

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.16.005

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190619.0916.014.html(2019-06-19)

miR-186 通过靶向调控 Smad6 抑制人胶质瘤细胞增殖^{*}刘 艳¹,邵阿末¹,曾金艳¹,胡亚玲²,许 路^{1△}

(1. 无锡卫生高等职业技术学校,江苏无锡 214028;2. 江苏省无锡市人民医院中心实验室 214023)

[摘要] **目的** 探讨 miR-186 靶向 Smad6 对人胶质瘤细胞增殖的影响。**方法** 运用生物信息学软件预测 miR-186 的下游靶基因。双荧光素酶报告实验验证 miR-186 与 Smad6 的 3'-非编码区(3'-UTR)的结合作用。人胶质瘤细胞系 U87 转染 miR-186 mimics 或 miR-186 inhibitor 后,qRT-PCR 检测 miR-186 及 Smad6 mRNA 的表达;Western blot 检测 Smad6 蛋白的表达水平。Smad6 过表达质粒或对照质粒与 miR-186 mimics 或 mimics NC 共转染,Western blot 检测 Smad6 蛋白的表达水平;CCK-8 和克隆形成实验检测细胞的增殖。**结果** 生物信息学软件预测出 Smad6 为 miR-186 的下游靶基因之一。双荧光素酶报告实验发现,相比各自对照组,转染 miR-186 mimics 或 miR-inhibitor 后,野生型 Smad6 3'-UTR 荧光强度相应地明显减弱或增强,而突变了 Smad6 3'-UTR 荧光强度没有明显变化。相较于各自的对照组,人胶质瘤细胞系 U87 转染 miR-186 mimics 后,Western blot 检测发现 Smad6 蛋白表达下调,而转染 miR-186 inhibitor 后,Smad6 蛋白的表达升高。miR-186 mimics 与 Smad6 过表达质粒共转染后,CCK-8 和克隆形成实验检测细胞的增殖情况,发现 Smad6 过表达可以逆转 miR-186 mimics 引起的细胞增殖的抑制作用。**结论** miR-186 可通过靶向调控 Smad6 的表达进而发挥其抑制人胶质瘤细胞增殖的作用。

[关键词] 微 RNA-186;Smad6 蛋白质;细胞增殖;神经胶质瘤**[中图法分类号]** R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)16-2718-05miR-186 inhibits the proliferation of human glioma cell lines by targeting Smad6^{*}LIU Yan¹,SHAO Amo¹,ZENG Jinyan¹,HU Yaling²,XU Lu^{1△}

(1. Wuxi Higher Health Vocational and Technology School, Wuxi, Jiangsu 214028, China;

2. Central Laboratory, People's Hospital of Wuxi City, Wuxi, Jiangsu 214023, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of miR-186 targeting Smad6 on regulating proliferation of human glioma cells. **Methods** The target gene of miR-186 was predicted by bioinformatics tools. The double luciferase reporter assay was used to verify the binding effect of miR-186 on the 3' non-coding region (3'-UTR) of Smad6. The human glioma cell line U87 was transfected with miR-186 mimics or miR-186 inhibitor, and the expression levels of miR-186 and Smad6 were detected by qRT-PCR. The expression level of Smad6 protein was detected by Western blot. Smad6 overexpression plasmid or control plasmid was co-transfected with miR-186 mimics or mimics NC, and the expression level of Smad6 protein was detected by Western blot. CCK-8 and clonal formation assay were used to detect cell proliferation. **Results** Bioinformatics tools predicted that Smad6 was one of the target gene of miR-186. The dual luciferase reporter assay showed that the fluorescence intensity of the wild-type Smad6 3'-UTR region was significantly weakened or enhanced after the transfection of miR-186 mimics or miR-186 inhibitor when compared to the respective control groups, while the fluorescence intensity was not significantly changed between the mutant-type Smad6 3'-UTR groups and the respective control groups. After transfecting miR-186 mimics or miR-186 inhibitor in human glioma cell line U87, the protein expression level of Smad6 was down-regulated or up-regulated when compared with the respective control groups. After co-transfection of miR-186 mimics with Smad6 overexpression plasmid, CCK-8 and clonal formation experiments were performed to detect cell proliferation, it was found that Smad6 overexpression could reverse the inhibitory effect of miR-186 mimics on cell proliferation. **Conclusion** miR-186 inhibits the proliferation of human glioma cells by targeting Smad6.

