

microRNAs 在马中的研究进展及应用

白东义 赵若阳 韩海格 陶克涛 图格琴 芒来*

(内蒙古农业大学 动物科学学院/内蒙古自治区马属动物遗传育种与繁殖重点实验室/
内蒙古农业大学马属动物研究中心,呼和浩特 010018)

摘要 为了解 microRNAs 在马医学临床诊断、预测和治疗中的应用,本研究通过整理相关文献并进行分析,概括了 microRNAs 在马中的研究进展。结果表明:1)在马的正常和病变组织中,microRNAs 存在差异表达,可以通过靶向抑制关键调节因子,参与调控病症相关信号通路;2)在赛马运动过程中,microRNAs 的表达与能量代谢相关调控因子以及血液生理生化指标呈现一定相关性,可以用于研究运动性能相关的新型分子标记物;3)在马的繁殖方面,microRNAs 被发现其靶基因可参与胎盘、胚胎、睾丸和精子的生长发育,与马的生育调控机制存在一定的联系;4)基于 microRNAs 显著的抑制调控作用与其靶基因的表达负相关性,microRNAs 可被用于治疗 and 诊断不同类型的马内外科疾病。随着赛马运动的广泛普及,人们对马的健康疾病日益重视,运用 microRNAs 在马中的诊断治疗将成为一个新的研究领域。

关键词 马; microRNAs; 应用

中图分类号 S821.3 **文章编号** 1007-4333(2022)01-0116-10 **文献标志码** A

Research progress and application of microRNAs in horse

BAI Dongyi, ZHAO Ruoyang, HAN Haige, Togtokh, Tugeqin, Manglai*

(College of Animal Science/Inner Mongolia Key Laboratory of Equine Genetics, Breeding and Reproduction/Equine Research Center, Scientific Observing and Experimental Station of Equine Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract To provide an overview of microRNAs in medical clinical diagnosis, prediction, and treatment for horses in further studies, the research progress of microRNAs in horses were summarized by sorting out and analyzing the relevant literatures. The results showed that: 1) There are differential expressions of microRNAs in normal and diseased tissues of horses. microRNAs can participate in the regulation of disease-related signal pathways by targeting key regulators; 2) During horse racing, the expression of microRNAs is related to energy metabolism-related regulatory factors and blood physiology biochemical indicators, which can be used to develop new molecular markers related to sports performance; 3) In horse reproduction, microRNAs are found targeting genes involved in the growth and development of placenta, embryos, testes and sperm. There is a certain connection between microRNAs and the fertility regulation mechanism; 4) Based on the significant inhibition of microRNAs and the negative correlation with the expression of their target genes, microRNAs can be used to treat and diagnose different types of equine surgical diseases. With the popularity of horse racing, increasing attention is paid to the health of horse and their diseases, the miRNAs of horse diagnosis and disease treatment will lead to a new research field.

Keywords horse; microRNAs; application

收稿日期: 2020-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960657,31961143025);国家重点研发计划项目(2017YFE0108700),内蒙古自治区自然科学基金重大项目(2017ZD06);内蒙古自治区科技重大专项(ZD20190039),内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS03064),内蒙古农业大学动物科学学院标志性成果项目(BZCG202115)

第一作者: 白东义,副教授,主要从事马属动物遗传育种与繁殖研究,E-mail:baidongyi1983@163.com

通讯作者: 芒来,教授,主要从事马属动物遗传育种与繁殖研究,E-mail:dmanglai@163.com

microRNAs(miRNAs)是存在于动植物中的单链小RNA分子,长度约22个核苷酸,通过与mRNA互补靶序列结合来调控特定基因的表达,改变了mRNA的稳定性,导致翻译过程受到抑制或mRNA降解,从而对翻译产生负调节,控制基因转录后表达^[1]。据估计,约占30%~80%编码蛋白的基因受miRNAs调控^[2]。单个miRNA可与一系列基因相互作用,单个基因的表达亦可受多个miRNAs控制。因此,miRNAs在个体发育、成熟和病理过程中参与调控多种生物学功能^[3]。随着马术、赛马等竞技项目的兴起与普及,马匹的健康状况备受关注,尤其是优秀赛马的疾病诊断治疗方案趋向使用无创和低损伤技术,miRNAs疾病诊断治疗无需进行大创面手术,便捷且见效迅速,为这一趋势提供了无限可能性。因此,本研究以miRNAs如何调控基因表达为切入点,结合miRNAs表达在马不同生理病理过程中的变化,旨在讨论miRNAs在马疾病诊断和治疗中的应用及潜力。

