

Crim1 在乳鼠肥大心室肌细胞中的表达及 AT1R 对 Crim1 表达的调控作用

唐倩 杨龙 夏桂玲 杨君 邓娜 何炯红 杨英 扶泽南 郑亚西

【摘要】 目的:探讨富含半胱氨酸型运动神经元蛋白 1(Crim1)在肥大心室肌细胞中的表达情况及血管紧张素 II 受体 1 型(AT1R)对其表达的调控作用。 方法:分离获取 1 日龄 SD 大鼠乳鼠的原代心室肌细胞,培养 48 h 后换无血清培养基,分为 4 组:对照组,不予其他干预,培养 26 h;牵张组,培养 2 h 后牵张刺激 24 h;氯沙坦组,氯沙坦(终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$)干预 26 h;氯沙坦+牵张组,氯沙坦(终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$)预处理 2 h 后牵张刺激 24 h。检测各组心室肌细胞蛋白/DNA 比值、心室肌细胞表面积、Crim1 的 mRNA 和蛋白表达水平。 结果:牵张组心室肌细胞蛋白/DNA 比值(1.83 ± 0.15 对 1.16 ± 0.07 , $P<0.001$)、心室肌细胞面积[(591.85 ± 180.20) μm^2 对 (259.96 ± 54.20) μm^2 , $P<0.001$]均明显高于对照组,氯沙坦+牵张组心室肌细胞蛋白/DNA 比值(1.68 ± 0.13 对 1.83 ± 0.15 , $P<0.001$)、心室肌细胞面积[(372.25 ± 116.13) μm^2 对 (591.85 ± 180.20) μm^2 , $P<0.001$]均明显低于牵张组。牵张组 Crim1 的 mRNA 表达水平(1.14 ± 0.38 对 4.27 ± 0.11 , $P<0.001$)、蛋白表达水平($19\ 230.97\pm 2\ 205.74$ 对 $37\ 178.94\pm 1\ 130.57$, $P<0.001$)均明显低于对照组,氯沙坦+牵张组 Crim1 的 mRNA 表达水平(2.24 ± 0.44 对 1.14 ± 0.38 , $P<0.05$)、蛋白表达水平($28\ 934.47\pm 1\ 897.06$ 对 $19\ 230.97\pm 2\ 205.74$, $P<0.05$)均明显高于牵张组。 结论:肥大心室肌细胞中 Crim1 表达下调,AT1R 可能参与了对肥大心室肌细胞中 Crim1 表达的调控。

【关键词】 心肌肥大;富含半胱氨酸型运动神经元蛋白 1;血管紧张素 II 受体 1 型

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.03.010

The expression of Crim1 in hypertrophic ventricular myocytes from neonatal rats and the regulation effect of AT1R on Crim1 expression TANG Qian, YANG Long, XIA Guiling, YANG Jun, DENG Na, HE Jionghong, YANG Ying, FU Zenan, ZHENG Yaxi. Department of Cardiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Yunnan 550002, China

【Abstract】 Objective: To investigate the expression of cysteine-rich motor neuron 1 (Crim1) in hypertrophic ventricular neonatal myocytes and the role of angiotensin II type 1 receptor (AT1R) on Crim1 expression. **Methods:** The primary ventricular myocytes were isolated from 1-day-old SD rats. After 48 h culture, they were replaced with serum-free medium. Cells were divided into four groups depending on the treatment administered. Control group: no intervention culture of 26 h. Stretch group: after cultivating 2 h, stretch for 24 h. Losartan group: losartan (final concentration of $10\text{ }\mu\text{mol/L}$) interferes for 26 h. Losartan + stretch group: losartan (final concentration of $10\text{ }\mu\text{mol/L}$) pretreatment 2 h, followed by a stretch of 24 h. The ventricular myocytes protein/DNA ratio, the surface area of ventricular myocytes, and the expression of Crim1 mRNA and protein were detected. **Results:** The ventricular myocyte protein/DNA ratio [(1.83 ± 0.15) vs. (1.16 ± 0.07), $P<0.001$] and the surface