[Key words] miR-186; Smad6 protein; cell proliferation; glioma

^{*} 基金项目:江苏省无锡市卫生和计划生育委员会科研面上项目(MS201765)。 作者简介:刘艳(1982—),讲师,硕士,主要从事肿瘤发病机制方面研究。 △ 通信作者,E-mail:xl4151@163.com。

胶质瘤是人颅内常见的原发恶性肿瘤,其主要特点是肿瘤细胞弥漫性浸润生长、边界不清、无限增殖且有高度侵袭性,治疗困难,严重影响人类的健康。尽管胶质瘤的治疗方法已取得很大的进展,但胶质瘤患者的 5 年生存率仍较低^[1]。微 RNA(microRNA, miRNA/miR)是一种内源性长 20~25 个碱基的非编码小分子单链 RNA,可调控人类约 1/3 编码蛋白的基因。越来越多的研究表明 miRNA 异常表达与多种肿瘤的发生发展密切相关,miRNA 既可作为癌基因促进肿瘤生长,又可作为抑癌基因抑制肿瘤相关靶基因的表达^[2]。近年来,与肿瘤相关的 miRNA 被陆续发现,多种 miRNA 参与胶质瘤发生发展。其中,miR-186 在包括胶质瘤在内的多种肿瘤中低表达,功能实验显示其具有抑癌作用^[3-5]。本研究通过生物信息学方法预测 miR-186 靶基因包括 Smad6,并利用双荧光素酶报告系统进行活性检测,通过分子生物学技术证实 miR-186 是否通过作用于 Smad6 对胶质瘤细胞增殖产生影响,以期解释两者在脑胶质瘤发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑胶质瘤细胞 U87 购自中国科学院上海细胞所;DMEM 培养液、青-链霉素混合液购自美国 HyClone 公司;Lipofectamine™ 2000、TRIzol 等试剂购自美国 Invitrogen 公司;M-MLV 反转录酶、DNA 聚合酶及缓冲体系购自美国 Promega 公司;dNTP 和相关引物购自上海生工生物工程有限公司;苯甲基磺酰胺(PMSF)、RIPA 裂解液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳配制相关产品、CCK-8 细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究;胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司;GAPDH、Smad6 抗体购自美国 Cell Signaling 公司;聚偏氟乙烯碳(PVDF)膜、化学发光底物 ECL 购自美国 Millipore 公司。野生型和突变型 Smad6 基因 3'-非编码区(3'-UTR)萤光素酶表达载体的构建和测序由上海吉玛制药技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 U87 细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基进行培养,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内常规传代培养,定期观察细胞密度,每 2~3 天换液 1 次。实验所用细胞均为对数生长期细胞。

1.2.2 细胞转染及分组 制备终浓度为 80 nmol/L miR-186 mimics 或 80 nmol/L miR-186 inhibitor Lipofectamine™ 2000 脂质体复合物。细胞分别加入 miR-186 mimics 或 miR-186 inhibitor 脂质体复合物(miR-186 mimics 组、miR-186 inhibitor 组),同时设置对应的对照组(分别为 miR-186 mimics NC 组、miR-186 inhibitor NC 组)。购建 Smad6 过表达质粒(Smad6 组),以及对应的对照质粒(vector 组),细胞分别转染相应质粒;用 Smad6 过表达质粒或对照组质

粒与 miR-186 mimics 或 miR-186 mimics NC 共转染,再分 miR-186 mimics NC+vector 组、miR-186 mimics NC+Smad6 组、miR-186 mimics+vector 组和 miR-186 mimics+Smad6 组 4 个组。将对数生长期的 U87 细胞以每孔 2×10⁵/mL 密度接种于六孔板,待细胞融合度达 70%左右时行共转染,置于 37℃、含 5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h。

1.2.4 定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 收集各组细胞,用 TRIzol 裂解并提取各组细胞总 RNA。应用紫外分光光度计测定各组细胞的总 RNA 浓度,然后取 2 μg 总 RNA 进行反转录,最后取 1 μL cDNA 模板于 25 μL 反应体系中进行 RT-qPCR,其中分别以 U6 和 GAPDH 为内参。扩增条件为 95℃ 5 min;95℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s,共 40 个循环。独立重复实验 3 次,采集数据,最后以 2^{-ΔΔCt} 相对定量法计算基因的相对表达量。具体引物序列见表 1。

