

本文引用: 张楠楠, 赵明镜, 孔令旗, 等. exoRBase 数据库外泌体基因在冠心病中的差异表达及意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(1): 36-42.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2022)30-01-0036-07

## exoRBase 数据库外泌体基因在冠心病中的差异表达及意义

张楠楠, 赵明镜, 孔令旗, 张艺璇, 王尔玉, 修晟尧, 李天力, 刘小芸, 贺小芳, 常佩芬

(北京中医药大学东直门医院, 北京市 100700)

[关键词] 冠心病; 外泌体; exoRBase; 差异表达基因

[摘要] **目的** 通过对 exoRBase 外泌体数据库中筛选出的冠心病(CHD)患者外周血外泌体差异表达基因的分析, 挖掘导致冠心病发病和疾病进展中的关键基因和调控机制, 通过对差异表达 mRNA 关键基因的 GO 和 KEGG 富集分析, 研究冠心病差异表达 mRNA 参与的分子功能和生物学过程。**方法** 应用 R 语言筛选出在 exoRBase 外泌体数据库冠心病患者外周血中差异表达的外泌体基因, 通过在线数据库和 Cytoscape 软件构建 CeRNA 网络, 对关键基因进行可视化分析, 并对差异表达的 mRNA 关键基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。**结果** 筛选出冠心病患者外周血中差异表达的外泌体 mRNA 312 个, lncRNA 43 个, circRNA 85 个; 通过构建 CeRNA 网络, 发现 mRNA、lncRNA 和 circRNA 竞争性地结合 miRNA, 且与 miRNA 相结合的 lncRNA 表达均显著上调, 而 mRNA 和 circRNA 的表达则大多数呈现显著下调的趋势; 差异表达 mRNA 关键基因的 GO 和 KEGG 富集分析结果显示, 这些关键基因主要与“磷酸酶激活活动”和“磷酸酶调节活动”功能相关。**结论** 由 exoRBase 数据库筛选出的冠心病患者外周血外泌体与健康人群具有显著差异性, 且 mRNA、lncRNA 和 circRNA 可以竞争性地与冠心病显著相关的 miRNA 相结合, 并以之实现相互调控作用。这些基因可能参与了冠心病的发生和发展, 可以作为其调控点和治疗药物靶点。

[中图分类号] R44;R5

[文献标识码] A

### Expression and significance of exosomal genes in coronary heart disease: an analysis based on exoRBase database

ZHANG Nannan, ZHAO Mingjing, KONG Lingqi, ZHANG Yixuan, WANG Eryu, XIU Shengyao, LI Tianli, LIU Xiaoyun, HE Xiaofang, CHANG Peifen

(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[KEY WORDS] coronary heart disease; exosomes; exoRBase; differentially expressed genes

[ABSTRACT] **Aim** Through the exoRBase database to screen the differentially expressed exosomal genes and build the CeRNA network in the peripheral blood of coronary heart disease (CHD), and then explore the key genes and regulatory mechanisms leading to the onset and progression of CHD. Through the key genes of differentially expressed mRNA who were enriched by GO and KEGG analysis, to study the molecular function and biological processes of the differentially expressed mRNA in CHD. **Methods** The R language was used to screen the differentially expressed exosomal genes in the peripheral blood of CHD, and the online databases and Cytoscape software was used to construct the CeRNA networks. And then visualized and analyzed the key genes. In the end, the GO and KEGG enrichment analysis was performed for the differentially expressed mRNA key genes. **Results** A total of 312 exosomal mRNA, 43 exosomal lncRNA and 85 exosomal circRNA with differential expressed were screened out from the peripheral blood of CHD patients. Through the construction of the CeRNA network, it was found that mRNA, lncRNA and circRNA competitively bound to miRNA, and the expressions of lncRNA combined with miRNA were significantly up-regulated, while the expressions of mRNA and circRNA were mostly significantly down-regulated. The GO and KEGG enrichment analysis of key genes of differentially expressed mRNA showed that these key genes were mainly related to “phosphatase activator activity” and “phosphatase regu-

[收稿日期] 2021-03-12

[修回日期] 2021-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973787)

[作者简介] 张楠楠, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合临床心血管内科, E-mail 为 997110541@qq.com. 通信作者常佩芬, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中西医结合临床心血管内科, E-mail 为 13661022016@163.com.

latory activity” functions. **Conclusions** The peripheral blood exosomes screened by exoRBase database in patients with CHD are significantly different from those in healthy people, and mRNA, lncRNA and circRNA can competitively combine with miRNA significantly related to CHD and achieve mutual regulation. These genes may be involved in the occurrence and development of CHD and can be used as its regulatory points and therapeutic drug targets.

