

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.02.021

MicroRNA 研究的基本方法及流程

张韶辉 魏广和 综述 刘立新 审校

(济宁医学院附属医院山东省心脏疾病诊疗重点实验室, 山东 济宁 272029)

关键词 miRNA; 研究方法; 流程

中图分类号: Q522

文献标志码: A

文章编号: 1000-9760(2013)04-141-06

MicroRNA(miRNA)属于非编码 RNA 大家族,是广泛存在于真核生物细胞中、长约 21~25 个碱基的单链小分子 RNA。1993 年在线虫中发现第一个 miRNA(lin-4),2001 年《Science》报道了分别从线虫、果蝇和人体内找到的几十个类似 lin-4 的小 RNA,并命名为 miRNA^[1],此后对 miRNA 的研究才取得了飞速发展。miRBase(<http://www.mirbase.org/>)的最新数据显示,截至目前已有 18226 种 miRNA 被发现,其中人类有 1527 种 miRNA 被鉴定出来。miRNA 开辟了生物学研究的一个新领域,目前的研究方法多种多样,相关文献也有不少,但大多仅对某一侧面展开,鉴于以上情况,我们认为有必要将 miRNA 的研究概况作一相对简单而完整的阐述,希望对初涉入该领域的同道有所帮助。

1 miRNA 的形成和作用机制

miRNA 有高度保守的基因序列,具备广泛的转录后基因调节功能,其调控方式是导致靶 mRNA 的降解或抑制靶基因翻译(图 1)。

绝大多数 miRNA 基因在 RNA 聚合酶的作用下转录生成长的茎环结构,称为初级 miRNA(primary-miRNA, pri-miRNA)。pri-miRNA 一般具有帽子结构和多聚腺苷酸尾巴。pri-miRNA 随后被由 RNA 酶 III 核酸内切酶 Drosha-DGCR8 复合体剪切,产生约 70 个核苷酸的发夹状 RNA,称为前体 miRNA(precursor-miRNA, pre-miRNA)。pre-miRNA 在 Exportin-5 复合物的作用下转运出细胞核,并在胞浆中由 Dicer 酶剪切成为 miRNA 双链结构,在解螺旋酶的作用下分离。其中一条链 miRNA 被降解,剩下的另一条链即为成熟 miRNA,成熟 miRNA 与 Argonaute 蛋白以及 Dicer 结合,形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),因此 miRNA 的转录调

控作用是以 RISC 复合物的形式进行的。

miRNA 通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区(untranslated regions, UTR)碱基配对结合,然后对靶 mRNA 进行切割或者翻译抑制。至于是抑制还是切割则取决于 miRNA 与靶序列互补的程度。如果 miRNA 与靶 mRNA 匹配完全,则 RISC 复合体降解靶 mRNA;若两者序列部分匹配,尤其是 miRNA 的 5'端 2~8 个被称为种子序列(seed sequence)的核苷酸与靶 mRNA 匹配完好,则通过抑制靶 mRNA 的翻译来沉默特定基因。在植物中,miRNA 主要通过降解 mRNA 发挥沉默功能^[2]。在动物中,多数 miRNA 是通过抑制翻译发挥功能^[3]。

2 miRNA 的研究策略

据估计,miRNA 能够调控人类基因组约 1/3 的基因,它通过调控靶基因的表达参与了生命过程中的发育、细胞增殖、凋亡、造血、器官形成等一系列重要进程,与心脏病、糖尿病、癌症、艾滋病等多种疾病密切相关^[4]。毫无疑问,针对 miRNA 的研究已成为一大热点,但 miRNA 分子序列短小,存在较多的互补序列,在不同生物体内与靶基因结合的方式也不尽相同,而且常与多种蛋白相互作用,这使得建立一个有效而且普遍适用的研究方法非常困难。目前检测 miRNA 的常用方法包括 Northern blotting、原位杂交、RT-PCR、miRNA 芯片等,而通过生物信息学方法预测 miRNA 及其靶基因,并进一步研究其表达与功能逐渐成为研究的热点。