表 1 引物名称和序列

基因	方向	序列(5'-3')	产物大小 (bp)
miRNA-186	正向	GCCGCCAAAGAATTCTCCTTT	22
	反向	GTGCAGGGTCCGAGGT	
Smad6	正向	CTGGAGTTGTTGAGCAGCC	220
	反向	GTGCGTCTTTCTTGTTTTGTCC	
U6	正向	GGGTCGGCACATATACTAAAAT	106
	反向	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	
GAPDH	正向	CCCATGTTCTGTCATGGGTGT	145
	反向	TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA	

1.2.5 Western blot 检测蛋白水平 收集各组细胞,用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞提取总蛋白,BCA 法检测各组蛋白浓度,每组取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离后并将其转移至 PVDF 膜,以 5%脱脂奶粉-TBST 封闭液封闭 1 h,一抗 4℃孵育过夜,TBST 洗 3 遍,HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,TBST 洗 3 遍,最后扫描 PVDF 膜并进行结果统计分析,其中以 GAPDH 作为内参。

1.2.6 CCK-8 法检测细胞活力 将细胞按 5×10³ 密度接种于 96 孔板中,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37℃条件下孵育 2 h 后酶标仪检测各孔在 490 nm 波长下的吸光度(A)值。每组设置 3 个复孔取平均值,另设单孔作为空白对照。细胞活力(%)=(检测时间点 A 值-0 h A 值)/(0 h A 值-空白对照 A 值)×100%。

1.2.7 集落形成实验 计数细胞悬液,将细胞接种于 6 孔板中(每孔 1×10³ 个细胞),置细胞于培养箱中培养 3 周,除去培养液,用 PBS 洗涤 2 次,加 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,然后去除固定液,加适量结晶紫染色 15 min,然后洗去染色液,自然环境中干燥,最后计算集落形成率。集落形成率(%)=集落形成数/

接种细胞数×100%。

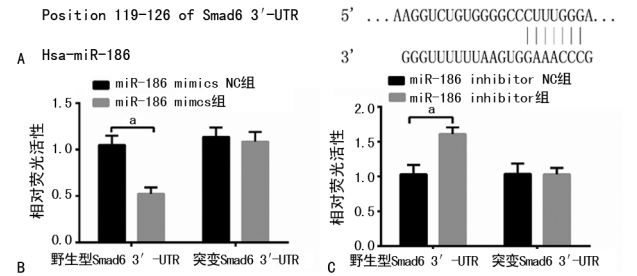
1.2.8 双荧光素酶报告实验 构建野生型和突变型 Smad6 基因 3'-UTR 的报告基因质粒 (wt-Smad6 和 mut-Smad6), 依照转染试剂说明将 miRNA-186 mimics 和 wt-Smad6、miRNA-186 mimics NC 和 wt-Smad6、miRNA-186 mimics 和 mut-Smad6、miRNA-186 mimics NC 和 mut-Smad6、miRNA-186 inhibitor NC 和 wt-Smad6、miRNA-186 inhibitor 和 mut-Smad6、miRNA-186 inhibitor NC 和 mut-Smad6 共转染细胞。转染 48 h 后, 根据试剂盒说明书建议的方法检测上述各组细胞的相对荧光强度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 组内比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-186 通过结合 Smad6 的 3'-UTR 调控 Smad6 的表达 通过生物信息学软件预测 miR-186 与 Smad6 的 3'-UTR 区结合位点。荧光素酶报告实验结果显示, 相比 miR-186 mimics NC 组, miR-186 mimics 组降低了野生型 Smad6 3'-UTR 转染细胞的荧光素酶活性 ($P < 0.05$); 而与 miR-186 inhibitor NC 组比较, miR-186 inhibitor 组 Smad6 3'-UTR 转染细胞的荧光素酶活性增强 ($P < 0.05$)。但在转染突变型