1 microRNAs 概述

在组织中表达的全部miRNA被称为miRNome。目前被主要的miRNA数据库miRBase注释(miRBase. www. miRBase. org)的马(*Equus caballus*)成熟miRNA与人(*Homo sapiens*)相比,数量并不多。miRNA可调控细胞的多个过程,包括DNA修复、代谢、应激反应、细胞增殖、凋亡、干

细胞维持和组织分化,并在涉及的相关信号通路中发挥重要作用,其异常表达与多种疾病相关^[4]。

在哺乳动物基因组的表达产物中,miRNA占比很大^[5]。表达miRNA的基因序列大多位于蛋白编码或非编码mRNA基因的内含子或3'UTRs区内,且绝大部分存在于基因间区^[6]。典型miRNA生物合成途径中(图1),上述基因序列经RNA聚合酶II转录,生成带有3'帽子和5'polyA尾巴的长miRNA前体,称为pri-miRNA^[7]。在双链RNA结合蛋白Pasha存在的情况下,RNase III内切酶Drosha将初级转录本裂解^[8],产生了具有60~80个核苷酸的前体pre-miRNA,这些前体经折叠形成茎环结构(又称“发夹”结构)。随后pre-miRNA被exportin5蛋白转运到细胞质中^[9],通过RNase III内切酶Dicer酶进一步裂解^[10],形成一个短暂存在的21~25个核苷酸双链miRNA-miRNA*复合物,称双链成熟miRNA,内含的2条单链分别为引导链和过客链。之后,这种双链结构会结合到RNA诱导沉默复合物miRISC上(该复合物由Argonaute蛋白家族成员组成)^[11]。两条链中的一条miRNA链通常优先保留为成熟miRNA(Mature miRNA),而第二条miRNA链会被降解。作为复合物的一部分,成熟的miRNA能够与靶mRNA的互补位点结合,通过其种子序列(一般为2~8个核苷酸)识别3'UTR的目标位点诱导mRNA降解,进而抑制翻译过程。

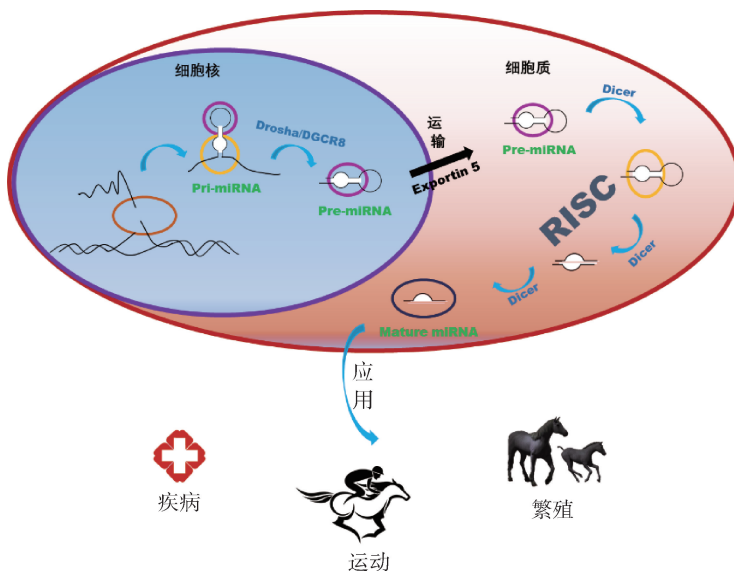


图1 miRNA的生物合成途径(改自文献^[18])

