

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.15.001

双荧光素酶报告基因技术验证 miR-31 对 LATS2 的靶向调控作用*

谢 飞¹, 曾俊义^{1,2△}, 张 婉², 魏云峰^{1,2}, 郑泽琪^{1,2}, 丁 露², 文 通¹, 易达松¹

南昌大学第一附属医院:1. 心血管内科;2. 江西省高血压病研究所, 江西南昌 330006

摘 要:目的 通过双荧光素酶报告基因技术验证 miR-31 对大肿瘤抑制因子 2(LATS2)的靶向调控作用,观察 miR-31 在心肌细胞肥大过程中的可能影响。方法 运用 Targetscan 软件预测大鼠 miR-31 对 LATS2 的靶向调控作用;以双荧光素酶报告质粒为工具载体,分别插入人工合成的大鼠 LATS2 基因野生型 3'UTR (LATS2-3'UTR-WT)及突变型 3'UTR(LATS2-3'UTR-MU)片段,构建 LATS2-3'UTR-WT 及 LATS2-3'UTR-MU 双荧光素酶报告质粒;重组双荧光素酶报告质粒分别与 miR-31 过表达质粒共转染 293T 细胞,检测荧光素酶活性并分析 miR-31 对 LATS2 的靶向调控作用;血管紧张素 II (Ang II)诱导体外心肌细胞肥大模型,RT-qPCR 检测 miR-31、LATS2 及心肌细胞肥大基因心房钠尿肽 (ANP)、β-肌球蛋白重链 (β-MHC) 的表达, F 肌动蛋白荧光探针观察心肌细胞形态变化。结果 Targetscan 软件预测结果显示,大鼠 miR-31 与 LATS2 基因 3'UTR 存在互补结合位点;经酶切及基因测序鉴定,成功构建 LATS2-3'UTR-WT 及 LATS2-3'UTR-MU 双荧光素酶报告质粒;与 LATS2-3'UTR-MU+miR-31 组相比, LATS2-3'UTR-NC+miRNA-31 组荧光素酶活性无明显变化 (0.98 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.03 , $P > 0.05$), 而 LATS2-3'UTR-MT+miR-31 组与 LATS2-3'UTR-NC+miR-31 组相比, 荧光素酶活性显著降低 (0.74 ± 0.02 vs. 1.00 ± 0.03 , $P < 0.01$); Ang II 诱导 48 h 后可检测到心肌细胞肥大基因 ANP ($P < 0.01$) 及 β-MHC 表达上调 ($P < 0.05$), 心肌细胞肥大过程中 miR-31 表达显著上调 ($P < 0.01$), LATS2 基因明显下调 ($P < 0.05$), 96 h 后心肌细胞表面积明显增大。结论 miR-31 可通过与 LATS2 基因 3'UTR 互补结合实现其对 LATS2 靶向调控作用, miR-31 靶向作用 LATS2 可能参与调控心肌细胞的肥大。

关键词:双荧光素酶报告基因; 微小核糖核酸-31; 大肿瘤抑制因子 2; 靶向调控; 心肌细胞肥大

中图法分类号:R541.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)15-2113-05

Dual luciferase reporter gene technology for verifying targeted regulation effect of miR-31 on LATS2*

