.01$). Compared with control group, OD value of miR-221-3p inhibitor group was significantly higher under hypoxia ($P < 0.01$).

5. The results of the cell tube formation experiment showed: compared with the control group, cell lumen formed were significantly decreased by overexpression of miR-221-3p under hypoxia ($P < 0.01$). Compared with the control group, cell lumen formed were significantly increased after transfection with miR-221-3p inhibitor under hypoxia ($P < 0.05$).

6. Western-blot results showed: compared with the control group, CD34, IGF1R, IGF-2, VEGFR2, and Ang-2 protein expressions in HCMEC were significantly decreased by overexpression of miR-221-3p under hypoxia ($P < 0.05$). Compared with the control group, CD34, IGF1R, IGF-2, VEGFR2, and Ang-2 protein expressions in HCMEC were significantly increased after transfection with miR-221-3p inhibitor under hypoxia ($P < 0.05$).

7. The qPCR and Western-blot results showed: compared with the control group and mimic NC group, CD34, IGF1R, IGF-2 and VEGFR2 expressions in HCMEC was significantly increased by overexpression of Ang-2 under hypoxia condition ($P < 0.01$).

Conclusion

1. The expression level of miR-221-3p was increased in the acute stage of MI and decreased in the chronic stage of MI in rats. In the acute stage of MI,

miR-221-3p was expressed in cardiomyocytes, fibroblasts, smooth muscle cells and endothelial cells.

2. Under hypoxia, miR-221-3p inhibited the transformation of HCMEC to tip cells may through targeting Ang-2.

3. The upregulation of miR-221-3p in the acute stage of MI has a protective effect on MI, and the underlying mechanism could be the inhibition of abnormal angiogenesis by miR-221-3p through targeting Ang-2 after MI, which alleviates vascular leakage and microvascular insufficiency.

Key words: miR-221-3p; Myocardial infarction; angiogenesis; angiopoietin 2

目 录

第 1 章 引言.....	1
第 2 章 实验第一部分: miR-221-3p 在心肌梗死大鼠心肌组织中的细胞定位及表达水平.....	4
1 材料与方法.....	4
1.1 实验材料.....	4
1.2 实验方法.....	6
1.3 统计分析.....	10
2 结果.....	10
2.1 心脏组织切片 HE 染色.....	10
2.2 心肌梗死大鼠心肌组织中 miR-221-3p 的表达水平.....	11
2.3 miR-221-3p 在心肌梗死急性期心肌组织中表达的细胞类型.....	12
3 讨论.....	13
4 结论.....	14
第 3 章 实验第二部分: miR-221-3p 对人心脏微血管内皮细胞血管生成能力的影响.....	15
1 材料与方法.....	15
1.1 实验材料.....	15
1.2 实验方法.....	17
1.3 统计分析.....	23
2 结果.....	23
2.1 缺氧对人心脏微血管内皮细胞 miR-221-3p 表达的影响.....	23
2.2 miR-221-3p 模拟物和抑制剂转染效果鉴定.....	23
2.3 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 抑制人心脏微血管内皮细胞 Ang-2 蛋白的表达.....	24
2.4 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 抑制人心脏微血管内皮细胞增殖...26	
2.5 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 抑制人心脏微血管内皮细胞成管...27	

2.6 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 抑制人心脏微血管内皮细胞 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白的表达.....	28
2.7 Ang-2 质粒转染效果鉴定.....	29
2.8 缺氧条件下过表达 Ang-2 促进人心脏微血管内皮细胞 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 mRNA 的表达.....	30
2.9 缺氧条件下过表达 Ang-2 促进人心脏微血管内皮细胞 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白的表达.....	30
3 讨论.....	32
4 结论.....	34
致 谢.....	35
参考文献.....	36
综 述.....	40

中英文缩略词表

缩写	英文	中文
MI	Myocardial infarction	心肌梗死
HCMEC	Human Cardiac Microvascular endothelial cell	人心脏微血管内皮细胞
Ang-1	angiopoietin-1 (ANGPT1)	血管生成素 1
Ang-2	angiopoietin-2 (ANGPT2)	血管生成素 2
IGF-1	insulin-like growth factor 1	胰岛素样生长因子 1
IGF-2	insulin-like growth factor 2	胰岛素样生长因子 2
IGF1R	insulin-like growth factor-1 receptor	胰岛素样生长因子 1 受体
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2	血管内皮生长因子受体 2
Tie-2	endothelial-specific receptor tyrosine kinase 2	内皮特异性受体酪氨酸激酶 2

第 1 章 引言

心肌梗死(MI)的病理定义是心肌缺血时间延长(心肌供氧不足)导致心肌细胞死亡^[1]。急性心肌梗死致死率在过去很高,在近几十年中,采用新的有效的治疗方法使 ACS 的住院死亡率从 30%下降到 3%~8%。目前有效的主要治疗方法有药物治疗(冠脉溶栓)、介入治疗、冠状动脉搭桥术^[2]等^[3]。通过这些方法可以有效的开通堵塞的主要血管、挽救心肌细胞,但是由于开通血管的时间与心肌细胞成功获救的时间并不能做到完美重合、缺血再灌注损伤^[4]、及一些微血管病灶我们无法通过上述手段直接处理等原因,导致仍有部分心肌细胞因缺血缺氧而坏死,而且患者在支架术后发生再梗死的情况也并不少见。除了介入、溶栓等治疗,科学家已经通过不同角度去探索挽救心肌细胞、保护心脏功能的方法,如:心脏保护机制^[4-8]、心肌细胞再生^[9]、血管生成^[10]等。不可否认,一些研究已经在心肌保护机制、心肌细胞再生等研究方面我们已经取得了一定的研究成果,但是通过手术、心肌保护机制只能用于控制环节,心肌细胞再生只能起到延缓病程的作用。因此,血管新生显得至关重要。

血管新生是一个生物学过程,“血管新生”一词通常用来指血管生长的过程,但从最严格的意义上来说,它指的是血管从已经存在的血管中生长出来。在促血管生成信号的吸引下,血管内皮细胞具有运动性、侵袭性和突出的丝状伪足的能力。这些所谓的尖端细胞在新芽中充当先锋,探测周围环境,寻找导向因子。茎细胞在尖端细胞之后,向外伸展较少的丝状伪足,但形成管腔并增殖以支持芽的伸长。尖端细胞与邻近芽细胞相吻合,形成血管祥。血流的开始、基底膜的建立和壁细胞的补充稳定了新的连接。发芽的过程不断重复,直到促血管生成信号减弱,静息被重新建立^[11-13]。血管新生不同于血管发生,血管发生是由内皮祖细胞新生血管丛。虽然这两种过程都能扩张血管网,但它们是通过非常不同的机制实现的。血管发生主要出现在胚胎发生的早期,通过预先设定的发展模式,而血管新生是由生长组织的局部生化信号触发的^[12]。在胚胎时期,新血管通过中胚层来源的内皮祖细胞(成血管细胞)的组装形成新生血管,分化为原始的血管迷路。随后的血管发芽(血管生成)创造了一个网络,重塑成动脉和静脉。募集的周细胞和血管平滑肌细胞包裹新生的 EC 小管提供稳定和调节灌注。

在成年人中，血管是静止的，很少形成新的分支。然而，血管内皮细胞对血管生成信号的感觉和反应具有很高的可塑性。尽管人们努力通过促血管生成因子来刺激血管生成，但大多数试验都未能达到这些预期。基于促血管生成细胞治疗或靶向 microRNAs 的替代策略提供了新的机会，但仍处于前临床开发阶段^[11]。

MicroRNA (miRNAs) 是一类内生的，长度约 22 个核苷酸的单链 RNA 小分子；它是由最原始的 pri-miRNA (即初级转录本)，经过 Drosha, RNase III 内切酶在靠近主环基部的位置将两股茎分开，成为 pre-miRNA 即 microRNA 前体，长度大约为 70~90 个碱基，然后 pre-miRNA 再经过 Dicer 酶酶切成为长约 20~24 个核苷酸的成熟 miRNA。miRNA 虽然无法进一步翻译成蛋白质的小 RNA，但其可以与靶 mRNA 特异性的结合，从而间接抑制转录后基因的表达^[14]。与 mRNA 相比，miRNAs 更稳定，能抵抗核糖核酸酶效应，使得 miRNA 可以作为某些疾病的生物标记物^[15-17]。miRNAs 参与复杂的病理生理过程，包括细胞信号、细胞发育、细胞死亡、细胞增殖和分化^[18]。

miRNAs 在血管生成和内皮细胞衰老过程中也起着关键作用^[13]。miRNAs 具有促血管生成能力。目前关于 miRNAs 在血管生成中的研究的种类多样，如：miR-10a、miR-19a、miR-23b、miR-21、miR-663、miR-92a 等，其中也包括我们此次关注的 miR-221-3p^[19]。

miR-221 基因位于 X 染色体上，未成熟体经过多次编辑修饰和 Dicer 酶的剪切，成熟体 3p 端即为 miR-221-3p^[20]。miR-221-3p 参与多种疾病的病理生理过程，如肿瘤^[21-25]、炎症^[26, 27]、动脉粥样硬化^[28-30]、心脏纤维化^[31]等。最近的研究表明在 STEMI 和 NSTEMI 患者血液循环中都发现了 miR-221-3p 水平升高^[32]。miR-221-3p 水平在急性冠脉综合征患者显著增高而且与肌钙蛋白、GRACE、Syntax 评分均呈显著正相关。血液循环中的 miR-221-3p 可作为急性心肌梗死早期预测的新标志物^[33]。

miR-221-3p 水平升高在急性心肌梗死患者的作用是什么？是单纯的由受损组织释放入血，还是机体对损伤的自我保护？如果是起保护作用，其机制又是什么？这方面的研究较少，只有少数研究表明 miR-221 在缺氧和复氧环境下可通过减少细胞凋亡和自噬来提高心肌细胞的存活，而仅通过抑制自噬来降低心脏成纤维细胞的死亡。miR-221 治疗可以减轻心肌梗死大鼠的梗死面积和心肌纤维化，改善左室重构和心功能^[34]。

那么 miR-221-3p 除了通过抑制自噬来降低心脏成纤维细胞的死亡这一途径

来减轻心肌梗死对心脏的损伤之外，是否还有其它途径？Zhou, Ma et al. 2019 的研究表明：miR-221-3p 可以下调 VASH1，促进宫颈癌的淋巴管生成和淋巴转移。而 VASH1 是被发现的第一个内皮细胞来源的、可以负反馈调节血管生成的蛋白因子，它是在血管内皮生长因子、成纤维生长因子 2 诱导下在人血管内皮细胞中特异性表达的血管生成抑制因子^[35]。并且，也有研究表明 miR-221 对血管生成至关重要，miR-221 对尖端细胞的增殖和迁移是必需的，miR-221 基因敲除与表达 FLT 4 受体的尖端细胞缺陷相关^[36]。据此，我们做出以下科学假设：miR-221-3p 在急性心肌梗死患者中水平升高是具有保护性意义的，其起保护作用的机制极大可能与心肌梗死后早期心脏微血管内皮活化和血管新生过程有关。针对以上假设，拟建立心肌梗死大鼠模型，采用 qPCR 检测 miR-221-3p 在心肌梗死大鼠心肌组织的表达情况，通过免疫荧光共染色观察 miR-221-3p 在心肌梗死急性期心肌组织表达的细胞类型，明确 miR-221-3p 是否在心脏内皮细胞表达；再通过体外诱导 HCMEC 细胞缺氧，采用 qPCR、CCK-8 实验、细胞成管实验、Western-blot 等检测手段，观察不同缺氧时间对人心脏微血管内皮细胞 miR-221-3p 表达水平的影响；观察缺氧条件下 miR-221-3p 对人心脏微血管内皮细胞增殖、成管和相关蛋白表达的影响。本实验将通过血管新生这一视角，探讨 miR-221-3p 在缺氧条件下对人心脏微血管内皮细胞血管新生的调控及机制，进而为 miR-221-3p 对急性心肌梗死后心功能的保护作用提供进一步的理论支持，对缺血性心肌病的防治具有重要意义。

第2章 实验第一部分：miR-221-3p 在心肌梗死大鼠心肌组织中的细胞定位及表达水平

miR-221-3p 被报道在急性冠脉综合症患者血浆中的表达水平明显升高，并且与肌钙蛋白、GRACE、Syntax 评分均呈显著正相关，STEMI 和 NSTEMI 患者血液中都发现了 miR-221-3p 水平升高。在大鼠心肌梗死实验中，过表达 miR-221 可以减轻心肌梗死大鼠的梗死面积和心肌纤维化，改善左室重构和心功能，其机制是 miR-221 抑制心肌细胞凋亡，抑制成纤维细胞激活减轻心肌纤维化。因为心肌梗死的损伤和修复涉及到不同细胞的协同作用，目前仍然不清楚 miR-221-3p 在心肌梗死后心肌组织中的表达以及其可能同时调控的细胞类型。本实验利用大鼠心肌梗死模型采用 qPCR 和免疫荧光共染色技术探索和进一步验证 miR-221-3p 在心肌梗死心肌组织中的表达情况和观察 miR-221-3p 在心肌梗死的细胞定位。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

购买 6~8 周龄体重在 220~250g SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只（武汉大学模式动物研究所），购买后常规喂养 1 周以适应环境。实验动物许可证：SYXK(鄂)2018-0069。

1.1.2 主要仪器

仪器	厂家
小动物剃毛器	宁波爱克利浦电器有限公司
小动物称量称	中国凯丰集团有限公司
带线缝合针	上海金环
一次性使用无菌注射器	上海康德莱企业发展集团股份有限公司

小动物呼吸机	安徽正华生物仪器设备有限公司
高速分散匀浆机	上海昂尼仪器
多样品研磨珠均质仪	Omni
台式高速冷冻型微量离心机	DragonLab
荧光定量 PCR 仪	Roche
超净工作台	苏净安泰
超微量分光光度计	Thermo
标准试剂型纯水仪	青岛富勒姆科技有限公司
离心管	Axygen Biosciences
TIP 头	Axygen Biosciences
包埋机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司
病理切片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司
摊片机	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司
冻台	浙江省金华市科迪仪器设备有限公司
烤箱	上海精宏实验设备有限公司
载玻片及盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
正置光学显微镜	日本奥林巴斯
成像系统	明美 Mshot
水平摇床	其林贝尔
载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
移液枪	Dragon
组化笔	Gene tech
冰箱	青岛海尔股份有限公司
成像系统	日本尼康
冰冻切片机	Thermo
Gene tech pen	Gene tech
正置荧光显微镜	日本尼康
恒温箱	上海精宏

1.1.3 主要试剂

试剂	厂家
水和氯醛	阿拉丁
75%医用酒精	武汉市活力消毒用品有限公司
活力碘	武汉市活力消毒用品有限公司
RNA 提取液	天根生化科技（北京）有限公司
三氯甲烷	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
HyPure™Molecular Biology Grade Water	HyClone
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo
FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)	Roche
4%多聚甲醛固定液	碧云天
结晶紫染色液	碧云天
引物	武汉擎科创新生物科技有限公司
DAPI	sigma
抗荧光淬灭封片剂	索莱宝
二抗兔抗小鼠（A555）	Invitrogen
重组 Anti-Actin 抗体（EPR16769）	Abcam
Anti-alpha smooth muscle Actin	Abcam
重组 Anti-Vimentin 抗体	Abcam
Anti-CD31 抗体	Abcam

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组与模型构建

挑选有活力，适应性好的 SD 大鼠 20 只随机分为急性期 10 只(对照组 $n=5$ 和心肌梗死模型组 $n=5$);慢性期 10 只(对照组 $n=5$ 和心肌梗死模型组 $n=5$)。大鼠用 10%水合氯醛，腹腔注射麻醉，麻醉成功后行气管插管，进行 MI 手术,梗死组和假手术组手术方式参照 Wang, D.和 Srikanth, G.等文章中所述^[37, 38]。

1.2.2 qPCR 检测大鼠心肌组织 miR-221-3p 的表达

1、总 RNA 抽提（枪头和离心管均经过湿热灭菌，无 RNA 酶）

- 1) 取匀浆器，加入 1ml 的 Trizol Reagent，置冰上预冷。
- 2) 取适量新鲜大鼠心肌组织，加入匀浆器中充分匀浆。
- 3) 12000 转速下离心 3min，提取上清液。
- 4) 加入三氯甲烷（200 μ l），震荡 45 秒使其充分混匀，室温静置 3min。
- 5) 4℃ 下离心 10min（12000 转速）。
- 6) 转移上清液到新的离心管中，加入等体积的异丙醇，充分混匀。
- 7) -20℃ 放置 5min。
- 8) 4℃下 12000 转速离心 10min。
- 9) 弃上清液，加入 75%乙醇 1ml，颠倒混匀。
- 10) 12000 转速离心 5min（4℃）。
- 11) 弃上清，再用小枪头吸净管底乙醇，将离心管置于超净台 3min，晾干沉淀。

12) 加入适量（20-50ul）的无 RNA 酶的水溶解 RNA。

13)使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度：仪器空白调零后取 2 μ l 待测 RNA 溶液于检测基座上，放下样品臂，使用电脑上的软件开始吸光值检测。

14) 将浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释，使其终浓度为 100ng/ μ l。

2、反转录（枪头和 PCR 均经过湿热灭菌，无 RNA 酶）

- 1) 取一 PCR 管，加入含 100ng RNA 以上的溶液，作为反转录的模板。
- 2) 加入 1 μ l 特异性 miRNA 反转录引物。
- 3) 用无核糖核酸酶的去离子水补足至 12 μ l。
- 4) 于 PCR 仪上 65℃ 保温 5min，迅速置冰上冷却。
- 5) 依次加入 4 μ l 5 $\times$ ES Reaction Mix，2 μ l 10mM dNTPs，1 μ l RNA inhibitor 和 1 μ l 反转录酶，用枪抽吸混匀。

6) 于 PCR 仪上 42℃保温 60min，结束后 80℃保温 5min 灭活反转录酶。

3、定量 PCR

- 1) 取 0.2ml PCR 管，配制如下反应体系（每个反转录产物配制 3 管）。

2 $\times$ qPCR Mix	12.5 μ l
7.5 μ M 基因引物	2.0 μ l
反转录产物	2.5 μ l

ddH₂O 8.0μl

2) PCR 扩增

预变性 95℃, 5min

循环 (44 次) 95℃, 15s→56℃, 30s→72℃ 20s

熔解曲线 75℃→95℃, 每 20s 升温 1℃

4、结果处理

ΔΔCT 法:

A=CT(目的基因, 待测样本)- CT(内标基因, 待测样本)

B=CT(目的基因, 对照样本)- CT(内标基因, 对照样本)

K=A-B

表达倍数=2^{-K}

引物序列如下:

名称	引物序列 (5'-3')
rno-miR221-3pRT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACGAAACC
rno-miR221-3pF	GACTAGCTACATTGTCTGCTG
Universal R (URP) LongA	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6-2QF	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-2QR	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.2.3 心脏组织切片 HE 染色

大鼠处死后取心脏组织, 梗死组在结扎线下方 2mm 处一分为二, 靠近心脏根部的一半用 10% 中心福尔马林固定用于病理切片 HE 染色; 对照组取相似部位做 HE 染色。组织石蜡包埋切片实验步骤如下:

1、取材: 新鲜组织用 4% 多聚甲醛固定 24h 以上。从固定液取出组织, 在通风橱内用手术刀将组织修平整, 做好标签放于脱水盒内。

2、脱水: 将脱水盒于脱水机内依次梯度酒精进行脱水。75% 酒精 1h-85% 酒精 1h-90% 酒精 1h-95% 酒精 1h-无水乙醇 I 30min-无水乙醇 II 30min-醇苯 5-10min-二甲苯 I 5-10min-二甲苯 II 5-10min-蜡 I 1h-蜡 II 1h-蜡 III 1h。

3、包埋: 组织浸蜡后于包埋机内进行包埋。于 -20℃ 冻台冷却, 蜡凝固后将蜡块从包埋框中取出并修整。

4、切片: 蜡块置于石蜡切片机上切片 (片厚 4μm)。在摊片机上将组织展

平（水温 40℃），用载玻片将组织捞起放进 60℃ 烘箱内烤片。待水烤干蜡烤化后取出常温保存备用。

HE 染色实验步骤

1、石蜡切片脱蜡至无水：依次将切片放入二甲苯 I 30min-二甲苯 II 30min-无水乙醇 I 10min-无水乙醇 II 10min-95%酒精 5min-90%酒精 5min-80%酒精 5min-70%酒精 5min-蒸馏水洗。

2、苏木素染细胞核：Harris 苏木素染 5-10min，自来水洗，1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗 10 分钟，PBS 返蓝 5 分钟，流水冲洗。

3、伊红染细胞质：切片用伊红染液染色 1-3min。

4、脱水封片：将切片依次放入 95%酒精 I 5min -95%酒精 II 5min-无水乙醇 I 5min -无水乙醇 II 5min -二甲苯 I 5min -二甲苯 II 5min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片。

5、显微镜镜检，图像采集分析。

1.2.4 免疫荧光共定位染色

1.组织固定：组织取出洗净后立即放入 4%多聚甲醛（DEPC 水配制）固定 12h 以上。

2.脱水：固定后组织放入 15%蔗糖溶液中 8h，后换 30%蔗糖溶液中过夜。

3.冰冻切片固定：冰冻切片室温晾干，置于 4%多聚甲醛(DEPC)固定 10min，于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

4.修复：根据组织固定时间长短，切片于修复液中修复，修复条件 95℃ 柠檬酸修复液 6min，自然冷却。

5.滴加封闭液：滴加封闭血清。室温 30min。

6.孵育一抗：分别滴加各一抗 CD31/vimentin/actc1/aSMA，一抗稀释比 1:200。4℃过夜。后 PBS 洗 3×5min。

7.孵育二抗：滴加相应二抗 HRP 标记兔抗小鼠或者是 HRP 标记山羊抗兔（根据不同一抗的种属来源），室温孵育 50min。后 PBS 洗 3×5min。

8.滴加 CY3-TSA：滴加 CY3-TSA 试剂，避光室温反应 5min。后 TBST 洗 3 次×10min.PBS 洗 1 次×5min。

9.消化：滴加蛋白酶 K（20ug/ml）37°消化 8min。纯水冲洗后 PBS 洗 3 次×5min。

10.预杂交：滴加预杂交液，37℃ 孵育 1h。

11.杂交：倾去预杂交液，滴加含探针 mir-221-3p probe 杂交液，终浓度 1 μ m。恒温箱 37℃杂交过夜。

12.杂交后洗涤：洗去杂交液，2×SSC，37℃洗 10min，1×SSC，37℃洗 2×5min，0.5×SSC 室温洗 10min。若非特异杂交体较多，可以增加甲酰胺洗涤。

13.DAPI 复染核：切片滴加 DAPI 染液，避光孵育 8min，冲洗后滴加抗荧光淬灭封片剂封片。

14.镜检拍照：切片于尼康正置荧光显微镜下观察并采集图像。（紫外激发波长 330-380nm，发射波长 420nm,发蓝光；FAM(488)绿光激发波长 465-495nm，发射波长 515-555 nm，发绿光；CY3 红光激发波长 510-560，发射波长 590nm，发红光。）

3.冰冻切片荧光探针原位杂交+免疫荧光实验结果判读

DAPI 染色的细胞核在紫外的激发下为蓝色，阳性表达为相应荧光素标记的荧光。FAM(488)为绿光，cy3 为红光。

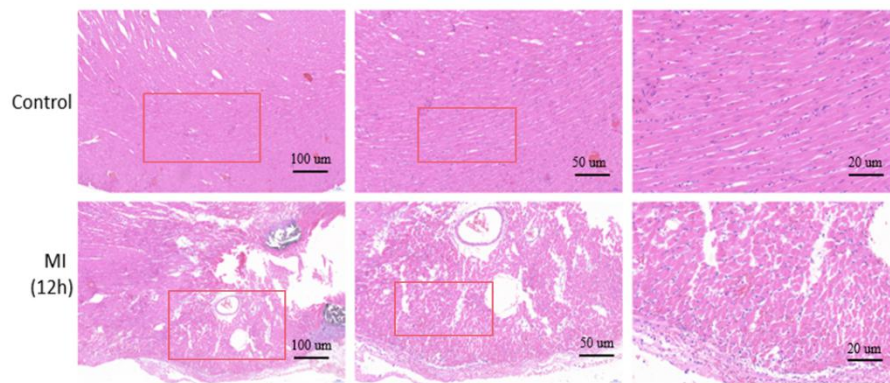
1.3 统计分析

定量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，两两比较采用 t 检验，不能比较的数据以文字进行描述，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

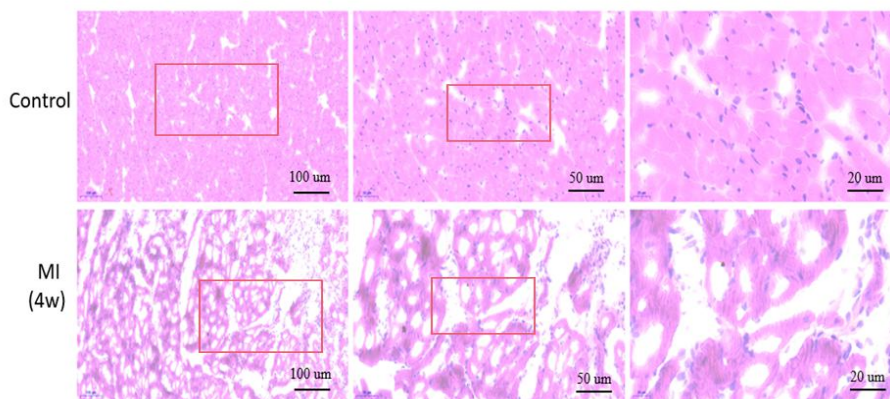
2 结果

2.1 心脏组织切片 HE 染色

假手术组见心肌细胞排列整齐，染色均匀，闰盘和横纹清晰，核呈卵圆形居中，间质血管正常，无炎细胞浸润。在梗死组见心肌细胞溶解、坏死、排列紊乱，炎性细胞浸润，纤维细胞增生、纤维化（图 1AB）。



A



B

图 1 心脏组织切片 HE 染色

注：图 1A 为心梗后 12h，图 1B 为心梗后 4 周；

2.2 心肌梗死大鼠心肌组织中 miR-221-3p 的表达水平

在心肌梗死后 12h，梗死组 miR-221-3p 的表达水平明显高于对照组，差异有统计学意义 ($t=-10.588$ $P<0.01$, $n=5$ 图 2A)，并且在梗死周边区 miR-221-3p 的表达水平也明显高于非梗死区，差异有统计学意义 ($t=-7.770$ $P<0.01$, $n=5$ 图 2B)。在大鼠心肌梗死第 4 周，梗死组 miR-221-3p 的表达水平明显低于对照组，差异有统计学意义 ($t=4.844$ $P<0.05$, $n=5$ 图 2C)。

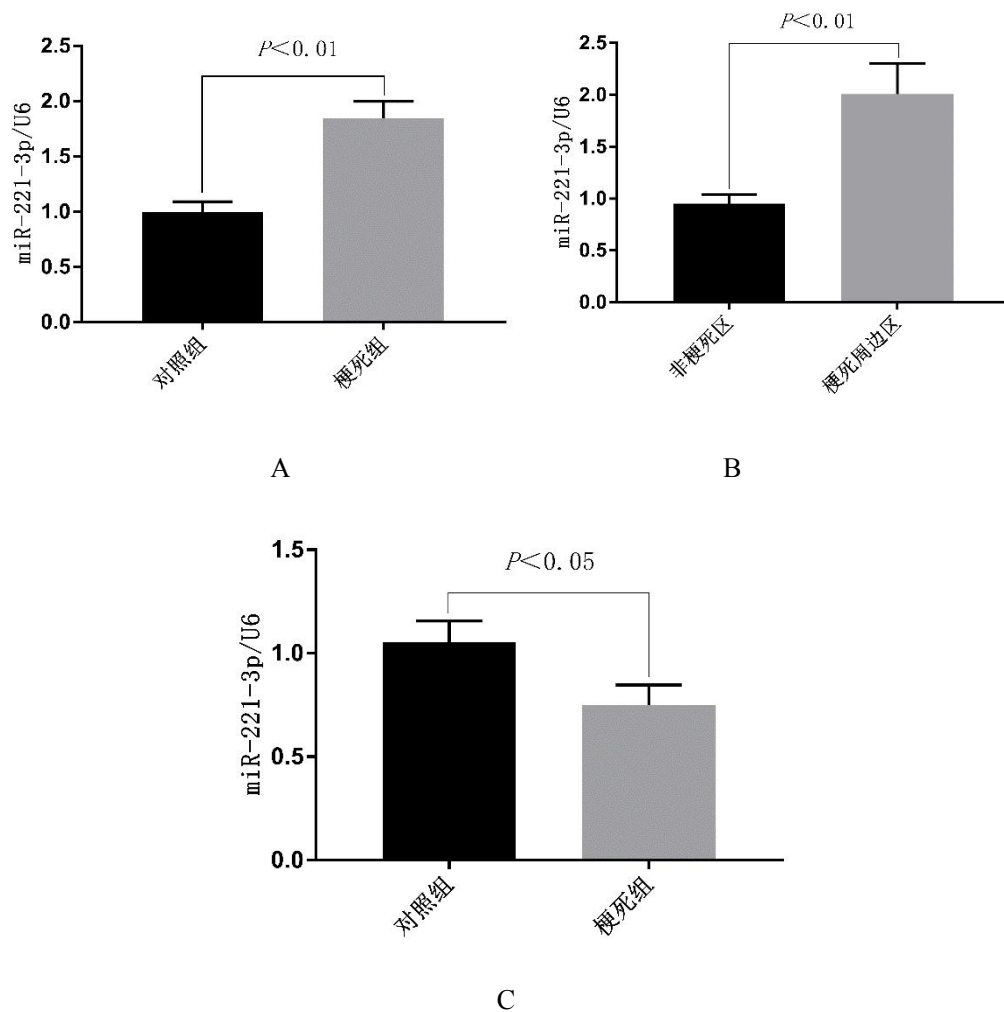


图 2 心肌梗死大鼠心肌组织中 miR-221-3p 的表达水平

注：A，大鼠心肌梗死后 12h；C，大鼠心肌梗死后 4 周心肌组织中 miR-221-3p 的表达水平（心肌梗死组在结扎线下方 2mm 处一分为二，取靠近心尖的一半心脏组织，对照组在相似部位取一半心脏组织）；B，大鼠心肌梗死后 12h 梗死周边区和非梗死区心肌组织中 miR-221-3p 的表达水平。

2.3 miR-221-3p 在心肌梗死急性期心肌组织中表达的细胞类型

免疫荧光共染色结果显示：在心肌梗死急性期 miR-221-3p 与心肌细胞（图 3A）、内皮细胞（图 3B）、平滑肌细胞（图 3D）和成纤维细胞（图 3C）都发现了共定位现象。

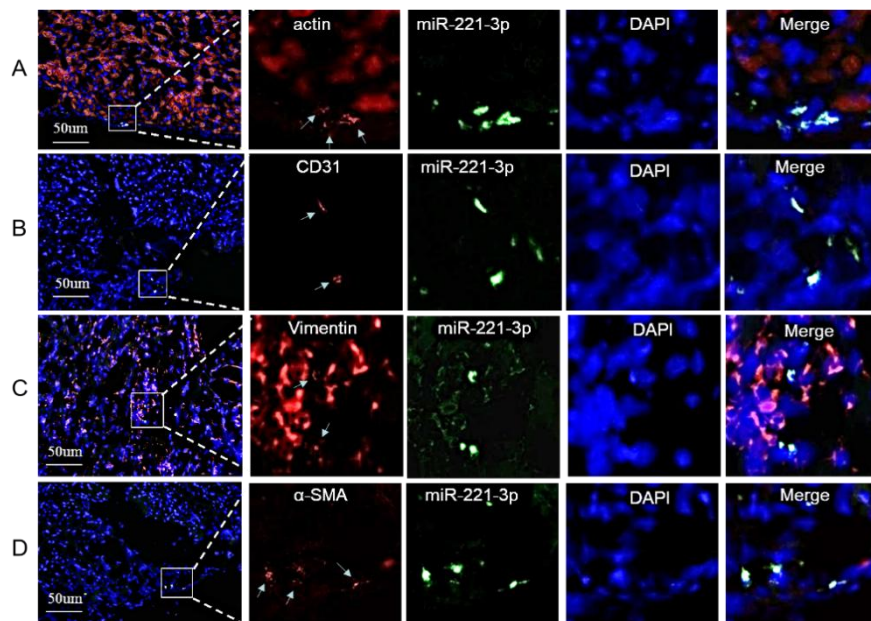


图 3 心肌梗死大鼠心脏组织中 miR-221-3p 表达的细胞类型(200 倍镜)

注：心肌细胞组（图 3A），内皮细胞组（图 3B），成纤维细胞组（图 3C）和平滑肌细胞组（图 3D）； DAPI（细胞核）在紫外的激发下为蓝色荧光。FAM(488)（miR-221-3p）为绿色荧光，心肌细胞（actin）、内皮细胞（CD31）、成纤维细胞（Vimentin）、平滑肌细胞（ α -SMA）为红色荧光。

3 讨论

心脏组织由心肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞四种主要的细胞类型和少数其他类型细胞构成^[39]。其中，节律收缩的心肌细胞构成了心脏作为功能泵的主要执行者，心肌细胞存活面积多少直接决定了心肌梗死患者的心功能的恢复情况。心肌微血管是心肌细胞的直接血供血管，心肌微血管的损伤直接影响到心肌细胞的存活，而且心肌梗死后梗死周围区的微血管功能状态也直接影响到出血、水肿程度和持续时间。成纤维细胞也在心肌梗死后心肌纤维化充当重要角色。在一项心肌梗死实验研究中，过表达 miR-221 可以抑制心肌细胞凋亡，抑制成纤维细胞激活减轻心肌纤维化，进而改善心功能^[34]，然而关于 miR-221-3p 在心肌梗死后不同时期心肌组织的表达水平和心肌梗死急性期表达的细胞类型其未作探究，梗死周围区和非梗死周围区 miR-221-3p 的表达水平也未作比较。

本实验通过建立大鼠心肌梗死模型，探索 miR-221-3p 在心肌梗死心脏组织

中的表达以及细胞定位。结果显示：大鼠心肌梗死急性期（12h）心肌组织 miR-221-3p 表达水平升高，梗死周边区也比非梗死区表达水平更高。心肌梗死慢性期（4周）心肌组织 miR-221-3p 表达水平降低。在大鼠心肌梗死急性期 miR-221-3p 在心肌细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞中都有表达。因此，在心肌梗死过程中 miR-221-3p 可能调控着心肌细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞协同参与心脏损伤修复的过程。

4 结论

- 1、大鼠心肌梗死急性期心肌组织 miR-221-3p 表达水平升高，心肌梗死慢性期心肌组织 miR-221-3p 表达水平降低。
- 2、在大鼠心肌梗死急性期 miR-221-3p 在心肌细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞中都有表达。

第3章 实验第二部分：miR-221-3p 对人心脏微血管内皮细胞血管生成能力的影响

前期的实验结果表明 miR-221-3p 在心肌梗死急性期大鼠心肌组织中上调，并且观察到 miR-221-3p 在内皮细胞中表达。因此，miR-221-3p 可能还调控心脏微血管内皮细胞的行为参与心肌缺血后的修复过程。本实验采用人心脏微血管内皮细胞（HCEMC），体外诱导细胞缺氧，研究不同缺氧时间对 HCEMC miR-221-3p 表达的影响。用 miR-221-3p mimic 和 miR-221-3p inhibitor 转染 HCEMC 模拟 miR-221-3p 过表达和敲低，研究 miR-221-3p 在缺氧条件下对 HCEMC 增殖、成管及 CD34、IGF1R、IGF2、VEGFR2、Ang-2 蛋白表达的影响，从而探讨 miR-221-3p 在缺氧条件下对人心脏微血管内皮细胞血管新生的调控及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人心脏微血管内皮细胞株（HCEMC Catalog#6000）购自 ScienCell 公司

1.1.2 主要仪器

名称	厂家
倒置光学显微镜	日本奥林巴斯
成像系统	明美 Mshot
细胞培养瓶	BIOFIL
细胞培养板	BIOFIL
细胞 CO2 培养箱	Panasonic
流式细胞仪	Novocyte
超净工作台	苏净安泰

