

内含子源性 miRNA 通过转录因子 AP1 调节内皮型一氧化氮合酶表达及血管内皮细胞增殖作用

李玉媚, 王 辉, 张文字, 陈 伟, 胡 楠, 欧和生

(广西医科大学, 广西南宁市 530021)

[关键词] miRNA; 内皮型一氧化氮合酶; 内皮细胞; AP1

[摘要] 目的 前期工作发现, 内皮型一氧化氮合酶(eNOS)第4内含子的27碱基重复子产生相应27-nt miRNA, 并对eNOS的转录和表达有负反馈调节作用。进一步探讨该内含子源性27-nt miRNA对内皮型一氧化氮合酶基因调节的分子机制及血管内皮细胞增殖相关转录因子AP1的作用机制。方法 应用MTT法检测人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖抑制率; 细胞划痕实验检测HUVEC迁移能力; 免疫组织化学方法检测内皮细胞中eNOS和AP1蛋白表达水平; 进一步用Western Blot检测27-nt miRNA表达相关情况及细胞核转录因子eNOS表达情况。结果 27-nt miRNA对HUVEC增殖具有强烈抑制作用($P < 0.05$); 27-nt miRNA对HUVEC迁移具有显著抑制作用($P < 0.05$); 27-nt miRNA显著降低eNOS和AP1蛋白表达($P < 0.05$); 27-nt miRNA通过负调控AP1降低eNOS蛋白表达($P < 0.05$)。结论 27-nt miRNA显著抑制eNOS和AP1蛋白表达, AP1在27-nt miRNA对eNOS表达调节中起重要作用。

[中图分类号] R97

[文献标识码] A

Intronic miRNA Regulates Human Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene and Proliferation of Endothelial Cells by the Transcription Factor AP1

LI Yu-Mei, WANG Hui, ZHANG Wen-Yu, CHEN Wei, HU Nan, and OU He-Sheng

(Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[KEY WORDS] 27-nt miRNA; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Endothelial Cells; AP1

[ABSTRACT] **Aim** We previously reported that endothelial nitric oxide synthase (eNOS) intron 4 of 27 bp repeat promoter to produce the corresponding 27-nt miRNA, which regulated expression of eNOS. This study was to investigate an intronic miRNA regulated expression of the human eNOS gene and proliferation of endothelial cells by mechanism related to the transcription factor AP1. **Methods** The endothelial cells proliferation inhibition rate was detected by MTT assay. Migration ability of endothelial cells was measured by scratch wound model in vitro. The protein expression level of AP1 and eNOS were detected by Western Blot. **Results** Overexpression of 27-nt miRNA significantly inhibited the endothelial cells proliferation ($P < 0.05$). Overexpression of 27-nt miRNA significantly inhibited HUVEC migration ($P < 0.05$). Overexpression of 27-nt miRNA significantly decreased AP1 and eNOS protein expression ($P < 0.05$). Overexpression of 27-nt miRNA significantly decreased eNOS protein expression by the transcription factor AP1. **Conclusions** The 27nt-miRNA suppresses eNOS gene expression and AP1 expression in endothelial cells. 27-nt miRNA regulated expression of the eNOS by the transcription factor AP1.

miRNA 是一类长约 18~24 个核苷酸的高度保守性的小分子非编码 RNA, 主要通过与其靶基因 miRNA 3'-UTR 区结合来调控基因的表达。新近研究显示, 内皮型 miRNA 对心血管内皮细胞生理功

能和血管发育及心血管疾病的发生发展起着重要的调节作用^[1,2]。进一步的研究资料提示, miRNA 与细胞增殖、分化、凋亡、胚胎发育、组织器官等形成以及多种疾病的发生发展密切相关^[3,4]。研究发现, 内皮

[收稿日期] 2013-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373403); 广西硕士研究生科研创新项目(YCSZ2013031)