area of ventricular myocytes $[(591.85 \pm 180.20) \mu\text{m}^2 \text{ vs. } (259.96 \pm 54.20) \mu\text{m}^2, P < 0.001]$ of stretch group were significantly higher than those of control group, while the ventricular myocyte protein/DNA ratio $[(1.68 \pm 0.13) \text{ vs. } (1.83 \pm 0.15), P < 0.001]$ and the surface area of ventricular myocytes $[(372.25 \pm 116.13) \mu\text{m}^2 \text{ vs. } (591.85 \pm 180.20) \mu\text{m}^2, P < 0.001]$ of losartan + stretch group were significantly lower than those of stretch group. The expression of Crim1 mRNA $[(1.14 \pm 0.38) \text{ vs. } (4.27 \pm 0.11), P < 0.001]$ and protein $[(19230.97 \pm 2205.74) \text{ vs. } (37178.94 \pm 1130.57), P < 0.001]$ of stretch group were significantly lower than those of control group, while the expression of Crim1 mRNA $[(2.24 \pm 0.44) \text{ vs. } (1.14 \pm 0.38), P < 0.05]$ and protein $[(28934.47 \pm 1897.06) \text{ vs. } (19230.97 \pm 2205.74), P < 0.05]$ of losartan + stretch group were significantly higher than those of stretch group.

Conclusions: The expression of Crim1 in hypertrophic ventricular myocyte is down-regulated, and AT1R may be involved in the regulation of the expression of Crim1 in hypertrophic ventricular myocytes.

【Key words】 Myocardial hypertrophy; Cysteine-rich motor neuron 1; Angiotensin II type 1 receptor

心肌肥大是心脏对各种原因引起的工作负荷增加所产生的一种代偿性反应^[1]。病理性心肌肥大是导致心力衰竭的主要危险因素^[2]。在压力负荷和血管紧张素 II (Ang II) 诱导的心肌肥大中, 骨形态发生蛋白 (BMPs) 家族成员骨形态发生蛋白 4 (BMP4) 表达上调, 进而诱导心肌细胞肥大、凋亡和心肌纤维化^[3]。BMP4 介导的这些效应可被 BMP4 抑制剂 noggin 和 DMH1 所抑制^[3]。Ang II 产生的心肌肥大效应主要通过激活血管紧张素 II 受体 1 型 (AT1R) 实现。心肌细胞在牵张刺激下产生 Ang II, 继而结合 AT1R 并使之激活, 诱导肥大基因表达, 促进心肌细胞肥大^[4]。以上研究提示牵张刺激可能通过 Ang II 激活 AT1R, 进而调控心肌中 BMP 信号通路, 促进心肌肥大。

富含半胱氨酸型运动神经元蛋白 1 (cysteine-rich motor neuron 1, Crim1) 在心脏中有较高表达^[5], 其拥有 vWF-C 型富含半胱氨酸重复片段 (CRR) 的跨膜结构域, 结构类似于 BMP 拮抗剂 Chordin^[6]。Crim1 在肥大心肌中的表达如何, AT1R 是否调控 Crim1 的表达, 目前尚未见相关报道。本研究以牵张刺激诱导 SD 大鼠乳鼠的心室肌细胞肥大, 观察 Crim1 在肥大心室肌细胞中的表达情况以及 AT1R 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

细胞牵张刺激装置为北京航空航天大学制作部根据国外文献提供的方案制备的等双轴牵张装置^[7]。氯沙坦购自美国 Sigma 公司, 兔抗大鼠 α -横纹肌肌动蛋白 (α -SCA) 抗体、羊抗兔 FITC-IgG、羊抗兔辣根过氧化物酶-IgG、BCA 蛋白质定量试剂盒购自北京中杉金桥公司, DNA/

RNA/蛋白质共提取试剂盒购自美国 Omega 生物技术公司, 兔抗大鼠 Crim1 抗体购自北京博奥森公司, 兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GADPH) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, TransScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix、TransStart® Top Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司, ECL 发光液购自美国 Thermo 公司。

1.2 原代心室肌细胞的培养及鉴定

清洁级 SD 大鼠 1 日龄乳鼠由北京大学医学部动物中心提供, 雌雄不限, 许可证号为 [SYXK(京) 2011-0039]。乙醚气雾麻醉大鼠, 取近心尖中下 2/3 部心室, 洗去血液, 剪至约 $1 \times 1 \text{ mm}$ 大小组织块。予含 0.05% 胰酶和 0.08 mol/mL II 型胶原酶的消化液消化, 差速贴壁法纯化获得心室肌细胞, 于 37°C 、饱和湿度、95% CO_2 培养箱中培养。培养 48 h 后采用免疫荧光法鉴定心室肌细胞, 一抗为兔抗大鼠 α -SCA 抗体, 二抗为羊抗兔 FITC-IgG, 阴性对照采用同批差速贴壁培养的成纤维细胞^[8]。

