

综述

小分子 RNA 在先天性心脏病中的研究进展

严华林^{1,2} 综述 华益民^{1,3} 审校

(1. 四川大学华西第二医院儿科; 2. 四川大学华西临床医学院;
3. 四川大学出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 小分子 RNA (miRNAs) 是一类在转录后水平调控基因表达的小分子非编码 RNA。它们具有进化保守性、组织细胞特异性和核酸杂交高度特异性。miRNAs 在心肌细胞的增殖、分化和凋亡、心脏神经嵴细胞的迁移、心脏形态发生和心脏图式发育等诸多过程中扮演着重要角色, 可为先天性心脏病发生机制的阐明提供一种全新的视角。miRNAs 在先天性心脏病发生机制中的研究可分为临床研究和动物研究两类, 该文就这两类研究的研究进展及其研究结论对先天性心脏病机制的阐释以及目前国内研究的现状和局限等方面进行综述。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(10): 1070-1074]

[关键词] 小分子 RNA; 先天性心脏病; 心脏发育

Research advances on role of microRNAs in congenital heart diseases

YAN Hua-Lin, HUA Yi-Min. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Email: hualin_yan@foxmail.com)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs, which mainly regulate gene expression through post-transcriptional process. They are highly conserved, tissue-specific and highly specific in miRNA-binding on 3'-untranslated regions. MicroRNAs have been identified as crucial regulators in myocardial cell proliferation, differentiation and apoptosis, migration of cardiac neural crest cells, cardiac morphogenesis and cardiac patterning processes, which may provide a new insight into the research on developmental mechanism of congenital heart diseases. The research on miRNAs in congenital heart diseases includes clinical research and animal experiments. This article reviews two types of research advances, the mechanism of congenital heart diseases, and the current status and limitation of the domestic reports.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(10): 1070-1074]

Key words: MicroRNAs; Congenital heart disease; Cardiac development

先天性心脏病 (congenital heart disease, CHD) 的发病率约为 6‰~8‰^[1]。根据我国 2012 年出生缺陷防治报告资料, 从 2005 年起, CHD 已跃居我国出生缺陷首位, 占有出生缺陷监测病例的 26.7% (2011 年), 是新生儿和婴儿期致残、致死的重要原因^[2]。目前 CHD 发病率整体呈上升趋势, 据估算我国每年新增 CHD 患儿将超过 13 万例。目前对于 CHD 发病机制的研究主要集中在心脏发育分子调控领域, 其中小分子 RNA (microRNAs, miRNAs) 作为近年来发现的一种表观遗传调控机制, 已经成为发育生物学的研究热点。

miRNAs 是一类在转录后水平调控基因表达的小分子非编码 RNA, 大小约为 22 个核苷酸。调控方式主要通过靶向结合 mRNA, 进而抑制或阻断翻译^[3-4]。在心血管系统疾病中, 通过 miRNAs 表达谱分析可以检测到多种 miRNAs 表达变化^[5], 它们在心力衰竭、心律失常、心肌肥厚和心脏发育等心血管疾病的发生演变及相关生物过程中起着重要的调控作用^[6-10]。

现阶段关于 miRNAs 在 CHD 中的研究可以分为临床和动物研究两类, 临床研究因取材于手术或流产标本, 其研究结果更具有代表性和应用价

[收稿日期] 2014-01-21; [接受日期] 2014-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金 (81070136、81270226)。