美国心脏协会最新研究<sup>[1]</sup>发现,既往无心血管疾病的亚洲人群致死性心血管疾病的发病率每年约为 3.68/1 000 人。Nikpay 等<sup>[2]</sup>研究发现,冠心病(coronary heart disease, CHD)的发生与多个基因相关,目前火热的“外泌体”相关研究<sup>[3-5]</sup>也为我们诊断和治疗冠心病提供了新的机遇。外泌体是存在于唾液、血液等各种生物流体中的一种纳米级膜状内吞囊泡<sup>[3]</sup>,其含有多种蛋白质和核糖核酸(RNA),可以调控受体细胞的行为,同时还可以作为诊断人类疾病的生物标志物,如 miRNA-130 即是诊断急性心肌梗死的一种极具潜力的外泌体<sup>[6]</sup>。exoRBase 数据库<sup>[7]</sup>(<http://www.exorbase.org/>)是一个可以在线查询的外泌体数据库,本研究在此基础上,以 miRNA 为纽带,利用 R 语言等多种数据分析软件,探讨了冠心病相关的信使 RNA(messenger RNA, mRNA)、长链非编码 RNA(long chain noncoding RNA, lncRNA)和环状 RNA(circular RNA, circRNA)以及三者之间的调控关系,以期对冠心病的深入研究提供一些具有价值的线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 基因表达谱数据下载

从 exoRBase 数据库下载了与健康人群和冠心病相关的表达谱数据,其中包含了 32 个正常样本和 6 个冠心病样本,所有的样本均由人类血液外泌体的转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)数据分析所得,当然也包括一些具有试验验证的数据。

### 1.2 差异表达基因的分析

本研究采用 R3.6.3 对所下载样本的差异表达基因进行了分析。首先运用 Limma 算法对多次出现的基因数据取均值,并删除表达量低于 1 的数据;其次采用 Sva 算法进行多个试验整合数据的批次校正,以保证每个样本基因表达值的中位数几乎在同一水平;然后用校正后的结果进行两独立样本 *t* 检验得到差异分析的结果( $P < 0.05$  和  $|\log_2 FC| > 0$ )。其中由于 exoRBase 数据库中 circRNA 的常用身份号(ID)并非 circBase 的 ID,因此在进行 circRNA 的差异分析前先通过 exoRBase 数据库提供的 circRNA 注释文件完成 ID 的转换。最后取上调和下调均显

著的部分差异基因数据使用 Pheatmap 函数做出其差异表达的热图。

### 1.3 mRNA-miRNA、lncRNA-miRNA、circRNA-miRNA 相互作用网络

基于 TargetScan(<http://www.targetscan.org>)和 miRanda(<http://cbio.mskcc.org/miRNA2003/miranda.html>)数据库预测了与 mRNA 结合的微小 RNA(miRNA),基于 miRcode 数据库(<http://mircode.org/>)预测了与 lncRNA 结合的 miRNA,通过 ENCORI(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)数据库预测了与 circRNA 相结合的 miRNA,然后采用 Cytoscape 3.8.2 构建了 mRNA、lncRNA 和 circRNA 与 miRNA 之间的相互作用网络,进一步可视化 mRNA、lncRNA 和 circRNA 三者之间的调控关系。

### 1.4 mRNA 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

采用基因本体论(Gene Ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集的方法对差异表达的 mRNA 进行了富集分析。首先利用 R 脚本将基因的名字转换成对应的基因 ID,然后运用 R 脚本进行 GO 和 KEGG 富集分析。其中 GO term 包含生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF),在进行 GO 富集分析时,本研究采用了费希尔检验(Fisher test)和错误发现率(false discovery rate, FDR)方法校验, $P$ 值和 $Q$ 值均设为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 差异表达基因分析