1.3 实验分组

原代心室肌细胞于牵张装置中培养 48 h 后换无血清 DMEM 培养基分组培养 26 h。分组情况如下: 牵张组, 培养 2 h 后增加 20% 膜面积培养 24 h; 氯沙坦组, 予氯沙坦 (终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$) 处理 26 h; 氯沙坦 + 牵张组, 予氯沙坦 (终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$) 预处理 2 h, 继而增加 20% 膜面积刺激 24 h; 对照组, 不予干预。干预结束后, 取心室肌细胞进行后续实验。

1.4 结晶紫染色评价各组细胞表面积

各组心室肌细胞加入 0.1% 结晶紫溶液 1 mL, 染色 10 min, 显微镜下观察, 每组随机拍摄 4 张图

片,每张图片随机选取 30 个细胞,通过 ImageJ 软件计算各组细胞的平均表面积。

1.5 心室肌细胞蛋白质/DNA 的提取

用 DNA/RNA/蛋白质共提取试剂盒按照说明书分别提取各组心室肌细胞的蛋白质和 DNA,分别测定含量,计算蛋白/DNA 比值。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测心室肌细胞 Crim1 的 mRNA 表达水平

采用 Trizol 一步法提取各组心室肌细胞总 RNA,检测总 RNA 含量及纯度。按反转录试剂盒 TransScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 说明书步骤取 1.5 μg RNA 进行反转录。将 2 μg 反转录产物按 TransStart® Top Green qPCR SuperMix 说明书步骤进行实时荧光定量 PCR 检测。以大鼠 GAPDH 作为内参。大鼠 Crim1 上游引物为 5'-GTCTTTCCCCGGCGATCA-3',下游引物为 5'-TTGTTGCAGGTTCGGATGGT-3'。GAPDH 上游引物为 5'-GTCAGTGGTGGACCTGGACCT-3',下游引物为 5'-AGGGGAGATTCACTGTGGTG-3'。反应条件为 95℃预变性 10 min,95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,40 个循环。以 2^{-ΔΔCt} 计算 Crim1 mRNA 的相对表达水平。

1.7 Western blot 检测心室肌细胞 Crim1 的蛋白表达水平

提取心室肌细胞总蛋白,测定蛋白浓度,按 40 μg 上样量进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。转膜后用 5%羊血清 37℃封闭 2 h,加入兔抗大鼠 Crim1 抗体或兔抗大鼠 GAPDH 抗体,4℃过夜,再加入羊抗兔辣根过氧化物酶-IgG,37℃孵育 2 h。ECL 显色后,采用 Bio-Rad 化学发光仪进行检测。利用 ImageJ 软件对条带进行半定量分析,以 GAPDH 作为内参。

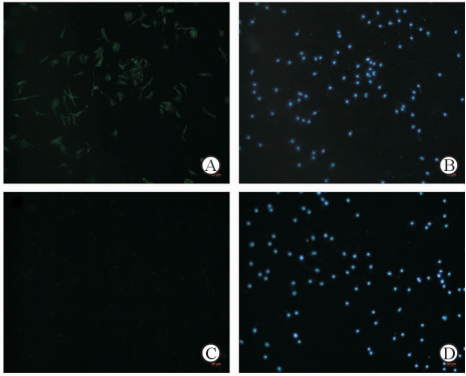
1.8 统计学分析

采用 Graphpad Prism 6 软件进行统计学分析。数据采用均数±标准差表示,多组间两两比较采用单因素方差分析及 Tukey 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代心室肌细胞的鉴定

原代心室肌细胞于倒置显微镜下观察,可见细胞呈长梭形、三角形和不规则形,核仁清晰可见,单个细胞贴壁后可见节律性舒缩搏动,细胞搏动频率随着培养时间延长呈现由慢到快再变慢的规律。免疫荧光染色显示心室肌细胞 α-SCA 阳性(见图 1)^[8]。