[作者简介] 严华林, 男, 硕士研究生。

值;动物实验研究因操作性更强,能进行更深入的基因敲除和信号通路研究。本文就这两方面的研究进展做一综述。

1 miRNAs 的结构与生物合成

miRNAs 是一类约为 22 个核苷酸长度的具有调控功能的非编码 RNA,其生物合成过程至今尚未完全阐明。多数观点认为,miRNAs 基因在 RNA 聚合酶 II、III 的作用下转录得到转录初产物(primary miRNA, pri-miRNA),pri-miRNA 在 RNA 聚合酶 III Drossha^[11]和 DiGeorge 综合征关键区域 8 蛋白(DiGeorge syndrome critical region 8, DGCR8)^[12-13]的协同催化下被剪切成 60~70 个核苷酸长度的茎环状 miRNA 前体(precursor miRNA, pre-miRNA)^[3-4]。随后 pre-miRNA 被 Ran-GTP 依赖的 Exportin-5 转运体识别并从细胞核内转运至胞浆,最终在胞浆中被 RNA 聚合酶 III Dicer 和反式激活应答 RNA 结合蛋白(transactivating response RNA-binding protein, TRBP)剪切成含约 22 个核苷酸的具有基因沉默功能的成熟双链结构^[14-15]。

2 miRNAs 的调控机制与功能

成熟双链结构中的主导链(guide strand)由 Argonaute 蛋白识别,并与 RNA 诱导转录沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,形成 miRISC,而 miRNAs 的随从链(passenger strand)被迅速降解^[4]。miRISC 与 mRNA 的 3' 非编码区(3' untranslated regions, UTRs)结合后可致基因沉默,基因沉默的效果取决于 miRNAs 与靶基因之间的互补程度,当二者互补不完全时仅抑制翻译水平,完全互补时则会导致相应 mRNA 发生降解^[3-4]。

目前研究证实 miRNAs 在心肌细胞的增殖、分化和凋亡、心脏神经嵴细胞的迁移、心脏形态发生和心脏图式发育等诸多过程中起重要作用^[9,16-17]。miRNAs 具有功能冗余性(functional redundancy)和上位联系性(epistatic relationships)^[18],即一个 miRNA 可能有多个基因靶点、多个 miRNAs 也可以共同调控一个基因靶点^[19],故寻找其上下游靶

点及相关通路非常复杂,其实验设计及实施需十分缜密。

3 miRNAs 与先天性心脏病

多数观点认为,心脏发育是一个多基因时空调控的过程,实验研究证实 miRNAs 可参与心脏发育的相关通路调控进而导致 CHD 发生^[20]。

目前,miRNAs 在 CHD 发生机制中的研究可分为临床及动物研究两类。因 miRNAs 在物种间具有保守性,利于动物实验及临床研究结果进行比较并相互促进;同时,miRNAs 还具有组织和发育阶段特异性,如 miR-1 和 miR-133 在心肌和骨骼肌特异性表达,并主要在新生和成年小鼠中表达^[21],利于研究特定组织细胞发育(如心脏发育组织)的基因调控。

3.1 临床研究

miRNAs 的临床研究标本来源于 CHD 患儿手术心脏标本或流产胎儿的心脏标本。

室间隔缺损(ventricular septal defect, VSD)是最常见的 CHD 类型。Li 等^[22]发现与对照组儿童相比,VSD 患儿心脏组织中 miRNAs 有显著变化,qRT-PCR 实验证实 miR-1-1 表达下调,而 miR-181c 表达上调。Li 等^[22]筛选并证实了 miR-1-1 的两个靶基因—GJA1 和 SOX9。SOX9 是心脏瓣膜和间隔发育重要的调控基因,在心内膜垫的形成中具有重要作用^[23]。人类家系研究发现,SOX9 上游区的增强子(如 Nkx2.5 和 Gata4)失调,与 CHD 发生有着重要关系^[24]。GJA1 基因编码连接蛋白 43(Cx43),是主要的心脏缝隙连接通道。在大鼠心肌梗死模型上,心肌 miR-1 的过表达可抑制靶基因 GJA1 和 KCNJ2,引起 QRS 波增宽、QT 间期延长等心律失常^[25],而 miR-1 调控 GJA1 与 VSD 发生之间的关系还有待进一步阐明。Li 等^[22]还发现,miR-181c 的靶基因是 BMPR2, BMPR2 基因编码骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)2 型受体。Beppu 等^[26]在小鼠中条件性基因敲除 BMPR2,导致右心室双出口、VSD 和心内膜垫缺损等心血管畸形。BMP2 及其受体是心脏发育中间隔形成、瓣膜生成、房室管形态发生以及心内膜垫上皮间质转化等过程所必需的^[26-27]。

