

miR-221 通过细胞周期蛋白 D1 介导同型半胱氨酸诱导人冠状动脉内皮细胞损伤

廖磊, 周贺民, 任松涛, 郭越

(驻马店市中心医院急诊科, 河南省驻马店市 463000)

[关键词] 人冠状动脉内皮细胞; 同型半胱氨酸; miR-221; 细胞周期; 细胞周期蛋白 D1

[摘要] **目的** 研究 miR-221 通过细胞周期蛋白 D1 介导同型半胱氨酸(Hcy)诱导人冠状动脉内皮细胞(HCAEC)损伤。**方法** 培养 HCAEC 并分为 4 组, 对照组用无血清培养基处理, Hcy 组用含有 1 mmol/L Hcy 的培养基处理, Hcy+NC(阴性对照)组转染 NC 抑制物后用含有 1 mmol/L 的培养基处理, Hcy+miR-221 组转染 miR-221 抑制物后用含有 1 mmol/L 的培养基处理。采用荧光定量 PCR 检测 miR-221 的表达水平, Western blot 检测细胞周期蛋白 D1 的表达水平, MTS 检测细胞活力 OD_{490 nm} 水平, 流式细胞术检测细胞周期, 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-221 靶向细胞周期蛋白 D1。**结果** 与对照组比较, Hcy 组 HCAEC 的 miR-221 表达水平、细胞 G0/G1 期比例明显增加, OD_{490 nm} 水平、S 期及 G2/M 期比例、细胞周期蛋白 D1 表达水平明显降低。与 Hcy 组及 Hcy+NC 组比较, Hcy+miR-221 组的 miR-221 表达水平、G0/G1 期比例明显降低, OD_{490 nm} 水平、S 期及 G2/M 期比例、细胞周期蛋白 D1 表达水平明显增加。细胞周期蛋白 D1 基因 mRNA 3'UTR 第 1224-1231 碱基是 miR-221 的结合位点, miR-221 能够降低野生型细胞周期蛋白 D1 双荧光素酶报告基因的荧光活力。**结论** miR-221 在 Hcy 诱导 HCAEC 损伤过程中表达增加, 抑制 miR-221 表达能够减轻 Hcy 诱导的 HCAEC 损伤, 靶向细胞周期蛋白 D1 是可能的分子机制。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

miR-221 mediates homocysteine induced injury of human coronary artery endothelial cells via cyclin D1

LIAO Lei, ZHOU Hemin, REN Songtao, GUO Yue

(Emergency Department, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian, Henan 463000, China)

[KEY WORDS] human coronary artery endothelial cell; homocysteine; miR-221; cell cycle; cyclin D1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of miR-221 in homocysteine (Hcy)-induced injury of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) mediated by cyclin D1. **Methods** HCAECs were cultured and divided into four groups. The control group was treated with serum-free medium, Hcy group was treated with medium containing 1 mmol/L Hcy, Hcy+NC (negative control) group was treated with medium containing 1 mmol/L Hcy after transfection with NC inhibitor, and Hcy+miR-221 group was treated with medium containing 1 mmol/L Hcy after transfection with miR-221 inhibitor. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of miR-221, Western blot was used to detect the expression of cyclin D1, MTS was used to detect the OD_{490 nm} level of cell viability, flow cytometry was used to detect cell cycle, and double luciferase reporter gene experiment was used to verify miR-221 targeting cyclin D1. **Results** Compared with the control group, the expression level of miR-221 and the proportion of G0/G1 phase of HCAEC were significantly increased, while the level of OD_{490 nm}, the proportion of S phase and G2/M phase and cyclin D1 expression level were significantly decreased in Hcy group. Compared with Hcy group and Hcy+NC group, the expression level of miR-221 and the proportion of G0/G1 phase of HCAEC were significantly decreased, while the level of OD_{490 nm}, the proportion of S phase and G2/M phase and cyclin D1 expression level were significantly increased in Hcy+miR-221 group. The 1224-1231 base of mRNA 3'UTR of cyclin D1 gene was the binding site of miR-221, and miR-221 reduced the fluorescence activity of wild-type cyclin D1 double luciferase reporter gene. **Conclusions** The expression of miR-221 increa-

ses during Hcy-induced HCAEC injury, and inhibition of miR-221 expression can reduce Hcy-induced HCAEC injury. Targeting cyclin D1 is a possible molecular mechanism.