2.1 miRNA 的分离

目前分离 RNA 有两大类主流方法:1)玻璃纤维滤膜/硅胶滤膜法;2)基于苯酚的抽提法(TRIzol 法)。目前各大试剂公司均有专门的 miRNA 提取试剂盒可供选择。miRNA 的检测方法较多,但应

注意在检测之前,一般应当对获得的 RNA 进行质量控制,比如用紫外分光光度计及凝胶电泳检测

miRNA 的产量及纯度。

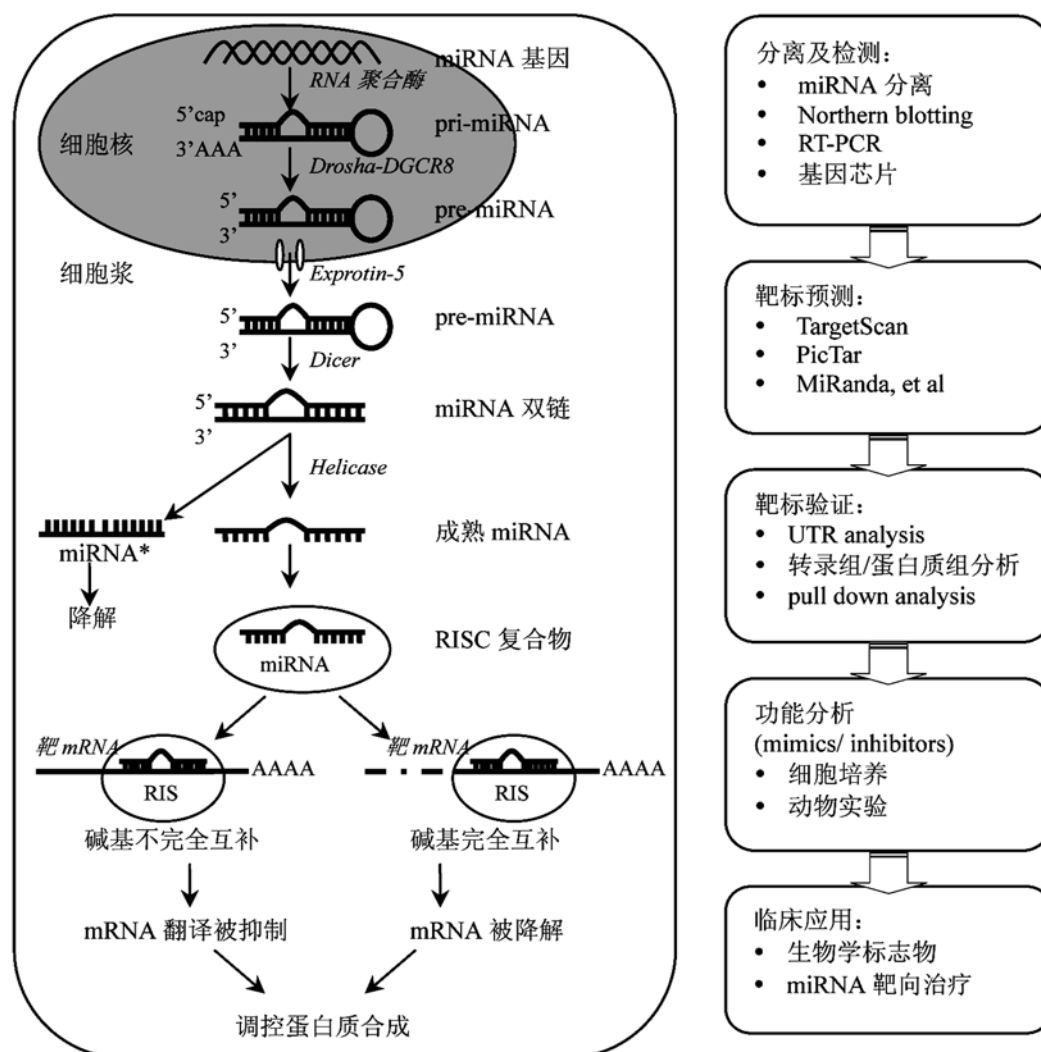


图 1 miRNA 的作用机制及研究流程

2.2 miRNA 检测方法

对循环 miRNA 进行量化检测就需要加入一个内参使检测结果标准化,试剂盒中提供的内参通常是秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) miRNA,这种 miRNA 不存在于人类及啮齿类动物,可以加到提取总 RNA 的每个标本中。虽然仔细选择合适的引物和内参是获得理想结果所必须的,但是某些 miRNA 家族成员之间由于高度的序列同源性,交叉反应有时仍难以避免^[5]。