[作者简介] 李玉媚, 硕士研究生, 主要研究方向为心血管分子药理学, E-mail 为 756234795@qq.com。通讯作者欧和生, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管分子药理学, E-mail 为 hsou01@yahoo.com。

型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS),含 26 个外显子和 25 个内含子,主要表达在内皮细胞^[5]。eNOS 基因中某些点突变或片段缺失,已被视为心血管疾病的重要危险因素^[6,7]。最近资料表明,eNOS 通过某些细胞因子的激活诱导血管内皮细胞增殖并促进血管内皮细胞增殖^[8]。我们前期工作发现,该 27 碱基重复子以加强子方式对 eNOS 基因的转录效率进行调节,外源性双链 27 碱基 RNA 明显抑制 eNOS 基因的转录效率^[9,10]。此外,高表达 27-nt miRNA 通过抑制 STAT3 信号对 eNOS 表达及内皮细胞的增殖进行调控^[11],以上研究提示,一些核转录因子可能参与调控基因表达。因此,我们推测内含子源性 27-nt miRNA 可能对血管内皮细胞增殖相关转录因子 AP1 具有调控作用。本研实验通过转染 27-nt miRNA 高表达质粒,观察其对 eNOS 基因及转录因子 AP1 的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) (Santiago); Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒 (Invitrogen 公司); AP1 (ABZOOM); Gibco™ (Invitrogen 公司); eNOS 兔源单克隆抗体 (Cell signaling 公司); 质粒提取试剂盒 (广州锐博生物科技有限公司); 总 RNA 提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司); RT 试剂盒 (美国 MBI 公司); PCR 试剂盒 (天根生化科技有限公司); ECL (Invitrogen 公司); 1640 细胞培养基和胎牛血清 (南宁博仁生物科技有限公司)。

1.2 27-nt miRNA 高表达质粒的构建及鉴定

根据 eNOS 第 4 内含子中 27-nt 重复序列 5'-GAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAG-3'设计发夹 microRNA,为检测该 microRNA 是否具有多态性,我们设计了一个突变型寡核苷酸与 3 个突变位点 13、14 和 15,其位于 27-nt 序列中心。一个有 9 个核苷酸的茎环(5'-UUCAAGACA-3')的产物 miRNA。使用来自荧光素酶基因的 27-nt 序列作为对照。该质粒含有一个 G418 抗生素选择标记用来识别已转染细胞,随后建立稳定细胞株。通过测序鉴定插入的顺序和方向。对照载体中的序列没有与人类基因组相似^[12]。

1.3 细胞培养及转染

HUVEC 用 10% 胎牛血清、DMEM 培养基培养 24 h,细胞生长至 90% 汇合,将 siRNA 或 miRNA 的

质粒通过脂质体 2000 转染到细胞,用 OptiMEM 液体孵育。5 h 后换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。待转染 48 h 后,用新霉素抗性基因筛选阳性克隆,观察转染情况。

1.4 MTT 法检测细胞的增殖抑制率

将 wt-27-nt miRNA 和 mut-27-nt miRNA 分别转染 HUVEC,以每孔 2×10^4 个接种到 96 孔板中。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中 24 h,换无血清培养 24 h。每孔加 10 μL MTT 和 90 μL DMEM 培养基,继续孵育 4 h,弃培养液。接着每孔加 150 μL DMSO,振荡 10 min。接种后 24、48 和 72 h 各检测一次。用酶标仪测定每孔吸光度(OD)值,实验重复 3 次。

1.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

将 wt-27-nt miRNA 和 mut-27-nt miRNA 分别转染 HUVEC,以每孔 3×10^4 个接种于 6 孔板,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中 24 h。到细胞融合之后,在培养板底部划“—”字痕。分别于培养至 0 h、12 h、24 h 应用显微镜观察细胞迁移情况。实验重复 3 次。