冠心病是临床常见的心血管系统疾病,以冠状动脉粥样斑块形成、管腔狭窄为特征,可引起心肌供血减少、心肌缺血缺氧损伤。血管内皮是血液循环与血管壁之间的屏障,血管内皮损伤后脂质、炎症细胞、血小板等在血管壁沉积,进而逐步发展为动脉粥样硬化。在冠心病的发病过程中,冠状动脉内皮损伤是重要的病理环节,引起冠状动脉内皮损伤的因素复杂,其中高同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)血症是近些年受到越来越多关注的内皮损伤因素^[1-2]。Hcy是甲硫氨酸代谢循环中产生的有细胞毒性的含硫氨基酸,能够通过激活炎症、凋亡、氧化应激以及诱导细胞周期阻滞等方式引起内皮损伤^[3-4],但Hcy引起冠状动脉内皮损伤的机制尚不十分明确。

微小RNA(microRNA, miR)是一类参与基因表达转录后调控的非编码RNA,长度约18~25 nt,在心肌损伤、内皮损伤等心血管疾病相关的病理环节中,多种miR的表达存在异常并起到加剧损伤或减轻损伤的作用。一项关于内皮功能障碍的临床研究表明,在存在心血管危险因素及合并内皮功能障碍的中青年女性患者中,血清Hcy含量及miR-221表达均异常升高^[5];另有研究报道,过表达miR-221能够使内皮细胞的活力降低^[6]。以上结果提示miR-221可能在高Hcy血症引起内皮损伤中起重要作用。基于此,本实验将以人冠状动脉内皮细胞(human coronary artery endothelial cell, HCAEC)为对象,具体分析miR-221在Hcy诱导HCAEC损伤中的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

HCAEC购自上海弘顺生物公司,miR-221-5p抑制剂(5'-AAATCTACATTGCCAGGT-3')及阴性对照(NC;5'-TATGCTACGTAGCTAGCTA-3')序列均购自上海吉玛公司,miR提取试剂盒、一步法miR反转录试剂盒、miRNA荧光定量PCR试剂盒购自哈尔滨新海基因公司,水溶性甲脎化合物[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲酯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(金翁)[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium,

MTS]细胞活力检测试剂盒、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)及真核翻译起始因子5A2(eukaryotic translation initiation factor 5A2, EIF5A2)一抗购自Abcam公司,碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自上海恒远生物科技有限公司,RIPA裂解液及BCA蛋白定量试剂盒购自北京普利莱基因公司,双荧光素酶报告基因检测系统购自Promega公司。

1.2 HCAEC培养及分组

HCAEC在含有10%胎牛血清的完全培养基中贴壁培养,待细胞铺满培养瓶底面80%~90%后,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,1:3比例传代培养。传代后的HCAEC接种在培养板内并进行分组,方法如下:(1)对照组:用无血清培养基处理;(2)Hcy组:用含有1 mmol/L Hcy的无血清培养基处理;(3)Hcy+NC组:用Lipofectamine 2000转染NC后用含有1 mmol/L Hcy的无血清培养基处理;(4)Hcy+miR-221组:用Lipofectamine 2000转染miR-221-5p抑制物后用含有1 mmol/L Hcy的无血清培养基处理。每个处理条件重复5次。

1.3 miR-221表达的荧光定量PCR检测

HCAEC接种在12孔培养板中,按照“1.2”的方法分组给药,转染24、36、48 h,采用miR提取试剂盒提取细胞中的miR,采用一步法miR反转录试剂盒将细胞中提取得到的miR反转录为cDNA,最后采用miR荧光定量PCR试剂盒配置PCR反应体系,所用引物分别为目的基因miR-221-5p的特异性引物和内参基因U6的特异性引物,PCR反应后得到循环曲线及循环阈值,以U6为内参,计算miR-221的表达水平。

1.4 细胞活力OD_{490 nm}水平的MTS检测

HCAEC接种在96孔培养板中,按照“1.2”的方法分组给药,转染24、36、48 h,采用MTS试剂盒检测细胞活力,按照试剂盒说明书进行操作并在酶标仪上测定490 nm波长的OD_{490 nm}值。