本研究自 exoRBase 数据库集中筛选出了在冠心病患者血液和健康人血液中均差异表达的外泌体 mRNA 312 个,其中 55 个基因(18%)上调,包括 3 个上调最显著( $|\log_2 FC| > 2$ ,即上调 4 倍以上)的基因,即组蛋白 2H3c(histone 2H3c, HIST2H3C)、防卫蛋白  $\alpha 1B$ (defensin alpha 1B, DEFA1B)和组蛋白 2 簇 H2aa3(histone 2H2aa3, HIST2H2AA3),257 个基因(82%)下调。lncRNA 43 个,其中 24 个基因(56%)上调,包括 5 个上调最显著( $|\log_2 FC| > 2$ ,即上调 4 倍以上)的基因,即热休克 70 kDa 蛋白 8P8(heat shock 70 kDa

protein 8P8, HSPA8P8)、核苷二磷酸连接部分 X 型基元 4P2 (nucleoside diphosphate linked moiety X-type motif 4P2, NUDT4P2)、多囊肾病 1P1 (polycystic kidney disease 1P1, PKD1P1)、高移动族核小体结合域 2P41 (high-mobility group nucleosomal binding domain 2P41, HMGN2P41) 和 H3 组蛋白家族 3BP1 (H3 histone family 3BP1, H3F3BP1), 19 个基因(44%) 下调。circRNA 85 个, 其中 4 个基因(5%) 上调, 包括 2 个上调最显著 ( $|\log_2 FC| > 1$ , 即上调 2 倍以上) 的基因, 即 hsa\_circ\_0001439 和 hsa\_circ\_0000896, 81 个基因

(95%) 下调, 包括 5 个下调最显著 ( $|\log_2 FC| > 1$ , 即下调 2 倍以上) 的基因, 即 hsa\_circ\_0000842、hsa\_circ\_0031446、hsa\_circ\_0001072、hsa\_circ\_0000982 和 hsa\_circ\_0075796。再利用 R 脚本对以上差异表达的基因进行可视化分析后, 取其上调和下调均显著的部分差异基因数据做出了相应的热图, 图中各个方块的颜色表达了不同差异基因在不同人体中表达的显著程度, 颜色由绿到红的演变表示了基因表达显著程度的递增 (图 1、图 2 和图 3)。

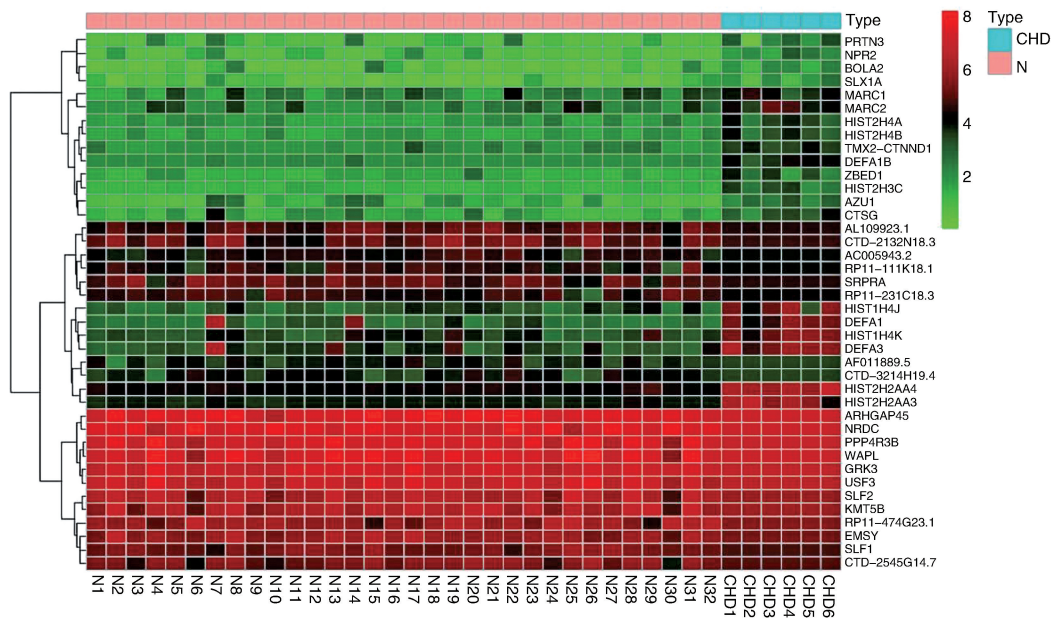


图 1. 差异表达的 mRNA 热图(上调基因 20 个, 下调基因 20 个)