血球计数板	北京索莱宝
酶标仪	Thermo
超声细胞破碎机	上海比朗
高速冷冻离心机	中科中佳
电泳仪	北京六一
水平摇床	其林贝尔
电泳槽	北京六一
湿转转印系统转印槽	北京君意
扫描仪	佳能

1.1.3 主要试剂

名称	厂家
ECM 培养基	ScienCell
RFect 小核酸转染试剂	百代生物
DMEM 培养基	Gibco
血清	北京政博
CCK-8 试剂盒(细胞增殖及毒性检测试剂盒)	Solarbio
Matrigel 基底胶	BD
细胞凋亡检测试剂盒	碧云天
细胞培养板（6 孔）	JET BIOFIL
Trizol Reagent	天根生化科技（北京）有限公司
质粒	吉玛基因
引物	武汉擎科创新生物科技有限公司
胰酶	Solarbio
重组 Anti-Angiopoietin2/ANG-2 抗体	Abcam
重组 Anti-CD34 抗体	Abcam
重组 Anti-IGF2 抗体 ^[EPR12221]	Abcam
重组 Anti-IGF1 Receptor 抗体 ^[EPR23027-204]	Abcam
重组 Anti-VEGF Receptor2 抗体 ^[EPRER16Y]	Abcam
GAPDH 抗体	武汉云克隆科技股份有限公司
miR-221-3p mimic	苏州吉玛基因股份有限公司

mimic NC	苏州吉玛基因股份有限公司
miR-221-3p inhibitor	苏州吉玛基因股份有限公司
Inhibitor NC	苏州吉玛基因股份有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 miR-221-3p 过表达实验分组

实验分为：

空白对照组：HCMEC+无血清培养基+ Rfect 小核酸转染试剂；

mimic 组：HCMEC+miR-221-3p mimic+ Rfect 小核酸转染试剂+无血清培养基；

mimic NC 组：HCMEC+mimic NC+ Rfect 小核酸转染试剂+无血清培养基；

inhibitor 组：HCMEC+miR-221-3p inhibitor+ Rfect 小核酸转染试剂+无血清培养基；

inhibitor NC 组：HCMEC+inhibitor NC+ Rfect 小核酸转染试剂+无血清培养基；

1.2.2 细胞培养

采用 HCMEC 专用培养基（内皮细胞培养基，Sciencell cat#1001）培养，培养条件为 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱，培养至细胞约 80% 汇合，用 0.25% 胰蛋白酶消化传代（1:2）。

1.2.3 诱导细胞缺氧

取对数生长期 HCMEC 细胞，待细胞汇合度达到 70%-80% 时，把细胞培养瓶（瓶口拧松，保证可以进行气体交换）放置在密封的塑料容器里，充入 100% 的氮气，持续充气 10 分钟，密封塑料袋，放入 37℃ 培养箱中，根据实验设计的不同时间点分别缺氧 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h。

1.2.4 细胞转染

① 胰酶消化对数期细胞接种入 6 孔板中，将 6 孔板置于培养箱中培养。

② 倒置显微镜镜下观察细胞汇合度约 50% 左右时进行转染，转染前一天更换不含抗生素的培养基进行培养

③ 30pmol mimic/mimic NC/inhibitor/inhibitor NC 用 250ul 无血清培养基稀释

④ 10ul Rfect 用 250ul 无血清稀释，轻轻混匀，室温孵育 5min

⑤ 孵育 5min 后，将 siRNA 稀释液与 **RFect** 稀释液混合（总体积 500ul），空白对照组将等量 **RFect** 稀释液和无血清培养基稀释至总体积 500ul，轻轻混匀，室温孵育 20min

⑥ 将混合物加入培养孔内，补加 2ml 无血清培养基至培养孔内，混匀

⑦ 将 6 孔板置于培养箱内转染 48h, qPCR 检测转染效率。

1.2.5 过表达质粒分组及鉴定

分组：A：空载体组，B：Ang-2 质粒组，C：阴性对照组。空载体，Ang-2 过表达质粒，阴性对照载体均从吉玛基因购买；三组质粒分别转染 HCMEC 细胞后 48h，收细胞，进行 qPCR 检测，鉴定 Ang-2 的表达情况(转染浓度及剂量：每 200ul 无血清培养基+4ul**RFect**+2ug 质粒)。

1.2.6 qPCR 检测 miR-221-3p 及 mRNA 的表达

1、总 RNA 抽提（枪头和离心管均经过湿热灭菌，无 RNA 酶）

1) 用剪口枪头，小心吸弃液体培养基。

2) 加入 1ml 的 Trizol Reagent，将细胞都从培养皿底部刷起，使其悬浮于 Trizol Reagent。

3) 将 Trizol Reagen 吸取到 2mL 离心管中，吸打混匀，静置 5min。对于悬浮生长的细胞，直接 12000rpm 离心 3min，弃去培养液，加入 1ml 的 Trizol Reagent，吸打混匀，静置 5min。

4) 12000rpm 离心 3min 取上清。

5) 加入 200 μ l 三氯甲烷，剧烈震荡 45 秒使其充分混匀，液体呈乳状，室温静置 3min。

6) 4℃ 下 12000rpm 离心 10min。

7) 将上清转移到一新的离心管中，加入等体积的异丙醇，颠倒混匀。

8) -20℃ 放置 5min。

9) 4℃下 12000rpm 离心 10min，管底的白色沉淀即为 RNA。

10) 吸除上清液，加入 75%乙醇 1ml，颠倒混匀数次，使沉淀悬浮。

11) 4℃下 12000rpm 离心 5min。

12) 弃上清，再用小枪头吸净管底乙醇，将离心管置于超净台上吹 3min，晾干沉淀。

13) 加入适量（20-50ul）的无 RNA 酶的水溶解 RNA。

14)使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度：仪器空白调零后取 2 μ l 待测

RNA 溶液于检测基座上，放下样品臂，使用电脑上的软件开始吸光值检测。

15) 将浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释，使其终浓度为 100ng/μl。

2、反转录（枪头和 PCR 均经过湿热灭菌，无 RNA 酶）

1) 取一 PCR 管，加入含 100ng RNA 以上的溶液，作为反转录的模板。

2) 加入 1μl 特异性 miRNA 反转录引物。

3) 用无核糖核酸酶的去离子水补足至 12μl。

4) 于 PCR 仪上 65℃ 保温 5min，迅速置冰上冷却。

5) 依次加入 4μl 5×ES Reaction Mix，2μl 10mM dNTPs，1μl RNA inhibitor 和 1μl 反转录酶，用枪抽吸混匀。

6) 于 PCR 仪上 42℃ 保温 60min，结束后 80℃ 保温 5min 灭活反转录酶。

3、定量 PCR

1) 取 0.2ml PCR 管，反应体系配制方法同实验第一部分，每个反转录产物配制 3 管。

4、结果处理

ΔΔCT 法：

A=CT(目的基因，待测样本)- CT(内标基因，待测样本)

B=CT(目的基因，对照样本)- CT(内标基因，对照样本)

K=A-B

表达倍数=2^{-K}

引物序列如下：

名称	引物序列 (5'-3')
hsa-miR-221-3pRT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT GGATACGACGAAACC
hsa-miR221-3pF	GACTAGCTACATTGTCTGCTG
Universal R (URP) LongA	GTGCAGGGTCCGAGGT
Hu-U6-2QF	CTCGCTTCGGCAGCACA
Hu-U6-2QR	AACGCTTCACGAATTTGCGT
hGAPDH-F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
hGAPDH-R	GGCTGTTGTCACTTCTCATGG
Hu-Ang-2-F	AACTTTCGGAAGAGCATGGAC
Hu-Ang-2-R	CGAGTCATCGTATTCGAGCGG

1.2.7 Western-blot 检测蛋白表达

Western blot 检测目的蛋白的表达，以 GADPH 为内参

1.提取蛋白：

(1) 用预冷的 PBS (0.01M, pH7.4) 洗涤细胞 2 次，加入 100 μ l 预冷的蛋白裂解液(0.1mol/L NaCl, 0.01mol/L Tris-Cl PH7.6, 0.001mol EDTA PH8.0, 1 μ g/ml Aprotinin, 100 μ g/ml PMSF, 1% NP40)，细胞刮刮下细胞收集至 1.5mL 的 EP 管中；

(2) 置冰浴中裂解 30min；

(3) 4℃、12000rpm，离心 15min，取上清至干净的 1.5mL EP 管中；

(4) 取 2 μ L 用紫外分光光度计进行蛋白定量；

(5) 其余与等体积 2 $\times$ SDS 上样缓冲液(Tris100mmol/L, DTT 200mmol/L, SDS 4%，溴酚兰 0.2%，甘油 20%)混合后沸水中煮 15min；

(6) 缓慢冷却后分装，并在-70℃冰箱中保存备用。

2.SDS-PAGE

(1) 准备：将玻璃板去污剂充分洗涤，自来水、蒸馏水冲洗，晾干。将玻璃板装入胶架，固定在垂直电泳槽上，待用。

(2) 10%分离胶（目的蛋白较大时，使用 8%的分离胶），分离胶配置方案：

成分	体积（总体积：10ml）
双蒸水	4ml
30%聚丙烯酰胺液	3.3ml
1.5mol/L Tris（PH8.8）	2.5ml
10%DS	0.1ml
10%过硫酸铵	0.1ml
TEMED	0.004ml

注：10%过硫酸铵和 TEMED 最后加入；TEMED 一旦加入，在充分混合后应立即进行下一步骤。加入混合好的凝胶混合液时注意不能存留气泡；随后加入 2ml 异丁醇封胶，防止氧气进入凝胶而抑制聚合反应。

分离凝胶完全后（30 分钟），弃覆盖层液体。用去离子水洗涤凝胶顶部数次以去除未聚合完全的聚丙烯酰胺。尽可能排尽凝胶上的液体，再用滤纸片小心吸尽上层残留液体。

(3) 5%积层胶配置方案:

成分	体积 (总体积: 4ml)
双蒸水	2.7ml
30%聚丙烯酰胺液	0.67ml
1.0mol/Ltris (PH8.8)	2.5ml
10%DS	0.04ml
10%过硫酸铵	0.04ml
TEMED	0.004ml

注: 预先将电泳梳子在 DDW 中浸泡数分钟以防止产生气泡。10%过硫酸铵和 TEMED 最后加入; TEMED 一旦加入, 立即进行下一步骤: 在已经聚合的分离胶上直接灌注积层胶, 并将梳子一头倾斜、小心插入灌满积层胶的垂直玻璃板间隙, 将胶垂直放置在室温 30 分钟以完全聚合。

(4) 电泳 取等量蛋白补齐 20 μ l 上样量后短暂离心上样, 每个上样孔加入 40 μ g 总蛋白。8V/ml 的电压电泳至染料进入分离胶后, 将电压增加到 15V/ml 直至染料到达分离胶底部, 终止电泳。

3.目的蛋白的免疫检测

(1) 特异抗体与抗原的结合

将 PVDF 膜浸于甲醇中 10 秒, DDW 浸泡 5 分钟。封闭液 (5%BSA 溶于 PBST, PBST: PBS pH 7.5, 0.1% Tween 20) 中室温 1 小时或 4℃过夜; 大量 PBST 冲洗 10 分钟×3 次; 室温一抗 (1: 500) 1 小时 (水平摇床); 大量 PBST 冲洗 10 分钟×3 次; 室温二抗 (1: 1000) 1 小时 (水平摇床), 大量 PBST 冲洗 10 分钟×3 次。

(2) 显影

采用化学发光检测系统 (Pierce, USA), 将 PVDF 膜正面向上平铺于一平皿内, 将化学发光底物 (Supersignal Chemiluminescent Substrate Stable Peroxide Solution 与 Substrate Luminal/Enhancer 按 1:1 混匀) 加于 PVDF 膜上, 于暗室中孵育约 5 分钟, 即可见发光的杂交带; 弃去发光底物, 用 Parafilm 膜包裹 PVDF 膜, 将 PVDF 膜置于已备好的数张与膜大小相等的 X 光胶片之间, 置入附设的增光屏的暗盒中; 曝光约 1-3 分钟, 每隔一分钟取出一张 X 光胶片, 显影 5 分钟, 定影 5 分钟, 水洗 10 分钟以上, 晾干。

(3) PVDF 膜的再利用及二次杂交

将显影后的 PVDF 膜浸于 10ml 洗脱缓冲液 (62.5 mMTris-HCl pH6.8, 2%

SDS, 100mM β 巯基乙醇)中, 70℃水浴静止孵育 30 分钟; 用 Wash buffer(1×PBS, 0.1% Tween-20) 摇洗, 5 分钟, 3 次; 同法以 GADPH 单抗检测作为内对照。

1.2.8 CCK-8 实验检测细胞增殖

①实验准备, 超净台喷洒酒精, 紫外照射 30min。准备好 96 孔板, 离心管, 10%DMEM, 0.25%胰酶, 戴上手套, 口罩等。

② 胰酶消化对数期细胞, 终止后离心收集, 制成细胞悬液, 细胞计数调整其浓度至 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 。

③ 将细胞悬液制备好后, 轻轻混匀, 每孔加入 100ul, 边缘孔用无菌 PBS 填充。

④ 将接种好的细胞培养板放入 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 将培养板在培养箱预培养 24 小时。

⑤ 按照实验分组, 向培养板加入 miR-221-3p 模拟物及抑制剂 (1.2pmol micro-RNA 用 10ul 无血清培养基稀释, 0.4 ul RFect 用 10ul 无血清稀释, 轻轻混匀, 室温孵育 5min, 将 siRNA 稀释液与 RFect 稀释液混合后加入原先约含 100ul 的培养孔内)对细胞进行相应处理。在培养箱孵育 12-72 小时。

⑥ 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液 (注意避免在孔中产生气泡), 继续培养 2h。

⑦ 用酶标仪测定其在 450nm 处吸光度(OD 值)。

1.2.9 miR-221-3p 对人心肌微血管内皮细胞成管的影响

按照实验分组进行缺氧处理后, 进行下述处理。

①冰上操作, Matrigel 用预冷枪头混匀, EP 管提前预冷, 每 500ul 分装。

②6 孔板提前预冷, 每孔加入 200ul matrigel, 避免产生气泡。在 37℃孵箱放置 45 分钟。

③ 胰酶消化, 收集细胞, 调整细胞密度 3×10^5 cells/mL 铺板, 每孔 2ml。

④ 30pmol micro-RNA 用 250ul 无血清培养基稀释, 10ul RFect 用 250ul 无血清稀释, 轻轻混匀, 室温孵育 5min; 加入培养孔内

⑤ 37℃孵箱孵育, 8h 进行成管。

⑥ 成管后拍照。

1.3 统计分析

定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，多组比较采用单因素方差分析，方差齐时组间比较采用 SNK-q 或 LSD 检验，方差不齐时采用 Games-howell 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧对人心脏微血管内皮细胞 miR-221-3p 表达的影响

qPCR 结果显示，细胞缺氧 4 小时 miR-221-3p 表达水平升高，与对照组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 4)。

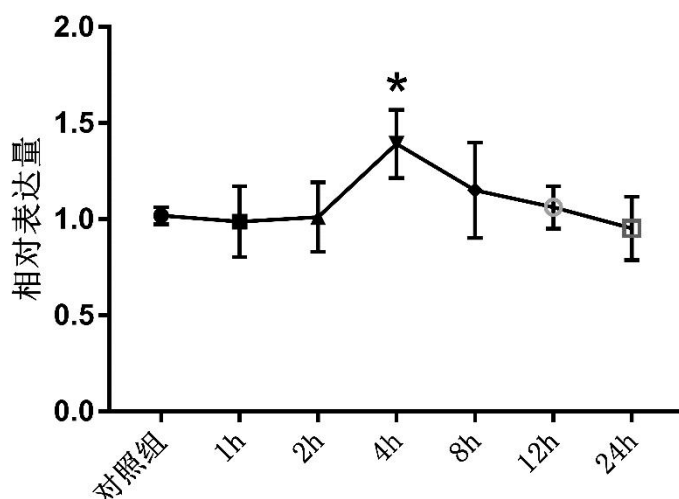


图 4 缺氧条件下人心脏微血管内皮细胞 miR-221-3p 的相对表达量

注：*:与对照组比较， $P < 0.05$ ($n=3$)

2.2 miR-221-3p 模拟物和抑制剂转染效果鉴定

转染 miR-221-3p 模拟物和抑制剂后，qPCR 结果显示：miR-221-3p mimic 组 miR-221-3p 表达量较空白对照组和 mimic NC 组高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-221-3p inhibitor 组 miR-221-3p 表达量较空白对照组和 inhibitor NC

组低，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）（见图5）。此结果表明 miR-221-3p 模拟物和抑制剂转染有效。

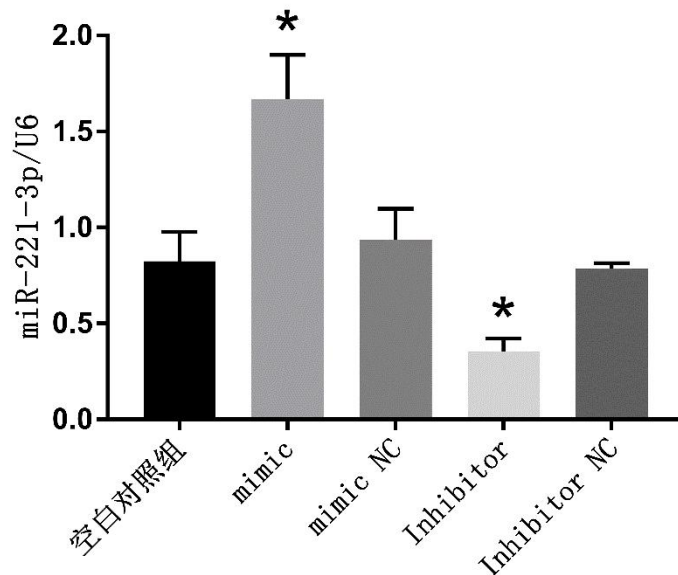


图5 转染 miR-221-3p 模拟物和抑制剂后 HCMEC miR-221-3p 的相对表达量

注：*：与对照组及 NC 组比较， $P<0.05$ （ $n=3$ ）

2.3 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 抑制人心脏微血管内皮细胞 Ang-2 蛋白的表达