1.6 免疫组织化学方法检测 eNOS 蛋白和 AP1 蛋白表达水平

切片用 PBS 洗 3 次,使用柠檬酸盐液热修复抗原 90 s。接着 PBS 洗 3 次,置于 3% H₂O₂ 室温孵育 15 min。再用 PBS 洗 3 次,每次 3 min。之后,非免疫血清封闭 40 min,室温下孵育 10 min。除去血清,分别滴加一抗 eNOS (1:400)和 AP1 (1:500),37℃ 下孵育 1 h。再滴加山羊抗兔二抗(1:300),置于室 20 min。然后 PBS 洗 3 次,再滴加 DAB 显色。滴加苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化,PBS 洗 10 min。最后脱水、封片。eNOS 和 AP1 阳性染色呈棕黄色,测量阳性标志物灰度值表示 eNOS 和 AP1 蛋白表达量,灰度值越大,eNOS 和 AP1 蛋白含量越低。

1.7 Western Blot 检测蛋白质表达水平

首先,对转染有目的基因的 HUVEC 用细胞裂解液进行裂解,收集细胞蛋白。用 BAC 法进行蛋白质定量。取 50 μg 蛋白质在 8% SDS-PAGE 上电泳,后电转至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,将膜加入 AP1 一抗并在 4℃ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,37℃ 孵育 45 min,TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min。将膜与化学发光检测试剂反应 2 min;A、B 的混合溶液激发荧光,在暗室 X 胶片感光,显影、定影后进行图像分析。

1.8 统计学处理

所有实验独立重复 3 次,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 16.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

2 结 果

2.1 27-nt miRNA 强烈抑制内皮细胞增殖

MTT 检测结果发现,在 24 h、48 h、72 h,wt-27-nt miRNA 和 mut-27-nt miRNA 对 HUVEC 增殖有抑制作用,wt-27-nt miRNA 组和 mut-27-nt miRNA 组细胞增殖抑制率明显高于对照组 ($P < 0.01$),差异具有统计学意义(表 1)。

表 1. 27nt miRNA 对内皮细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1. Effect of 27-nt miRNA on the proliferation inhibition rate of endothelial cells($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	24 h	36 h	72 h
对照组	8	0.253 ± 0.082	0.241 ± 0.056	0.294 ± 0.134
wt-27-nt miRNA 组	8	0.415 ± 0.023 ^a	0.593 ± 0.075 ^a	0.524 ± 0.132 ^a
mut-27-nt miRNA 组	8	0.528 ± 0.156 ^a	0.640 ± 0.134 ^a	0.713 ± 0.122 ^a

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较。

2.2 27-nt miRNA 强烈抑制内皮细胞迁移

划痕实验结果显示,wt-27-nt miRNA 与 mut-27-nt miRNA 对细胞迁移具有明显的抑制作用。经处理 0 h、24h 后,wt-27-nt miRNA 组和 mut-27-nt miRNA 组细胞愈合率与同期对照组比较分别减少 41.10% 和 43.90%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 1 和表 2)。

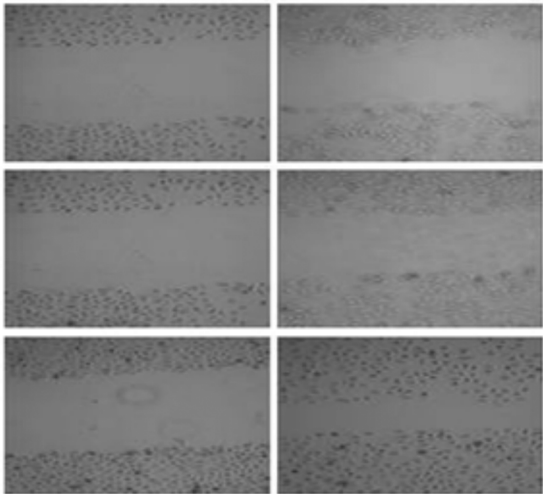


图 1. 27-nt miRNA 对内皮细胞迁移的影响 左为 0 h,右为 24 h;上图为 mut-27-nt miRNA 组;中图为 wt-27-nt miRNA 组;下图为对照组。
Figure 1. Effect of 27-nt miRNA on migration of endothelial cells