Figure 1. Heat map of differentially expressed mRNA (20 up-regulated genes and 20 down-regulated genes)



图 2. 差异表达的 lncRNA 热图(上调基因 19 个, 下调基因 19 个)

Figure 2. Heat map of differentially expressed lncRNA (19 up-regulated genes and 19 down-regulated genes)



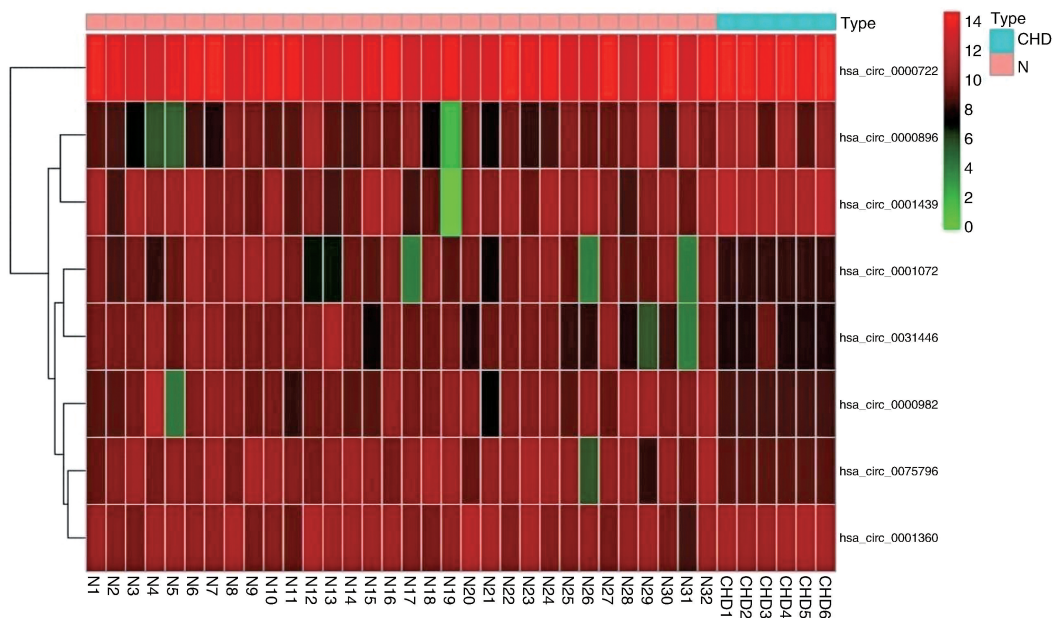


图 3. 差异表达的 circRNA 热图(上调基因 4 个, 下调基因 4 个)

Figure 3. Heat map of differentially expressed circRNA (4 up-regulated genes and 4 down-regulated genes)

2.2 mRNA-miRNA、lncRNA-miRNA、circRNA-miRNA 相互作用网络

本研究通过 TargetScan、miRnada、miRcode 和 ENCORI 在线数据库预测到了与 miRNA 相结合的 mRNA 48 个, lncRNA 10 个, circRNA 15 个, 使用 Cytoscape 3.8.2 软件构建出的四者之间的调控关系网络中红色节点为 mRNA, 蓝色节点为 lncRNA, 绿色

节点为 circRNA, 黄色节点为 miRNA, 节点之间的连线表示两者之间存在相互作用关系。由基因间的相互调控网络可以清晰地看出 mRNA、lncRNA 和 circRNA 竞争性地结合 miRNA(图 4), 且与 miRNA 相结合的 lncRNA 的表达均显著上调, 而 mRNA 和 circRNA 的表达则大多数呈现显著下调的趋势。