1.5 细胞周期的流式细胞术检测

HCAEC接种在60 mm的培养皿内,按照“1.2”的方法分组给药,转染48 h,0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,用预冷的70%乙醇在4℃固定过夜,次日用磷酸盐缓冲液漂洗,离心3次后加入5 g/L的PI染液,避光染色30 min,最后在流式细胞仪上检测细胞G0/G1期、S期、G2/M期的比例。

1.6 细胞周期蛋白 D1、EIF5A2 表达的 Western blot 检测

HCAEC 接种在 12 孔培养板中,按照“1.2”的方法分组给药,转染 48 h,采用 RIPA 裂解液裂解细胞,分离细胞中的蛋白,采用 BCA 试剂盒检测蛋白含量,将含有 20 μg 蛋白的样本用于 Western blot,在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离蛋白后电转移至二氟化树脂 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜,5% 脱脂牛奶室温孵育 PVDF 膜 1 h,细胞周期蛋白 D1、EIF5A2 或 β -actin 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 PVDF 膜过夜,次日辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 PVDF 膜 1 h,最后在凝胶成像系统中成像得到蛋白电泳图,根据图像中蛋白条带的灰度值计算细胞周期蛋白 D1、EIF5A2 的表达水平。

1.7 miR-221 靶向细胞周期蛋白 D1 的 Targetscan 生物信息学分析

在 Targetscan 网站中进行生物信息学分析,输入 miR-221-5p 的信息后得到靶基因细胞周期蛋白 D1 中 mRNA 3' UTR 序列上 miR-221-5p 的结合位点。

1.8 miR-221 靶向细胞周期蛋白 D1 的双荧光素酶报告基因实验

设计含有野生型细胞周期蛋白 D1 基因 mRNA 3' UTR 的双荧光素酶报告基因,将 Targetscan 预测的 miR-221-5p 结合位点进行突变,得到突变型双荧光素酶报告基因,将双荧光素酶报告基因与 miR-NC 或 miR-221-5p 模拟物共转染进入 HCAEC,24 h 后

用双荧光素酶报告基因检测系统检测细胞中萤火虫荧光素酶的活力及海肾荧光素酶的活力,根据公式萤火虫荧光素酶的活力/海肾荧光素酶的活力计算荧光活力。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件录入数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,4 组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 诱导 HCAEC 损伤过程中 miR-221 表达的变化

各组 HCAEC 处理 24、36、48 h 后,与对照组比较,Hcy 组 miR-221 的表达水平明显增加 ($P < 0.05$);与 Hcy 组比较,Hcy+NC 组 miR-221 的表达水平无明显变化 ($P > 0.05$);与 Hcy 组及 Hcy+NC 组比较,Hcy+miR-221 组 miR-221 的表达水平明显降低 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 抑制 miR-221 对 Hcy 诱导 HCAEC 活力下降的影响

各组 HCAEC 处理 24、36、48 h 后,与对照组比较,Hcy 组 OD_{490 nm} 水平明显降低 ($P < 0.05$);与 Hcy 组比较,Hcy+NC 组 OD_{490 nm} 水平无明显变化 ($P > 0.05$);与 Hcy 组及 Hcy+NC 组比较,Hcy+miR-221 组 OD_{490 nm} 水平明显增加 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 1. 4 组间 miR-221 表达水平的比较

Table 1. Comparison of miR-221 expression levels among four groups

分组	<i>n</i>	0 h	24 h	36 h	48 h
对照组	5	0.71 \pm 0.21	0.77 \pm 0.15	0.84 \pm 0.18	0.76 \pm 0.12
Hcy 组	5	0.78 \pm 0.22	1.44 \pm 0.25 ^a	1.71 \pm 0.22 ^a	1.74 \pm 0.29 ^a
Hcy+NC 组	5	0.73 \pm 0.25	1.49 \pm 0.21	1.80 \pm 0.24	1.75 \pm 0.28
Hcy+miR-221 组	5	0.72 \pm 0.14	0.69 \pm 0.13 ^b	1.02 \pm 0.18 ^b	0.98 \pm 0.17 ^b