Fig. 1 Schematic of the miRNA biogenesis pathway(Modified from literature^[18])

miRNAs的生物学功能并不局限于合成它们的细胞中,因为研究表明它们可介导细胞间信号转导^[12]。高浓度的 miRNA 存在于哺乳动物体液如血液、唾液和尿液中,初级 miRNA 转录本含有发夹结构,可被 RNase III 内切酶 Droscha 和双链 RNA 结合蛋白 DGCR8 的微加工复合物识别^[13];或被包裹在囊泡中被释放出来^[14]。在细胞外囊泡中发现的 miRNA 是细胞选择性释放的部分 miRNA 序列^[15]。细胞外囊泡包裹的这些 miRNA 可被邻近或远一些的细胞吸收,这些细胞具有特定的细胞表面受体,随后这些 miRNA 可调节受体细胞内的基因表达^[16]。细胞凋亡后,细胞外会出现 miRNA 核糖核蛋白复合物^[17]。

存在于多细胞有机体中的 miRNAs,通过相同的生物合成途径产生和机制调节基因表达。miRNAs 核苷酸序列变化与 pre-miRNA 序列变异程度低^[19],物种间的前体和成熟 miRNA 序列,特别是种子序列区域保守程度则非常高^[20]。受 miRNAs 调控的基因表达调控网络在进化过程中是相对保守的,同时在生物进化过程中,miRNAs 通路的复杂性与表型复杂性之间存在正相关关系^[21]。且其前体和成熟序列在进化中的保守性是通过实验鉴定未知 miRNA 同源物基因组的基础^[22]。

2 马 miRNA

2.1 miRNA 与马疾病的相关性

miRNAs 通过靶基因互作,在基因的表达调控中发挥重要作用。近乎所有类型的细胞均可以产生和释放 miRNAs,在肿瘤微环境下的基因调控中发挥重要作用^[23]。肉瘤是一种良性的、局部侵袭性的纤维母细胞肿瘤,是临床常见病^[24]。到目前为止缺乏有效的治疗方法,不适当的治疗方法可能会导致疾病恶化^[25]。尽管研究表明牛乳头瘤病毒(Bovine papillomavirus, BPV)是肉瘤发病机制中的关键因素^[26],但其确切的作用机理尚待阐明。在马 BPV 导致的成纤维细胞瘤模型中,有 206 个 miRNAs 的表达量与正常马成纤维细胞相比存在差异^[27]。与健康皮肤组织相比,马类肉瘤组织中有 40 个 miRNAs 上调,34 个 miRNAs 下调,其中许多 miRNA 参与了已知癌症通路。miRNA 表达量的改变在诊断人类肿瘤中得到很好的应用^[28]。因此,人们对 miRNA 在早期癌症诊断、亚型分类、预测和治疗中的潜在应用非常感兴趣,这对赛马及马术运

动中运动马疾病诊断与治疗提供了启示。如今对 miRNA 在马疾病中作用的认知仍处于初级阶段。

马肉状瘤(Equine sarcoid, ES)和鳞状细胞癌(Squamous cell carcinoma, SCC)是马最常见的 2 种皮肤肿瘤,马 24 号染色体上的 1 个 microRNA 簇中的 miRNAs 差异表达与马肉瘤和鳞状细胞癌相关^[29]。研究表明,温和型(ES mild, ESM)、激进型(ES aggressive, ESA)、眼部鳞状细胞癌(ocular SCC, oSCC)和生殖器鳞状细胞癌(genital SCC, gSCC)4 个亚群中的 miRNA 存在差异表达,在比较肿瘤组织和对照组织时,发现 ESM 中有 57 个 miRNAs, ESA 中有 6 个 miRNAs, oSCC 中有 47 个 miRNAs, gSCC 中的 miRNAs 存在差异表达,因此可以作为诊断依据的潜在生物标志物。ES 病变通常与 miR-200 家族的下调表达相关,而 miR-200 家族可能触发上皮间充质转化,使上皮细胞在某些生理或病理条件下失去上皮细胞特征并获得间充质细胞特征。ESM 病变与马 24 号染色体上肿瘤抑制 miRNA 簇的上调表达相关。相反,在 oSCC 肿瘤中,该簇下调表达,进而 miR-34 家族表达下调,这可能有利于 oSCC 肿瘤细胞的代谢^[29]。为进一步证明筛选出的 miRNA 的生物学效应,还需进一步验证,目前还没有可以提前检测出马患有肉样瘤的方法。在对健康马和患病马的对比研究中发现,有 14 个差异表达 miRNAs, 4 个 miRNAs (28.6%)上调,10 个 miRNAs (71.4%)下调,下调的 miRNAs 中,有 7 个 miRNAs 编码在马 24 号染色体上的一个 miRNA 簇中。它们的靶基因富集在病毒致癌相关信号通路上,表明马 24 号染色体上 miRNAs 的异常表达可能导致 ES^[30]。通过比较 ES 特异性血清和全血 miRNA 图谱并对表达量进行关联后分析发现,有 19 个差异表达 miRNAs。血清中 2/9 和全血中 7/19 的差异表达 miRNAs 都呈现高表达,且这些 miRNAs 靶基因会富集到癌症相关信号通路上^[31]。