Western-blot 结果显示,缺氧条件下过表达 miR-221-3p 可致 Ang-2 蛋白表达水平降低，与对照组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。缺氧条件下转染 miR-221-3p 抑制剂后 Ang-2 蛋白表达水平升高，与对照组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）（见图6）。targets can 7.2 靶点预测结果显示：miR-221-3p 与 Ang-2 存在结合位点,并且 Ang-2 与 miR-221-3p 在人、大鼠和小鼠中结合位点具有保守性（见图7）。

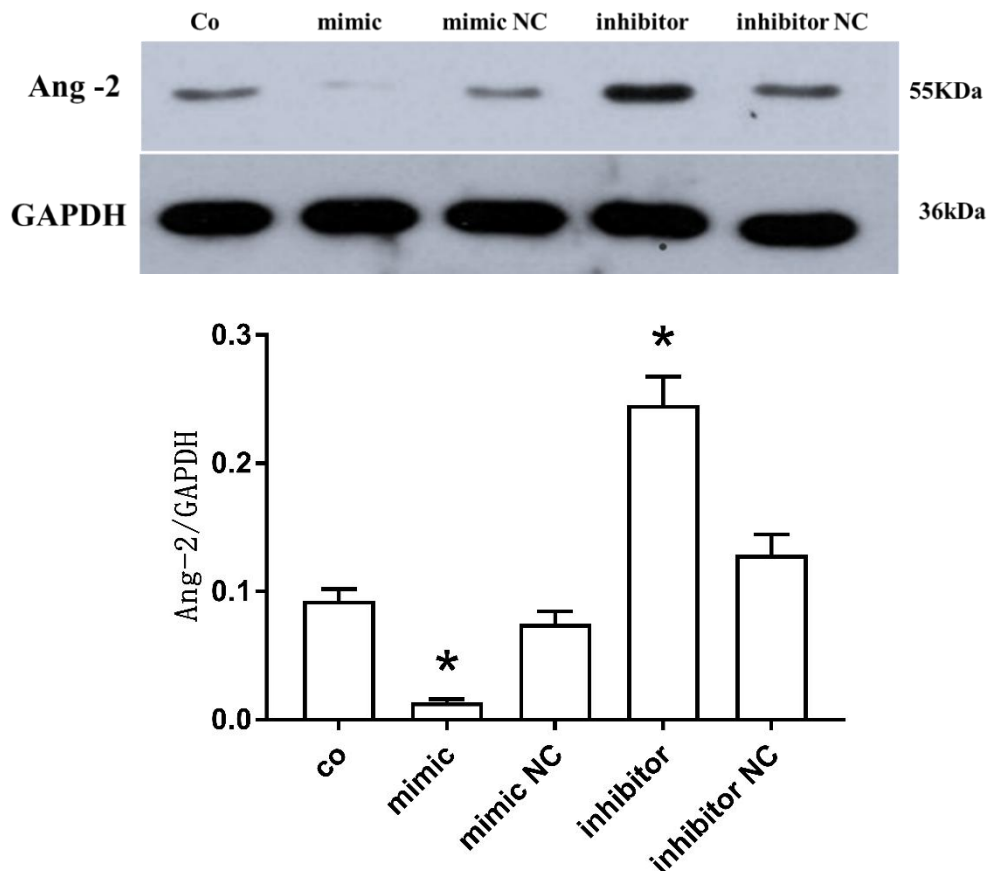
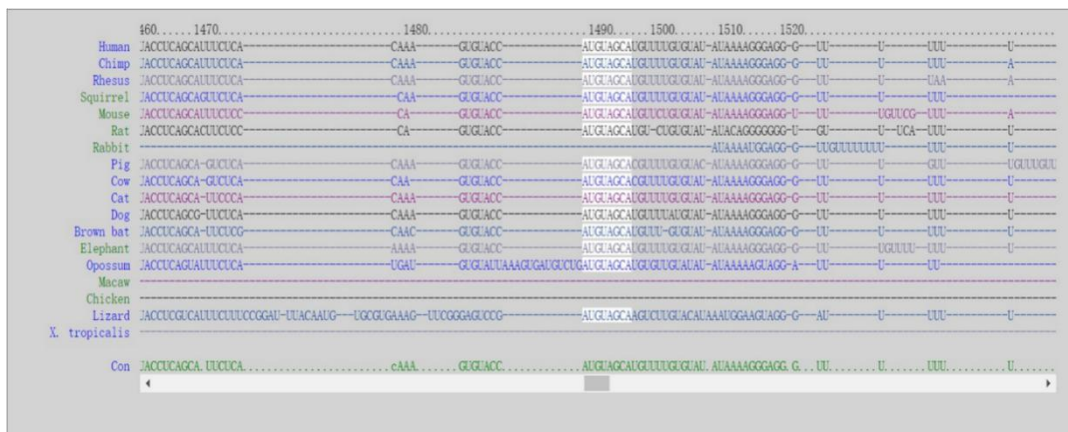


图6 转染 miR-221-3p 模拟物和抑制物后 Ang-2 蛋白电泳灰度值比较

注：Co:空白对照组；mimic:miR-221-3p mimic 组；mimic NC: miR-221-3p mimic NC 组；inhibitor: miR-221-3p inhibitor 组；inhibitor NC: miR-221-3p inhibitor NC 组。*:与 co 组或 NC 组相比， $P<0.05$ (n=3)



Ang-2 在不同物种中具有保守的结合位点（图片来源于 targetsan 7.2）

Position 1489-1496 of ANGPTL2 3' UTR 5' ...CUCACAAAGUGUACCAUGUAGCA...
 |||||
 hsa-miR-221-3p 3' CUUUGGGUCGUCUGUUACAUCGA

miR-221-3p 与 Ang-2 的结合位点

图7 targetscan 7.2 预测 miR-221-3p 与 Ang-2 结合

2.4 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 抑制人心脏微血管内皮细胞增殖

CCK-8 实验结果显示：在缺氧条件下 miR-221-3p mimic 组 OD 值在 12~72h 均较对照组低，差异有统计学意义（其中 72h $P<0.05$ ，其余时间点 $P<0.01$ ）。在缺氧条件下 miR-221-3p inhibitor 组 OD 值在 12~72h 均较对照组高，差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）（见表 1）。增殖曲线（见图 8）。

表 1 缺氧条件下 miR-221-3p 对 HCMEC 增殖的影响

组别	OD 值 ($\bar{X}\pm S$)				
	12h	24h	36h	48h	72h
空白对照组	0.396±0.006	0.480±0.004	0.563±0.002	0.644±0.003	0.730±0.005
mimic	0.381±0.000##	0.450±0.002##	0.527±0.005##	0.607±0.004##	0.717±0.004#
mimic NC	0.407±0.004	0.484±0.005	0.575±0.003	0.653±0.002	0.740±0.004
Inhibitor	0.421±0.002**	0.502±0.002**	0.602±0.005**	0.676±0.004**	0.770±0.007**
Inhibitor NC	0.395±0.002	0.481±0.003	0.563±0.005	0.643±0.004	0.746±0.004

注：*/#：与空白对照组及 NC 组比较， $P<0.05$ ；**/##：与空白对照组及 NC 组比较 $P<0.01$ （ $n=3$ ）

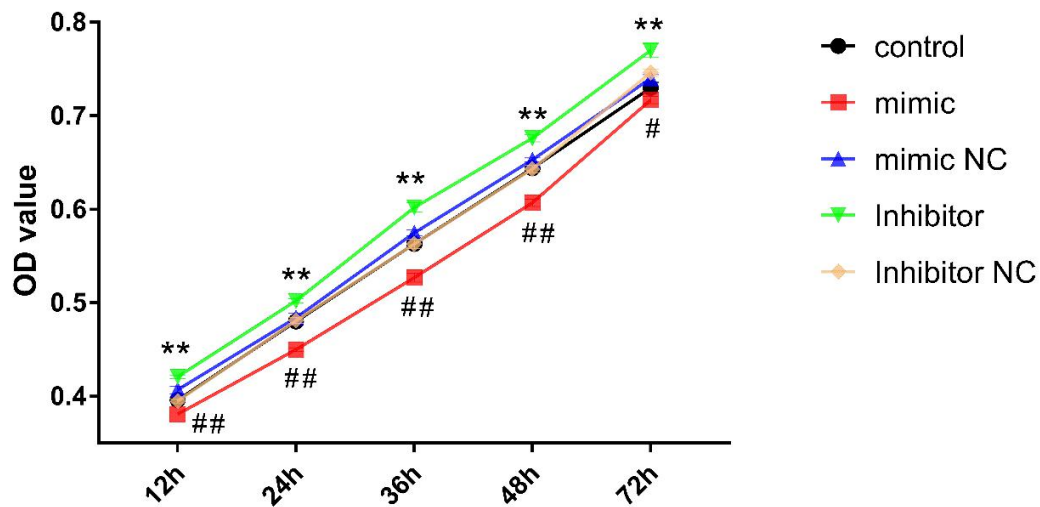


图8 缺氧条件下转染 miR-221-3p 模拟物和抑制剂后 HCMEC 的增殖曲线

2.5 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 抑制人心脏微血管内皮细胞成管

细胞成管实验结果显示：在缺氧条件下过表达 miR-221-3p 导致细胞管腔形成数减少，与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在缺氧条件下转染 miR-221-3p 抑制剂后导致细胞管腔形成数增多，与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图9)。

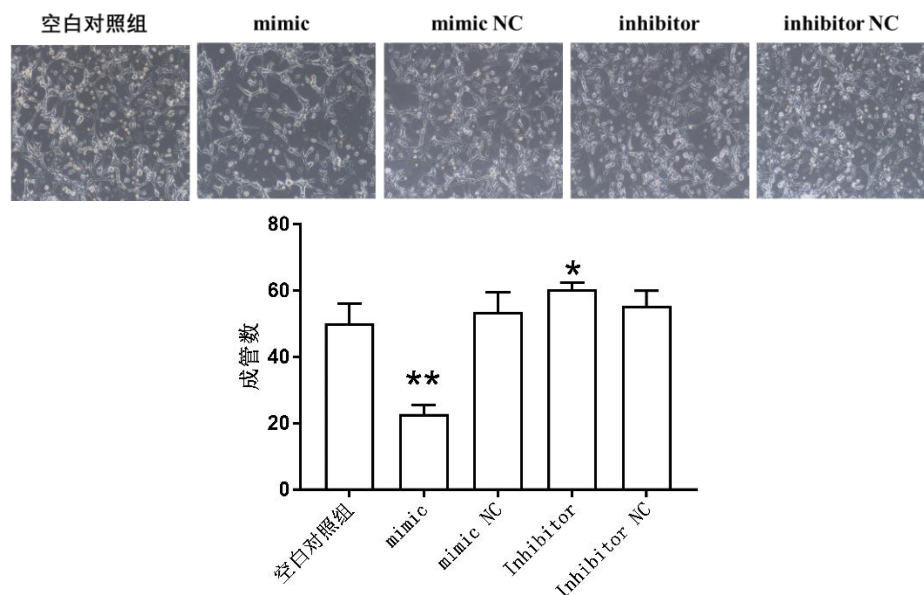
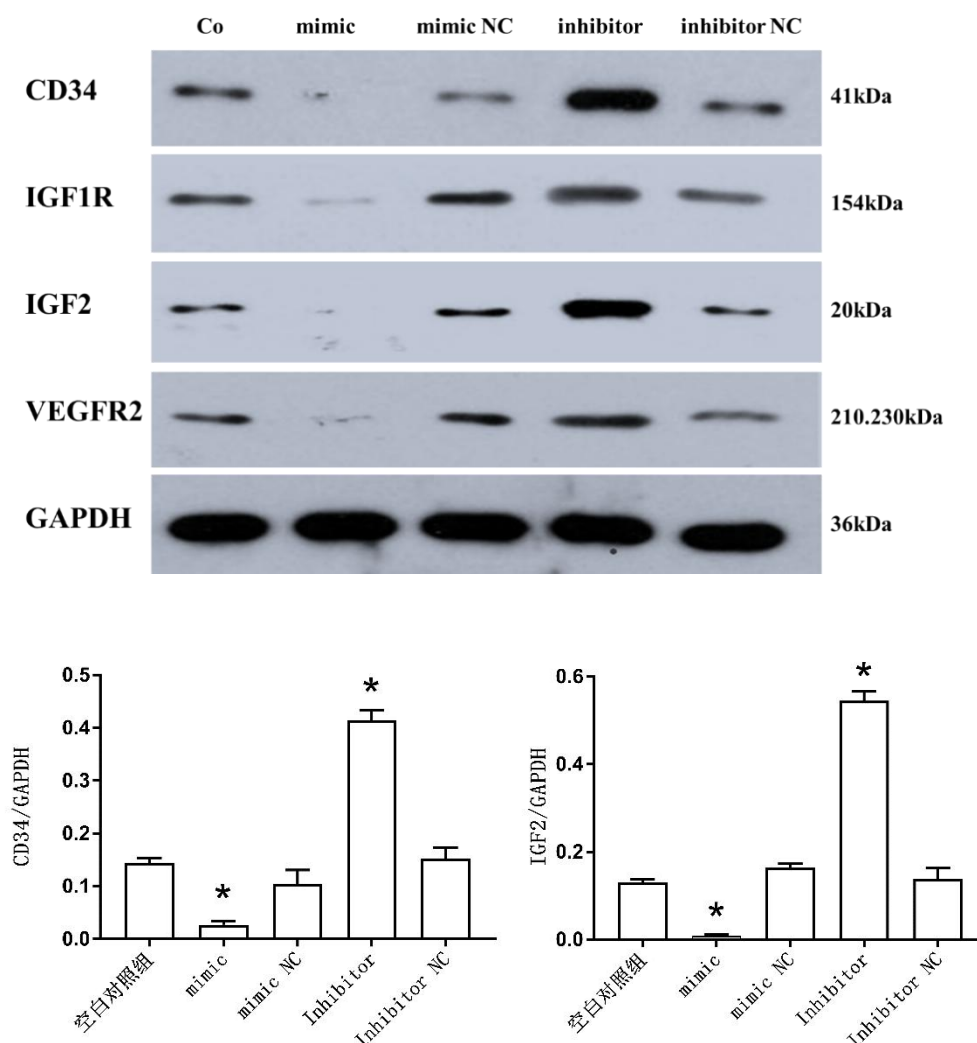


图9 转染 miR-221-3p 模拟物和抑制剂后 HCMEC 成管数

注：*:与对照组比较, $P < 0.05$; **:与对照组比较 $P < 0.01$ (n=5)

2.6 缺氧条件下过表达 miR-221-3p 抑制人心脏微血管内皮细胞 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白的表达

Western-blot 结果显示,缺氧条件下过表达 miR-221-3p 可致 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白表达水平减少,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。缺氧条件下转染 miR-221-3p 抑制剂后 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白表达水平升高,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$) (见图 10)。



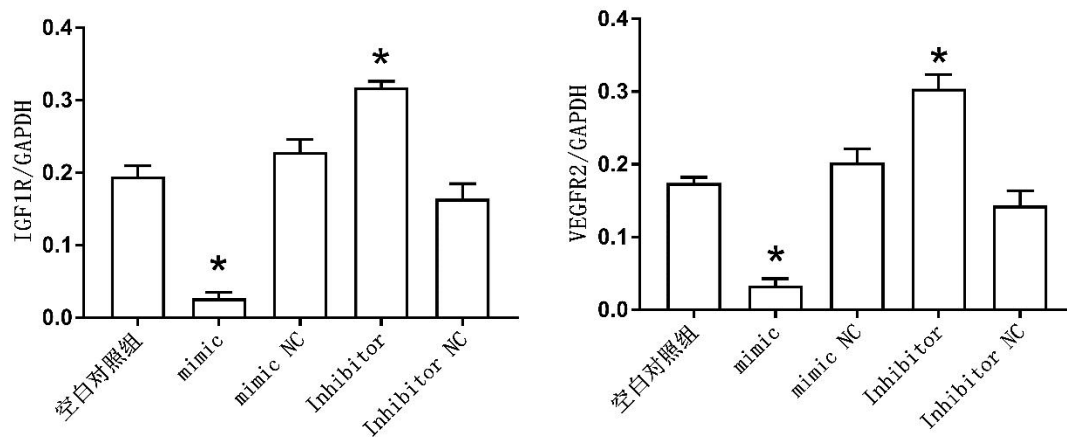


图 10 转染 miR-221-3p 模拟物和抑制物后 CD34、IGF1R 等蛋白电泳灰度值比较

注：*:与空白对照组或 NC 组比较， $P < 0.05$ ($n=3$)

2.7 Ang-2 质粒转染效果鉴定

转染 Ang-2 质粒后，qPCR 结果显示：Ang-2 质粒组 Ang-2 mRNA 表达量较空载组和阴性对照组高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。（见图 11）此结果表明 Ang-2 质粒转染效果良好。

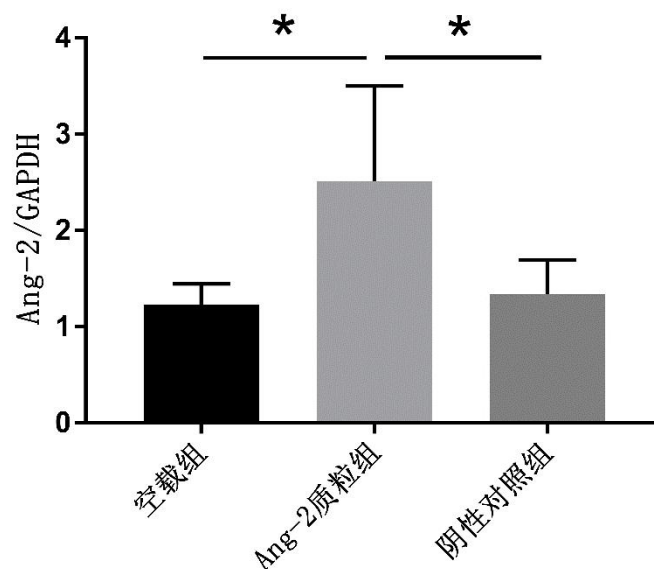


图 11 转染 Ang-2 质粒后 Ang-2 mRNA 相对表达量比较

注：*:与空载质粒组或阴性对照组比较， $P < 0.05$ ($n=3$)

2.8 缺氧条件下过表达 Ang-2 促进人心脏微血管内皮细胞 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 mRNA 的表达

转染 Ang-2 质粒后，qPCR 结果显示：CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 的 mRNA 表达量 Ang-2 质粒组较空载组和阴性对照组明显升高，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）（见图 12）。