表 2. 27-nt miRNA 对内皮细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 2. Effect of 27-nt miRNA on migration of endothelial cells($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	0 h	24 h	抑制率
对照组	8	–	0.820 ± 0.020	–
wt-27-nt miRNA 组	8	–	0.483 ± 0.049	41.10%
mut-27-nt miRNA 组	8	–	0.460 ± 0.020	43.90%

2.3 27-nt miRNA 明显抑制 eNOS 和 API 蛋白表达

免疫组织化学检测结果表明,eNOS 在 wt-27-nt miRNA 组和 mut-27-nt miRNA 组低表达(图 2);与对照组比较,wt-27-nt miRNA 组和 mut-27-nt miRNA 组 eNOS 表达明显下降 ($P < 0.01$;表 3)。此外,API 在 wt-27-nt miRNA 组和 mut-27-nt miRNA 组低表达(图 2);与对照组比较,wt-27-nt miRNA 组和 mut-27-nt miRNA 组 API 蛋白表达明显下降 ($P < 0.01$;表 4)。提示,27-nt miRNA 高表达质粒转入显著抑制 eNOS 和 API 在内皮细胞中表达。

表 3. 27-nt miRNA 对 eNOS 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 3. Effect of the 27-nt miRNA on eNOS protein expression($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	灰度值	抑制率	<i>P</i> 值
对照组	10	51.36 ± 4.87	–	–
wt-27-nt miRNA 组	10	78.10 ± 8.13	34.23%	<0.01
mut-27-nt miRNA 组	10	66.47 ± 7.06	22.73%	<0.01

表 4. 27-nt miRNA 对 API 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 4. Effect of the 27-nt miRNA on API protein expression($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	灰度值	抑制率	<i>P</i> 值
对照组	10	53.78 ± 5.32	–	–
wt-27-nt miRNA 组	10	73.60 ± 8.46	26.93%	<0.01
mut-27-nt miRNA 组	10	64.24 ± 8.12	16.28%	<0.01

2.4 27-nt miRNA 和 API 共同参与 eNOS 表达

Western Blot 检测结果表明,与对照组比较,eNOS 在 wt-27-nt miRNA 组和 mut-27-nt miRNA 组的表达分别下降 37.54% 和 34.31% ($P < 0.01$;表 5 和图 3)。此外,与对照组比较,API 在 wt-27-nt miRNA 组和 mut-27-nt miRNA 组的表达分别降低 47.07% 和 26.18% ($P < 0.01$;表 6 和图 3)。有趣的是,与对照组相比,单独转染 wt-27-nt miRNA 或 mut-27-nt miRNA eNOS 蛋白表达水平分别减少 32.7% 和 28.6% ($P < 0.01$),而共转染 API 的 wt-27-nt miRNA 或 mut-27-nt miRNA eNOS 蛋白表达水平分别减少 74.7% 和