气道平滑肌(Airway wall remodeling, ASM)炎症表现为平滑肌细胞的增生和肥大,导致平滑肌群增加,是哮喘的核心起因。miR-221-3p 通过抑制靶 mRNA 翻译来下调 P53、P21 和 P27 蛋白的表达,成为影响肺部炎症和修复过程的关键调节因子。miRNAs 通过调节 ASM 细胞增殖并参与了哮喘过程中 ASM 的重建^[32]。通过对比患哮喘马匹在疾病加重和缓解期间以及健康马对照组在支气管平滑肌

中 miRNAs 的表达规律,来研究它们在 ASM 细胞增殖中的作用。结果显示,马匹中 miR-26a、miR-133 和 miR-221 在 ASM 哮喘加重组与哮喘缓解组和对照组相比明显上调。还有研究表明 miR-221-3p 在不同组织中的表达量有差异^[33]。因此,利用 miR-221 进行靶向治疗可能是缓解哮喘的一种新方法^[32]。

马精外泌体(Seminal exosomes, SEs)中含少量 miRNAs^[34]。研究表明,马动脉炎病毒(Equine arteritis virus, EAV)在体内的长期持续存在与 SEs 中 eca-mir-128 的表达下调以及生殖道中 CXCL16 基因的表达上调相关,同时 CXCL16 是 eca-mir-128 的预期靶点。表明 SEs 中的 eca-mir-128 持续参与调控 CXCL16 表达,进而导致公马感染病毒。目前,病毒持续存在的分子机制正在被逐步阐明,为研发有效的治疗方法阻止此类病毒感染提供启示^[34]。

2.2 miRNA 与马运动的相关性

马的耐力训练包括生理、生化和认知-行为反应在内的一系列适应过程。马进行耐力运动期间,血液 mRNA 转录组、miRNome 和代谢组之间的关系可以进一步揭示耐力运动的分子机理,这些分子网络可能在调节马匹耐力运动的代谢和免疫反应中发挥关键作用^[35]。运动能力是马的一个重要特性,是筛选优质马的标准。虽然运动影响马体内部的分子稳态和适应性,但这些影响机制尚不明确。

研究表明,马运动后血液白细胞中 miRNAs 表达谱中有 6 个 miRNAs 发生变化,这些外周血白细胞中受运动影响的 miRNAs 有助于阐明马运动相关生理的分子机制^[36]。miRNAs 对转录和翻译过程的调控还可调节马匹对极端耐力运动的适应性。对 160 km 耐力赛前后的马血液 miRNA 表达谱进行综合分析,共鉴定了 167 个差异表达 miRNAs。其中 44 个差异表达 miRNAs 可以靶向调节总计 351 个基因,这些基因涉及不同的葡萄糖代谢、脂肪酸氧化、线粒体生物发生和免疫应答等信号途径。同时证实了 miR-21-5p、miR-181b-5p 和 miR-505-5p 是马适应耐力运动的候选调控因子。表明 miRNA-mRNA 协同调控网络可能在耐力运动中控制转录后调控中发挥关键作用^[37]。血浆中细胞外颗粒(Extracellular particles, EP)中的 miRNAs 循环存在,参与了赛马的运动和健康调节。进行耐力赛的赛马是用来研究长时间/低强度运动对血浆 EP 中

miRNAs 影响的极好模型。通过对赛马赛前赛后节点取样研究,miRNA 差异表达分析显示,比赛中及比赛后,aca-mir-486-5p 水平升高,比赛结束后,aca-mir-9083 表达水平降低。这为后续研究低强度耐力运动中运动产生的 EP miRNAs 的作用提供借鉴^[38]。同时这项研究增加了关于长距离运动后血浆 EP 浓度变化的新数据,并对在低强度耐力运动中 EP 中 miRNAs 的作用提出新的见解。