法洛四联症(tetralogy of Fallot, TOF)是存活

婴儿中最常见的青紫型CHD。O'Brien等^[28]发现,与配对婴儿相比,TOF患儿中共有61个miRNA显著变化,qRT-PCR验证显示miR-1275、miR-27b和miR-421表达上调,而miR-1201和miR-122表达下调。miR-27b过度表达可抑制靶基因Mef2c影响心脏发育中心肌生成过程(myogenesis),导致心肌肥厚^[29]。研究显示,miR-27b在心肌中的靶点为过氧化物酶体增生物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ),PPAR- γ 抑制与心肌肥厚直接相关^[30];miR-122在转基因模型小鼠(Pax-8^{-/-} mice)上的过表达可引起左室壁和间隔区的细胞凋亡,导致VSD发生^[31]。

然而,miRNA表达具有时空差异性,取材于出生后心脏标本的研究结果能否反映胚胎时期的特征尚存在争议。与其他研究者不同的是,O'Brien等^[28]收集了妊娠90d的胎儿心脏标本作为研究TOF的胚胎学对照,发现只有miR-1275、miR-421和miR-1201的表达变化在胎儿期与出生后一致,而在胎儿标本中,miR-122表达上调,miR-27b表达下调,提示胎儿期与出生后患儿心肌中miRNAs的表达变化不尽相同,因此,胎儿期心肌标本或能为CHD胚胎发育机制阐明提供更多的信息。如果研究仅探讨出生后的疾病状态和进展[如TOF中右心室肥厚的机理,二叶式主动脉瓣(bicuspid aortic valve, BAV)中的钙化机制],不涉及胚胎发育成因,则不存在上述胚胎学代表性的疑问,这种研究是非常有价值的。

Zhang等^[32]发现,与非配对捐赠心脏对照相比,TOF患儿心脏标本中有47个表达显著变化的miRNAs,其中16个表达下调,31个表达上调。生物学信息方法研究显示,促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路相关的6个基因(MAPKAPK3、MAPK3K3、MAPK3K5、MAPK3、MAPK9和TRAF2)可能是上述miRNAs的靶点,参与了右心室肥厚的病变^[32]。有报道显示,与对照组相比,在CHD胎儿心脏标本中MAPK通路分子蛋白有明显表达变化^[33]。Brown等^[34]发现在缺氧诱导的肺动脉高压小鼠模型中,MAP3K2参与了右室心肌肥厚的发生。

BAV是重要的先天性心脏瓣膜疾病。Nigam等^[35]采用BAV患者瓣膜标本进行miRNAs研究,发现相对于主动脉瓣关闭不全组,主动脉瓣狭窄

组瓣膜中的miR-26a、miR-30b和miR-195表达下调。体外miRNAs模拟体(mimic)细胞转染实验证实miR-26a和miR-30b能抑制钙化相关通路的mRNA水平,miR-195作用则相反,能使钙化相关通路的mRNA水平提高,如miR-26a可抑制前钙化基因(pro-calcification gene)BMP2,骨形态发生蛋白-2(BMP2)基因在主动脉狭窄的瓣膜中有过表达,参与了瓣膜的钙化^[36]。

由于上述CHD大多预后良好,即使超声证实这些CHD的存在,医学妊娠决策及孕妇、家庭的意愿均指向继续妊娠及出生后治疗,因此缺乏这些疾病胎儿期心脏标本的相关研究报道。然而对于一些严重的复杂型CHD,产前明确诊断后,部分将被终止妊娠,在符合伦理和知情同意的情况下可以选择这类CHD的胎儿心脏标本进行研究。