48.2% ($P < 0.01$; 表 7 和图 4)。这些结果显示,同时转染 wt-27-nt miRNA 和 API 的 HUVEC 受到抑制的

效果极为明显,API 和 27-nt miRNA 对 eNOS 表达和 HUVEC 增殖可能有协同作用。

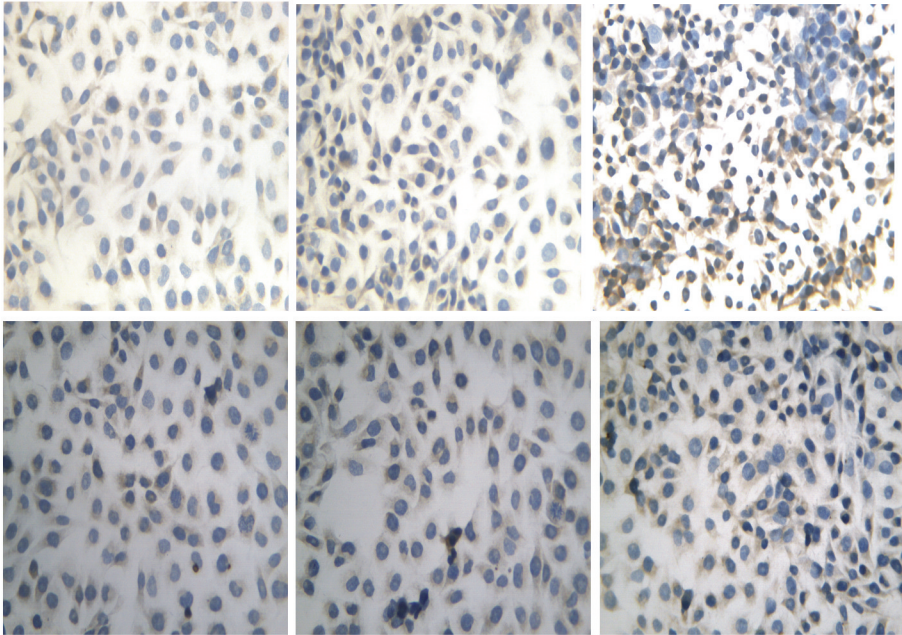


图 2. 27-nt miRNA 对 eNOS(上图)和 API(下图)蛋白表达的影响

左为 wt-27-nt miRNA 组,中为 mut-27-nt miRNA 组,右为对照组。

Figure 2. Effect of the 27-nt miRNA on protein expressions of eNOS and API

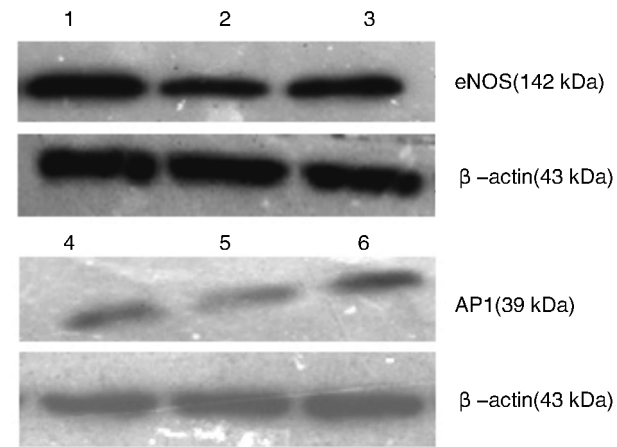


图 3. 27-nt miRNA 对 eNOS 和 API 蛋白表达的影响

1、6 为对照组,2、4 为 mut-27-nt miRNA 组,3、5 为 wt-27-nt miRNA 组。

Figure 3. Effect of 27-nt miRNA on protein expressions of eNOS and API

表 5. 27-nt miRNA 对 eNOS 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5. Effect of the 27-nt miRNA on eNOS protein expression($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	灰度值	抑制率	<i>P</i> 值
对照组	3	2.629 ± 0.088	—	—
wt-27-nt miRNA 组	3	1.642 ± 0.020	37.54%	<0.01
mut-27-nt miRNA 组	3	1.727 ± 0.010	34.31%	<0.01

表 6. 27-nt miRNA 对 API 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 6. Effect of the 27-nt miRNA on API protein expression($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	灰度值	抑制率	<i>P</i> 值
对照组	3	2.777 ± 0.083	—	—
wt-27-nt miRNA 组	3	1.470 ± 0.036	47.07%	<0.01
mut-27-nt miRNA 组	3	2.050 ± 0.098	26.18%	<0.01

表 7. 27-nt miRNA 和 API 共同参与 eNOS 表达($\bar{x} \pm s$)