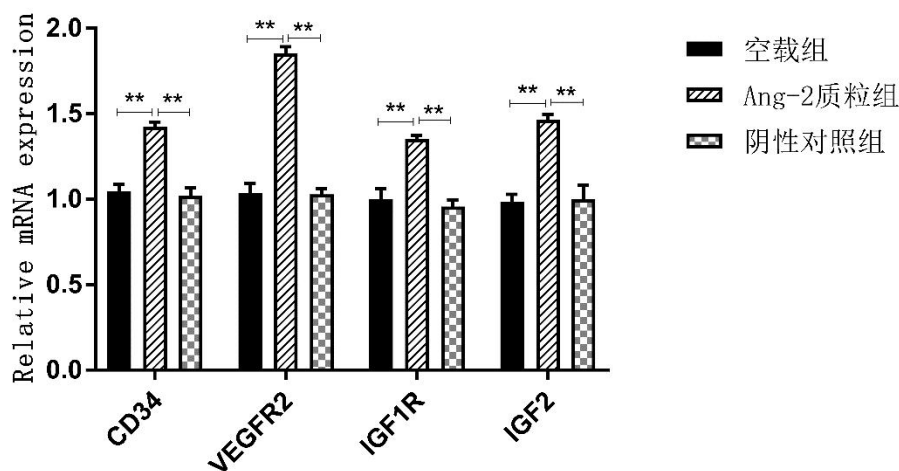


图 12 转染 Ang-2 质粒后 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 mRNA 表达量比较

注：**：与空载组或阴性对照组比较， $P < 0.01$ （ $n=3$ ）

2.9 缺氧条件下过表达 Ang-2 促进人心脏微血管内皮细胞 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白的表达

转染 Ang-2 质粒后，Western-blot 结果显示，Ang-2 质粒组 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白表达量较空载组和阴性对照组明显升高，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）（见图 13）。

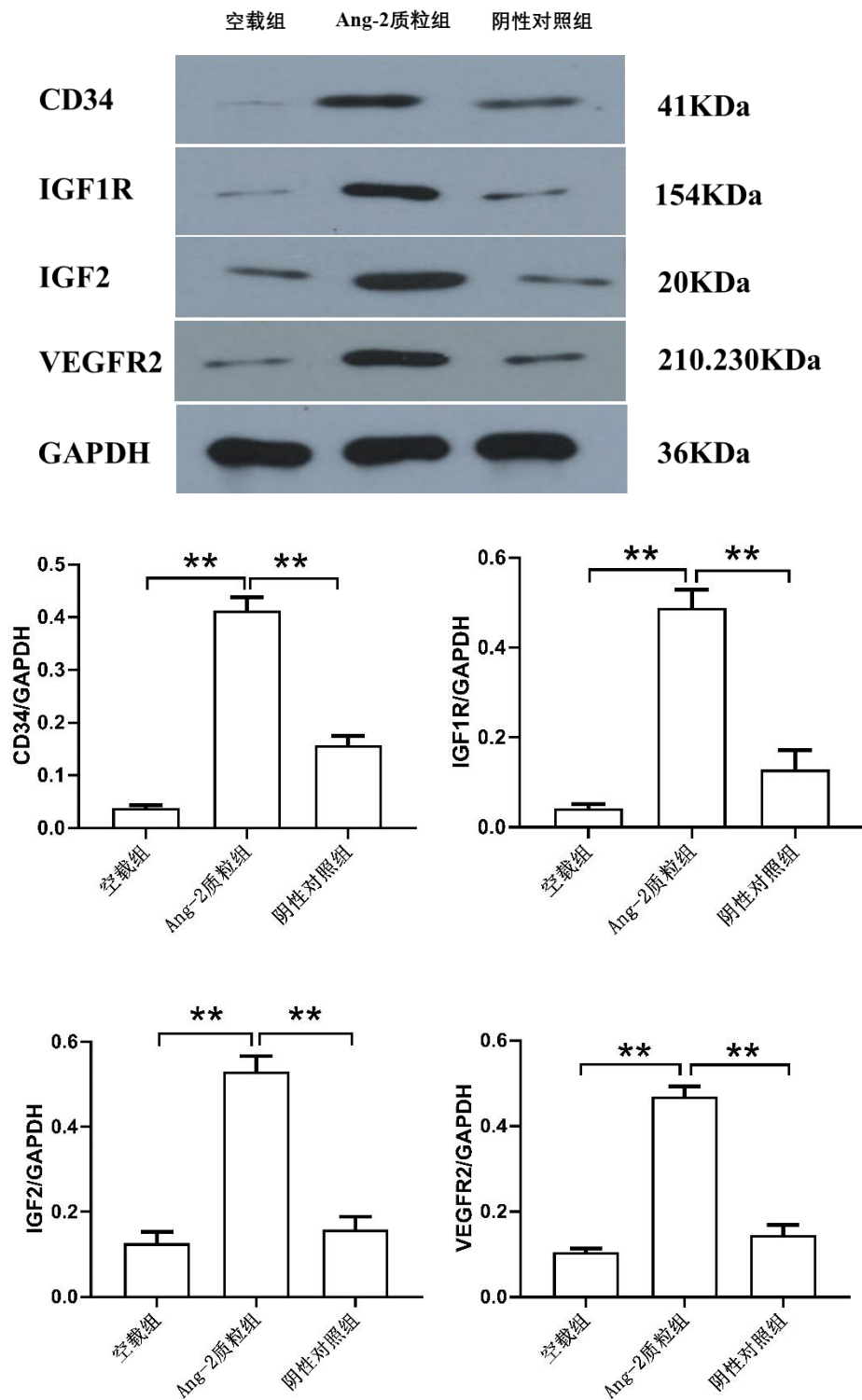


图 13 转染 Ang-2 质粒后 CD34、IGF1R 等蛋白电泳灰度值比较

注：**与空载组或阴性对照组比较 $P < 0.01$ ($n=3$)

Gene symbol	Full name	Mean fold difference CD34 ⁺ compared to CD34 ⁻ HUVEC	P value
VEGFR2	Kinase insert domain receptor	5.9	0.002
VEGFR3	Fms-related tyrosine kinase 4	1.8	0.180
NRP1	Neuropilin 1	2.5	0.013
NRP2	Neuropilin 2	4.8	0.003
PDGFB	Platelet-derived growth factor beta polypeptide	2.1	0.180
DLL4	Delta-like 4	7.0	0.085
ANGPT2	Angiopoietin 2	8.1	0.004
APLN	Apelin	5.0	0.025
UNC5B	Unc-5 homolog B	4.1	0.475
ROBO4	Roundabout homolog 4, magic roundabout	2.0	0.013
PLXND1	Plexin D1	3.9	0.006
EFNB2	Ephrin-B2	4.4	0.009
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	41.9	0.017
CD34	CD34 molecule	121.4	0.001

Figure 14. From: CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. Siemerink, Martin J. et al 2012 Angiogenesis.

图 14 表格图片来源于 Siemerink, Martin J. et al 2012, Angiogenesis.

3 讨论

新的血管生长是由尖端细胞(tip cells)引导的,这是一种由血管生成因子诱导的内皮细胞转分化表型^[40]。在众多外形和功能相似的内皮细胞中区分出早期的尖端细胞是一项比较困难的工程,而根据一些特异性表达于尖端细胞的小分子蛋白基因来鉴别尖端细胞和普通内皮细胞的方法是不错的选择。

CD34 是一种表达于发育早期造血干细胞、小血管内皮细胞和胚胎成纤维细胞的表面糖磷蛋白。CD34 在原始的造血细胞上高水平表达,并且在失去体外形成集落能力阶段的成熟造血细胞表面,其表达降低到不可检测的水平,常用于造血祖细胞和干细胞的筛选^[41]。CD34 也可能参与造血祖细胞表型的维持^[42]。静止的内皮细胞向尖端细胞转变的过程是胚胎后血管新生过程的关键步骤,CD34 能否用于鉴别和标记尖端细胞?研究表明,CD34 在一小群培养的内皮细胞中表达,这些细胞能像体内的尖端细胞一样延伸丝状伪足^[43]。Siemerink MJ 等人通过分析比较 CD34 阳性和阴性内皮细胞的全基因组 mRNA 谱发现,CD34 阳性细胞富集与血管生成和迁移相关的生物学功能,而 CD34 阴性细胞富集与增殖相关的功能。此外, Siemerink MJ 等人还发现,在体外刺激下,CD34 阳性细胞的数量增加或减少,而对应的在体内尖端细胞数量分别增加或减少。因此,在培养的血管内皮细胞中存在具有几乎所有已知尖端细胞特性的细胞,并且可以根据 CD34 的表达分离出这些细胞^[40]。

胰岛素样生长因子（IGF）系统包含 IGF-1/2，IGF 受体（IGFR），IGF 结合蛋白（IGFBPs）和 IGFBP 水解酶的配体。IGF 系统在各种疾病发展过程中起着多种作用，因为 IGF 通过调节 DNA 转录广泛参与细胞增殖和分化^[44]。在以 CD34 为标记物在人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中鉴定了血管生成芽的尖端细胞后，Schlingemann RO 团队最近还发现尖端细胞也存在于人微血管内皮细胞(hMVECs)中，这是一种与血管生成更相关的内皮细胞类型，并且鉴定出胰岛素样生长因子-2 (IGF-2)和 IGF-1 受体(IGF1R)两个基因可作为新的尖端细胞特异性基因^[40]。

血管生成素 1（Ang-1）和血管生成素 2（Ang-2）都属于生长因子家族成员，在血管生成过程充当重要作用。虽然 Ang-1 和 Ang-2 对 Tie-2 受体具有相似的结合亲和力，但它们对 Tie-2 受体的激活作用相反。Ang-1 与 Tie-2 结合促进血管生成，Ang-2 似乎通过阻止 Ang-1 与 Tie-2 受体的结合而拮抗 Ang-1 的功能^[45-47]。此外 Ang-2 还可以通过结合整合素介导 Tie-2 阴性内皮细胞的血管生成过程^[47]。Ang-1 是血管成熟的关键因素，它介导内皮细胞的迁移，粘附和存活，而 Ang-2 破坏内皮细胞与血管周细胞之间的连接，与血管不稳定有关^[45, 46]。在血管生成小鼠模型中，Ang-2 抗体不仅影响视网膜中央血管的重塑，它还影响了正在生长的视网膜血管网络边缘的尖端细胞出芽。Ang-2 抗体处理的小鼠幼鼠中的视网膜的尖端细胞数量显著减少^[47]。同样，Ang-2 也被鉴定为尖端细胞的标记基因^[48]。

本实验研究发现，过表达 miR-221-3p 导致缺氧条件下人心脏微血管内皮细胞 Ang-2 蛋白表达水平降低，抑制人心脏微血管内皮细胞的增殖和成管；转染 miR-221-3p 抑制剂可以导致缺氧条件下人心脏微血管内皮细胞 Ang-2 蛋白表达水平升高，促进人心脏微血管内皮细胞的增殖和成管。本实验还检测了在 CD34 阳性和阴性内皮细胞中表达差异最明显的两个尖端细胞标记基因 CD34、VEGFR2（见图 14）和最近鉴定的两个尖端细胞标记基因 IGF1R、IGF-2 的蛋白表达情况。过表达 miR-221-3p 可导致缺氧条件下人心脏微血管内皮细胞 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白表达水平降低，转染 miR-221-3p 抑制剂可以导致缺氧条件下人心脏微血管内皮细胞 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白表达水平升高。并且，缺氧条件下过表达 Ang-2 可以导致 CD34、IGF1R、IGF-2、VEGFR2 蛋白及 mRNA 表达水平升高。因此，miR-221-3p 可能靶向 Ang-2 抑制缺氧条件下人心脏微血管内皮细胞的不稳定和向尖端细胞的转化。targets can 7.2 靶点预测结果也支持 miR-221-3p 与 Ang-2 的靶向关系（见图 7）。

正常功能的新生血管可以滋养组织，而异常的血管生长是癌症以及缺血性和炎症疾病的标志，有助于疾病的发展^[11]。前者对心肌梗死后心功能的恢复是有益的，然而异常血管的新生却会导致血管渗漏，组织缺氧和水肿加重。有研究表明，连续血流左心室辅助装置患者 Ang-2 水平升高导致血管生成改变，并与更高的非手术出血相关^[49]。还有研究究表明，体外循环心脏手术后的微循环灌注紊乱与 Ang-2 水平增加相关^[50]。Seung-Jun Lee 等人的研究表明，Ang-2 在 小鼠心肌梗死边界区的内皮细胞中高表达，而且 Ang-2 可以通过拮抗 Ang-1/Tie-2 信号转导诱导梗死边界区内皮细胞与周细胞脱离，他们还证明源自内皮细胞的 Ang-2 可以拮抗内皮 Tie-2 磷酸化，并通过加剧血管渗漏和微血管灌注不足而加剧心脏缺氧和梗塞的进展^[51]。

综上所述，心肌梗死急性期 miR-221-3p 的上调对心肌梗死是有保护作用的，其机制可能是 miR-221-3p 靶向 Ang-2 抑制心肌梗死后的异常血管新生，从而减轻血管渗漏和微血管灌注不足。

4 结论

1、缺氧条件下 miR-221-3p 可能靶向 Ang-2 抑制心脏微血管内皮细胞向尖端细胞转化。

2、心肌梗死后 miR-221-3p 的上调对急性心肌梗死是有保护作用的，其机制可能是 miR-221-3p 靶向 Ang-2 抑制心肌梗死后的异常血管新生，从而减轻血管渗漏和微血管灌注不足。

致 谢

三年的研究生学习即将结束，回想这三年的点点滴滴，不由感慨时光飞逝！在这毕业论文完稿之际，有很多需要感谢的人！

首先感谢我的导师郑振中教授，感谢您在生活中予以我的关心和帮助！感谢您在学习上对我的悉心指导，无论是在是在毕业论文的选题、标书的撰写和论文的写作以及临床诊疗上都给予了我很多的帮助。在您的指导下，让我初步掌握了用科研技术和思维去探索临床疾病的重要方法。在临床工作中，您指导我掌握了心血管内科常见病多发病的基本诊治方法。感谢恩师对我的培养！同时，感谢吴豪研究员在科研上对我的引导和帮助！

此外，我还要感谢心血管内科郑泽琪教授、彭景添教授、彭小平教授，感谢其他帮助和指导过我临床学习的各位老师！

感谢研究所曾俊义、张婉、丁露老师对我实验方面提供的帮助和支持！

感谢李芳飞师兄和其他师兄师姐、同学及师弟师妹们的无私帮助！

感谢室友对我的关心和帮助！

感谢父母和家人的全力支持和理解！

感谢南昌大学第一附属医院和南昌大学！

杨青

2021 年 3 月 10 日

参考文献

- [1] DeFilippis AP, Chapman AR, Mills NL, et al. Assessment and Treatment of Patients With Type 2 Myocardial Infarction and Acute Nonischemic Myocardial Injury. *Circulation*. 2019;140(20):1661-78.
- [2] Chikwe J, Sun E, Hannan EL, et al. Outcomes of Second Arterial Conduits in Patients Undergoing Multivessel Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(18):2238-48.
- [3] Szummer K, Jernberg T, Wallentin L. From Early Pharmacology to Recent Pharmacology Interventions in Acute Coronary Syndromes: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(12):1618-36.
- [4] Petz A, Grandoch M, Gorski DJ, et al. Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury. *Circ Res*. 2019;124(10):1433-47.
- [5] Thijssen DHJ, Redington A, George KP, et al. Association of Exercise Preconditioning With Immediate Cardioprotection: A Review. *JAMA Cardiol*. 2018;3(2):169-76.
- [6] Lieder HR, Kleinbongard P, Skyschally A, et al. Vago-Splenic Axis in Signal Transduction of Remote Ischemic Preconditioning in Pigs and Rats. *Circ Res*. 2018;123(10):1152-63.
- [7] Fernandez-Jimenez R, Galan-Arriola C, Sanchez-Gonzalez J, et al. Effect of Ischemia Duration and Protective Interventions on the Temporal Dynamics of Tissue Composition After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2017;121(4):439-50.
- [8] Cheng YF, Chang YT, Chen WH, et al. Cardioprotection induced in a mouse model of neuropathic pain via anterior nucleus of paraventricular thalamus. *Nat Commun*. 2017;8(1):826.
- [9] Heallen TR, Kadow ZA, Kim JH, et al. Stimulating Cardiogenesis as a Treatment for Heart Failure. *Circ Res*. 2019;124(11):1647-57.
- [10] Ganta VC, Choi M, Farber CR, et al. Antiangiogenic VEGFb Regulates Macrophage Polarization via S100A8/S100A9 in Peripheral Artery Disease. *Circulation*. 2019;139(2):226-42.
- [11] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87.
- [12] Falcon BL, Chintharlapalli S, Uhlik MT, et al. Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents. *Pharmacol Ther*. 2016;164:204-25.
- [13] Qin B, Lu Z. GW29-e0289 Regulatory role of microRNA-150 in the angiogenesis of senescent endothelial cells. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(16):C79-C80.