注:a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 Hcy 组、Hcy+NC 组比较。

表 2. 4 组间 OD_{490 nm} 水平的比较

Table 2. Comparison of OD_{490 nm} levels among four groups

分组	<i>n</i>	24 h	36 h	48 h
对照组	5	0.83 \pm 0.14	1.04 \pm 0.20	1.38 \pm 0.18
Hcy 组	5	0.59 \pm 0.08 ^a	0.71 \pm 0.15 ^a	0.93 \pm 0.12 ^a
Hcy+NC 组	5	0.55 \pm 0.07	0.74 \pm 0.14	0.90 \pm 0.17
Hcy+miR-221 组	5	0.77 \pm 0.11 ^b	0.98 \pm 0.17 ^b	1.24 \pm 0.20 ^b

注:a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 Hcy 组、Hcy+NC 组比较。

2.3 抑制 miR-221 对 Hcy 诱导 HCAEC 细胞周期阻滞的影响

各组 HCAEC 处理 48 h 后,与对照组比较,Hcy 组 HCAEC 的 G0/G1 期比例明显增加,S 期、G2/M 期比例明显降低 ($P < 0.05$);与 Hcy 组比较,Hcy+NC 组 G0/G1 期、S 期、G2/M 期比例无明显变化 ($P > 0.05$);与 Hcy 组及 Hcy+NC 组比较,Hcy+miR-221 组 G0/G1 期比例明显降低,S 期、G2/M 期比例明显