Table 7. 27-nt miRNA and API are involved in the expression of eNOS($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	灰度值	抑制率	<i>P</i> 值
对照组	3	1.000 ± 0.105	—	—
wt-27-nt miRNA 组	3	0.673 ± 0.052	32.7%	<0.01
mut-27-nt miRNA 组	3	0.714 ± 0.072	28.6%	<0.01
wt-27-nt miRNA + API 组	3	0.253 ± 0.063	74.7%	<0.01
mut-27-nt miRNA + API 组	3	0.518 ± 0.082	48.2%	<0.01

3 讨 论

miRNA 是一类长约 20 ~ 25 nt 的内源性非编码的小分子 RNA。越来越多的证据表明,miRNA 对细胞分化、增殖、迁移和凋亡具有重要的作用。miRNA 在各种人类疾病中,包括血管疾病和癌症以及糖尿

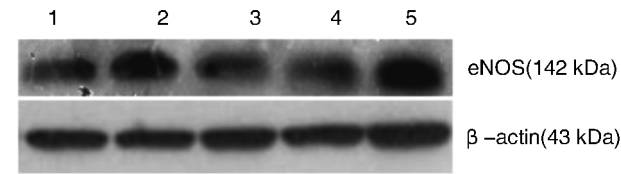


图 4. 27-nt miRNA 和 API 共同参与 eNOS 表达 1 为 wt-27-nt miRNA 组,2 为 mut-27-nt miRNA 组,3 为 wt-27-nt miRNA + API 组,4 为 mut-27-nt miRNA + API 组,5 为对照组。

Figure 4. 27-nt miRNA and API are involved in the expression of eNOS

病等疾病的发病机制中发挥关键作用^[13]。本研究我们探讨 27-nt miRNA 参与 eNOS 基因调节分子机制及血管内皮细胞增殖相关转录因子 API 的作用机制,结果发现,过表达 27-nt miRNA 对 eNOS 的表达有显著抑制作用以及转录因子 API 表达水平也受到不同程度抑制。进一步研究提示,转录因子 API 和 27-nt miRNA 对 eNOS 表达可能有协同作用。

eNOS 基因存在多态性^[14],包括某些点突变或片段缺失。研究表明,eNOS 基因无论是点突变,还是重复子序列片段缺失,都与心血管疾病有密切关系^[15]。前期研究发现,在体外,与野生型 wt-27-nt miRNA 相比,突变体 mut-27-nt miRNA 对 eNOS 转录的抑制率明显降低。此外,在体内的细胞实验中也发现类似现象^[12]。这些数据提示,27-nt miRNA 特异性调节宿主基因序列表达。此外,27-nt miRNA 可能参与 eNOS mRNA 剪切、成熟等阶段调控,该调控机制对心血管疾病的发生、发展具有重要意义。

转录因子和 miRNA 对基因组与基因进行调控,具有广泛相互作用和反式作用^[16,17]。研究发现,转录因子和 miRNA 内部相互协同作用已成为调控基因的重要分子作用机制^[18]。研究表明,API 与 eNOS 基因 5'调节区具有结合位点,对调控 eNOS 表达具有重要作用^[19]。因此我们选取 API 进行检测,结果发现,含有 27-nt miRNA 的 HUVEC 中 API 的表达量受到不同程度的抑制,进而影响 eNOS 的表达水平。这一结果提示,27-nt miRNA 可能是 API 转录因子一类调节子。此外,我们实验研究发现,miRNA 过表达对 eNOS 表达具有显著抑制作用,该作用与 API 表达水平下降有关。本研究提示,27-nt miRNA 和 API 交互调节 eNOS 在内皮细胞表达。

越来越多研究表明,miRNA 在细胞的增殖和凋亡中发挥重要作用。例如,过表达 miR-34a 促进内皮细胞衰老^[20]。过表达 miR-29a 促进心肌细胞凋亡^[21]。另外,最近研究发现,转录因子与 miRNA 对