- [14] Arora S, Rana R, Chhabra A, et al. miRNA-transcription factor interactions: a combinatorial regulation of gene expression. *Mol Genet Genomics*. 2013;288(3-4):77-87.
- [15] Schober A, Weber C. Mechanisms of MicroRNAs in Atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:583-616.
- [16] Lu D, Thum T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019.
- [17] Trabucchi M, Mategot R. Subcellular Heterogeneity of the microRNA Machinery. *Trends Genet*. 2019;35(1):15-28.
- [18] Leonetti A, Assaraf YG, Veltsista PD, et al. MicroRNAs as a drug resistance mechanism to targeted therapies in EGFR-mutated NSCLC: Current implications and future directions. *Drug Resist Updat*. 2019;42:1-11.
- [19] Caputo M, Saif J, Rajakaruna C, et al. MicroRNAs in vascular tissue engineering and post-ischemic neovascularization. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;88:78-91.
- [20] Mayoral RJ, Pipkin ME, Pachkov M, et al. MicroRNA-221-222 regulate the cell cycle in mast cells. *J Immunol*. 2009;182(1):433-45.
- [21] Ergun S, Tayeb TS, Arslan A, et al. The investigation of miR-221-3p and PAK1 gene expressions in breast cancer cell lines. *Gene*. 2015;555(2):377-81.
- [22] Xie Y, Gou Q, Xie K, et al. ADAMTS6 suppresses tumor progression via the ERK signaling pathway and serves as a prognostic marker in human breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(38):61273-83.
- [23] Abak A, Amini S, Estiar MA, et al. Analysis of miRNA-221 Expression Level in Tumors and Marginal Biopsies from Patients with Breast Cancer (Cross-Sectional Observational Study). *Clin Lab*. 2018;64(1):169-75.
- [24] Wu Q, Ren X, Zhang Y, et al. MiR-221-3p targets ARF4 and inhibits the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(4):1162-70.
- [25] Zhou CF, Ma J, Huang L, et al. Cervical squamous cell carcinoma-secreted exosomal miR-221-3p promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by targeting VASH1. *Oncogene*. 2019;38(8):1256-68.
- [26] Zhang K, Liang Y, Feng Y, et al. Decreased epithelial and sputum miR-221-3p associates with airway eosinophilic inflammation and CXCL17 expression in asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018;315(2):L253-L64.
- [27] Nikulin SV, Gerasimenko TN, Shilin SA, et al. Comparison of Profiles of Extracellular MicroRNA Secreted by Caco-2 Cells from the Apical Side of the Membrane under Static and Microcirculation Conditions. *Bull Exp Biol Med*. 2019;166(5):626-30.
- [28] Zhang X, Shao S, Geng H, et al. Expression profiles of six circulating microRNAs critical to atherosclerosis in patients with subclinical hypothyroidism: a clinical study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):E766-74.
- [29] Zhuang X, Li R, Maimaitijiang A, et al. miR-221-3p inhibits oxidized low-density

- lipoprotein induced oxidative stress and apoptosis via targeting a disintegrin and metalloprotease-22. *J Cell Biochem*. 2019;120(4):6304-14.
- [30] Pereira-da-Silva T, Coutinho Cruz M, Carrusca C, et al. Circulating microRNA profiles in different arterial territories of stable atherosclerotic disease: a systematic review. *Am J Cardiovasc Dis*. 2018;8(1):1-13.
- [31] Verjans R, Peters T, Beaumont FJ, et al. MicroRNA-221/222 Family Counteracts Myocardial Fibrosis in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Hypertension*. 2018;71(2):280-8.
- [32] Ward JA, Esa N, Pidikiti R, et al. Circulating Cell and Plasma microRNA Profiles Differ between Non-ST-Segment and ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Fam Med Med Sci Res*. 2013;2(2):108.
- [33] Coskunpinar E, Cakmak HA, Kalkan AK, et al. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction. *Gene*. 2016;591(1):90-6.
- [34] Zhou Y, Richards AM, Wang P. MicroRNA-221 Is Cardioprotective and Anti-fibrotic in a Rat Model of Myocardial Infarction. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2019;17:185-97.
- [35] Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest*. 2004;114(7):898-907.
- [36] Nicoli S, Knyphausen CP, Zhu LJ, et al. miR-221 is required for endothelial tip cell behaviors during vascular development. *Dev Cell*. 2012;22(2):418-29.
- [37] Wang D, Tian L, Lv H, et al. Chlorogenic acid prevents acute myocardial infarction in rats by reducing inflammatory damage and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2020;132:110773.
- [38] Srikanth G, Prakash P, Tripathy N, et al. Establishment of a rat model of myocardial infarction with a high survival rate: A suitable model for evaluation of efficacy of stem cell therapy. *Journal of stem cells & regenerative medicine*. 2009;5(1):30-6.
- [39] Litvinukova M, Talavera-Lopez C, Maatz H, et al. Cells of the adult human heart. *Nature*. 2020;588(7838):466-72.
- [40] Dallinga MG, Yetkin-Arik B, Kayser RP, et al. IGF2 and IGF1R identified as novel tip cell genes in primary microvascular endothelial cell monolayers. *Angiogenesis*. 2018;21(4):823-36.
- [41] Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87(1).
- [42] Fackler MJ, Krause DS, Smith OM, et al. Full-Length But Not Truncated CD34 Inhibits Hematopoietic Cell Differentiation of M1 Cells. *Blood*. 1995;85(11):3040-7.
- [43] van Beijnum JR, van der Linden E, Griffioen AW. Angiogenic profiling and comparison of immortalized endothelial cells for functional genomics. *Exp Cell Res*. 2008;314(2):264-72.
- [44] Song F, Zhou XX, Hu Y, et al. The Roles of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein Family in Development and Diseases. *Adv Ther*. 2021;38(2):885-903.
- [45] Reiss Y, Droste J, Heil M, et al. Angiopoietin-2 impairs revascularization after limb ischemia. *Circ Res*. 2007;101(1):88-96.

- [46] Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 2013;328(1):18-26.
- [47] Felcht M, Luck R, Schering A, et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest.* 2012;122(6):1991-2005.
- [48] Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, et al. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis.* 2012;15(1):151-63.
- [49] Tabit CE, Chen P, Kim GH, et al. Elevated Angiopoietin-2 Level in Patients With Continuous-Flow Left Ventricular Assist Devices Leads to Altered Angiogenesis and Is Associated With Higher Nonsurgical Bleeding. *Circulation.* 2016;134(2):141-52.
- [50] Dekker NAM, van Leeuwen ALI, van Strien WWJ, et al. Microcirculatory perfusion disturbances following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass are associated with in vitro endothelial hyperpermeability and increased angiopoietin-2 levels. *Critical care (London, England).* 2019;23(1):117.
- [51] Lee S-J, Lee C-K, Kang S, et al. Angiopoietin-2 exacerbates cardiac hypoxia and inflammation after myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2018;128(11):5018-33.

综 述

miR-221 和心血管疾病相关性研究

杨青（综述） 郑振中（审校）

摘要：MicroRNAs(MiRNAs)是一种小的单链 RNA 分子。虽然 miRNAs 不能像 mRNA 一样翻译成蛋白质，但它们以只占人类基因组中的一小部分却调节超过 30%的蛋白质编码基因。随着越来越多的 miRNAs 的发现，其生理和病理功能也逐渐被揭示。然而，由于其调控靶点并不只有一个，有些 miRNA 调控靶点多达数十个甚至数百个，要充分了解它们的分子机制将是一个巨大的工程。虽然在多数情况下其调控过程是由多种 miRNAs 共同完成的，但是单独的强化某一种 miRNA 的表达已被证明对机体或疾病某一方面的病理生理过程的影响是突出的。miR-221 作为 miRNA 的成员，目前的研究已经将其与癌症进展、炎症、代谢紊乱、心脏病等联系起来。为了提高对它在心血管疾病中作用的认识，我们有必要对其在心血管疾病中的作用进行系统综述。通过归纳、整合目前已经发表的研究，我们发现它广泛参与心血管疾病的病理生理过程，与心力衰竭、心脏瓣膜病、心肌梗死、肺动脉高压、糖尿病心血管并发症等心血管疾病联系密切，其机制可能是参与动脉粥样硬化、心肌纤维化、血管生成和代谢紊乱的过程。通过 Funrich3.13 软件将已发表的研究中已经验证的 miR-221-3p 靶基因集合，然后富集分析，结果显示 miR-221-3p 主要与血管生成素受体-Tie2 通路、AP-1 转录因子网络、整合素激酶信号等通路有关，主要参与细胞通讯、信号转导、核酸代谢、蛋白质代谢等生物学过程。miR-221 可能是心血管疾病防治的重要靶点。

关键词：miR-221/-3p ； miRNAs ； 心血管疾病；

Abstract: MicroRNAs(miRNAs) are small single-stranded RNA molecules. Although miRNAs cannot be translated into proteins like mRNA, they regulate more

than 30% of protein-coding genes in a small proportion of the human genome. As the number of microRNAs expands, the biological behaviour in which they are involved is being revealed. However, since there is more than one regulatory target for miRNA, and some regulatory targets can be as many as dozens or even hundreds, it will be a huge project to fully understand its molecular mechanism. miR-221 is one of miRNAs. Current research has linked it to cancer progression, inflammation, blood disorders, heart disease and more. In order to improve the understanding of its role in cardiovascular disease, it is necessary to conduct a systematic review of its role in cardiovascular disease. By integrating existing published studies, we found that it is widely involved in the pathophysiological process of cardiovascular disease, and is associated with heart failure, valvular heart disease, myocardial infarction, pulmonary hypertension, diabetic cardiovascular complications and other cardiovascular diseases. The mechanism may be involved in the processes of atherosclerosis, myocardial fibrosis, angiogenesis and metabolic disorders. The target genes of miR-221-3p that have been verified in published studies were collected and then enriched by Funrich3.13 software. It was found that miR-221-3p was mainly related to the angiopoietic receptor-Tie2 pathway, AP-1 transcription factor network, integrin kinase signaling and other pathways. It is mainly involved in cell communication, signal transduction, nucleic acid metabolism, protein metabolism and other biological processes. miR-221 may be an important target for the prevention and treatment of cardiovascular diseases.

Key words: miR-221/-3p; miRNAs; cardiovascular disease;

MicroRNA (miRNAs) 是一类内源性单链 RNA 分子, 长度约为 22 个核苷酸。它由最原始的 pri-miRNA (初级转录本) 组成, 由 Drosha 分离。主环基部附近的 RNase III 内切酶将两茎分离成长度约为 80 个碱基的 pre-miRNA (MicroRNA 前体), 然后 pre-miRNA 被 Dicer 消化成为长度约为 22 个核苷酸的成熟 miRNA。虽然 miRNAs 是不能进一步翻译为蛋白质的小分子 RNA, 但它们可以特异性结合靶 mRNA, 从而间接抑制转录后基因的表达。据报道, 它只占不到人类基因组的 16%, 但却控制着不少于 30% 的蛋白质编码基因^[1]。miRNAs 比 mRNA 更

稳定，能够抵抗核糖核酸酶的作用，使其被认为能够作为某些疾病的生物标记物^[2-4]。miRNAs 参与复杂的病理生理过程，与细胞信号转导、发育、增殖、分化和死亡密切相关^[5]。

miR-221 定位于 X 染色体，其 3p 端碱基序列描述为 5'agcuacauugucugcuggg-uuuc3'，5p 端 5'accuggcauacaauguagauuucugu3'^[6]。已有研究表明，miR-221/-3p 与心血管疾病密切相关。在这篇综述中，我们总结了它在心血管疾病中的作用靶点(表 1)，并根据目前已发表的研究介绍了它在心血管和心血管相关疾病中的作用，发现它广泛参与心血管疾病的调节。

1.miR-221 与心血管疾病

1.1 miR-221 与心力衰竭

慢性心力衰竭常伴有心脏结构和功能的改变，导致各种心力衰竭症状。microRNAs 在心肌肥厚和纤维化中发挥重要作用，受到人们的广泛关注。miR-221 在心肌肥厚患者的组织中上调^[7-9]。体外通过转染 miR-221 模拟物而过表达 miR-221 会增大心肌细胞的大小^[7]。过表达 miR-221 导致小鼠出现心功能不全和心力衰竭^[10]。它还被认为可作为评价 HOCM 心肌肥厚和纤维化^[9]的生物标志物，并与心脏肥厚^[8]患者猝死风险相关，可能是心肌肥厚新的干预靶点^[7]和心力衰竭的治疗靶点^[10]。

表 1 miR-221 在心血管疾病中的相关靶点

疾病/病理	组织/细胞	靶点	作用	参考文献
糖尿病心肌病	老鼠心脏	p27	加剧疾病进展	Qian, L.B., et al (2017) 29
肺动脉高压	肺/肺动脉平滑肌细胞 (老鼠和人)	AXIN2	促进细胞增殖	Nie, X., et al (2019)
动脉粥样硬化	人脐静脉内皮细胞	AdipoR1	调节内皮炎症反应	Chen, C.F., et al (2015)
动脉粥样硬化	血管内皮祖细胞	PAK1	抑制 EPCs 增殖	Zhang, X., et al (2013)
动脉粥样硬化	RAW264.7 巨噬细胞	ADAM22	抑制 ox - LDL 诱导的 泡沫细胞形成	Zhuang, X., et al (2019)
脂质代谢疾病	脂肪细胞	ANGPTL8	调节脂肪细胞中 ANGPTL8 的表达	Mysore, R., et al(2017)
血管生成	斑马鱼胚胎	PIK3R1 和 CDKN1b	促进的尖端细胞行为	Nicoli, S., et al(2012)
GATA2-缺失 性血管疾病	人脐静脉内皮细胞	ICAM1 和 ETS1	抑制血管生成	Hartmann, D., et al (2016)
血管生成	人脐静脉内皮细胞	ZEB2	上调 GAX /抑制血管 生成	Chen, Y., et al (2010)

1.2 miR-221 与心肌梗死

心肌梗死(MI)病理定义为心肌缺血时间延长(心肌供氧不足), 导致心肌细胞死亡^[11]。急性心肌梗死(AMI)的死亡率在过去是很高的, 但在最近几十年, 新的和有效的治疗方法的引进大大降低了急性冠状动脉综合征(ACS)的住院死亡率。因此, 急性心肌梗死的早期发现和及时治疗, 取决于如何更早、更准确地作出诊断。科学家们正试图将他们的研究转向比 mRNAs 更稳定的 microRNAs。microRNAs 被定义为冠状动脉疾病(CAD)诊断的有前途的生物标志物^[12]。Sanlialp M 和 Jia QW 等人发现, 冠心病患者的循环中 miR-221 水平低于对照组^[12, 13], 但 Ward JA 等人表明在急性冠脉综合征患者中显著增高^[14, 15], 与肌钙蛋白、GRACE 和 Synthax 评分正相关^[14], 血液中 miR-221-3p 可作为急性心肌梗死早期预测的新标志物^[14]。此外, Jia QW 等人证明血液中低水平 miR-221 是冠心病的

一个潜在危险因素^[13],与冠心病患者的高发病率风险增加有关^[16]。miR-221 在心肌梗死后的治疗和心功能保护中也发挥着重要作用。干细胞治疗心肌梗死是一种很有前途的新治疗方法。miR-221 等 microRNAs 可以提高移植心脏祖细胞的着床率和治疗缺血性心脏病的疗效^[17]。miR-221 还可以增强心肌细胞的存活,降低远端心肌梗死面积和梗死范围,保护心肌梗死后的心功能^[18]。

1.3 miR-221 与心脏瓣膜病

瓣膜病的主要病因是瓣膜病变的年龄相关性钙化和遗传性或先天性病变。瓣膜性疾病药物治疗效果有限,主要依靠手术治疗。一些研究通过分析 microRNA 的表达谱,探索新的治疗方法^[19-21]。进展期主动脉瓣病变的 miRNA 表达谱与对照组有显著差异,其中 miR-221-3p 在主动脉瓣狭窄患者的瓣膜组织中上调^[19]。主动脉瓣二瓣化(BAV)是最常见的先天性主动脉瓣畸形,与升主动脉功能障碍和扩张有关。miR-221-3p 的表达受主动脉扩张程度的调节,主动脉扩张严重时 miR-221-3p 水平升高^[20]。风湿性心脏病患儿外周血的 microRNA 表达谱与正常儿童也存在差异,miR-221-3p 的表达水平低于对照组^[21]。这些研究表明 miR-221-3p 的表达水平与瓣膜病相关,但具体机制尚未进一步研究。

1.4 miR-221 与病毒性心肌炎

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VM)是由柯萨奇病毒、腺病毒、流感病毒等感染引起的一种直接或间接的心脏炎症性损伤疾病。它是年轻人心力衰竭和心源性猝死的重要原因,也是扩张型心肌病的原因。关于 miR-221 与病毒性心肌炎的研究较少,目前只发现了一项相关研究。结果显示,在柯萨奇病毒 B3 (CVB 3)引起的急性 VM 中,miR-221 和 miR-222 水平显著升高,抑制 miR-221/-222 可增加心肌病毒载量,延长病毒状态,严重加重心脏损伤和炎症。miR-221/-222 参与心脏病毒感染的抗病毒和炎症免疫反应^[22]。

1.5 miR-221 与肺动脉高血压

肺动脉高压定义为静息状态下,右心导管测量的肺动脉平均压 $\geq 25\text{mmHg}$ ^[23]。2008 年世界卫生组织第四届肺动脉高压会议将肺动脉高压分为动脉性肺动脉高

压(pulmonary arterial hypertension, PAH)、左心疾病引起的肺动脉高压、肺部疾病和/或缺氧引起的肺动脉高压、慢性血栓栓塞性肺动脉高压(chronic thromboembolic pulmonary hypertension, CTEPH)和多因素机制不明的肺动脉高压。PAH是指孤立的肺动脉压力的增加,而左心房及肺静脉的压力是正常的,这主要是由于肺小动脉本身,和不伴有引起肺动脉高压的慢性呼吸道疾病,慢性血栓栓塞疾病和其他未知因素^[24]。肺动脉高压的特征是肺动脉平滑肌细胞过度增殖和迁移^[25, 26]。miR-221-3p 或 miR-221 在 PAH 患者^[26]或在肺动脉高压右心室肥厚大鼠模型中表达上调^[27]。miR-221 在肺气道发展中发挥重要作用,抑制 miR-221 表达可使肺近端气道分支和远端气道分支增加,末端气道分支尖端变窄。miR-221 也参与肺血管床的发育,将 miR-221 转染内皮细胞可以减缓内皮细胞的迁移,过表达 miR-221 抑制血管的发育,限制内皮细胞的投射^[28]。miR-221 还调节肺动脉平滑肌细胞的增殖和迁移^[25, 26]。miR-221 靶向 AXIN2 轴抑制蛋白 2 调节 PASMC 的增殖^[25]。lncRNA-Ang362(Inc-Ang362)通过促进 miR-221 和 miR-222 的表达调控人肺动脉平滑肌细胞的生物学功能^[26]。

1.6 miR-221 与糖尿病心血管并发症

糖尿病心血管并发症是糖尿病患者死亡的主要原因,其病理机制主要是心肌病和内皮功能障碍^[29]。miR-221 在这一病理过程中发挥着重要作用。1 型糖尿病小鼠经血管紧张素 II (Ang II)治疗后,miR-221 的磷酸化水平升高,p27 的表达降低,而 p27 是 miR-221 的直接靶点,可加重糖尿病引起的心功能障碍和肥厚。Ang II 可通过激活 JKN/c-jun/miR-221 轴和抑制下游自噬而加速小鼠糖尿病早期心肌肥厚,这与 JNK/c-jun 的激活和随后 miR-221 介导的自噬抑制有关。这提示 miR-221 可能是糖尿病性心肌病(DCM)的治疗靶点^[29]。

miR-221 也与糖尿病内皮功能障碍相关^[30, 31]。miR-221 在糖尿病视网膜病变(DR)患者内皮祖细胞(EPCs)中的表达高于无 DR 患者^[30]。在高血糖条件下,可以诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中 miR-221 表达增加,从而导致 c-kit 抑制和 HUVECs 迁移损伤。调控 miR-221-c-kit 通路可能是治疗糖尿病患者血管功能障碍的新策略。^[31]