2.2.1 基因克隆 大多数现有的 miRNA 是通过反转录 DNA (cDNA) 克隆识别和鉴定出来的,这是发现 miRNA 的重要方法^[6]。直接克隆的方法通常是从总 RNA 中提取大约 22nt 的小 RNA 分子,制备一个小 RNA 的 cDNA 文库。将文库中的

小 RNA 序列与基因组数据库中 BLAST 比对,排除非 miRNA 序列后,通过 Northern blotting 得到最终确认。基因克隆方法的优点是对于高丰度、常表达的基因可以获得完整的 miRNA 序列,缺点是对于生物体内浓度很低(表达量低或表达产物极不稳定等)或者某些只在生物体的特定时期、特定组织器官中表达的 miRNA,直接克隆法则无法获取。

2.2.2 Northern blotting Northern blotting 是最为经典的 RNA 检测方法,也是现在检测 miRNA 表达的最主要手段。目前所有克隆和生物信息学分析得来的 miRNA 都需要经过 Northern blotting 来验证和确认。Northern blotting 缺点是费时以及消耗大量的标本,可测范围小,存在一定的错配杂交等问题,因此 Northern blotting 灵敏

度较低且不适合进行高通量的检测,在 miRNA 检测时,Northern blotting 通常用于结果的验证。

2.2.3 原位杂交(in situ hybridization, ISH)

ISH 是了解 miRNA 时间和组织特异性表达最常用的方法。但由于 miRNA 分子太小,传统 ISH 技术需进一步改进,以增加杂交亲和性,从而避免 miRNA 在杂交及随后的洗脱过程中丢失。现在,一种新的杂交探针—锁定核苷酸探针(locked nucleic acid, LNA)可克服上述困难,这种修饰后的寡核苷酸探针与互补的 RNA 结合后具有很好的双链稳定性。这种技术又称为锁定核苷酸原位杂交(LNA-ISH),大大提升了其灵敏度和有效性^[7]。目前 Northern blotting 和 ISH 已经广泛用于细胞或组织中单个 pre-miRNA 或 miRNA 的检测。

2.2.4 实时 PCR(Real time PCR, RT-PCR)

RT-PCR 能检测 miRNA 的表达量,尤其是在使用 Taqman 探针法时特异性高。RT-PCR 也可用来检测 pre-miRNA 的表达水平。基于 PCR 技术检测 miRNA 的方法尚有引物延伸法,就是在引物的 5'末端加一个特异标记,可以定量测定较低浓度的 miRNA 含量。RT-PCR 可以较精确地定量检测 miRNA 水平,也经常用于验证软件预测的 miRNA。该方法具有高灵敏度、高特异性、样品需量低(可检测到总量低至纳克级的样品)及测量范围宽等优点,缺点是价格较高。

2.2.5 miRNA 基因芯片 基因芯片(microarray)是一种更快、更广泛、更有前途的检测 miRNA 的方法,可以高质量地鉴定多数已知 miRNA 的表达。由于 miRNA 片段小,而且 miRNA 分子间的差别有可能只是一个碱基,所以对芯片要求极高。芯片检测的前提是首先分离得到具有高质量的、一定浓度的小 RNA 组分。为了达到这一目的,通常需要用专门的 miRNA 提取盒抽提,因为一般的抽提方法会丢失 200nt 以下的小 RNA。虽然芯片技术以其高通量及并行处理的特点在基因信息分析中占据重要地位,但信息量大并不等于质量高。基因芯片技术一般多用于 miRNA 的初筛,得到的结果通常需经过 Northern blotting 和 RT-PCR 的验证,其优点是高出、高灵敏度、高特异性,但缺点在于价格昂贵、结果可重复性差,更大的缺陷在于基因芯片需要根据已知 miRNA 的序列信息来进行设计,因此难以检测目前未知的 miRNA。