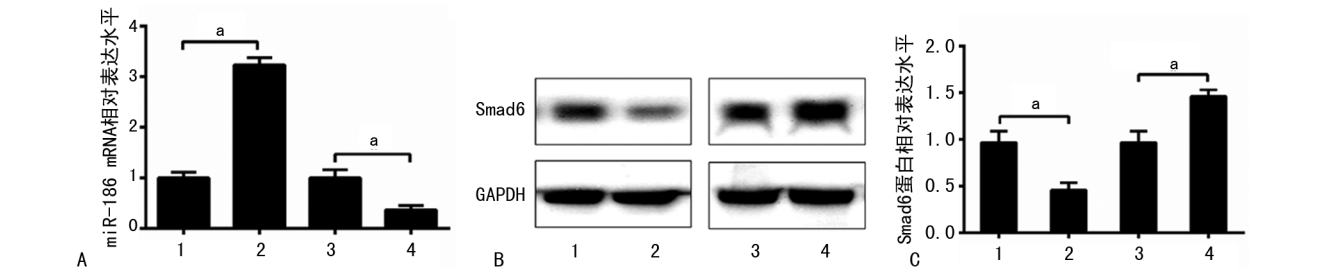
Smad6 3'-UTR 的细胞中, 相比各自对照组, miR-186 mimics 组、miR-186 inhibitor 组都不能改变突变型 Smad6 3'-UTR 细胞的荧光素酶活性 ($P > 0.05$), 见图 1。



A: 生物信息学软件预测 miR-186 的下游靶基因; B、C: 荧光素酶报告实验; ^a: $P < 0.05$

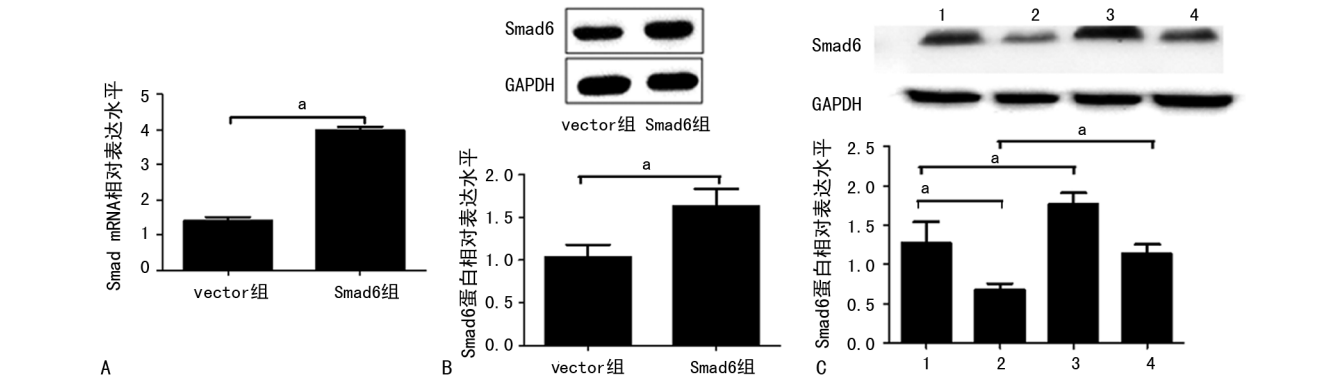
图 1 miR-186 与 Smad6 的靶向关系

2.2 miR-186 负向调控 U87 细胞 Smad6 蛋白的表达水平 qRT-PCR 检测结果显示, miR-186 mimics 组 miR-186 的表达水平较 miR-186 mimics NC 组显著升高 ($P < 0.05$); miR-186 inhibitor 组 miR-186 的表达水平较 miR-186 inhibitor NC 组明显降低 ($P < 0.05$), 见图 2A。Western blot 实验检测结果显示, 与 miR-186 mimics NC 组比较, miR-186 mimics 组 Smad6 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$); 与 miR-186 inhibitor NC 组比较, miR-186 inhibitor 组 Smad6 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), 见图 2B、C。



A: PCR 分析图; B: Western blot; C: Western blot 分析图; 1: miR-186 mimics NC 组; 2: miR-186 mimics 组; 3: miR-186 inhibitor NC 组; 4: miR-186 inhibitor 组; ^a: $P < 0.05$

图 2 miR-186 对 U87 细胞 Smad6 蛋白表达水平影响



A: 转染 Smad6 过表达质粒后 U87 细胞 Smad6 mRNA 的表达变化; B: 转染 Smad6 过表达质粒后 U87 细胞 Smad6 蛋白的表达变化; C: Smad6 过表达质粒或对照组质粒与 miR-186 mimics NC 组或 miR-186 mimics 共转染后 Smad6 蛋白的表达变化; 1: miR-186 mimics NC + vector 组; 2: miR-186 mimics + vector 组; 3: miR-186 mimics NC + Smad6 组; 4: miR-186 mimics + Smad6 组; ^a: $P < 0.05$