XIE Fei¹, ZENG Junyi^{1,2△}, ZHANG Wan², WEI Yunfeng^{1,2},

ZHENG Zeqi^{1,2}, DING Lu², WEN Tong¹, YI Dasong¹

1. Department of Cardiology; 2. Jiangxi Provincial Institute of Hypertension Research,

First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China

Abstract: Objective To verify the targeted regulation effect of miR-31 on LATS2 by dual luciferase reporter gene technology and to observe its possible influence during cardiomyocyte hypertrophy process. **Methods** The Targetscan software was used to predict the targeted regulation effect of rat miR-31 on LATS2. The recombinant double luciferase reporter plasmid served as the tool vector and were inserted by the fragments of wild-type 3'UTR (LATS2-3'UTR-WT) or mutant-type 3'UTR (LATS2-3'UTR-MU) of rat synthetic LATS2 gene for constructing the double luciferase vectors of LATS2-3'UTR-WT and LATS2-3'UTR-MU respectively. The recombinant luciferase reporter plasmids and the plasmids overexpressing miR-31 were co-transfected into 293T cells, and the luciferase activity was detected and the targeted regulatory effect of miR-31 on LATS2 was analyzed. The in vitro cardiomyocyte hypertrophic model was induced by Ang II. The expressions of miR-31, LATS2, myocardial hypertrophy genes ANP and β-MHC were detected by RT-qPCR. The change of cardiomyocyte morphology was observed by F-actin fluorescence probe. **Results** The Targetscan software prediction results showed that the complementary binding site existed between rat miR-31 and 3'

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81760082);江西省自然科学基金项目(20181BAB205005);江西省教育厅科学技术研究重点项目(GJJ170040)。

作者简介:谢飞,男,硕士研究生,主要从事心血管重构方面的研究。△ 通信作者, E-mail: zjy1312@163.com。

UTR of LATS2 gene. In the verification of enzyme digestion and gene sequencing, the dual luciferase reporter vectors carrying LATS2-3'UTR-WT and LATS2-3'UTR-MU were successfully constructed. Compared to the LATS2-3'UTR-MU+miR-31 group, the luciferase activity of LATS2-3'UTR-NC+miR-31 group showed no significant change (0.98 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.03 , $P > 0.05$). However, compared with the LATS2-3'UTR-NC+miR-31 group, the luciferase activity of the LATS2-3'UTR-MU+miR-31 group was significantly decreased (0.74 ± 0.02 vs. 1.00 ± 0.03 , $P < 0.01$). The myocardial hypertrophy genes ANP and β -MHC expression up-regulation could be detected after Ang II induction for 48 h ($P < 0.01$, $P < 0.05$). In the cardiomyocyte hypertrophy process, the miR-31 expression was significantly up-regulated ($P < 0.01$), while the LATS2 gene was down-regulated obviously ($P < 0.05$). The surface area of cardiomyocyte was increased significantly after 96 h. **Conclusion** miR-31 realizes the targeted regulation effect on LATS2 by the complementation binding with 3'UTR of LATS2 gene, the miR-31 targeted effect on LATS2 may be involved in the regulation of cardiomyocyte hypertrophy.

Key words: dual luciferase reporter gene; miR-31; LATS2; targeted regulation; cardiomyocyte hypertrophy

研究发现,大肿瘤抑制因子 2(LATS2)可通过调节心肌细胞的生长和凋亡来调控心室的大小,是心肌细胞的负性调控因子^[1];同时,微小核糖核酸-31(miR-31)在压力负荷诱导的肥厚心肌中表达上调^[2-3],表明 miR-31 和 LATS2 均参与了心肌细胞肥大过程。本研究小组前期研究表明,在血管紧张素 II(Ang II)诱导的体外心肌细胞肥大模型中,miR-31 表达出现明显上调,同时伴随 LATS2 表达下调,与 miRNA 调控靶基因的特点相符,提示 miR-31 可能通过靶向调控 LATS2 参与心肌细胞肥大过程^[4]。本研究通过 Targetscan 软件预测 LATS2 是否为 miR-31 靶基因,并构建双荧光素酶报告质粒,验证 miR-31 对 LATS2 的靶向调控作用,为心肌细胞肥大调控机制的相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 清洁级 1~3 d SD 大鼠(南昌大学医学院实验动物中心),miR-31 过表达质粒及 miRNA 空载质粒(miRNA-NC)、阳性参照 hsa-mir-146b 质粒及 TRAF6 基因 3'端非编码区(3'UTR)质粒(TRAF6-3'UTR)、双荧光素酶报告基因质粒 GV306、293T 细胞株、感受态大肠埃希菌 DH5 α (上海吉凯基因化学技术有限公司),高糖 DMEM、胎牛血清(美国 Hyclone 公司),Ang II 和 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)(Sigma 公司),限制性内切酶(美国 NEB 公司),PrimeSTAR HS DNA polymerase(日本 Takara 公司),ClonExpressTM II One Step Cloning Kit(南京诺唯赞生物科技有限公司),X-tremegene HP(美国 Roche 公司),Dual-luciferase Reporter Assay System(美国 Promega 公司),Trizol Reagent(Invitrogen 公司),All-in-one First-Strand cDNA Synthesis Kit、All-in-one qPCR Mix、All-in-one miRNA RT-qPCR