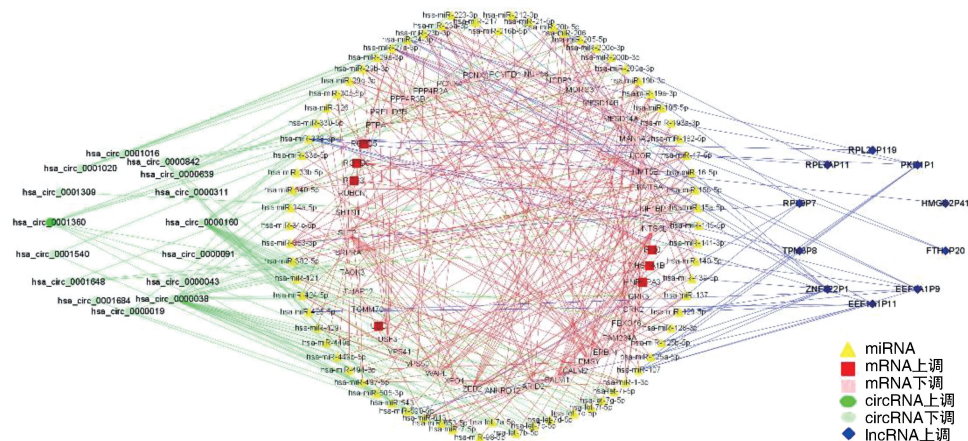


图 4. 关键基因的 CeRNA 调控关系网络图

Figure 4. CeRNA regulatory network map of key genes

2.3 mRNA 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

研究表明, 差异表达基因显著富集的生物学过程 (BP) 主要包括磷酸酶活性的正性调节 (positive regulation of phosphoprotein phosphatase activity)、磷酸酶活性的正性调节 (positive regulation of

phosphatase activity) 和包含信号通路的核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain containing signaling pathway) 等(图 5)。差异表达基因显著富集的细胞组分 (CC) 主要包括钙通道复杂性 (calcium channel complex)、宿主 (host) 和宿



主细胞(host cell)等(图5)。差异表达基因显著富集的分子功能(MF)主要包括蛋白磷酸酶激活活动(protein phosphatase activator activity)、磷酸酶激活活动(phosphatase activator activity)和磷酸酶调节活动(phosphatase regulator activity)等(图5)。

此外,KEGG 通路富集(图6)结果表明,差异表达的 mRNA 中有蛋白磷酸酶 4 调控亚基 3B( protein

phosphatase 4 regulatory subunit 3B,PPP4R3B)、钙调蛋白 1( calmodulin 1, CALM1)、蛋白磷酸酶 4 调控亚基 3A( protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A, PPP4R3A)和钙调蛋白 2( calmodulin 2, CALM2)4 个基因显著映射到了胰高血糖素信号通路( glucagon signaling pathway)( $P<0.05, Q<0.05$ )。