增加($P < 0.05$) (图1、表3)。

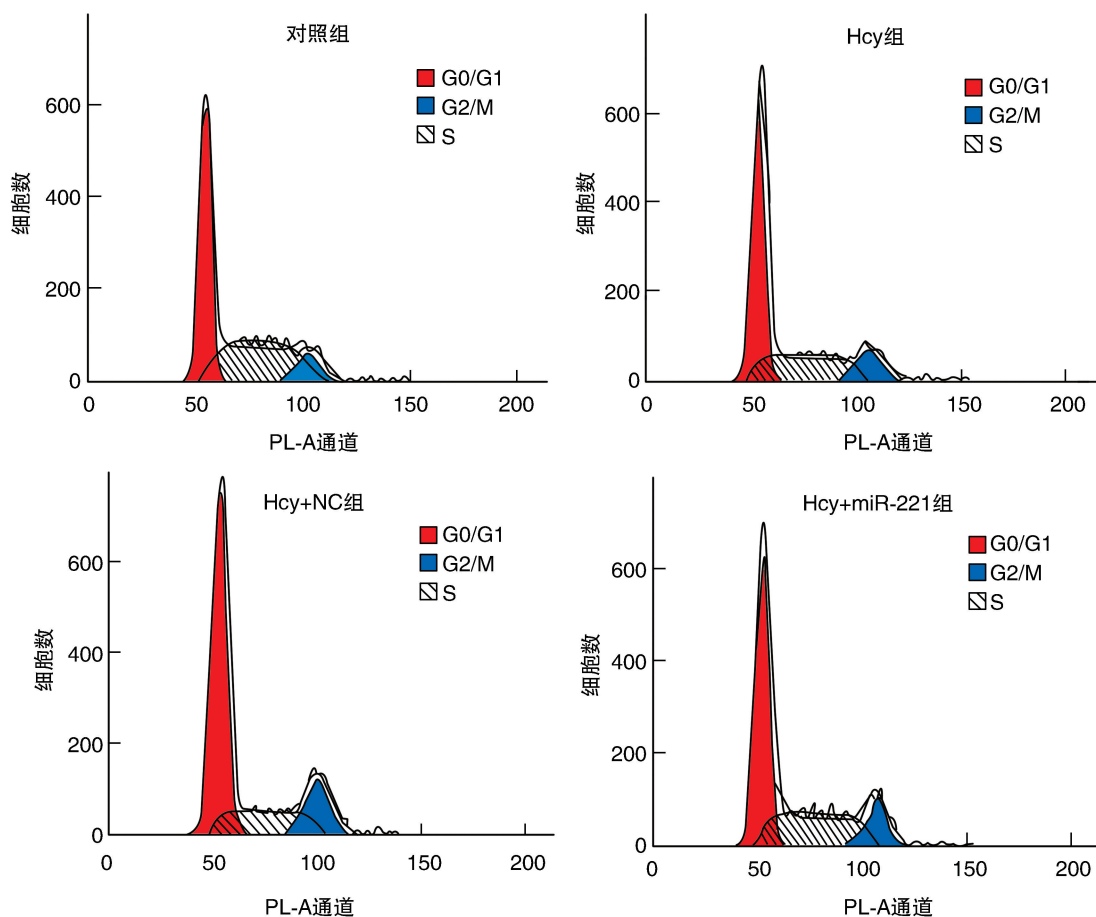


图1. 4组细胞周期的流式细胞图

Figure 1. Flow cytometry of cell cycle in four groups

表3. 4组间细胞周期分布的比较

Table 3. Comparison of cell cycle distribution among four groups

分组	n	G0/G1	S	G2/M
对照组	5	43.38±6.29	42.27±5.37	14.34±2.12
Hcy组	5	62.75±8.27 ^a	25.48±5.41 ^a	11.77±1.84 ^a
Hcy+NC组	5	65.27±8.39	24.91±4.48	9.82±1.35
Hcy+miR-221组	5	44.75±5.11 ^b	38.84±3.94 ^b	16.41±1.84 ^b

注:a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与Hcy组、Hcy+NC组比较。

2.4 抑制 miR-221 对 Hcy 诱导 HCAEC 细胞损伤过程中细胞周期蛋白 D1、EIF5A2 表达的影响

各组 HCAEC 处理 48 h 后,4 组间 EIF5A2 表达水平的比较无显著性差异($P > 0.05$)。与对照组比较,Hcy 组细胞周期蛋白 D1 的表达水平明显降低($P < 0.05$);与 Hcy 组比较,Hcy+NC 组细胞周期蛋白 D1 的表达水平无明显变化($P > 0.05$);与 Hcy 组

及 Hcy+NC 组比较,Hcy+miR-221 组细胞周期蛋白 D1 的表达水平明显增加($P < 0.05$) (图2、表4)。

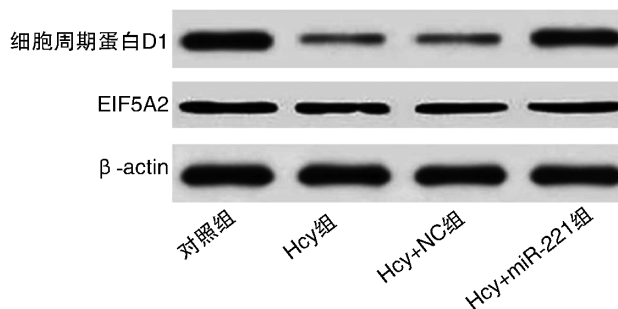


图2. 4组细胞周期蛋白 D1、EIF5A2 的蛋白电泳图
Figure 2. Protein electrophoresis of cyclin D1 and EIF5A2 in four groups

2.5 miR-221 靶向细胞周期蛋白 D1 的生物信息学分析

经 Targetscan 网站进行生物信息学分析,细胞

周期蛋白 D1 基因 mRNA 3'UTR 第 1224-1231 碱基是 miR-221 的结合位点(图 3)。

表 4. 4 组间细胞周期蛋白 D1、EIF5A2 表达水平的比较

Table 4. Comparison of cyclin D1 and EIF5A2 expression levels among four groups

分组	n	细胞周期蛋白 D1	EIF5A2
对照组	5	0.92±0.17	0.74±0.19
Hcy 组	5	0.42±0.09 ^a	0.71±0.20
Hcy+NC 组	5	0.38±0.08	0.69±0.16
Hcy+miR-221 组	5	0.86±0.18 ^b	0.75±0.22

注:a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Hcy 组、Hcy+NC 组比较。

2.6 miR-221 靶向细胞周期蛋白 D1 的双荧光素酶报告验证

与 miR-NC 组比较, miR-221 组 HCAEC 中野生

型细胞周期蛋白 D1 双荧光素酶报告基因的荧光活力明显降低($P < 0.05$), 突变型细胞周期蛋白 D1 双荧光素酶报告基因的荧光活力无明显变化($P > 0.05$)(表 5)。

表 5. 两组间细胞周期蛋白 D1 双荧光素酶报告基因荧光活力的比较

Table 5. Comparison of fluorescence activity of cyclin D1 double luciferase reporter gene between the two groups

分组	n	野生型细胞周期蛋白 D1	突变型细胞周期蛋白 D1
miR-NC 组	5	1.03±0.25	1.07±0.22
miR-221 组	5	0.49±0.08	1.02±0.18
t		4.600	0.393
P		0.002	0.704