此外,糖尿病还伴有动脉 miR-221/222 表达升高,可促进内膜增厚^[32]。miR-221 下调抑制糖尿病巨噬细胞条件培养基(DM-MCM)诱导的血管平滑肌细胞增殖^[33]。

1.7 miR-221 与妊娠期心血管并发症

妊娠并发症可引起孕妇外周血和胎盘组织中 miRNA 表达谱的变化。在需要 34 周提前终止妊娠的先兆子痫和宫内生长受限妇女血液中 miR-221-3p 下调^[34]。妊娠期高血压与 miR-221-3p 上调相关^[35]。miR-221-3p 在子痫前期胎盘组织^[36] 还有脐带血^[37] 中表达下调。过表达 miR-221-3p 可促进滋养细胞(htr-8 /SVneo 细胞)的生长、侵袭和迁移,负向调节 htr-8 /SVneo 细胞中 THBS 2 的表达^[36]。miR-221-3p 在孕妇产后第一年内血浆表达下降,而其他在产后表达有显著差异的 miRNA 在产后一年内基本消失。miR-221-3p 表达的持续差异可能与持续性产后炎症有关^[38]。

1.8 miR-221 与其他血管疾病

miR-221 也参与多种血管疾病,如血管术后再狭窄^[39, 40],胸、腹主动脉瘤^[41, 42],和下肢动脉硬化闭塞症^[43]。

大鼠颈动脉血管成形术后,miR-221 在血管平滑肌细胞(VSMC)中表达上调,miR-221 和 miR-222 通过靶向 p27(Kip 1)和 p57(Kip 2)介导 VSMC 的生长。相反,敲除 miR-221 和 miR-222 可以抑制血管平滑肌细胞的增殖和血管成形术后新内膜的形成^[39]。透析患者介入血管成形术后再狭窄组织中 miR-221 表达上调,血管成形术后 2 天血液循环中 miR-221 水平显著升高^[40]。

胸主动脉瘤和腹主动脉瘤的 miRNA 表达谱不同,miR-221 在胸主动脉标本中表达上调,而腹主动脉中 miR-221 水平与对照组无差异,且 miR-221 参与了人胸主动脉的发育^[42]。有趣的是,miR-221 水平在大鼠腹主动脉瘤模型中却是上调的^[41]。

有研究表明,miR-221 基因海绵治疗在体外可显著降低 miR-221 在 VSMC 中的表达,抑制移植静脉内膜增生,可能为预防静脉移植失败提供一种新的基因治疗方法^[44]。

2. miR-221 介导心血管疾病的机制

2.1 miR-221 在动脉粥样硬化中的作用

动脉粥样硬化与循环 miRNA 的变化有关^[45, 46], 在不同位置的循环 miRNA 也有差异。miR-221-3p 包含在这些不同动脉粥样硬化疾病位点的常见 microRNA 谱中^[46], 并且 miR-221-3p 与动脉粥样硬化相关^[45]。在动脉粥样硬化斑块发展的不同阶段, miR-221 的表达水平也存在差异。miR-221 在动脉粥样硬化斑块早期显著下调^[47], 而与健康血管组织相比, 动脉粥样硬化斑块中 miR-221 表达上调^[48]。内皮细胞、血管平滑肌细胞和泡沫细胞在动脉粥样硬化过程中发挥重要作用。miR-19b /221/222 可引起人主动脉内皮细胞(HAECs)的线粒体功能障碍, 并通过靶向抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活物 1 α (Pgc-1)^[49]。miR-221/222 通过靶向 ETS1 间接调节内皮细胞炎症分子的表达^[50], 其中, miR-221 单独靶向脂联素受体 1 (AdipoR1), 抑制其抗动脉粥样硬化作用, 从而调节内皮细胞的炎症反应^[51]。既往研究表明, 内皮祖细胞(EPCs)在内皮细胞修复中发挥重要作用, miR-221 通过靶向 PAK1 抑制内皮祖细胞增殖, 从而促进动脉粥样硬化^[52]。也就是说, miR-221 可以通过抑制内皮细胞修复途径促进动脉粥样硬化。

此外, 来源于人主动脉平滑肌细胞(HAoSMCs)的外泌体 miR-221/222 也可以通过 PTEN/Akt 信号通路影响内皮细胞的自噬功能, 从而影响动脉粥样硬化的进展^[53]。在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的研究中, 脂肪组织分泌的 miR-221-3p 可被 VSMCs 吸收, 进而促进其增殖和迁移, 介导血管重建^[54]。miR-221/222 也在 VSMCs 的钙化调节中发挥作用, 因为它调节细胞中无机焦磷酸盐的水平^[55]。另一项研究表明, miR-221-3p 还可以靶向金属蛋白酶 22(ADAM 22)抑制氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的泡沫细胞的形成和凋亡^[56]。

有趣的是, 抗胆固醇药物可影响动脉粥样硬化患者 miRNAs 的表达, 如阿托伐他汀、辛伐他汀和依折麦布, 可降低 miR-221 在患者中的表达^[57]。阿托伐他汀除了降低 miR-221/222 水平外, 还可增加患者循环内皮祖细胞的数量^[58]。

2.2. miR-221 在心肌纤维化中的作用

许多心血管疾病最终会导致心肌纤维化, 如酒精性心肌病、高血压、心肌

梗死等。miR-221 也与心肌纤维化密切相关。miR-221/222 家族可能在超负荷导致的心脏纤维化进程中发挥重要作用，它的表达与心肌纤维化程度负相关，其机制可能是 miR-221/222 的表达削弱了 TGF- β 诱导的纤维信号转导^[59]。酒精性心肌病小鼠模型中 miR-221 的表达水平明显高于对照组。在酒精性心肌病中，miR-221 参与心肌纤维化的机制可能与 TGF- β 和 PI3K/AKT 信号通路有关，而外源性 H₂S 治疗可降低 miR-221 的表达水平，改善长期饮酒引起的心肌纤维化^[60]。

由于 miR-221 与心肌纤维化密切相关，Huang, D. et al 分析了 42 例肥厚性梗阻性心肌病(HOCM)患者血浆和心脏组织中 microRNAs 的表达。结果显示，循环 miR-221 与心肌纤维化和心肌肥厚显著相关，循环 miR-221 可作为 HOCM 心肌肥厚和心肌纤维化的生物标志物^[9]。此外，在大鼠心肌梗死的实验模型中发现 miR-221 具有心脏保护和抗纤维化作用。其机制是，miR-221 可显著抑制心肌成纤维细胞(cFBs)中 smad-3 的磷酸化，而 smad-3 在 TGF- β 信号的激活导致纤维化中发挥关键作用，miR-221 还可降低 α -SMA 的表达和胶原蛋白的分泌^[18]。

2.3. miR-221 与肥胖的关系

肥胖对新陈代谢和心血管的影响从儿童时期就开始了，所以预防应该尽早开始^[61, 62]。miRNAs 在生命早期就开始调节代谢，研究表明，miRNAs 不仅在肥胖和正常体重女性的新生儿中表达情况不同^[61]，肥胖儿童和瘦儿童也不一样^[61, 63]，miR-221 就是其中之一。除了母亲肥胖对儿童代谢紊乱的影响，其他研究表明，产后过度喂养也是儿童肥胖的帮凶，因为产后过度喂养导致肝脏中 miR-221 过表达，影响 PI3K/AKT 信号通路，导致胰岛素抵抗，这是肥胖的危险因素^[64]。miR-221-3p 被发现在血管周围脂肪组织的细胞外囊泡中高度富集，可靶向降低脂质代谢关键调控因子 ANGPTL8 蛋白^[54, 65]。

2.4. miR-221 与内皮细胞和血管生成的关系

miR-221 是内皮细胞中高表达的 miRNAs 之一，被认为与内皮细胞的增殖、迁移和血管生成密切相关^[66-76]。关于 miR-221 在血管生成中的作用和机制的看法并不一致，或者说应该说不很清楚。在一项斑马鱼的研究中，miR-221 与血管生成过程中起重要作用的尖端细胞的活性密切相关，它的缺失导致斑马鱼胚胎的尖端细胞无法分裂，最终导致胚胎血管发育的缺陷。这可能是 miR-221 靶向抑

制新生内皮细胞中 PIK3R1 和 CDKN1B 的作用^[66]。然而,在其他体外细胞研究中,miR-221 被认为可以抑制内皮细胞的活性^[68, 70-72, 76],甚至是对内皮细胞起到稳定和保护作用^[67, 73]。miR-221/222 通过靶向 ETS-1 和 p21 降低氧化低密度脂蛋白(ox-ldl)介导内皮细胞死亡^[67]。虽然 miR-221/222 属于同一家族,但它们的靶点不同,有研究表明,miR-221 和 mir-222 分别靶向 ETS-2 和 ETS-1 抑制内皮细胞迁移从而起到抗血管生成的作用^[74]。此外,miR-221 可以靶向 PIK3R1 调节内皮细胞和内皮祖细胞之间的血管生成活性^[76]。miR-221 的表达与转录因子 GATA2 相关。GATA2 的沉默会增加 miR-221 的表达,从而靶向血管生成基因 ICAM 1 和 ETS-1 的表达,从而抑制血管生成^[68]。miR-221 也可以通过下调 ZEB2 来增加抗血管生成的同源盒基因 GAX 的表达,从而抑制血管生成^[71]。另外,miR-221 和 mir-222 还可以通过调节干细胞因子(SCF)及其受体 c-kit 水平来调节体外血管生成过程^[69]。

2.5. miR-221 与体育锻炼

个体化、科学合理的运动有益于健康^[77]。MicroRNAs 广泛参与代谢活动,也受到运动的影响。运动训练后 microRNAs 表达水平的变化已被研究者发现^[77-82]。miR-221 是众多受影响的 microRNAs 之一。运动可以分为急性耗竭运动、慢性耐力运动和规律运动,这些运动方式对心血管相关 microRNAs 的影响是不同的^[77-79, 82]。急性运动诱导的 miR-221 水平变化更大^[78]。慢性耐力训练可以上调 miR-221,急性运动则下调 miR-221^[77],而在规律的运动中,miR-221 也被上调^[82]。运动引起的 microRNAs 的变化水平也与受试者的肥胖程度有关,肥胖患者的 microRNAs 在运动后变化更大^[81]。miR-221 的变化也与运动能力指标显著相关^[77]。在心力衰竭小鼠模型中,有氧运动后 17 个 miRNAs,包括 miR-221,显著升高,而且结果表明有氧运动降低了心脏重构和改善心功能^[83]。分析这些显著改变 miRNAs 的靶基因,揭示了这些 miRNAs 参与了多种基因和不同生物通路的调控。可以想象,这些 miRNAs 对心血管系统有重大影响。^[82]

表 2 miR-221-3p 在疾病中作为生物标志物

疾病	样本	表达水平(与 对照组比较)	生物标记	参考文献
急性心肌梗死	血浆	上调	早期预测	Coskunpinar, E., et al 2016
围手术期患者情 绪低落	血清	上调	早期预测	Feng, J et al 2019
乳腺癌	肿瘤组织	上调	诊断和预判病情	Abak, A et al 2018
前列腺癌	肿瘤组织	上调	预判病情	Kristensen, H. et al 2016
转移性肾细胞癌	肿瘤组织	上调	抗血管生成药物反 应的预测	Garcia-Donas, J. et al 2016
胰腺癌	肿瘤组织和 血液	上调	诊断和预判病情	Li, F. et al 2018
肝细胞癌	肿瘤组织	上调	预测肝细胞癌进展	de Conti, A. et al 2017
甲状腺乳头状癌	血清	上调	甲状腺癌复发	Rosignolo, F. et al 2017
宫颈鳞状细胞癌	宫颈鳞状细 胞癌外泌体	上调	诊断	Wu, X.G. et al 2019
弥漫大 B 细胞淋 巴瘤	肿瘤组织	下调或不变	分级	Larrabeiti-Etxebarria, A. et al 2019
免疫性血小板减 少症	血浆	上调	诊断和预后	Garabet, L. et al 2019
支气管哮喘	上皮脱落细 胞和痰液	下调	哮喘的气道嗜酸性 炎症反应	Zhang, K. et al 2018
苯中毒	血浆	下调	暗示苯暴露	Liu, Y. et al 2016

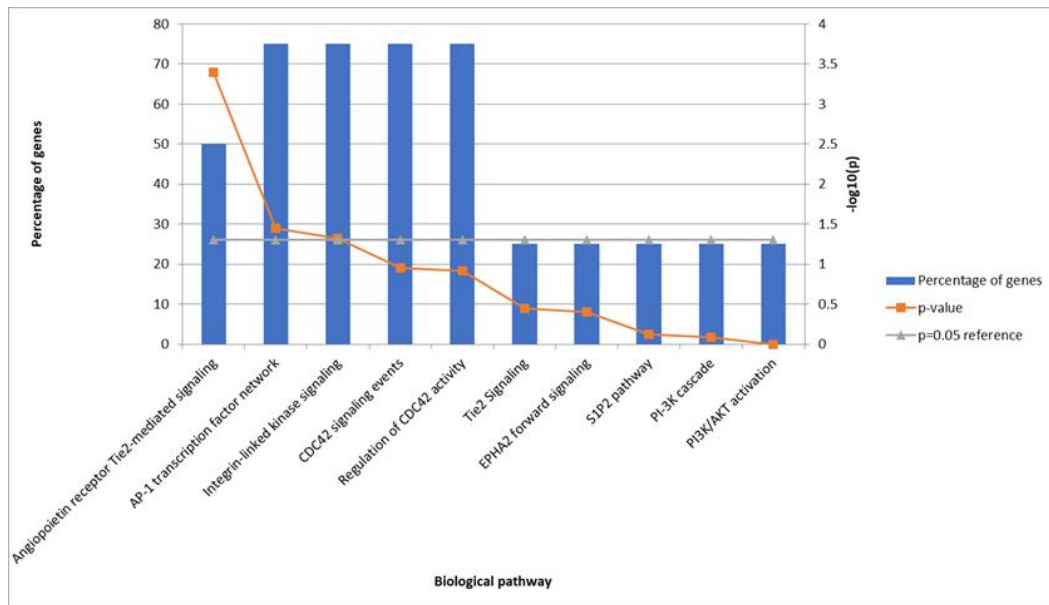


图 1 miR-221-3p 靶基因生物通路分析

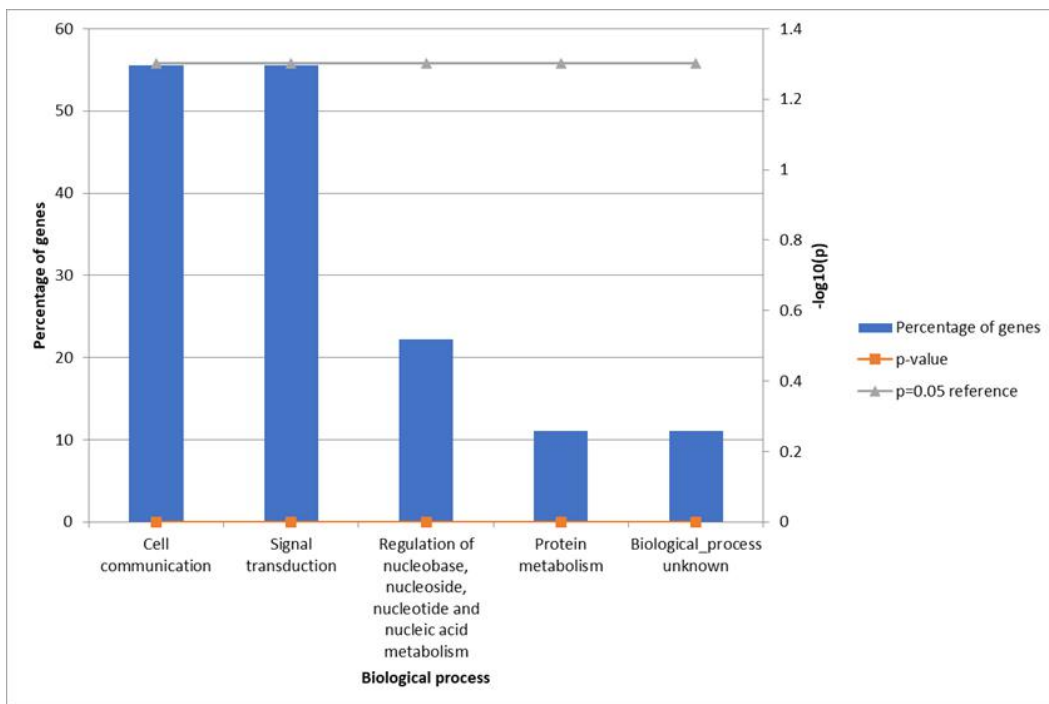


图 2 miR-221-3p 靶基因生物学过程分析

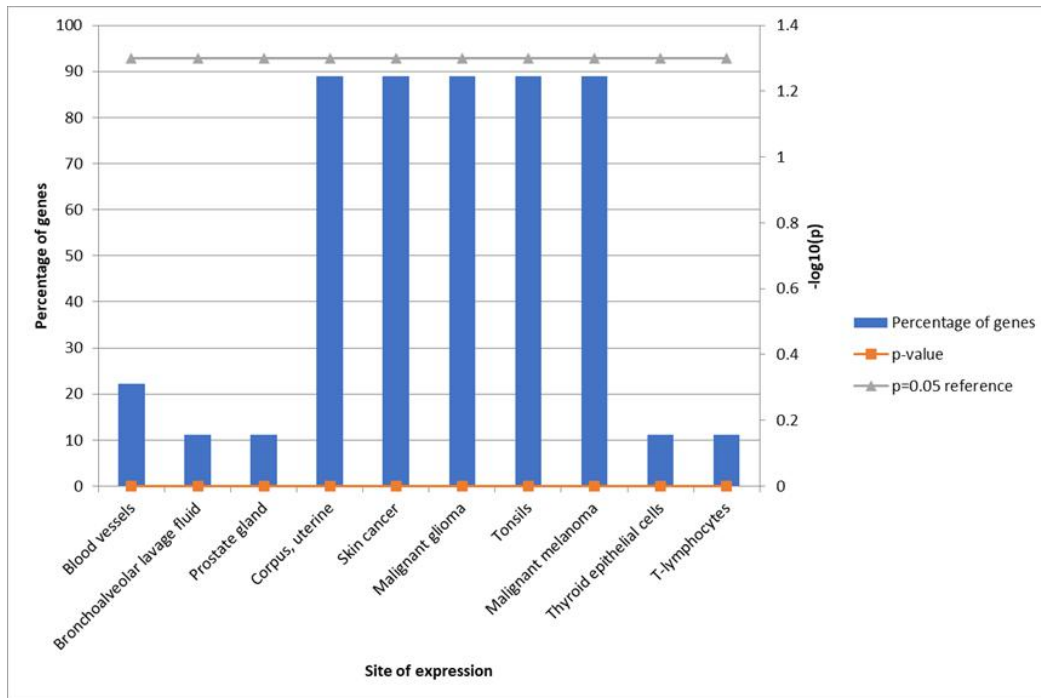


图3 miR-221-3p 靶基因表达定位分析

讨论

miR-221/-3p 在心血管疾病中起着非常重要的作用。它与心力衰竭、心脏瓣膜病、心肌梗死、肺动脉高压、糖尿病心血管并发症等心血管疾病联系密切。其机制可能是参与动脉粥样硬化、心肌纤维化、血管生成和代谢紊乱的过程。