Detection Kit(Gene Copoeia 公司),ActinRedTM 555 ReadyProbes[®] Reagent(Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 miR-31 与 LATS2 靶向关系预测 采用生物信息学软件 Targetscan 在线(http://www.targetscan.org/vert_71/)搜索大鼠 miR-31 可能调控的靶基因,筛选并确认大鼠 LATS2 基因 3'UTR 是否存在与 miR-31 配对结合的位点,评估 miR-31 靶向调控 LATS2 的可能性。

1.2.2 双荧光素酶报告基因载体构建 从 Pubmed 基因库中获取大鼠 LATS2 基因 3'UTR 序列(NM_001107267),设计并化学合成涵盖 miR-31 作用位点的 LATS2 基因 3'UTR 野生型与突变型片段,LATS2-3'UTR-WT 与 miR-31 结合位点进行点突变处理即为 LATS2-3'UTR-MU 基因片段。用于 LATS2-3'UTR-WT 与 LATS2-3'UTR-MU 基因片段 PCR 扩增的引物为 LATS2-Fp: 5'-GATCGCCGTGTA-ATTCTAGATTCCTAGAGAGTGAGCGCAG -3'; LATS2-Rp: 5'-CCGCGCCGCCCCG ACTCTAGATAA-CAATAAGGGCTACAATC -3',PCR 产物两端分别为 Xho I 及 Not I 酶切位点。LATS2 基因 3'UTR 野生型与突变型片段扩增产物经双酶切鉴定,与 GV306 双荧光素酶报告载体进行酶连接。将连接产物转化至感受态大肠埃希菌 DH5 α ,挑选阳性克隆菌落进行双酶切鉴定及测序。鉴定正确的 LATS2 基因 3'UTR 野生型与突变型重组双荧光素酶基因报告载体命名为 GV306- LATS2-3'UTR-WT 及 GV306- LATS2-3'UTR-MU。

1.2.3 质粒共转染及荧光素酶活性检测 制备对数生长期 293T 细胞悬液,接种于 24 孔培养板(细胞数约为 10^5 /孔),在 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养至细胞

汇合度约为 60%。将 3' UTR 双荧光素酶质粒 (LATS2-3' UTR-NC、LATS2-3' UTR-WT、LATS2-3' UTR-MU) 与 miRNA 质粒 (miR-31、miRNA-NC) 两两组合共转染 293T 细胞, 形成 6 个共转染组: LATS2-3' UTR-NC + miRNA-NC 组、LATS2-3' UTR-NC + miR-31 组、LATS2-3' UTR-WT + miRNA-NC 组、LATS2-3' UTR-WT + miR-31 组、LATS2-3' UTR-MU + miRNA-NC 组、LATS2-3' UTR-MU + miR-31 组; 另设阳性参照共转染组两组: TRAF6-3' UTR + miRNA-NC 组、TRAF6-3' UTR + miR-146b 组; 各转染组质粒转染量分别为: 3' UTR 荧光素酶质粒 0.1 μg 、miRNA 质粒 0.4 μg , 具体操作按 X-tremegene HP 转染试剂说明书进行。转染目的质粒时, 安排 0.5 μg GFP 质粒单独转染, 观察质粒转染情况。细胞转染 48 h 后按 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 说明书进行荧光素酶活性检测。