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 1224-1231 of CCND1 3' UTR	5' ...UUUGCAUUCUCACAU----UGCCAGGA...
hsa-miR-221-5p	3' UUUAGAUGUAACAUACGGUCCA

图 3. 细胞周期蛋白 D1 基因 mRNA 3'UTR 中 miR-221 结合位点的生物信息学分析

Figure 3. Bioinformatics analysis of miR-221 binding site in cyclin D1 mRNA 3'UTR

3 讨论

高 Hcy 血症是近些年受到越来越多关注的心血管疾病危险因素之一。Hcy 增多能够损伤血管内皮细胞, 使脂质、炎症细胞等在内皮损伤局部浸润, 形成泡沫细胞、脂纹并逐步发展为粥样斑块^[7-8]。在冠心病的发病过程中, 高 Hcy 能够引起冠状动脉内皮细胞损伤并促进冠状动脉粥样斑块的形成, Hcy 诱导冠状动脉内皮细胞损伤也被认为是高 Hcy 增加冠心病发病风险的重要病理环节^[9]。本实验以 HCAEC 为对象, 用 Hcy 刺激细胞后观察到细胞活力 $OD_{490\text{nm}}$ 水平明显降低, 表明 Hcy 能够诱导 HCAEC 损伤, 与既往其他研究中 Hcy 诱导冠状动脉内皮细胞损伤的报道一致。但是, 目前 Hcy 诱导冠状动脉内皮细胞损伤的机制尚不十分清楚, 因此本实验将对可能的机制进行深入探索。

miR 是具有广泛生物学作用的非编码小分子 RNA, 能够在转录后水平调节多种基因的表达, 进而在心血管、消化、呼吸等多个系统中发挥调节作用。

miR-221 是一种在心血管系统中介导细胞损伤的 miR。有多项研究报道, 在过氧化氢以及脂多糖诱导心肌细胞损伤的模型中, miR-221 的表达明显增加; 抑制 miR-221 的表达能够减轻上述病理因素诱导的心肌细胞损伤^[10-12]。在此基础上, 本实验分析了 miR-221 在 Hcy 诱导 HCAEC 损伤中的作用, 实验结果表明: 在 Hcy 处理 HCAEC 后, miR-221 的表达明显增加; 而在 Hcy 处理的同时转染 miR-221 抑制剂使 miR-221 的表达下调后, HCAEC 的活力 $OD_{490\text{nm}}$ 水平明显增加。这一结果提示 Hcy 通过增加 miR-221 的表达来诱导 HCAEC 损伤, 与既往其他研究报道的过氧化氢及脂多糖通过增加 miR-221 的表达诱导心肌损伤的作用吻合。

miR 本身不具备编码氨基酸的功能, 因此不直接参与细胞增殖、凋亡、损伤等生物学环节的调控, miR 调控生物学环节的作用依赖其对多种靶基因的负调控。目前关于 miR-221 下游调控机制的研究主要集中在恶性肿瘤, 多项研究报道 miR-221 能够使癌细胞的增殖活力下降、细胞周期发生停滞, 并且

靶向细胞周期蛋白 D1、EIF5A2 是与之相关的调控机制^[13-14]。在 Hcy 诱导内皮细胞损伤的过程中,细胞周期停滞同样也是重要的病理环节^[15-16],本实验也观察到:在 Hcy 处理后,miR-221 表达增加,细胞停滞在 G0/G1 期增加,进入 S 期及 G2/M 期均减少;而转染 miR-221 抑制物后,Hcy 引起的细胞周期变化被逆转。以上结果表明 Hcy 能够通过增加 miR-221 的表达引起 HCAEC 的细胞周期停滞,这是 Hcy 诱导 HCAEC 损伤的机制之一。