众所周知,赛马过程中机体内运动相关基因表达量会发生变化,从而激活葡萄糖代谢通路进行能量消耗。纯血马赛马运动 30 min 后血液中 eca-miR-17 和 eca-miR-33a 水平升高,说明其可能在葡萄糖代谢通路中发挥重要作用^[39]。这些 miRNAs 可下调乳酸脱氢酶和糖原合成酶的表达,在运动后的外周血中表达量有所下降^[39]。通过比较 61 匹纯血或半血阿拉伯马在 160 km 耐力赛后血液中的 miRNAs 表达水平,对马匹极端耐力运动的适应性反应进行研究发^[40]。在 167 个差异表达的 miRNAs 中,有 44 个可能参与糖代谢、脂肪酸氧化、线粒体生物过程和免疫应答通路^[40]。分别进行进一步验证后表明,eca-miR-21-5p、eca-miR-181b-5p 和 eca-miR-505-5p 可能是马耐力运动适应能力的候选 miRNAs^[40]。随后的一项研究表明,这 5 个 miRNAs(包括 miR-21-5p)可靶向 263 个基因和影响 11 种代谢产物,在马匹适应耐力运动中发挥重要作用^[41]。

通过研究阿拉伯赛马唾液中 miRNAs 的表达水平变化,可以更好地了解赛马运动比赛期间 miRNAs 调控的分子机制^[42]。唾液中包含的 miRNAs 最多,但在马的唾液中还没有 miRNAs 的相关研究。首个从马唾液中分离 miRNAs 的研究通过对差异表达 miRNAs 及其靶基因在脂质代谢通路的鉴定,进而了解阿拉伯赛马在比赛中如何进行能量供应。阿拉伯赛马有低糖原含量和高甘油三酯储存能力,这是由于他们的肌肉组织具有丰富的氧化 I 型肌纤维。因此,阿拉伯赛马可以利用更多的脂肪提供更高的能量。结果筛选到运动肌肉相关的 aca-mir-33a 及其靶基因 ABCA1、CROT、ABHD2 和 SATB2,揭示了 aca-mir-33a 及其靶基因可能在阿拉伯赛马在比赛中提供能量的脂质代谢中发挥重要作用^[42]。

2.3 miRNA 与马繁殖的相关性

人类染色体 14 microRNA 簇(Human chromosome

14 microRNA cluster, C14MC) 是存在于真兽类哺乳动物中的保守 miRNA 簇, 在胎盘发育中发挥重要作用, 该簇在哺乳动物胎盘中的表达规律和功能尚不清楚, 马的 C24MC 与其同源性很高。妊娠识别信号 (Maternal recognition of pregnancy, MRP) 用于检测怀孕, 目前母马的 MRP 还没有被识别出来。胚胎-母体之间如何互相影响的高通量分子生物学有助于分析 MRP 过程中所涉及到的信号通路, 但目前缺乏蛋白质组学、转录组学与 miRNA 表达直接关联的集成研究^[43]。通过评估马妊娠过程中 C24MC 在绒毛膜尿囊中的表达变化, 发现 C24MC 相关的 miRNAs 在妊娠早期表达水平较高, 在妊娠后期表达水平下降。此外, 通过测序分析了 C24MC 相关 miRNAs 与其预测靶点转录本表达量, 结果表明, 两者表达水平呈负相关, 推测该 miRNA 簇与这些靶点转录本相互抑制。靶点富集研究还显示, C24MC 可能在马的胎盘发育过程中调节血管生成^[44]。C24MC 还与妊娠相关, 参与胚胎、胎儿和胎盘的发育。通过研究马妊娠期母体循环中的表达谱, 分析了妊娠前、妊娠中不同阶段和产后母马的血清中 miRNA 表达谱, 在妊娠母马的血清中发现其中 4 个 miRNAs (eca-miR-1247-3p, eca-miR-134-5p, eca-miR-382-5p 和 eca-miR-433-3p) 富集, 这些 miRNAs 主要参与神经系统发育和器官发育^[45]。这些数据为今后的针对性研究提供了基础。