1.2.4 体外心肌细胞肥大模型构建及 miR-31、LATS2 检测 分离培养大鼠原代心肌细胞, 具体步骤参照文献[5]进行。原代培养第 5 天, 将细胞分为对照组 (Ang II -) 及实验组 (Ang II +), 对照组加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液培养, 实验组培养液中加入 10^{-6} mol/L Ang II。培养 48 h 收集标本, RT-qPCR 检测 miR-31、LATS2 及心肌细胞肥大基因心房钠尿肽 (ANP) 和 β -肌球蛋白重链 (β -MHC) 表达。miR-31 及内参 U6 引物由 GeneCopeia 公司提供 (引物 ID: RmiRQP1224、RmiRQP9003)。ANP: 上游引物 5'-GGGGGTAGGATTGACAGGAT-3', 下游引物 5'-CTCCAGGAGGGTATTCACCA-3'; β -MHC: 上游引物 5'-CCTCGCAATATCAAGGGAAA-3', 下游引物 5'-TACAGGTGCATCAGCTCCAG-3'; LATS2: 上游引物 5'-CCAACAGCAAGCACCCAGAG-3', 下游引物 5'-CGACCGCACCTCCTAACTC-3'; GAPDH: 上游引物 5'-CAAGTTCAACGGCACAGTCAAG-3', 下游引物 5'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'。以 U6 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 miR-31 相对表达量; 以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算心肌细胞肥大基因及 LATS2 基因相对表达量。96 h 收集标本进行心肌细胞 F 肌动蛋白荧光染色, 具体方法参照试剂说明书。

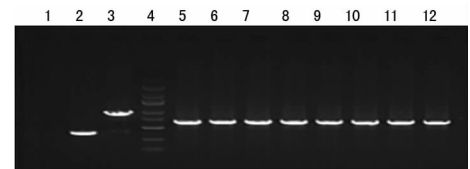
1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件分析。荧光素酶活性检测及基因表达数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-31 与 LATS2 靶向关系预测 在线软件 Targetscan 预测发现, 大鼠 LATS2 的 3'-UTR 存在 miR-31 的结合位点, 此位点序列在物种间高度保守,

大鼠 miR-31 的种子序列 (5'-GGCAAGA-3') 与 LATS2 mRNA 的 3'-UTR575-582 核苷酸 (5'-UCU-UGCC-3') 完全配对互补, 且预测评分较高, 表明 miR-31 靶向调控 LATS2 可能性大。

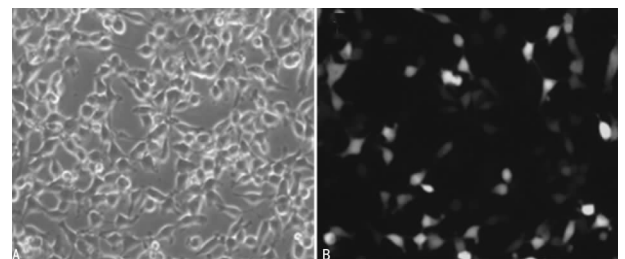
2.2 双荧光素酶报告基因载体构建 LATS2-3' UTR-WT 双荧光素酶重组载体转化大肠埃希菌后, 挑选 8 个转化子进行 PCR 扩增, 产物琼脂糖凝胶电泳见 613 bp 位置出现特异性条带, 与目的条带相符 (图 1)。挑选阳性转化子进行测序, 测序结果与目标序列完全一致。因 LATS2-3' UTR-MU 双荧光素酶重组载体所用工具载体与鉴定 PCR 产物相同, 电泳图与野生型类似, 故未列出。测序显示 LATS2-3' UTR-MU 双荧光素酶重组载体阳性克隆结果与目标序列相符, 点突变存在。



注: 1 为阴性对照 (ddH₂O); 2 为阴性对照 (空载自连对照组); 3 为阳性对照 (GAPDH); 4 为标记物, 自上而下依次为 5 kb、3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp; 5~12 为 1~8 号转化子