单心室(single ventricle, SV)是一种预后不良的严重青紫型CHD。Yu等^[37]发现与对照组相比,自然流产的胎儿单心室心脏标本中共有48个miRNA显著变化,其中qRT-PCR实验显示hsa-miR-214、hsa-miR-19b和hsa-miR-126表达上调,hsa-miR-200a、hsa-miR-10a和hsa-miR-206表达下调,这些miRNAs可能通过WNT和mTOR通路参与了单心室心脏发育的调控。Liu等^[38]发现,miRNAs参与了小鼠神经发育中经典WNT通路(Wnt- β -catenin signaling)的调控。

目前国内通过手术标本进行CHD发生机制实验研究很大程度上局限于对照组心脏标本的获取。在Li等^[22]对VSD的研究中,28例手术实验组只有7例对照,且作者未明确指出对照组的人口学信息是否配对,研究的难度可见一斑。国外组织标本库(Tissue Bank for Developmental Disorders)的建立使这方面的研究具有明显优势。如Kuhn等^[39]从标本库中取唐氏综合症的胎儿标本研究miRNAs的作用,发现5个人类21号染色体衍生miRNAs(miR-99a、let-7c、miR-125b-2、miR-155和miR-802)过表达,这些miRNAs可能参与了唐氏综合症患儿神经和心脏异常发育过程。

3.2 动物实验研究

miRNAs的临床研究虽然具有代表性,但却无法阐明与CHD相关的miRNAs中每一个具体miRNA的功能作用,也不能直接说明这些miRNA之间是如何相互作用并如何调控CHD的胚胎发育。

而动物实验研究既能直接针对某一 miRNA 在心脏发育中的作用进行研究,也能获取心脏发育各个时期 miRNAs 的表达规律并证明其与心脏发育的相关性。目前基因敲除实验已经证明部分 miRNA 参与心脏发育过程,并且具有一定的表型特异性,同时采取联合敲除等手段的实施,再次证明 miRNA 调控的复杂性和功能冗余性。

Liu 等^[40]特异性地敲除了小鼠中的 miR-133a-1 和 miR-133a-2 基因,发现单一敲除 miR-133a-1 或 miR-133a-2 的小鼠发育特征及心脏结构与野生型基本相同,而联合敲除 miR-133a-1 与 miR-133a-2 的小鼠约半数在胚胎期或出生早期死亡,最为常见的心脏畸形为 VSD,其余存活至成年小鼠也极易进展为扩张型心肌病和心力衰竭。Liu 等^[40]证实 miR-133a 可能通过 SRF 和 cyclin D2 基因调控心肌细胞增殖和凋亡。Chen 等^[21]研究发现 miR-133a-1 和 miR-133a-2 具有相同序列且分别位于小鼠 18 号染色体和 2 号染色体,它们在调控小鼠心脏发育中有类似的功能。

在本世纪初,研究者发明了 Cre-loxP 重组系统条件性基因敲除 (conditional gene knock-out) 技术^[41]。利用该项技术可以特异性敲除特定的发育

组织细胞 (如心脏神经嵴细胞) 中 miRNAs 合成的必要 RNA 聚合酶 III Dicer 基因,而不影响其他组织中的 Dicer 正常表达和 miRNAs 正常合成,这既减少了广泛基因敲除可能导致的突变型高致死率,又能证明 miRNA 在特定组织细胞发育中的调控作用。Huang 等^[17]运用该技术条件性地敲除神经嵴细胞系 (neural crest cell lineage, NCCs) 中的 Dicer 基因,培育出 Dicer^{flax/flax}/Wnt1-Cre 小鼠,发现心脏神经嵴细胞中丢失 Dicer 后,心脏图示发育受到严重影响,导致诸如 B 型主动脉弓中断、右心室双出口、VSD 等多种心血管畸形。上述提及的主要研究概要见表 1。