基因调控具有协同作用。例如,miRNA 通过调节 SP-1 对 HUVEC 的增殖具有调控作用^[12];miR-365 通过调节 Bcl-2 的表达加强 ox-LDL 诱导内皮细胞凋亡^[22]。本研究结果显示,27-nt miRNA 高表达质粒的 HUVEC 增殖速率受到不同程度抑制,尤其是同时转染 27-nt miRNA 和 API 的 HUVEC 中 eNOS 蛋白表达水平显著降低。因此,我们推测 27-nt miRNA 与 API 可能对 HUVEC 增殖具有协同作用,但 27-nt miRNA 与 API 的协同作用分子机制尚不清楚,还有待进一步研究。

综上所述,我们已经证明,27-nt miRNA 在 eNOS 基因表达调控的重要作用;27-nt miRNA 与 API 对 eNOS 基因调控具有协同作用。本研究为研究基因靶点提供一种新的方法;此外,揭示了 miRNA 与人类重大疾病关键基因之间的内在关联及其潜在临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Chen JH, Wang DZ. microRNAs in cardiovascular development[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(5): 949-957.
- [2] Santoro MM, Nicoli S. miRNAs in endothelial cell signaling: The endomiRNAs[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(9): 1 324-330.
- [3] Liu L, Zhang G, Liang Z, et al. MicroRNA-15b enhances hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes via a mitochondrial apoptotic pathway [J]. Apoptosis, 2013, [Epub ahead of print]
- [4] Li X, Wang J, Jia Z, et al. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74504.
- [5] Tai SC, Robb GB, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24: 405-412
- [6] Wang X L, Sim A S, Badenhop R F, et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene [J]. Nat Med, 1996, 2 (1): 41-45
- [7] Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, et al. T-786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm[J]. Circulation, 1999, 99: 2 864-870.
- [8] Siobhan M, Chen Kai, Yongmei Pei, et al. NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through eNOS activation[J]. Circulation, 2011, 124(6): 731-740.
- [9] Ou H, Shen YH, Utama B, et al. Effect of nuclear actin

- on endothelial nitric oxide synthase expression[J]. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 2005, 25(12): 2 509-514.
- [10] Zhang MX, Ou H, Shen YH, et al. Regulation of eNOS expression by small RNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(47): 16 967-972.
- [11] Yan L, Hao H, Elton TS, et al. Intronic microRNA suppresses endothelial nitric oxide synthase expression and endothelial cell proliferation via inhibition of STAT3 signaling[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 357(1-2): 9-19.
- [12] Yan LM, Kang M, Qin ZQ, et al. An intronic miRNA regulates expression of the human endothelial nitric oxide synthase gene and proliferation of endothelial cells by a mechanism related to the transcription factor SP-1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70658.
- [13] Catarina Rippe, Mark Blimline. MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, enos and inflammation[J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47(1): 45-51.
- [14] Sandrim V C, Coelho E B, Nobre F, et al. Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 186(2): 428-432.
- [15] Kim IJ, Bae J, Lim SW, et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (- 786T > C, 4a4b, 894G > T) in Korean patients with coronary artery disease[J]. *Thromb Res*, 2007, 119(5): 579-585.
- [16] Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs[J]. *Science*, 2008, 319(5871): 1 785-786.
- [17] Makeyev EV, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs [J]. *Science*, 2008, 319(5871): 1 789-790.
- [18] Poos K, Smida J, Nathrath M, et al. How microRNA and transcription factor co-regulatory networks affect osteosarcoma cell proliferation[J]. *PLoS Comput Biol*, 2013, 9(8): e1003210.
- [19] Zhang R, Min W, Sessa WC. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter AP1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(25): 15 320-5326.
- [20] 黎 健. miR-34a 调控内皮祖细胞介导的血管新生[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(3): 232-233.
- [21] 张振辉, 黎 佼, 刘本荣, 等. 过表达 miR-29a 对大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(12): 1 079-082.
- [22] Qin B, Xiao B, Liang D, et al. MicroRNAs expression in ox-LDL treated HUVECs: MiR-365 modulates apoptosis and Bcl-2 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(1): 127-133.

(此文编辑 许雪梅)