图 1 LATS2-3' UTR-WT 双荧光素酶重组质粒双酶切鉴定

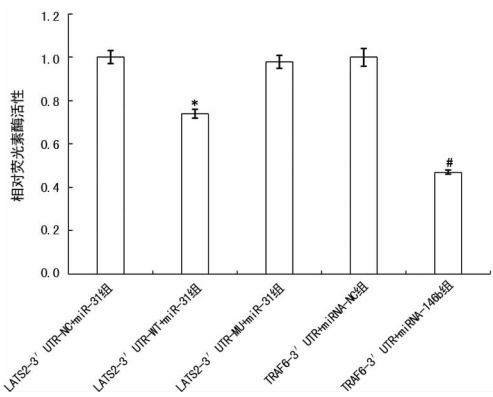
2.3 293T 细胞质粒转染 倒置荧光显微镜下连续观察 GFP 质粒转染 293T 细胞, 可见 GFP 表达随时间增加而不断增强, 至 48 h 荧光表达强度基本稳定, 转染效率为 90% 以上 (图 2)。



注: A 为光学显微镜; B 为荧光显微镜

图 2 GFP 质粒转染 293T 细胞 48 h ($\times 200$)

2.4 荧光素酶活性检测 质粒共转染 293T 细胞 48 h 后, 荧光素酶活性检测结果显示: TRAF6-3' UTR + miR-146b 组较 TRAF6-3' UTR + miRNA-NC 组荧光素酶活性明显下降 ($P < 0.01$); LATS2-3' UTR-MU + miR-31 组与 LATS2-3' UTR-NC + miR-31 组荧光素酶活性差异无统计学意义 (0.98 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.03 , $P > 0.05$); LATS2-3' UTR-WT + miR-31 组与 LATS2-3' UTR-NC + miR-31 组相比, 荧光素酶活性明显降低 (0.74 ± 0.02 vs. 1.00 ± 0.03 , $P < 0.01$), 见图 3。



注：与 LATS2-3' UTR-NC + miR-31 组比较，* $P < 0.01$ ；与 TRAF6-3' UTR + miRNA-NC 组比较，# $P < 0.01$

图 3 各实验组相对荧光素酶活性

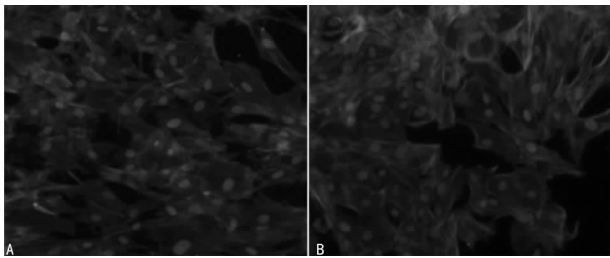
2.5 心肌细胞肥大模型 miR-31、LATS2 及心肌细胞肥大基因检测 Ang II 诱导心肌细胞 48 h 后实验组 miR-31 及心肌细胞肥大基因 ANP ($P < 0.01$) 及 β -MHC ($P < 0.05$) 表达水平较对照组显著上升；与对照组相比，实验组 LATS2 基因表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组 miR-31、LATS2 及心肌细胞肥大基因
相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-31	LATS2	ANP	β -MHC
对照组	3	1.00±0.08	1.00±0.04	1.00±0.07	1.00±0.05
实验组	3	9.32±0.47**	0.37±0.02*	5.21±0.24**	3.06±0.12*

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

2.6 心肌细胞肥大模型心肌细胞表面积变化 Ang II 诱导心肌细胞 96 h 后实验组细胞表面积较对照组增大(图 4)。



注：A 为对照组；B 为实验组

图 4 心肌细胞 F 肌动蛋白荧光染色 ($\times 200$)