4 结语

miRNAs 的发现为阐释和研究基因表达调控、生物过程异常调控和疾病发生提供了一个全新的视角。虽然暂时对于 miRNAs 的生物学功能还知之甚少,对其在心脏发育和先天性心脏病形成中的作用也非常局限,但由于具有分子量小、作用特异、组织细胞特异等优点,决定了 miRNAs 很好的研究价值和临床应用前景。

表 1 先天性心脏病发病机制中 miRNAs 作用的概要

参考文献	研究疾病	标本来源	miRNAs 的表达变化 (相对于对照组)	可能靶基因及参与调控通路
Huang 等 ^[17]		转基因小鼠	miR-21 和 miR-181a	MEK/ERK 通路
Li 等 ^[22]	室间隔缺损	手术标本	上调: miR-181c, 下调: miR-1-1	miR-1-1: GJA1 和 SOX9, miR-181c: BMPR2
O'Brien 等 ^[28]	法洛四联症	手术标本	上调: miR-1275、miR-27b 和 miR-421, 下调: miR-1201 和 miR-122 *	44 个潜在靶基因与 33 个 miRNAs 呈负相关性
Zhang 等 ^[32]	法洛四联症	手术标本	47 个显著变化的 miRNAs, 其中 16 个下调, 31 个上调	MAPK 通路
Nigam 等 ^[35]	二叶式主动脉瓣	手术标本	下调 (相对于主动脉关闭不全组): miR-26a、miR-30b 和 miR-195	钙化相关基因: 前钙化基因 (BMP2、RUNX2、ALPL、SMAD1、SMAD3、SMAD5), 抗钙化基因 (SMAD7、JAG2)
Yu 等 ^[37]	单心室	自然流产标本	上调: hsa-miR-214、hsa-miR-19b 和 hsa-miR-126, 下调: hsa-miR-200a、hsa-miR-10a 和 hsa-miR-206	WNT 和 mTOR 通路
Liu 等 ^[40]		转基因小鼠	miR-133a-1 和 miR-133a-2	miR-133a: SRF 和 cyclin D2

注: * 引入胎儿对照后, 只有 miR-1275、miR-421 和 miR-1201 的结果在胎儿与患儿中是一致的。

【参 考 文 献】

- Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(12): 1890-1900.
- 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 中国出生缺陷防治报告 (2012). [DB/OL] (2012-09-12) <http://www.gov.cn/gzdt/att/att/site1/20120912/1c6f6506c7f811bacf9301.pdf>.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA[J]. Cell, 2013, 153(3): 516-519.
- Ikeda S, Kong SW, Lu J, et al. Altered microRNA expression in human heart disease[J]. Physiol Genomics, 2007, 31(3): 367-373.
- Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac

- remodeling and heart failure[J]. *Circ Res*, 2013, 113(6): 676-689.
- [7] Kim GH. MicroRNA regulation of cardiac conduction and arrhythmias[J]. *Transl Res*, 2013, 161(5): 381-392.
- [8] Pan W, Zhong Y, Cheng C, et al. MiR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53950.
- [9] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2[J]. *Cell*, 2007, 129(2): 303-317.
- [10] Boettger T, Braun T. A new level of complexity: the role of microRNAs in cardiovascular development[J]. *Circ Res*, 2012, 110(7): 1000-1013.
- [11] Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha[J]. *EMBO J*, 2005, 24(1): 138-148.
- [12] Faller M, Toso D, Matsunaga M, et al. DGCR8 recognizes primary transcripts of microRNAs through highly cooperative binding and formation of higher-order structures[J]. *RNA*, 2010, 16(8): 1570-1583.
- [13] Barr I, Smith AT, Senturia R, et al. DiGeorge critical region 8 (DGCR8) is a double-cysteine-ligated heme protein[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(19): 16716-16725.
- [14] Chakravarthy S, Sternberg SH, Kellenberger CA, et al. Substrate-specific kinetics of dicer-catalyzed RNA processing[J]. *J Mol Biol*, 2010, 404(3): 392-402.
- [15] Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang HD, et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing[J]. *EMBO Rep*, 2005, 6(10): 961-967.
- [16] Chen J, Wang DZ. microRNAs in cardiovascular development[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(5): 949-957.
- [17] Huang ZP, Chen JF, Regan JN, et al. Loss of microRNAs in neural crest leads to cardiovascular syndromes resembling human congenital heart defects[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2575-2586.
- [18] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [19] Hashimoto Y, Akiyama Y, Yuasa Y. Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62589.
- [20] Liu N, Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development[J]. *Dev Cell*, 2010, 18(4): 510-525.
- [21] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 228-233.
- [22] Li J, Cao Y, Ma XJ, et al. Roles of miR-1-1 and miR-181c in ventricular septal defects[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(2): 1441-1446.
- [23] Akiyama H, Chaboissier MC, Behringer RR, et al. Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(17): 6502-6507.
- [24] Sanchez-Castro M, Gordon CT, Petit F, et al. Congenital heart defects in patients with deletions upstream of SOX9[J]. *Hum Mutat*, 2013, 34(12): 1628-1631.
- [25] Yang B, Lin H, Xiao J, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2[J]. *Nat Med*, 2007, 13(4): 486-491.
- [26] Beppu H, Malhotra R, Beppu Y, et al. BMP type II receptor regulates positioning of outflow tract and remodeling of atrioventricular cushion during cardiogenesis[J]. *Dev Biol*, 2009, 331(2): 167-175.
- [27] Ma LJ, Lu MF, Schwartz RJ, et al. Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning[J]. *Development*, 2005, 132(24): 5601-5611.
- [28] O'Brien JE Jr, Kibiryeveva N, Zhou XG, et al. Noncoding RNA expression in myocardium from infants with tetralogy of Fallot[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012, 5(3): 279-286.
- [29] Chinchilla A, Lozano E, Daimi H, et al. MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: a role for miR-27 modulating Mef2c expression[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(1): 98-108.
- [30] Wang J, Song Y, Zhang Y, et al. Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice[J]. *Cell Res*, 2012, 22(3): 516-527.
- [31] Huang X, Huang F, Yang D, et al. Expression of microRNA-122 contributes to apoptosis in H9C2 myocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(11): 2637-2646.
- [32] Zhang HS, Wu QY, Xu M, et al. Mitogen-activated protein kinase signal pathways play an important role in right ventricular hypertrophy of tetralogy of Fallot[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(13): 2243-2249.
- [33] 徐洁, 杨中州, 张姝, 等. 先天性心脏病胎儿心脏及胎盘组织中 MAPK 及 Akt 信号通路分子的变化 [J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(5): 327-332.
- [34] Brown RD, Ambler SK, Li M, et al. MAP kinase kinase-2 (MEKK2) regulates hypertrophic remodeling of the right ventricle in hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(2): H269-H281.
- [35] Nigam V, Sievers HH, Jensen BC, et al. Altered microRNAs in bicuspid aortic valve: a comparison between stenotic and insufficient valves[J]. *J Heart Valve Dis*, 2010, 19(4): 459-465.
- [36] Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, et al. Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis[J]. *J Heart Valve Dis*, 2004, 13(4): 560-566.
- [37] Yu ZB, Han SP, Bai YF, et al. microRNA expression profiling in fetal single ventricle malformation identified by deep sequencing[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(1): 53-60.
- [38] Liu YG, Huang TW, Zhao XL, et al. MicroRNAs modulate the Wnt signaling pathway through targeting its inhibitors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(2): 259-264.
- [39] Kuhn DE, Nuovo GJ, Martin MM, et al. Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370(3): 473-477.
- [40] Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(23): 3242-3254.
- [41] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring[J]. *Genesis*, 2000, 26(2): 99-109.

(本文编辑: 王庆红)