图 3 Smad6 过表达恢复 miR-186 对 Smad6 蛋白表达的抑制作用

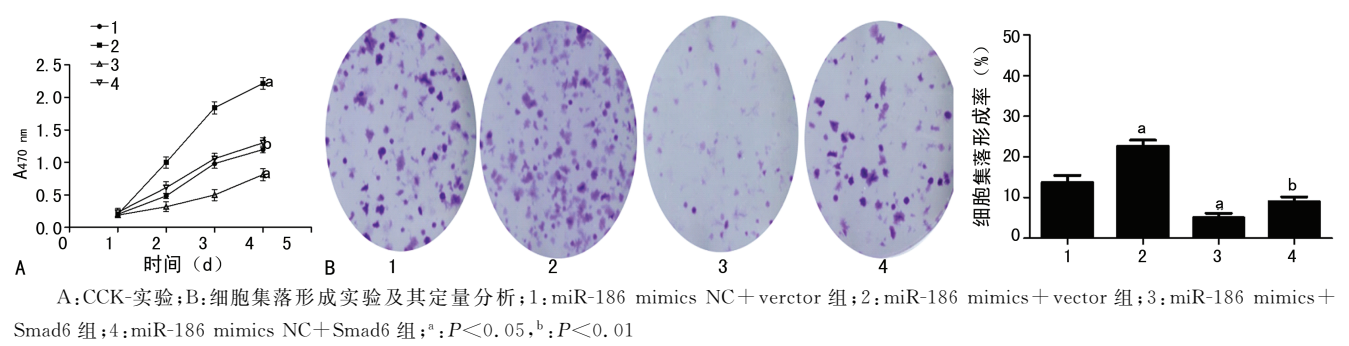


图 4 miR-186 靶向 Smad6 对 U87 细胞增殖的影响

2.3 Smad6 过表达可恢复 miR-186 对 Smad6 的抑制作用 U87 细胞转染 Smad6 质粒后,Smad6 mRNA 和蛋白质的表达均增加($P<0.05$),见图 3。

2.4 miR-186 靶向 Smad6 抑制 U87 细胞增殖 CCK-8 检测结果显示,与 miR-186 mimics NC+vector 组比较,miR-186 mimics+vector 组 U87 细胞增殖能力明显降低,miR-186 mimics NC+Smad6 组细胞的增殖能力显著升高($P<0.05$);与 miR-186 mimics+vector 组比较,miR-186 mimics+Smad6 组细胞的增殖能力显著升高($P<0.05$),见图 1A。细胞集落形成实验显示,与 mimics NC+vector 组相比,miR-186 mimics+vector 组 U87 细胞克隆形成率明显降低,miR-186 mimics NC+Smad6 组细胞克隆形成率显著升高($P<0.05$);与 miR-186 mimics+vector 组相比,miR-186 mimics+Smad6 组细胞克隆形成率显著升高($P<0.05$),见图 4。

3 讨 论

胶质瘤具有高发病率和低生存率的特点^[6]。虽然胶质瘤的手术、放化疗等治疗技术已取得长足的发展,但胶质瘤患者的预后仍不理想。随着胶质瘤分子学的研究,发现胶质瘤的本质是一种多基因异常疾病,包括抑癌基因的突变缺失及原癌基因的过表达。因此寻求新的分子基因靶点成为治疗胶质瘤新的突破点。

miRNAs 具有高度的保守性、组织特异性,可通过 3'-UTR 碱基互补的方式识别特异靶基因,在转录后水平降解靶基因 mRNA 或抑制靶基因的翻译,从而在细胞增殖、分化、凋亡中发挥重要作用。近年来的研究发现,在胶质瘤中存在大量 miRNA 的异常表达,并参与了胶质瘤的增殖、凋亡与侵袭等生物功能^[7]。BAO 等^[8]研究表明 miR-519a 在胶质瘤标本和细胞系中多表达降低,低表达的 miR-519a 与胶质瘤患者较差的预后呈正相关。XUE 等^[9]研究发现,与正常组织相比,胶质瘤组织中 miR-221/222 的表达明显升高,恶性程度高的胶质瘤组织的表达高于恶性程度低的组织,高表达 miR-221/222 的胶质瘤患者生存期较短。miR-186 作为 miRNAs 中的一员,近年已成为研究的热点,CAI 等^[10]研究发现 miR-186 在口腔鳞状细胞癌组织和细胞系中表达明显降低,发挥抑癌作用。SU 等^[11]实验结果表明与正常细胞系相比,