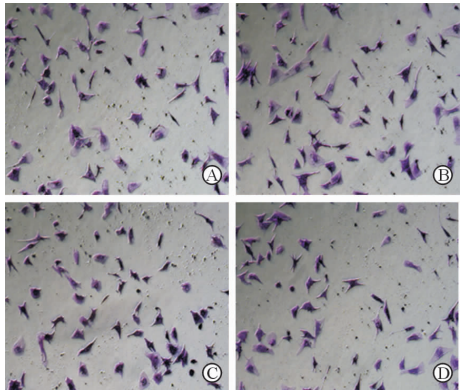
注: A 为心室肌细胞 α-SCA FITC 染色;B 为心室肌细胞核 DAPI 染色; C 为成纤维细胞 α-SCA FITC 染色;D 为成纤维细胞核 DAPI 染色

图 1 心室肌细胞和成纤维细胞 α-横纹肌肌动蛋白(α-SCA)免疫荧光染色(×100)

2.2 氯沙坦抑制牵张刺激诱导的心室肌细胞肥大效应

对各组心室肌细胞蛋白质/DNA 比值进行测定,牵张组蛋白/DNA 比值较对照组及氯沙坦组明显升高,氯沙坦+牵张组蛋白/DNA 比值较牵张组明显下降(P 均<0.001),氯沙坦组蛋白/DNA 比值与对照组相比无统计学差异,见表 1。

对各组心室肌细胞进行结晶紫染色并测量细胞表面积,牵张组心室肌细胞表面积较对照组及氯沙坦组明显增大,氯沙坦+牵张组心室肌细胞表面积较牵张组明显减小(P 均<0.001),氯沙坦组心室肌细胞表面积与对照组相比无统计学差异,见图 2、表 1。



注: A 为对照组;B 为牵张组;C 为氯沙坦组;D 为氯沙坦+牵张组

图 2 各组心室肌细胞结晶紫染色(×100)

表 1 各组心室肌细胞蛋白/DNA 比值及细胞表面积的比较

分组	蛋白/DNA 比值	心室肌细胞表面积/μm ²
对照组	1.16±0.07	259.96±54.20
牵张组	1.83±0.15 ⁽¹⁾⁽²⁾	591.85±180.20 ⁽¹⁾⁽²⁾
氯沙坦组	1.25±0.07	257.82±70.16
氯沙坦+牵张组	1.68±0.13 ⁽³⁾	372.25±116.13 ⁽³⁾

注:与对照组相比,⁽¹⁾ P<0.001;与氯沙坦组相比,⁽²⁾ P<0.001;与牵张组相比,⁽³⁾ P<0.001

2.3 氯沙坦抑制牵张刺激诱导的肥大心室肌细胞中 Crim1 的表达下调

牵张组心室肌细胞 Crim1 的 mRNA 和蛋白表达水平均较对照组及氯沙坦组下降,氯沙坦+牵张组心室肌细胞 Crim1 的 mRNA 和蛋白表达水平均较牵张组显著升高(P 均 <0.05),氯沙坦组心室肌细胞 Crim1 的 mRNA 和蛋白表达水平与对照组相比无统计学差异,见表 2、图 3。

表 2 各组心室肌细胞 Crim1 mRNA 和蛋白相对表达水平的比较

分组	mRNA 表达水平	蛋白表达水平
对照组	4.27±0.11	37 178.94±1 130.57
牵张组	1.14±0.38 ⁽¹⁾⁽²⁾	19 230.97±2 205.74 ⁽¹⁾⁽²⁾
氯沙坦组	4.61±0.16	38 592.98±4 804.73
氯沙坦+牵张组	2.24±0.44 ⁽³⁾	28 934.47±1 897.06 ⁽³⁾

注:与对照组相比,⁽¹⁾ $P<0.001$;与氯沙坦组相比,⁽²⁾ $P<0.001$;与牵张组相比,⁽³⁾ $P<0.05$

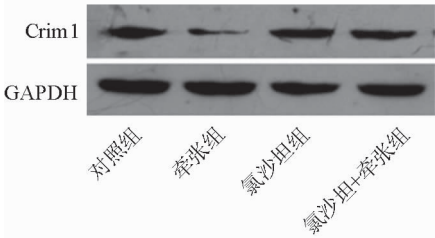


图 3 各组心室肌细胞 Crim1 的蛋白表达水平

3 讨论

本研究通过牵张刺激诱导 SD 大鼠乳鼠的心室肌细胞肥大,证实心室肌细胞肥大时 Crim1 表达下调。运用血管紧张素受体阻滞剂(ARB)阻断 AT1R 信号,不仅可以抑制心室肌细胞肥大,而且增加了 Crim1 在肥大心室肌细胞中的表达。AT1R 信号通路可能参与对肥大心室肌细胞中 Crim1 表达的调控。