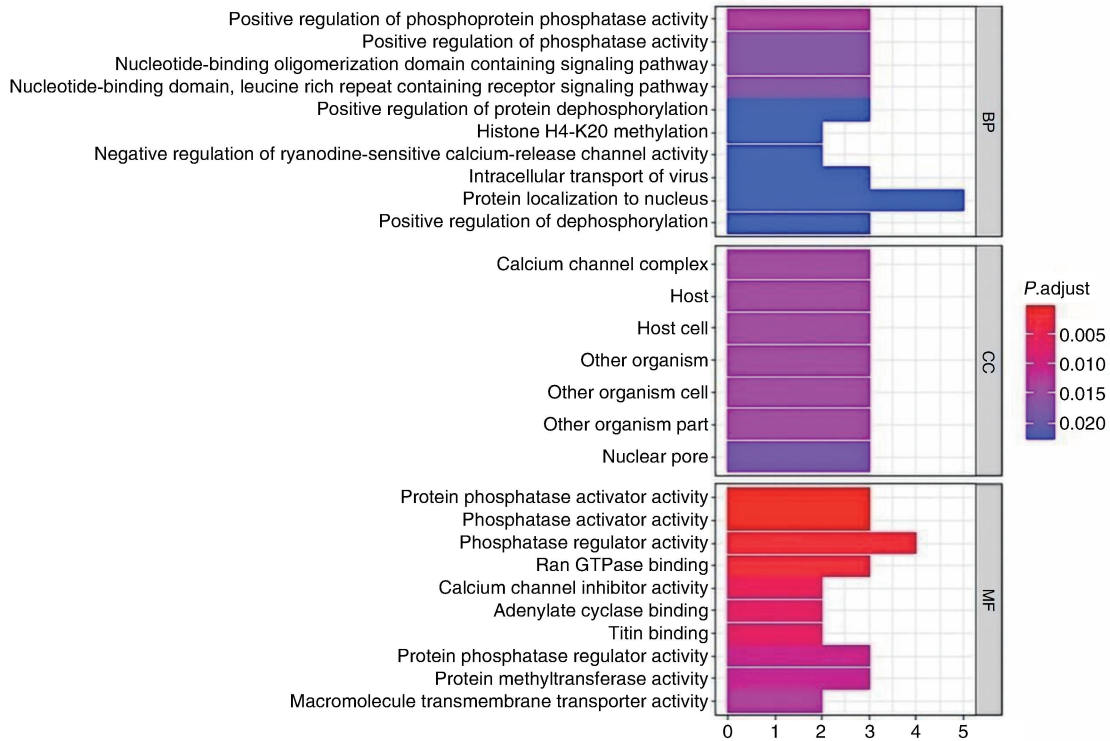


图5. 差异表达基因 GO 富集情况

横坐标为基因数;纵坐标为 GO term,从上到下 P-adjust 依次增大。BP:生物学过程;CC:细胞组成;MF:分子功能。

Figure 5. GO enrichment of differentially expressed genes

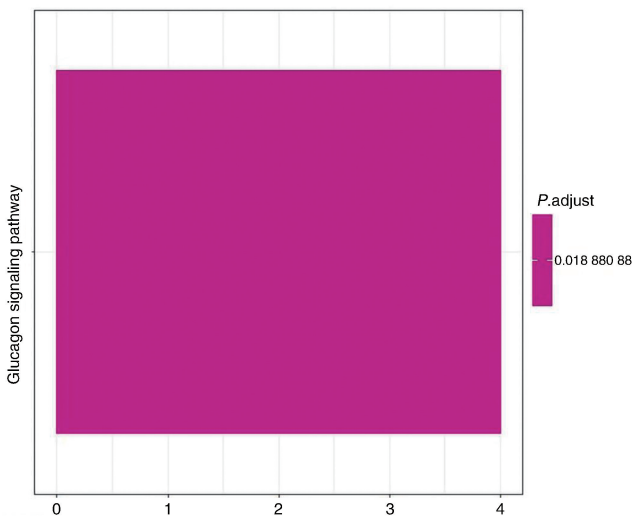


图6. 差异表达的 mRNA 富集的 KEGG 通路

Figure 6. KEGG pathways of differentially expressed mRNA

### 3 讨论

本研究发现,在调控网络中,mRNA、lncRNA 和 circRNA 竞争性地结合 miRNA,且 lncRNA 的表达显著上调,而 mRNA 和 circRNA 的表达则大多数显著下调。众多研究<sup>[8-12]</sup>也表明,lncRNA 可通过调节与之相结合的 miRNA 的表达,来调控对应 mRNA 的表达,从而参与细胞间的生物学活动。本研究在此基础上,结合 GO 和 KEGG 富集分析对筛选出来的部分差异表达 mRNA 进行了如下讨论。

#### 3.1 CALM1——与和免疫浸润相关的 miRNA-19 相结合的差异表达 mRNA

现有研究<sup>[13]</sup>表明,动脉粥样硬化的血管内膜中存在着大量的免疫细胞,如巨噬细胞等,且柳强等<sup>[14]</sup>的研究亦表明单核细胞/淋巴细胞比率越大,

冠状动脉病变程度越严重。本研究发现,在 mRNA-miRNA 网络中与巨噬细胞分泌的 miRNA-19<sup>[15]</sup>相结合的 CALM1,于 GO 通路富集分析中显著富集到了生物学过程中的磷蛋白磷酸酶活性的正性调节、细胞组分中的钙通道复杂性和分子功能中的蛋白磷酸酶激活活动等关键通路,同时还经 KEGG 富集分析显著富集到了胰高血糖素信号通路。这表明 CALM1 可能一方面受巨噬细胞的调控,参与血管内膜损伤修复的炎症细胞浸润过程<sup>[13]</sup>;一方面通过调节心肌细胞钙离子通道的复杂性等,来参与和心脏收缩功能密切相关的生物学过程。此外,Tsai 等<sup>[16]</sup>研究亦表明 CALM1 的 N98S 突变可以导致以窦性心动过缓、QRS 波增宽、肾上腺素介导的 QT-C 间期延长和双向室性心动过速为特征的心律失常综合征,而 CALM1 基因突变发生在青少年人群中也可导致心源性猝死<sup>[17]</sup>。