3 讨论

近年来，生物信息学技术的快速发展为 miRNA 靶基因的鉴定提供了便捷的途径，极大提升了 miRNA 靶基因研究效率。在众多 miRNA 靶基因预测软件中，Targetscan 具有预测准确度较高、数据库更新较快的特点，是目前公认的 miRNA 靶基因优秀预测软件，该软件要求 miRNA 的 5' 端第 2~8 位碱基(被称作“miRNA 种子序列”)与 mRNA 3' UTR 完全互补，显著提升了靶基因预测阳性率^[6]。本研究选用

Targetscan 进行靶基因预测，发现大鼠 miR-31 的种子序列(5'-GGCAAGA-3')与 LATS2 mRNA 的 3'-UTR575-582 核苷酸(5'-UCUUGCC-3')完全配对互补，且预测评分较高，提示 miR-31 对 LATS2 可能存在靶向调控作用。

miRNA 靶基因软件的预测结果属理论推测，miRNA 与靶基因是否存在功能关系尚需生物学实验进一步验证。目前常用的 miRNA 靶基因鉴定方法为双荧光素酶报告基因法，广泛应用于转录因子、miRNA 结合的靶分子序列检测^[7]。LEE 等^[8]研究证实双荧光素酶报告基因系统可在体内、体外准确地检测 miR-23a 的表达和转录后调控。本研究实验设计及数据处理参照文献^[9-10]，荧光素酶活性检测数据经多层校正，显示大鼠 miR-31 可与 LATS2 的 3' UTR 结合，显著抑制其荧光素酶活性，充分证实 miR-31 可靶向作用于 LATS2。

在有关心肌肥厚的研究中，miR-31 被证实肥厚心肌中的表达上调，miR-31 可能是心肌细胞肥大的重要调控因子^[2-3]。同样，LATS2 高表达于心脏组织，在心脏发育调节中发挥重要作用^[11-12]，LATS2 可通过调节心肌细胞的生长和凋亡来调控心室的大小，是压力负荷诱导的心肌肥厚的负性调节因子^[1]。由此可见，miR-31 与 LATS2 均参与了心肌肥厚过程，其生物学作用也在本研究中得到进一步证实。在体外心肌细胞肥大模型中，伴随心肌细胞的肥大变化，miR-31 表达显著上调，LATS2 基因明显下调，与 miR-31 靶向作用 LATS2 特点相符，miR-31 靶向作用 LATS2 可能在心肌细胞肥大过程中发挥重要作用。

本研究通过生物信息学软件发现大鼠 LATS2 的 3'-UTR 存在 miR-31 的结合位点，预测 miR-31 与 LATS2 可能存在靶向调控关系；双荧光素酶报告基因技术进一步验证 miR-31 可与 LATS2 的 3' UTR 结合，证实 miR-31 可靶向作用于 LATS2；在体外心肌细胞肥大模型中，伴随心肌细胞的肥大变化，miR-31 表达显著上调，LATS2 基因明显下调，与 miR-31 靶向作用 LATS2 的推论相符，进一步证实 miR-31 靶向作用 LATS2 可能参与调控心肌细胞的肥大，为心肌细胞肥大相关调控机制的研究提供了重要线索。

参考文献

[1] MATSUI Y, NAKANO N, SHAO D, et al. Lats2 is a negative regulator of myocyte size in the heart[J]. Circ Res, 2008, 103(11): 1309-1318.
[2] SAYED D, HONG C, CHEN I Y, et al. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2007, 100(3): 416-424. (下转第 2119 页)

的方法以准确检测 CGG 重复数。本研究采用该方法分析了一个 FMR1 基因前突变家系,结果显示,除咨询者的丈夫和弟弟外,其他家系成员均为前突变或前突变携带者。从比较父母和儿女的结果来看,存在动态突变的情形。即儿女的 CGG 重复数存在增加或减少的情况,其动态突变的范围为±3 左右。根据家系检测结果,可对咨询者孕后进行产前筛查和诊断的临床指导和风险评估。因此,笔者建议咨询者在怀孕后适当时期采用胎儿绒毛或羊水进行胎儿 FMR1 基因检测,根据胎儿 FMR1 基因 CGG 重复数,评估胎儿患脆性 X 综合征的风险。

参考文献

[1] CRAWFORD D J, SHERMAN S L. FMR1 and the fragile X syndrome human genome epidemiology review[J]. Genet Med, 2001, 3(5): 359-371.