2.2.6 深度测序(deep sequencing) 深度测序是对传统测序技术的一次革命性改变,一次对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,使得对一个

物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能,因此又被称为高通量测序。深度测序用于对小 RNA 序列的分析比基因芯片更加敏感。深度测序不依赖于提前预知序列信息,能轻易地解决基因芯片在检测小分子时遇到的技术难题(短序列,高度同源),因此深度测序能够在实验中发现新的小分子 RNA。但深度测序的缺点在于其产生的大量复杂原始数据,这需要相关的生物信息学技术来解释,而且深度测序花费巨大,尚难广泛使用。这项技术只是在近来的少数研究中有用到,它成功地检测到了基因芯片未发现的 miRNA^[8]。

用高通量的分子生物学工具(如 miRNA 芯片、深度测序)对全基因组进行 miRNA 表达的检测,可以获得大量在各种病理生理条件下的 miRNA 信息,这或许是研究 miRNA 的一个捷径。标本可以是体液、血浆、组织细胞中提取的总 RNA,但由于 miRNA 只占总 RNA 的 0.01%,因此通常要对 miRNA 进行纯化或富集以提高其检测的灵敏度。虽然高通量筛选可短时间获得大量的数据,但必须注意高通量检测结果需要通过 Northern blotting、RT-PCR 或 ISH 来进行验证。

2.3 miRNA 数据库及靶标预测工具

miRNA 对靶基因的调节并非是一对一的,一个 miRNA 分子可同时作用于多个靶基因,而一个基因也可同时被多个 miRNA 分子调节,因此 miRNA 对于基因的调节存在着多种组合模式。虽然上述生物实验的结果可靠性高,但是其周期长、代价高,并且由于 miRNA 自身的一些限制(如序列较短,组织特异性和时序性等),使 miRNA 靶标很难全部通过传统的实验方法得到验证。而事实上,迄今为止只有少数的 miRNA 靶标被生物实验证实。精确鉴定 miRNA 所调节的靶标是目前面临的挑战。但目前研究发现 miRNA 和靶基因的相互作用具有一定的规律性,可以允许编程来进行预测,通过建立计算模型,整合已有的生物学数据来挖掘疾病相关的 miRNA 具有周期短、代价低的特点。

通过对已知靶基因的 miRNA 进行分析,目前已经出现了多种软件及数据库用于 miRNA 的检索和靶标预测(表 1),如 miRBase^[9]、miRgator^[10]和 miRGen^[11]主要针对 miRNA 注释和系统命名;TarBase^[12]收集了实验证实的或计算预测 miRNA 与靶基因的关系。所有这些数据库通过收集、存储、管理这些数据,实现了在线数据共享,方便了获取这些 miRNA 的信息。从 2003 年第一个靶基因

预测软件 miRanda 到现在,已经涌现出数十个靶基因预测软件,如 TargetScan、PicTar、PITA、miRanda、DIANA-MicroT、RNA22 等^[13]。Tar-