miR-186 在人皮肤恶性黑色素瘤细胞系中的表达明显降低,过表达后可抑制肿瘤细胞增殖,同时也降低细胞的迁移和侵袭能力。另有研究表明该基因在胶质瘤中也是低表达,发挥抑癌功能,但是具体的机制并不明确^[12]。本课题组前期研究也发现,与正常星形胶质细胞相比,miR-186 在胶质瘤细胞中的表达明显降低。笔者通过 miRanda、miRDB、miRWalk、TargetsCan 数据库预测出能与 Smad6 结合的 miRNAs 包含 miR-186,推测 miR-186 可能通过靶向调节 Smad6 的表达来发挥作用。

Smad6 是抑制性 Smad 蛋白,是转化生长因子- β (transformation growth factor- β , TGF- β) 信号通路的一类关键调控分子。TGF- β 家族成员具有广泛的细胞功能,比如调节细胞增殖与分化、细胞凋亡、细胞迁移和细胞间粘连。另外,它们在胚胎发育、免疫监督及干细胞自我更新和分化中也起着重要的作用。多个证据表明 Smad6 对肿瘤的发生发展发挥一定的作用。比如 Smad6 在胰腺癌、口腔鳞状细胞癌中存在过表达现象,可能是导致该肿瘤发生的原因之一^[13]。Smad6 影响非小细胞肺癌的生存期,敲降该基因可引起肺癌细胞活力下降、凋亡增加,同时抑制细胞周期,从而重建肺癌细胞 TGF- β 信号通路的平衡^[14]。另有研究表明 Smad6 在肝癌 CD133⁺ 干细胞中表达增加^[15]。前期研究发现 Smad6 在胶质瘤中表达亦增加^[16]。本研究通过双荧光素酶报告实验证实 miR-186 能直接结合到 Smad6 3'-UTR,与生物信息学方法的预测结果一致。与文献报道的 miR-186 可通过调控相关靶基因影响肿瘤的生物功能类似^[3-4],本研究也发现转染 miR-186 模拟物或抑制物后,Smad6 的表达水平明显降低或升高,说明 miR-186 负向调控胶质瘤 U87 细胞 Smad6 蛋白的表达水平;转染 miR-186 模拟物后,细胞的增殖显著减弱,共转染 miR-186 模拟物和 Smad6 过表达质粒后,细胞的增殖能力有明显恢复,故推断在胶质瘤细胞中 miR-186 通过靶向调节 Smad6 影响了细胞的增殖能力。

综上所述,miRNAs 通过调控不同的靶基因参与胶质瘤的发生、发展过程。本文探讨了 miR-186、Smad6 在胶质瘤发生发展中的重要作用,为胶质瘤的防治提供实验依据,并有可能成为胶质瘤治疗的新方向。