### 3.2 HSPA1B——与和心脏重构相关的 miRNA-34 相结合的差异表达 mRNA

本研究经 mRNA-miRNA 网络分析发现 HSPA1B 与 miRNA-34 相结合,同时 Ooi 等<sup>[18]</sup>研究发现 miRNA-34 家族与病理性心脏重构密切相关,且治疗性抑制 miRNA-34 家族可有效改善此病理现象,因此可以大胆猜测,抑制与 miRNA-34 家族紧密结合的 HSPA1B,或许同样能够改善病理性心肌肥厚患者的心脏重构。Gombos 等<sup>[19]</sup>研究也证实,携带 HSPA1B 等位基因 G 的心衰患者血清中,循环热休克蛋白 70 (HSP70) 的水平较对照组明显升高。此外,本研究在 mRNA 的 GO 富集分析中发现,HSPA1B 作用于细胞质模式识别受体信号通路。Portig 等<sup>[20]</sup>研究亦表明,HSPA1B 与自身免疫性疾病的免疫浸润水平相关,而动脉粥样硬化的血管内膜中也存在着大量的免疫细胞<sup>[13]</sup>,这正说明 HSPA1B 有可能通过介导免疫细胞浸润,引起动脉粥样硬化,进而导致冠心病。

### 3.3 ERBIN——与和血脂相关的 miRNA-33 相结合的差异表达 mRNA

本研究发现,在 mRNA-miRNA 网络中 ErbB2 相互作用蛋白 (ErbB2 interacting protein, ERBIN) 可与 miRNA-33 等相结合。Reddy 等<sup>[21]</sup>研究发现 miRNA-33 在正常情况下,可提高脂肪酸氧化和胰岛素信号通路代谢途径活性,同时,miRNA-33 还可调节胆固醇外排和高密度脂蛋白胆固醇的生成。因此,被 miRNA-33 调控的 ERBIN 很有可能也参与了脂肪代谢。而 Toh 等<sup>[22]</sup>的最新研究也发现脂肪变性与冠心病相关,且中度至重度脂肪变性与临床冠状动脉

疾病相关。此外,ERBIN 还可与 miRNA-23、miRNA-130 等 miRNA 相结合,Liu 等<sup>[23]</sup>的研究表明 miRNA-23 在冠心病患者的外周血中显著上调,且过表达的 miRNA-23 可促进血管平滑肌细胞的增殖,并抑制其凋亡;而 miRNA-130 则作为诊断急性心肌梗死的一种极具潜力的外泌体<sup>[6]</sup>被临床研究人员所关注。

## 4 研究的局限性

在冠心病差异表达基因的分析中,笔者筛选出了在冠心病患者和健康人血液中均差异表达的外泌体 mRNA 312 个,lncRNA 43 个,circRNA 85 个。但在对以上基因进行与 miRNA 相互作用网络分析后,通过相应的在线数据库仅预测到了与 miRNA 相结合的 mRNA 48 个,lncRNA 10 个,circRNA 15 个。造成此结果的原因,笔者认为可能有以下 3 点:①目前研究发现的有关外泌体的数据尚不完全,还有许多未知的基因及可能存在的冠心病相关病理机制亟待发掘;②本研究所选用的 miRNA 在线预测数据库较少,且相应数据库所收录的基因样本亦不够全面;③本研究选用的 exoRBase 数据库收录的基因样本存在一定偏差。

此外,由于本研究选用的 exoRBase 数据库收录的有关冠心病的样本仅 6 例,数目较少,且因研究经费及医院检测技术的局限性,本研究未能进行实际临床基因验证,因此,本研究中筛选出的冠心病的差异表达基因或许不够全面,而且难以避免误差。可能尚有许多差异表达程度更显著、对冠心病的临床诊断和治疗更具有价值的基因数据未被挖掘出来,在此,笔者希望在后续的临床研究中可以将其进一步完善。

## 5 结论

综上所述,本研究发现冠心病患者的外周血外泌体中可检测到的 mRNA、lncRNA 和 circRNA 较之健康人群均具有显著差异,且它们可以竞争性地和与冠心病显著相关的 miRNA 相结合,并以之实现相互调控作用,同时参与众多关键性生物学过程。本研究首先运用 R 脚本进行基因样本数据的筛选和分析,其次运用 Cytoscape 对所筛选数据进行可视化,最后还对具有差异性的 mRNA 关键基因进行了 GO 和 KEGG 富集分析探索其可能的生物学过程,具有一定的科学性。此外,本研究中所挖掘出的冠