getScan、PicTar、miRanda 是基于碱基互补性及保守性,PITA 和 RNA22 是基于靶区可接性和模式识别。

表 1 常用的 miRNA 数据库及靶标预测工具

数据库名称	网 址	描 述
TargetScan	http://www.targetscan.org/	使用频率最高的 miRNA 靶标预测软件。基于靶基因跨物种保守和 miRNA 与靶位点互补结构的热力学稳定性特点,预测 miRNA 靶标假阳性率较低。TargetScans 是其改进版
PicTar	http://pictar.mdc-berlin.de/	基于 miRNA 或 miRNA 靶标联合作用等特征开发的搜寻动物的 miRNA 靶基因的的软件,假阳性率较低。
miRanda	http://www.microrna.org/	第一个 miRNA 靶基因预测软件,使用范围广泛,不受物种限制。较高的检出率,但假阳性率也高
DIANA-microT	http://diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/micro_t.cgi	基于实验和计算生物学方法开发的 miRNA 靶基因预测软件
RNAhybrid	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/	基于 miRNA-target 配对自由能预测 miRNA 靶标
RNA22	http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html	基于基因序列特征预测 miRNA 的结合位点。该算法也可用于预测 pre-miRNA
PITA	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html	基于靶位点的可接性(target-site accessibility)和自由能预测 miRNA 的靶标
StarBase	http://starbase.sysu.edu.cn/	实验数据和 mRNA 降解组测序数据支持的 miRNA 靶标数据库,整合和构建多个流行的靶标预测软件的交集和调控关系
miRGen	http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html	miRNA 基因和 miRNA 靶标数据库,目的在于研究 miRNA 基因组与 miRNA 功能之间的关系
miRGator v2.0	http://mirgator.kobic.re.kr:8080/MEXWebApp/	整合了 miRNA 靶标预测,功能分析以及基因表达数据和疾病相关信息的数据库
miRBase	http://www.mirbase.org/	miRNA 基因注释数据库,用于查询和发布已发表的 miRNA 基因
TarBase	http://microrna.gr/tarbase	该数据库覆盖了通过人工收集的有实验支撑的 miRNA 的靶标,包括许多动物物种及植物和病毒
miR2Disease	http://mir2disease.org/	提供与人类疾病相关 miRNA 的数据资源

预测软件的发展需要实验技术的发展,只有实验验证的 miRNA 靶基因增多,miRNA 和靶基因作用机制的逐渐阐明,预测算法引入更多作用参数,才能使预测软件进一步完善。预测软件的进一步完善也有助于实验室实验,使科学家更有针对性地对感兴趣的 miRNA 靶基因进行研究。值得注意的是,miRNA 靶基因预测软件往往对已知的 miRNA 靶基因有很高的预测特异性和敏感性,而对于未知的靶基因预测,各预测软件之间交集很小,假阳性率也较高。显然,联合数个预测软件的结果(或者基因芯片的结果)并取其交集,预测结果将更加全面及准确^[14]。

2.4 靶标验证工具

由于 miRNA—靶标之间关系的复杂性和预测软件的局限性,软件筛选得到的结果必须进行生物实验验证。

2.4.1 UTR 分析(UTR analysis) 用于鉴定 miRNA 靶位点的最常用方法就是荧光指示测定法,将靶 mRNA 的 3'UTR 克隆到荧光素酶报告

载体上。荧光酶能够显示 miRNA 是否结合到这个 UTR 上,并提示在 mRNA 水平还是蛋白质水平调控基因的表达。

2.4.2 miRNA 类似物(mimics)和抑制物(inhibitors) 另一种间接的方法是用 miRNA 的类似物和抑制物^[15]。导入化学合成的 mimics 或 inhibitors,通过 RT-PCR 或免疫印迹(Western blotting)检测 miRNA 的靶标产物。其他方法还有转录组分析(transcriptome analysis)、下拉检测(pull down assays)、蛋白质组分析(proteome analysis)等^[16]。

2.5 miRNA 的调控功能研究

基因功能的研究通常采用过表达或干涉(抑制、敲除)的方法,miRNA 的研究也不例外。通过导入化学合成的 mimics 或 inhibitors,观察靶 mRNA 及编码蛋白表达以及细胞、动物水平的表型变化,进行信号通路研究,是目前 miRNA 功能研究的常用方法。

2.5.1 体外研究(细胞培养) mimics 和 inhibi-

tors 用于细胞培养的研究,可以明确 miRNA 的调控作用和生理效应,如细胞增殖、死亡、分化、迁移、毒性和形态变化。mimics 是双链的寡核苷酸,能够增强 miRNA 的作用,它将进一步降低靶蛋白的水平;而 inhibitors 是单链寡核苷酸,能够与靶 mRNA 竞争 miRNA,从而抑制 miRNA 发挥作用,导致蛋白水平增加。但在将 mimics 或 inhibitors 转染细胞之前还有许多细节需要综合考虑^[17],在此不详述。

2.5.2 体内研究(动物实验) 由于通过 mimics 增加 miRNA 水平的方法尚未在动物实验中建立^[18],这里主要对 inhibitors 的体内实验进行阐述。miRNA 的 inhibitors 也称为 antimiRs,是一种部分或完全与 miRNA 互补的反义寡核苷酸链,antimiRs 可以降低致病 miRNA 的水平,从而增加靶 mRNA 或靶蛋白的水平。目前文献报道较多的 antimiRs 化学修饰方法有两类:

1) 2-氧甲基 miRNA(2'-O-methyl miRNA) 也称为 antagomir,它能够连接到胆固醇上,因此能克服体内细胞膜、组织等障碍富集于靶细胞。通过与体内的成熟 miRNA 竞争性结合,阻止 miRNA 与其靶 mRNA 的互补配对,抑制 miRNA 发挥作用。antagomir 在动物实验中可用全身或局部注射、吸入、喂药等方法进行给药,作用效果持续时间可长达数周。其缺点是用药剂量较大,某些情况需要反复给药^[19]。

2) 锁核酸(locked nucleic acid, LNA) 修饰 LNA 是一种特殊的双环状核苷酸衍生物,由于 LNA 与 DNA/RNA 在结构上具有相同的磷酸盐骨架,故其对 DNA/RNA 有很好的识别能力和强大的亲和力,与其他寡核苷酸类似物相比,LNA 具有与 DNA/RNA 强大的杂交亲和力、反义活性和抗核酸酶能力,并有合成简单、水溶性好、体内无毒性等特点。LNA 对 miRNA 的抑制作用更持久,甚至可达 60d 以上。这些特点使 LNA 只需要相对低的剂量、通过静脉或皮下用药就可以对 miRNA 达到满意的抑制效果^[20]。体内抑制 miRNA 的其它方法还有 miRNA 面纱(mask)、miRNA 橡皮擦(eraser)、miRNA 海绵(sponge)等^[21],因为还没有得到广泛的应用,在此不作详述。

2.6 miRNA 临床应用研究

对 miRNA 的临床应用研究目前主要集中于两个方面:1) 体液 miRNA 的检测及其与疾病发生、发展相关性的研究,以期筛选到更为敏感的生物标志物,为疾病诊断、疾病分型和预后提供帮助;

2) 对 miRNA 信号路径的研究,以寻找并筛选潜在的药物靶点,开辟基于 miRNA 的分子靶向治疗及个体化治疗方案。

2.6.1 miRNA 作为生物标志物的研究 选择 miRNA 作为生物标志物是基于以下的特点:1) miRNA 在人的体液(包括血液、唾液、尿液、胸腹水等)中广泛存在,体液中 miRNA 表达谱在病理状态下会发生特征改变;2) 体液和组织中的 miRNA 因常与蛋白质等构成复合物,具有较强的抗 RNA 酶(RNase)降解能力;3) miRNA 表达具有组织特异性和时序性,部分 miRNA 分子只表达在特定的体液或组织中,如 miR-1 是心脏和肌肉特异性 miRNA^[22],有些 miRNA 仅在发育的特定时段表达,但在某疾病状态下可被重新激活而表达,如正常 miR-21 和 miR-320 仅在胎儿时期表达,但在心力衰竭时其表达量甚至超过了胎儿期^[23];4) 血液 miRNA 可长期保存,即使放置室温一周或反复冻融,miRNA 仅有微量的改变^[24],在各种极端条件下(如煮沸、强酸或强碱等)miRNA 含量也无明显改变。因此体液含量丰富而稳定的 miRNA,较之成分复杂、易降解、易变性的蛋白分子,可能更适合作为生物标志物应用于临床。但是,体液 miRNA 作为生物标志物的研究只是刚刚起步,目前研究的病种还不全面,所检测的病例数也有限,miRNA 的检测方法临床上尚无统一公认的标准,还有待进一步的改善和优化^[25]。

2.6.2 基于 miRNA 的靶向治疗 由于一个 miRNA 分子可同时作用于多个靶基因甚至影响整个基因网络,人们设想通过合成 inhibitor 实现对特定 miRNA 进行抑制,并达到对疾病靶向治疗的目的。与传统的药物治疗相比,miRNA 可以被有效地靶向抑制而不附带副作用^[26],如 Park 等^[27]通过使用 miR-221 的反义寡核苷酸,选择性地阻断了人体肝癌移植到小鼠体内 miR-221 的作用,结果显著延长了实验动物的生存时间,并增强了相关抑癌基因的活性。Obad S 等^[28]宣称成功地研发了一类基于 LNA 的化合物,这类化合物具有极高的亲和力和靶向特异性,可抑制大量的单个 miRNA,甚至全部的 miRNA 家族而不会发生脱靶效应。这为疾病的治疗提出了新的模式,从而为心血管疾病、代谢疾病、炎症疾病和癌症等疾病的治疗提供了一条新的有潜力的途径。