参考文献

- [1] JOHNSON D R, GALANIS E. Incorporation of prognostic and predictive factors into glioma clinical trials[J]. *Curr Oncol Rep*, 2013, 15(1): 56-63.
 - [2] HAYS J, PERUZZI P P, LAWLER S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(8): 460-469.
 - [3] CAO C, SUN D, ZHANG L, et al. miR-186 affects the proliferation, invasion and migration of human gastric cancer by inhibition of Twist1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 79956-79963.
 - [4] HUA X, XIAO Y, PAN W, et al. miR-186 inhibits cell proliferation of prostate cancer by targeting GOLPH3[J]. *Am J Cancer Res*, 2016 6(8): 1650-1660.
 - [5] MA Y, WANG P, XUE Y, et al. PVT1 affects growth of glioma microvascular endothelial cells by negatively regulating miR-186[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1010428317694326.
 - [6] CHEN X, ZHANG Y, SHI Y, et al. MiR-873 acts as a novel sensitizer of glioma cells to cisplatin by targeting Bel-2[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(4): 1603-1611.
 - [7] WANG B C, MA J. Role of microRNAs in malignant glioma[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(9): 1238-1244.
 - [8] BAO G, WANG N, LI R, et al. MiR-508-5p inhibits the progression of glioma by targeting glycoprotein non-metastatic melanoma B[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(7): 1684-1690.
 - [9] XUE L, WANG Y, YUE S, et al. The expression of miRNA-221 and miRNA-222 in gliomas patients and their prognosis[J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(1): 67-73.
 - [10] CAI Z, HAO X Y, LIU F X. MicroRNA-186 serves as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma by negatively regulating the protein tyrosine phosphatase SHP2 expression[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 89: 20-25.
 - [11] SU B B, ZHOU S W, GAN C B, et al. MiR-186 inhibits cell proliferation and invasion in human cutaneous malignant melanoma. [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement): S60-64.
 - [12] ZHENG J, LI X D, WANG P, et al. CRNDE affects the malignant biological characteristics of human glioma stem cells by negatively regulating miR-186 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 25339-25355.
 - [13] MANGONE F R, WALDER F, MAISTRO S, et al. Smad2 and Smad6 as predictors of overall survival in oral squamous cell carcinoma patients[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 106.
 - [14] JEON H S, DRACHEVA T, YANG S H, et al. SMAD6 contributes to patient survival in non-Small cell lung cancer and its knockdown reestablishes TGF- β homeostasis in lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(23): 9686-9692.
 - [15] ZHANG L, SUN H, ZHAO F, et al. BMP4 Administration induces differentiation of CD133⁺ hepatic cancer stem cells, blocking their contributions to hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4276-4285.
 - [16] JIAO J, ZHANG R, LI Z, et al. Nuclear Smad6 promotes gliomagenesis by negatively regulating PIAS3-mediated STAT3 inhibition[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2504.
-
- (收稿日期: 2019-03-03 修回日期: 2019-04-20)
- (上接第 2717 页)
- [3] PATRON M, RAFFAELLO A, GRANATIERO V, et al. The mitochondrial Calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(15): 10750-10758.
 - [4] BROOKES P S, YOON Y, ROBOTHAM J L, et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(4): C817-833.
 - [5] SANCAK Y, MARKHARD A L, KITAMI T A, et al. EMRE is an essential component of the mitochondrial Calcium uniporter complex[J]. *Science*, 2013, 342(6164): 1379-1382.
 - [6] FOSKETT J K, MADESH M. Regulation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by MICU1 and MICU2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 449(4): 377-383.
 - [7] 张文斌, 唐其柱, 李金, 等. 皮下注射异丙肾上腺素诱导小鼠心肌梗塞模型[J]. *医学研究杂志*, 2015, 44(7): 88-91.
 - [8] GOVINDSAMY A, NAIDOO S, CERF M E. Cardiac development and transcription factors; insulin signalling, insulin resistance, and intrauterine nutritional programming of cardiovascular disease[J]. *J Nutr Metab*, 2018, 2018: 1-12.
 - [9] 张蒙, 董苗, 周喧宣, 等. 二苯乙炔苷对小鼠心肌梗塞作用的研究[J]. *中国体外循环杂志*, 2016, 14(4): 233-237.
 - [10] 罗时珂, 李萍, 程晓曙. 异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的建立[J]. *重庆医学*, 2012, 41(4): 352-354.
 - [11] CHOWDHURY D, TANGUTUR A D, KHATUA T N, et al. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy; prohibitin identified as a potential biomarker in rats[J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1): 130.
 - [12] PAN X, LIU J, NGUYEN T, et al. The physiological role of mitochondrial Calcium revealed by mice lacking the mitochondrial Calcium uniporter[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(12): 1464-1472.
 - [13] HOLMSTROEM K M, PAN X, LIU J C, et al. Assessment of cardiac function in mice lacking the mitochondrial Calcium uniporter[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 85: 178-182.
 - [14] SANTULLI G, XIE W J, REIKEN S R, et al. Mitochondrial Calcium overload is a key determinant in heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(36): 11389-11394.
 - [15] BELL J R, ERICKSON J R, DELBRIDGE L M. Ca²⁺/calmodulin dependent kinase II: a critical mediator in determining reperfusion outcomes in the heart? [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(11): 940-946.
- (收稿日期: 2019-03-21 修回日期: 2019-04-29)