人源和鼠源 Crim1 基因编码了 6 个高度保守的 CRR 片段,被称为 vWF-C 结构域。这种结构使 Crim1 成为 BMPs 的调控分子。Crim1 通过 CRR 片段与 BMP4、BMP7 结合,对 BMPs 起抑制作用,当这些蛋白在细胞高尔基体中共表达时,Crim1 主要通过 3 种方式实现对 BMPs 的抑制作用:(1)阻断 BMPs 的加工成熟;(2)将 BMP 前体(pre-BMP)限制于细胞表面;(3)减少成熟 BMP 的分泌^[9]。本研究予 SD 大鼠乳鼠的心室肌细胞牵张刺激,结果显示牵张刺激后心室肌细胞蛋白/DNA 比值、心室肌细胞表面积均增加,提示牵张刺激成功诱导了 SD

大鼠乳鼠的心室肌细胞肥大,而在肥大心室肌细胞中 Crim1 mRNA 和蛋白表达均明显下调。近年来的研究发现,BMP 信号通路参与心肌肥大的发生发展^[3,10-11]。因此我们推测,在致心肌肥大的刺激下,BMP 信号通路的激活可能是由于 Crim1 表达下降,使 Crim1 对 BMPs 的抑制作用削弱所致。

在压力负荷和 Ang II 诱导的心肌肥大小鼠模型中,成熟 BMP4 蛋白、BMP4 蛋白前体及 BMP4 mRNA 的表达均上调;Ang II 诱导的体外肥大心肌中也同样存在 BMP4 mRNA 和蛋白表达水平的增加^[3]。机械刺激能通过 Ang II 激活 AT1R,从而诱导心肌细胞肥大效应,ARB 类药物可抑制这种效应^[12]。体内外实验证实,机械刺激诱导心肌肥大时,心肌细胞自身能产生 Ang II 激活 AT1R,AT1R 也能不依赖于 Ang II 而被激活,参与心肌肥大的发生发展过程^[13-16]。由此推测,压力负荷和 Ang II 在诱导心肌肥大过程中有共同的信号分子 AT1R,且在压力负荷诱导的心肌肥大中,AT1R 的作用可能更加重要。AT1R 的激活可能与肥大心肌中 BMP 信号通路的激活有关,我们推测 AT1R 激活后通过 Crim1 调控 BMP 信号通路,进而促进心肌细胞肥大。我们应用氯沙坦在体外对受牵张刺激的心室肌细胞进行干预,发现其蛋白/DNA 比值、细胞表面积较牵张组心室肌细胞明显减小,提示氯沙坦抑制了牵张刺激诱导的心肌细胞肥大,这与本课题组前期研究中替米沙坦抑制牵张刺激诱导的心室肌细胞肥大的结果一致^[17]。我们还发现,应用氯沙坦对受牵张刺激的心室肌细胞进行干预,心室肌细胞的 Crim1 mRNA 和蛋白表达水平较牵张组明显上调,说明氯沙坦在抑制心室肌细胞肥大的同时上调了心室肌细胞中 Crim1 的表达,提示 AT1R 的激活可能参与了对肥大心室肌细胞中 Crim1 的调控。

参 考 文 献

[1] Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity[J]. N Engl J Med, 2008, 358(13):1370-1380.

[2] Jiang X, Deng KQ, Luo Y, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a positive regulator of pathological cardiac hypertrophy[J]. Hypertension, 2015, 66(2):356-367.

[3] Sun B, Huo R, Sheng Y, et al. Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy [J]. Hypertension, 2013, 61(2):352-360.