心病差异表达基因,可以作为其调控点和治疗药物靶点,应当引起关注。

#### [参考文献]

- [1] VIRANI S S, ALONSO A, APARICIO H J, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2021, 143(8): e254-e743.
- [2] NIKPAY M, GOEL A, WON H H, et al. A comprehensive 1 000 Genomes-based genome-wide association Meta-analysis of coronary artery disease [J]. *Nat Genet*, 2015, 47(10): 1121-1130.
- [3] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 255-289.
- [4] KALLURI R, VALERIE S L. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [5] YAN Z S, ZHANG N C, LI K, et al. Upregulation of long non-coding RNA myocardial infarction-associated transcription is correlated with coronary artery stenosis and elevated inflammation in patients with coronary atherosclerotic heart disease[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021. DOI: 10.1002/kjm2.12444.
- [6] PAN X, HE Y, CHEN Z, et al. Circulating miR-130 is a potential bio signature for early prognosis of acute myocardial infarction [J]. *J Thorac Dis*, 2020, 12(12): 7320-7325.
- [7] LI S, LI Y C, CHEN B, et al. exoRBase: a database of circRNA, lncRNA and mRNA in human blood exosomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D106-D112.
- [8] HUI Z, ZHANWEI W, XI Y, et al. Construction of ceRNA coexpression network and screening of molecular targets in colorectal cancer [J]. *Dis Markers*, 2020, 2020: 2860582.
- [9] LI Y, LUO M, SHI X, et al. Integrated bioinformatics analysis of chromatin regulator EZH2 in regulating mRNA and lncRNA expression by ChIP sequencing and RNA sequencing [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81715-81726.
- [10] SONG C, ZHANG J, LIU Y, et al. Construction and analysis of cardiac hypertrophy-associated lncRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveal functional lncRNAs in cardiac hypertrophy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 10827-10840.
- [11] ZHANG X, LIANG H, KOURKOUMELIS N, et al. Comprehensive analysis of lncRNA and miRNA expression profiles and ceRNA network construction in osteoporosis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 106(4): 343-354.
- [12] 廖江铨, 王阶, 刘咏梅, 等. 高通量测序筛选冠心病血瘀证相关 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(19): 28-33.
- [13] LEGEIN B, TEMMERMAN L, BIESSEN E A, et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20): 3847-3869.
- [14] 柳强, 胡有志, 薛雪. 冠心病患者单核细胞/淋巴细胞比率与冠状动脉病变严重程度相关性分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(10): 868-873.
- [15] 李超, 戴敏. 不同细胞来源的外泌体在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(1): 27-32.
- [16] TSAI W, GUO S, OLAOPA M, et al. CALM1 complex arrhythmia syndrome in a knock-in mouse model carrier of the N98S mutation [J]. *Circulation*, 2020, 142(20): 1937-1955.
- [17] WU A Z, TSAI W C, YIN D C, et al. Isoproterenol fails to activate cardiac SK currents in mice heterozygous for the N98S calmodulin mutation [J]. *Circulation*, 2017, 136: 3.
- [18] OOI J Y, BERNARDO B C, BOEY E J, et al. Identification of miRNA-34 networks in pathological cardiac remodeling [J]. *Circ Res*, 2014, 115: 2.
- [19] GOMBOS T, FÖRHÉCZ Z, POZSONYI Z, et al. Interaction of serum 70-kDa heat shock protein levels and HspA1B (+1267) gene polymorphism with disease severity in patients with chronic heart failure [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2008, 13(2): 199-206.
- [20] PORTIG I, KLIEBE F, KLIEBE C, et al. HSPA1B polymorphism in familial forms of inflammatory dilated cardiomyopathy [J]. *Int J Cardiol*, 2009, 133(1): 126-128.
- [21] REDDY L L, SHAH S, PONDE C K, et al. Circulating miRNA-33: a potential biomarker in patients with coronary artery disease [J]. *Biomarkers*, 2019, 24(1): 36-42.
- [22] TOH J Z K, PAN X H, LIN TAY P W, et al. A Meta-analysis on the global prevalence, risk factors and screening of coronary heart disease in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2021. DOI: 10.1016/j.cgh.2021.09.021.
- [23] LIU L, CHENG Z, YANG J. miR-23 regulates cell proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells in coronary heart disease [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(11): 1873-1878.

(此文编辑 许雪梅)