3 小结

必须提到的是,本文所述的 miRNA 研究流程

只是对现阶段在该领域一个相对常见的研究策略和方法的粗略总结。因为还有许许多多的研究方法,在此限于知识有限及篇幅而不能详细阐述。随着 miRNA 研究的全面深入,相信将来会有更多、更有效的研究方法涌现出来,必将全面更新目前的研究策略。虽然 miRNA 已经在疾病靶向领域展现了其巨大的潜力,但要在浩瀚的基因组中寻找每一个可能的 miRNA 基因,鉴定其信号传导途径和生物学意义,这将是一个巨大的挑战,需要将生物信息学、分子生物学、生物化学以及遗传学等多个学科的研究方法结合起来才能解决。miRNA 的研究既需要从传统的实验方法中获得帮助,又迫切需要新技术新方法的出现。有理由相信,基于 miRNA 的研究必将全面更新人们对疾病的认识,基于 miRNA 的分子靶向治疗必将全面改变人们对抗疾病的方式。

参考文献:

- [1] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [2] Llave C, Xie Z, Kasschau KD, et al. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA[J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- [3] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells[J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1573-1576.
- [4] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 827-887.
- [5] Dangwal S, Bang C, Thum T. Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93(4): 545-554.
- [6] Chen PY, Manninga H, Slanchev K, et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(11): 1288-1293.
- [7] Jørgensen S, Baker A, Møller S, et al. Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes[J]. *Methods*, 2010, 52(4): 375-381.
- [8] Baker M. MicroRNA profiling: separating signal from noise[J]. *Nat Methods*, 2010, 7(9): 687-692.
- [9] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Database issue): D152-D157.
- [10] Nam S, Kim B, Shin S, et al. Mirgator: an integrated system for functional annotation of microRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D159-D164.
- [11] Alexiou P, Vergoulis T, Gleditsch M, et al. Mirgen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D137-D141.
- [12] Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou AG. Tarbase: a comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets[J]. *RNA*, 2006, 12(2): 192-197.
- [13] Witkos TM, Koscińska E, Krzyżosiak WJ. Practical aspects of microRNA target prediction[J]. *Curr Mol Med*, 2011, 11(2): 93-109.
- [14] Van Rooij E. The art of microRNA research[J]. *Circ Res*, 2011, 108(2): 219-234.
- [15] Van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense[J]. *Circ Res*, 2008, 103(9): 919-928.
- [16] Orom UA, Lund AH. Experimental identification of microRNA targets[J]. *Gene*, 2010, 451(1-2): 1-5.
- [17] Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. Cell-cell contact globally activates microRNA biogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(17): 7016-7021.
- [18] Bernardo BC, Charchar FJ, Lin RC, et al. A microRNA guide for clinicians and basic scientists: background and experimental techniques[J]. *Heart Lung Circ*, 2012, 21(3): 131-142.
- [19] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts[J]. *Nature*, 2008, 456(7224): 980-984.
- [20] Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, et al. MIR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2011, 109(6): 670-679.
- [21] Fasanaro P, Greco S, Ivan M, et al. MicroRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125(1): 92-104.
- [22] Cheng Y, Tan N, Yang J, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction[J]. *Clin Sci*, 2010, 119(2): 87-95.
- [23] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure[J]. *Circulation*, 2007, 116(3): 258-267.
- [24] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [25] 张春妮, 张辰宇. 体液 microRNA 作为新的无创性生物标志物的意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(3): 145-151.
- [26] Seto AG. The road toward microRNA therapeutics[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(8): 1298-1305.
- [27] Park JK, Kogure T, Nuovo GJ, et al. miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(24): 7608-7616.
- [28] Obad S, dos Santos CO, Petri A, et al. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(4): 371-378.

(收稿日期 2013-01-11)