[4] Wang S, Gong H, Jiang G, et al. Src is required for mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy through angiotensin II type 1 receptor-dependent β -arrestin2

- pathways[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e92926.
- [5] Kolle G, Georgas K, Holmes GP, et al. CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis[J]. *Mech Dev*, 2000, 90(2): 181-193.
- [6] Larrain J, Bachiller D, Lu B, et al. BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space[J]. *Development*, 2000, 127(4):821-830.
- [7] Seidman RJ, Kaufman LD, Sokoloff L, et al. The neuromuscular pathology of the Eosinophilia-Myalgia syndrome[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1991, 50(1): 49-62.
- [8] 邓娜, 夏桂玲, 杨龙, 等. AT1R-Ca^N 信号通路在乳鼠肥大心室肌细胞 Nav1.5 蛋白表达调控中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(2):221-226.
- [9] Wilkinson L, Kolle G, Wen D, et al. CRIM1 regulates the rate of processing and delivery of bone morphogenetic proteins to the cell surface[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(36): 34181-34188.
- [10] Sun B, Sheng Y, Huo R, et al. Bone morphogenetic protein-4 contributes to the down-regulation of Kv4.3 K⁺ channels in pathological cardiac hypertrophy[J]. *Biochem biophys Res Commun*, 2013, 436(4):591-594.
- [11] Shahid M, Spagnolli E, Ernande L, et al. Bmp type I receptor Alk2 is required for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(8):H984-H994.
- [12] Zablocki D, Sadoshima J. Solving the cardiac hypertrophy riddle: the angiotensin II-mechanical stress connection[J]. *Circ Res*, 2013, 113(11):1192-1195.
- [13] Akazawa H, Komuro I. Mechanisms underlying angiotensin II-independent activation of angiotensin II type 1 receptor[J]. *Nihon Rinsho*, 2012, 70(9):1492-1498.
- [14] Zou Y, Akazawa H, Qin Y, et al. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(6): 499-506.
- [15] Zhou N, Li L, Wu J, et al. Mechanical stress-evoked but angiotensin II-independent activation of angiotensin II type 1 receptor induces cardiac hypertrophy through calcineurin pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(2): 263-269.
- [16] Jiang G, Gong H, Niu Y, et al. Identification of amino acid residues in angiotensin II type 1 receptor sensing mechanical stretch and function in cardiomyocyte hypertrophy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(1):105-116.
- [17] 杨君, 杨龙, 唐倩, 等. 替米沙坦在牵张刺激导致的心室肌细胞延迟整流钾通道改变中的作用[J]. *国际心血管病杂志*, 2015, 42(1):51-55.

(收稿:2017-08-31 修回:2018-03-04)

(本文编辑:胡晓静)

~~~~~

(上接第 148 页)

- [18] Kunamalla A, Ng J, Parini V, et al. Constitutive expression of a dominant-negative TGF- $\beta$  type II receptor in the posterior left atrium leads to beneficial remodeling of atrial fibrillation substrate[J]. *Circ Res*, 2016, 119(1):69-82.
- [19] Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis[J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 22(17): 30127-30129.
- [20] Moore-Morris T, Cattaneo P, Puceat M, et al. Origins of cardiac fibroblasts[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91:1-5.
- [21] Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(48):18255-18260.
- [22] Chen C, Ponnusamy M, Liu C, et al. MicroRNA as a therapeutic target in cardiac remodeling[J]. *Biomed Res Int*, 2017:1278436.
- [23] Mcmanus DD, Lin H, Tanriverdi K, et al. Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: data from the Framingham Offspring Study[J]. *Heart Rhythm*, 2014, 11(4):663-669.
- [24] 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.
- [25] Liu H, Qin H, Chen GX, et al. Comparative expression profiles of microRNA in left and right atrial appendages from patients with rheumatic mitral valve disease exhibiting sinus rhythm or atrial fibrillation[J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 90.
- [26] Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35):13027-13032.
- [27] Qiao G, Xia D, Cheng Z, et al. miR-132 in atrial fibrillation directly targets connective tissue growth factor[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4):4143-4150.
- [28] Huang Y, Li J. MicroRNA208 family in cardiovascular diseases: therapeutic implication and potential biomarker[J]. *J Physiol Biochem*, 2015, 71(3):479-486.
- [29] Huang Y, Qi Y, Du JQ, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting Smad4[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(12):1355-1365.
- [30] Mcvicker BL, Bennett RG. Novel anti-fibrotic therapies[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8:318.

(收稿:2018-01-09 修回:2018-03-07)

(本文编辑:丁媛媛)