[2] VERKERK A J, PIERETH M, SUTCLIFFE J, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome[J]. Cell, 1991, 65(5): 905-914.

[3] FU Y H, KUHL D P, PIZZUTI A, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox[J]. Cell, 1991, 67(6): 1047-1058.

[4] NOLIN S L, BROWN W T, GICKSMAN A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with pre-

mutation or intermediate alleles[J]. Am J Hum Genet, 2003, 2: 454-464.

[5] FERNANDEZ C, LOPEZ B, PAN R, et al. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations[J]. J Mol Diagn, 2009, 11(4): 306-310.

[6] STORM C M, CROSSLEY B, REDMAN J B, et al. Molecular testing for fragile X syndrome: lessons learned from 119,232 tests performed in a clinical laboratory[J]. Genet Med, 2007, 9: 46-51.

[7] TOLEDANO A H, BASEL V L, MAGAL N, et al. Fragile-X carrier screening and the prevalence of permutation and full-mutation carriers in Israel[J]. Am J Hum Genet, 2001, 69: 351-360.

[8] FERNANDEZ C, WALICHIEWICZ P, XIAOSEN X, et al. Screening for expanded alleles of FMR1 gene in blood spots from newborn males in a Spanish population[J]. J Mol Diagn, 2009, 11(4): 324-329.

[9] SALUTO A, BRUSSINO A, TASSONE F, et al. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene[J]. J Mol Diagn, 2005, 7(5): 605-612.

[10] 周雅, 孙维, 肖冰, 等. 优化 PCR 体系结合毛细管电泳技术检测 FMR1 基因前突变与全突变[J]. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(4): 401-405.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-06-14)

(上接第 2116 页)

[3] EL-ARMOUCHE A, SCHWOERER A P, NEUBER C, et al. Common MicroRNA signatures in cardiac hypertrophic and atrophic remodeling induced by changes in hemodynamic load[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e14263.

[4] 曾俊义, 张婉, 丁露, 等. miR-31 及其靶基因 LATS2 在老鼠肥大大肌细胞中的表达变化[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(11): 1537-1541.

[5] PEDROZO Z, CRIOLLO A, BATTIPROLU P K, et al. Polycystin-1 Is a cardiomyocyte mechanosensor that governs L-Type Ca²⁺ channel protein stability[J]. Circulation, 2015, 131(24): 2131-2142.

[6] LEWIS B P, SHIH I, JONES-RHOADES M W, et al. Prediction of mammalian microRNA Targets[J]. Cell, 2003, 115(7): 787-798.

[7] MOYLE R L, CARVALHAIS L C, PRETORIUS L S, et al. An optimized transient dual luciferase assay for quantifying microRNA directed repression of targeted sequences[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1631-1638.

[8] LEE J Y, KIM S, HWANG D W, et al. Development of a dual-luciferase reporter system for in vivo visualization of

microRNA biogenesis and posttranscriptional regulation[J]. J Nucl Med, 2008, 49(2): 285-294.

[9] DUAN M J, YAN M L, WANG Q, et al. Overexpression of miR-1 in the heart attenuates hippocampal synaptic vesicle exocytosis by the posttranscriptional regulation of SNAP-25 through the transportation of exosomes[J]. Cell Commun Signa, 2018, 16(1): 91-98.

[10] PARK H, HUANG X, LU C M, et al. MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins[J]. J Biol Chem, 2015, 290(5): 2831-2841.

[11] ZHOU J. An emerging role for Hippo-YAP signaling in cardiovascular development[J]. J Biomed Res, 2014, 28(4): 251-254.

[12] MCPHERSON J P, TAMBLYN L, ELIA A, et al. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity[J]. EMBO J, 2004, 23(18): 3677-3688.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-06-14)