miR 能够识别并结合靶基因 mRNA 的 3'UTR,进而引起 mRNA 降解或阻碍 mRNA 翻译。恶性肿瘤相关的研究已经证实,miR-221 靶向调控细胞周期蛋白 D1、EIF5A2 等细胞周期调控基因^[13-14]。本实验在 Hcy 诱导 HCAEC 损伤过程中检测了上述两种可能受到 miR-221 调控的基因,发现细胞周期蛋白 D1 的表达降低,EIF5A2 的表达无明显变化;而转染 miR-221 抑制物后,细胞周期蛋白 D1 的表达增加,EIF5A2 的表达无明显变化。这一结果表明 Hcy 增加 miR-221 的表达后主要影响细胞周期蛋白 D1 的表达,进而造成 HCAEC 损伤及细胞周期停滞。为了进一步确认 miR-221 对细胞周期蛋白 D1 的靶向调节作用,本实验通过生物信息学分析发现:细胞周期蛋白 D1 基因 mRNA 3'UTR 第 1224-1231 碱基是 miR-221 的结合位点;通过双荧光素酶报告基因验证可知:miR-221 能够使含有细胞周期蛋白 D1 基因 mRNA 3'UTR 的双荧光素酶报告基因的荧光活力降低,将第 1224-1231 碱基进行突变后,miR-221 不再影响双荧光素酶报告基因的荧光活力。

综上所述,miR-221 在 Hcy 诱导 HCAEC 损伤过程中表达增加,抑制 miR-221 表达能够减轻 Hcy 诱导的 HCAEC 损伤。靶向细胞周期蛋白 D1 是 miR-221 参与 Hcy 诱导 HCAEC 损伤的可能分子机制,Hcy 增加 miR-221 的表达后靶向抑制细胞周期蛋白 D1,进而引起细胞周期停滞并造成细胞损伤。未来,miR-221 可能成为研究高 Hcy 血症增加心血管疾病发病风险的靶点。

[参考文献]

[1] Rucher G, Cameliere L, Fendri J, et al. Molecular imaging of endothelial activation and mineralization in a mouse model of accelerated atherosclerosis[J]. *EJNMMI Res*, 2019, 9(1): 80.
[2] Santoro L, Birra D, Bosello S, et al. Subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction in patients with polymyalgia rheumatica: a

pilot study[J]. *Scand J Rheumatol*, 2020, 49(1): 68-74.

- [3] Zhu M, Mao M, Lou X. Elevated homocysteine level and prognosis in patients with acute coronary syndrome: a Meta-analysis[J]. *Biomarkers*, 2019, 24(4): 309-316.
[4] Zhang Z, Wei C, Zhou Y, et al. Homocysteine induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells via mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 5736506.
[5] Ilona H, Katerina K, Lenka D, et al. Evaluation of vascular endothelial function in young and middle-aged women with respect to a history of pregnancy, pregnancy-related complications, classical cardiovascular risk factors, and epigenetics[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 430.
[6] Xue Y, Wei Z, Ding H, et al. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1 α in the progression of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(2): 671-81.
[7] Kim J, Kim H, Roh H, et al. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance[J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(4): 372-383.
[8] Azad MAK, Huang P, Liu G, et al. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in animal model[J]. *Amino Acids*, 2018, 50(1): 3-9.
[9] Lai WK, Kan MY. Homocysteine-induced endothelial dysfunction [J]. *Ann Nutr Metab*, 2015, 67(1): 1-12.
[10] Zhang L, Wang L, Guo E, et al. Silence of lncRNA CHRF protects H9c2 cells against lipopolysaccharide-induced injury via up-regulating microRNA-221 [J]. *Exp Mol Pathol*, 2019, 107: 43-50.
[11] Meng Q, Liu Y, Huo X, et al. MicroRNA-221-3p contributes to cardiomyocyte injury in H₂O₂-treated H9c2 cells and a rat model of myocardial ischemia-reperfusion by targeting p57 [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 589-596.
[12] 符丽珍, 黄茂芹, 劳之勇, 等. miR-221 在 H₂O₂ 诱导的大鼠心肌细胞损伤中的作用及机制研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(5): 83-88.
[13] Fu F, Wang T, Wu Z, et al. HMGA1 exacerbates tumor growth through regulating the cell cycle and accelerates migration/invasion via targeting miR-221/222 in cervical cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 594.
[14] Yang Y, Cui H, Wang X. Downregulation of EIF5A2 by miR-221-3p inhibits cell proliferation, promotes cell cycle arrest and apoptosis in medulloblastoma cells[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(3): 400-408.
[15] 肖丹丹, 诸葛欣, 陶珍珍. 同型半胱氨酸导致血管内皮细胞损伤机制的研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2016, 10(18): 2789-2793.
[16] Pan L, Yu G, Huang J, et al. Homocysteine inhibits angiogenesis through cytoskeleton remodeling [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(5): BSR20170860.

(此文编辑 曾学清)