由于 miRNAs 的调控机制涉及到一个大的网络，目前包括 miR-221/-3p 在内的 miRNAs 的完整机制尚不清楚。在目前对 miRNAs 的研究中，许多科学家倾向于将其作为诊断或鉴定疾病的标记物。同样，miR-221-3p 也被报道作为急性心肌梗死早期诊断的生物标志物^[14]。然而，我们发现 miR-221-3p 在其他疾病中也有作为生物标志物的报道(表 2)。不仅如此，还有药物^[57, 58]、运动也可以影响 miR-221 的表达水平^[77, 78, 83]。因此，在将来的临床应用中应该个体化考虑、准确的评估。

miR-221 在血管生成的体外研究中被认为具有抑制血管生成的作用，但有报道称，miR-221 是斑马鱼胚胎血管生成过程中促进血管生成的必要且重要的调节因子^[66]。在肿瘤研究中，miR-221 被认为在肿瘤的侵袭和转移中具有促进淋巴管

生成和肿瘤转移的作用^[84]。因此,在脉管生成和心血管调节机制方面,miR-221可能涉及一个有待发现的更大的调控网络。

通过Funrich3.13软件将已发表的研究中已经验证的miR-221-3p靶基因集合,然后富集分析,我们发现miR-221-3p主要与血管生成素受体-Tie2通路、AP-1转录因子网络、整合素激酶信号等通路相关(见图1);主要参与细胞通讯、信号转导、核酸代谢、蛋白质代谢等生物学过程(见图2);主要表达于血管、支气管肺泡灌洗液、前列腺、黄体 and 子宫、皮肤癌和恶性胶质细胞瘤等(见图3)。

参考文献:

- [1] Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-61.
- [2] Schober A, Weber C. Mechanisms of MicroRNAs in Atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:583-616.
- [3] Lu D, Thum T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019.
- [4] Trabucchi M, Mategot R. Subcellular Heterogeneity of the microRNA Machinery. *Trends Genet*. 2019;35(1):15-28.
- [5] Leonetti A, Assaraf YG, Veltsista PD, et al. MicroRNAs as a drug resistance mechanism to targeted therapies in EGFR-mutated NSCLC: Current implications and future directions. *Drug Resist Updat*. 2019;42:1-11.
- [6] Chen TY, Lee SH, Dhar SS, et al. Protein arginine methyltransferase 7-mediated microRNA-221 repression maintains Oct4, Nanog, and Sox2 levels in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2018;293(11):3925-36.
- [7] Wang C, Wang S, Zhao P, et al. MiR-221 promotes cardiac hypertrophy in vitro through the modulation of p27 expression. *J Cell Biochem*. 2012;113(6):2040-6.
- [8] Kakimoto Y, Tanaka M, Hayashi H, et al. Overexpression of miR-221 in sudden death with cardiac hypertrophy patients. *Heliyon*. 2018;4(6):e00639.
- [9] Huang D, Chen Z, Wang J, et al. MicroRNA-221 is a potential biomarker of myocardial hypertrophy and fibrosis in hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Biosci Rep*. 2019.
- [10] Su M, Wang J, Wang C, et al. MicroRNA-221 inhibits autophagy and promotes heart failure by modulating the p27/CDK2/mTOR axis. *Cell Death Differ*. 2015;22(6):986-99.
- [11] DeFilippis AP, Chapman AR, Mills NL, et al. Assessment and Treatment of Patients With Type 2 Myocardial Infarction and Acute Nonischemic Myocardial Injury. *Circulation*. 2019;140(20):1661-78.
- [12] Sanliarp M, Dodurga Y, Uludag B, et al. Peripheral blood mononuclear cell microRNAs in

- coronary artery disease. *J Cell Biochem.* 2019.
- [13] Jia QW, Chen ZH, Ding XQ, et al. Predictive Effects of Circulating miR-221, miR-130a and miR-155 for Coronary Heart Disease: A Multi-Ethnic Study in China. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(2):808-23.
- [14] Coskunpinar E, Cakmak HA, Kalkan AK, et al. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction. *Gene.* 2016;591(1):90-6.
- [15] Ward JA, Esa N, Pidikiti R, et al. Circulating Cell and Plasma microRNA Profiles Differ between Non-ST-Segment and ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Fam Med Med Sci Res.* 2013;2(2):108.
- [16] Yao Y, Song T, Xiong G, et al. Combination of peripheral blood mononuclear cell miR-19b-5p, miR- 221, miR-25-5p, and hypertension correlates with an increased heart failure risk in coronary heart disease patients. *Anatol J Cardiol.* 2018;20(2):100-9.
- [17] Hu S, Huang M, Nguyen PK, et al. Novel microRNA pro-survival cocktail for improving engraftment and function of cardiac progenitor cell transplantation. *Circulation.* 2011;124(11 Suppl):S27-34.
- [18] Zhou Y, Richards AM, Wang P. MicroRNA-221 Is Cardioprotective and Anti-fibrotic in a Rat Model of Myocardial Infarction. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;17:185-97.
- [19] Coffey S, Williams MJ, Phillips LV, et al. Integrated microRNA and messenger RNA analysis in aortic stenosis. *Sci Rep.* 2016;6:36904.
- [20] Gallo A, Agnese V, Coronello C, et al. On the prospect of serum exosomal miRNA profiling and protein biomarkers for the diagnosis of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *Int J Cardiol.* 2018;273:230-6.
- [21] Gumus G, Giray D, Bobusoglu O, et al. MicroRNA values in children with rheumatic carditis: a preliminary study. *Rheumatol Int.* 2018;38(7):1199-205.
- [22] Corsten MF, Heggermont W, Papageorgiou AP, et al. The microRNA-221/-222 cluster balances the antiviral and inflammatory response in viral myocarditis. *Eur Heart J.* 2015;36(42):2909-19.
- [23] Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ.* 2018;360:j5492.
- [24] Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European Heart Journal.* 2016;37(1).
- [25] Nie X, Chen Y, Tan J, et al. MicroRNA-221-3p promotes pulmonary artery smooth muscle cells proliferation by targeting AXIN2 during pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2019;116:24-35.
- [26] Wang H, Qin R, Cheng Y. LncRNA-Ang362 Promotes Pulmonary Arterial Hypertension by

- Regulating miR-221 and miR-222. Shock. 2019.
- [27] Joshi SR, Dhagia V, Gairhe S, et al. MicroRNA-140 is elevated and mitofusin-1 is downregulated in the right ventricle of the Sugena5416/hypoxia/normoxia model of pulmonary arterial hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016;311(3):H689-98.
- [28] Mujahid S, Nielsen HC, Volpe MV. MiR-221 and miR-130a regulate lung airway and vascular development. PLoS One. 2013;8(2):e55911.
- [29] Qian LB, Jiang SZ, Tang XQ, et al. Exacerbation of diabetic cardiac hypertrophy in OVE26 mice by angiotensin II is associated with JNK/c-Jun/miR-221-mediated autophagy inhibition. Oncotarget. 2017;8(63):106661-71.
- [30] Garcia de la Torre N, Fernandez-Durango R, Gomez R, Fuentes M, et al. Expression of Angiogenic MicroRNAs in Endothelial Progenitor Cells From Type 1 Diabetic Patients With and Without Diabetic Retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56(6):4090-8.
- [31] Li Y, Song YH, Li F, et al. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. Biochem Biophys Res Commun. 2009;381(1):81-3.
- [32] Lightell DJ, Jr., Moss SC, Woods TC. Upregulation of miR-221 and -222 in response to increased extracellular signal-regulated kinases 1/2 activity exacerbates neointimal hyperplasia in diabetes mellitus. Atherosclerosis. 2018;269:71-8.
- [33] Chen TC, Sung ML, Kuo HC, et al. Differential regulation of human aortic smooth muscle cell proliferation by monocyte-derived macrophages from diabetic patients. PLoS One. 2014;9(11):e113752.
- [34] Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, et al. Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. Thromb Res. 2016;137:126-40.
- [35] Hromadnikova I, Kotlabova K, Dvorakova L, et al. Postpartum profiling of microRNAs involved in pathogenesis of cardiovascular/cerebrovascular diseases in women exposed to pregnancy-related complications. Int J Cardiol. 2019;291:158-67.
- [36] Yang Y, Li H, Ma Y, et al. MiR-221-3p is down-regulated in preeclampsia and affects trophoblast growth, invasion and migration partly via targeting thrombospondin 2. Biomed Pharmacother. 2019;109:127-34.
- [37] Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, et al. Profiling of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNA expression in umbilical cord blood in gestational hypertension, preeclampsia and fetal growth restriction. Int J Cardiol. 2017;249:402-9.
- [38] Murphy MS, Casselman RC, Tayade C, et al. Differential expression of plasma microRNA in preeclamptic patients at delivery and 1 year postpartum. Am J Obstet Gynecol. 2015;213(3):367 e1-9.
- [39] Liu X, Cheng Y, Zhang S, et al. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. Circ Res. 2009;104(4):476-87.

- [40] Wu CC, Chen LJ, Hsieh MY, et al. MicroRNA-21 and Venous Neointimal Hyperplasia of Dialysis Vascular Access. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(11):1712-20.
- [41] Liu G, Huang Y, Lu X, et al. Identification and characteristics of microRNAs with altered expression patterns in a rat model of abdominal aortic aneurysms. *Tohoku J Exp Med*. 2010;222(3):187-93.
- [42] Venkatesh P, Phillippi J, Chukkapalli S, et al. Aneurysm-Specific miR-221 and miR-146a Participates in Human Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).
- [43] He XM, Zheng YQ, Liu SZ, et al. Altered Plasma MicroRNAs as Novel Biomarkers for Arteriosclerosis Obliterans. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(2):196-206.
- [44] Wang XW, He XJ, Lee KC, et al. MicroRNA-221 sponge therapy attenuates neointimal hyperplasia and improves blood flows in vein grafts. *Int J Cardiol*. 2016;208:79-86.
- [45] Zhang X, Shao S, Geng H, et al. Expression profiles of six circulating microRNAs critical to atherosclerosis in patients with subclinical hypothyroidism: a clinical study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):E766-74.
- [46] Pereira-da-Silva T, Coutinho Cruz M, Carrusca C, et al. Circulating microRNA profiles in different arterial territories of stable atherosclerotic disease: a systematic review. *Am J Cardiovasc Dis*. 2018;8(1):1-13.
- [47] Wang R, Dong LD, Meng XB, et al. Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464(2):574-9.
- [48] Bildirici AE, Arslan S, Ozbilum Sahin N, et al. MicroRNA-221/222 expression in atherosclerotic coronary artery plaque versus internal mammarian artery and in peripheral blood samples. *Biomarkers*. 2018;23(7):670-5.
- [49] Xue Y, Wei Z, Ding H, et al. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1alpha in the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):671-81.
- [50] Zhu N, Zhang D, Chen S, et al. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):286-93.
- [51] Chen CF, Huang J, Li H, et al. MicroRNA-221 regulates endothelial nitric oxide production and inflammatory response by targeting adiponectin receptor 1. *Gene*. 2015;565(2):246-51.
- [52] Zhang X, Mao H, Chen JY, et al. Increased expression of microRNA-221 inhibits PAK1 in endothelial progenitor cells and impairs its function via c-Raf/MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431(3):404-8.
- [53] Li L, Wang Z, Hu X, et al. Human aortic smooth muscle cell-derived exosomal miR-221/222 inhibits autophagy via a PTEN/Akt signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(2):343-50.
- [54] Li X, Ballantyne LL, Yu Y, et al. Perivascular adipose tissue-derived extracellular vesicle miR-221-3p mediates vascular remodeling. *Faseb j*. 2019:fj201901548R.
- [55] Mackenzie NC, Staines KA, Zhu D, et al. miRNA-221 and miRNA-222 synergistically

- function to promote vascular calcification. *Cell Biochem Funct.* 2014;32(2):209-16.
- [56] Zhuang X, Li R, Maimaitijiang A, et al. miR-221-3p inhibits oxidized low-density lipoprotein induced oxidative stress and apoptosis via targeting a disintegrin and metalloprotease-22. *J Cell Biochem.* 2019;120(4):6304-14.
- [57] Cerda A, Fajardo CM, Basso RG, et al. Role of microRNAs 221/222 on statin induced nitric oxide release in human endothelial cells. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104(3):195-201.
- [58] Minami Y, Satoh M, Maesawa C, et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(5):359-67.
- [59] Verjans R, Peters T, Beaumont FJ, et al. MicroRNA-221/222 Family Counteracts Myocardial Fibrosis in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Hypertension.* 2018;71(2):280-8.
- [60] Liang B, Xiao T, Long J, et al. Hydrogen sulfide alleviates myocardial fibrosis in mice with alcoholic cardiomyopathy by downregulating autophagy. *Int J Mol Med.* 2017;40(6):1781-91.
- [61] Mendez-Mancilla A, Lima-Rogel V, Toro-Ortiz JC, et al. Differential expression profiles of circulating microRNAs in newborns associated to maternal pregestational overweight and obesity. *Pediatr Obes.* 2018;13(3):168-74.
- [62] Andersen LG, Holst C, Michaelsen KF, et al. Weight and weight gain during early infancy predict childhood obesity: a case-cohort study. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(10):1306-11.
- [63] Prats-Puig A, Ortega FJ, Mercader JM, et al. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):E1655-60.
- [64] F H, P Z, J W, et al. Postnatal overfeeding induces hepatic microRNA-221 expression and impairs the PI3K/AKT pathway in adult male rats. 2020.
- [65] Mysore R, Ortega FJ, Latorre J, et al. MicroRNA-221-3p Regulates Angiopoietin-Like 8 (ANGPTL8) Expression in Adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(11):4001-12.
- [66] Nicoli S, Knyphausen CP, Zhu LJ, et al. miR-221 is required for endothelial tip cell behaviors during vascular development. *Dev Cell.* 2012;22(2):418-29.
- [67] Qin B, Cao Y, Yang H, et al. MicroRNA-221/222 regulate ox-LDL-induced endothelial apoptosis via Ets-1/p21 inhibition. *Mol Cell Biochem.* 2015;405(1-2):115-24.
- [68] Hartmann D, Fiedler J, Sonnenschein K, et al. MicroRNA-Based Therapy of GATA2-Deficient Vascular Disease. *Circulation.* 2016;134(24):1973-90.
- [69] Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood.* 2006;108(9):3068-71.
- [70] Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res.* 2007;101(1):59-68.
- [71] Chen Y, Banda M, Speyer CL, et al. Regulation of the expression and activity of the antiangiogenic homeobox gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and microRNA-221. *Mol Cell Biol.* 2010;30(15):3902-13.
- [72] Kuehbach A, Urbich C, Dimmeler S. Targeting microRNA expression to regulate

- angiogenesis. Trends Pharmacol Sci. 2008;29(1):12-5.
- [73] Vincenti S, Brillante N, Lanza V, et al. HUVEC respond to radiation by inducing the expression of pro-angiogenic microRNAs. Radiat Res. 2011;175(5):535-46.
- [74] Wu YH, Hu TF, Chen YC, et al. The manipulation of miRNA-gene regulatory networks by KSHV induces endothelial cell motility. Blood. 2011;118(10):2896-905.
- [75] Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. Biochem Biophys Res Commun. 2011;405(1):42-6.
- [76] Chang TY, Huang TS, Wang HW, et al. miRNome traits analysis on endothelial lineage cells discloses biomarker potential circulating microRNAs which affect progenitor activities. BMC Genomics. 2014;15:802.
- [77] Li Y, Yao M, Zhou Q, et al. Dynamic Regulation of Circulating microRNAs During Acute Exercise and Long-Term Exercise Training in Basketball Athletes. Front Physiol. 2018; 9:282.
- [78] Baggish AL, Hale A, Weiner RB, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. J Physiol. 2011;589(Pt 16):3983-94.
- [79] Nielsen S, Akerstrom T, Rinnov A, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. PLoS One. 2014;9(2):e87308.
- [80] Nunez Lopez YO, Coen PM, Goodpaster BH, et al. Gastric bypass surgery with exercise alters plasma microRNAs that predict improvements in cardiometabolic risk. Int J Obes (Lond). 2017;41(7):1121-30.
- [81] Bao F, Slusher AL, Whitehurst M, et al. Circulating microRNAs are upregulated following acute aerobic exercise in obese individuals. Physiol Behav. 2018;197:15-21.
- [82] Barber JL, Zellars KN, Barringhaus KG, et al. The Effects of Regular Exercise on Circulating Cardiovascular-related MicroRNAs. Sci Rep. 2019;9(1):7527.
- [83] Souza RW, Fernandez GJ, Cunha JP, et al. Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015;309(10):H1629-41.
- [84] Zhou CF, Ma J, Huang L, et al. Cervical squamous cell carcinoma-secreted exosomal miR-221-3p promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by targeting VASH1. Oncogene. 2019;38(8):1256-68.