通过对母马卵泡液中 miRNA 水平的定量分析, 可以发现腔液与颗粒细胞组分具有相似性, 证明腔液 miRNA 指标可代表卵泡^[46]。研究还发现, 卵泡液 miRNA 表达谱随母马年龄的变化而变化^[46]。一些 miRNAs 表达量与卵巢卵泡发育的不同阶段有关, miRNAs 在参与卵泡的分选、促成熟和排卵, 同时调节其存活和分化的过程中表达量均有变化^[47]。此外, 已经有报道马的排卵卵泡和无排卵卵泡之间 miRNAs 存在表达差异, 母马季节性停止排卵与卵泡中 miRNAs 表达量增加存在着某些生理联系^[48]。这些结果的意义尚不清楚, 但抽取母马卵泡液进行 miRNA 分析可以帮助分析其不孕的原因。

研究表明, miRNAs 对睾丸发育和精子生成至关重要^[49]。对从种公马附睾不同区域分离出来的精子中 miRNAs 表达量进行鉴定, 得到 23 个 miRNAs 在不同区域表达水平存在差异, 提示 miRNA 可能参与精子成熟过程^[50]。对蒙古马未成

熟和成熟睾丸进行 RNA 测序分析, 鉴定出了 531 个成熟 miRNAs, 其中包括 46 个新的 miRNAs, 这些 miRNAs 之前都没有明确的功能。在 531 个 miRNAs 中, 421 个在未成熟和成熟的 miRNA 文库中均有表达, 65 个单独在未成熟的睾丸文库中, 45 个单独在成熟的睾丸文库中^[51]。这些差异表达的 miRNAs 在睾丸发育和精子发生中起重要作用。这些发现确定了 miRNAs 调控在蒙古马睾丸发育和精子发生中起关键作用, 有助于对哺乳动物生育机制的理解。

3 miRNA 在马中应用的未来趋势

3.1 miRNA 用于马外科手术

外科手术中, 无创 miRNA 治疗方案备受青睐, 可以最大程度上减小患者的治疗创面, 也利于术后恢复, 但目前 miRNA 治疗手段并不成熟, 因而用于临床的案例较少。赛马是历史最悠久的运动之一, 赛马运动决定了马匹健康方面常出现的疾病集中在骨骼、肌肉和蹄部, 无创 miRNA 治疗方案实施起来较简便, 对马匹伤害最小, 并且起效快, 具可操作性。

在对健康马驹软骨和软骨下骨质中 miRNAs 的表达与患有软骨和骨合并软骨症的马驹比较可以看出, miRNA 表达量在马驹正常骨、软骨和异常骨、试验中载荷作用下的软骨中均有差异^[52]。这表明在病理生理学中, miRNA 对软骨病有很重要的作用, 同时影响着软骨和骨对生物压力的应激反应^[52]。eca-miR-140 在正常马关节软骨中高表达, 被鉴定为软骨特异性 miRNA; 此外, 马脐带血来源间充质细胞在软骨分化 14 d 后 eca-miR-140 上调表达^[53]。在这些细胞中, miR-140 的表达模式与软骨特异性转录因子 *sox9* 十分相似, 表明 miR-140 可能受 *sox9* 的调控^[53]。还有研究比较了患蹄叶炎马与健康马间的 miRNAs 水平, 发现 3 个 miRNAs (eca-miR-23b-3p, miR-145-5p 和 miR-200b-3p) 在治疗前表达量增加, 而治疗后 miR-200b-3p 表达量降低^[54]。此外, eca-miR-145-5p 和 eca-miR-200b-3p 表达在蹄叶炎急性发作疼痛马和健康对照组马中表达量也不同^[54]。

在胶原酶诱导的马肌腱病变模型中 eca-miR-29a 下调表达是病变过程中胶原蛋白 3 (Col3) 过量表达导致^[55]。同样, 人 hsa-miR-29a 在肌腱疾病中与 IL33 介导的组织重建和 Col3 表达量增加有关^[56]。这表明, 将 miR-29a 重新导入受损肌腱是一种可行

的新治疗方案^[56]。有针对于 miRNA 表达水平在马匹糖原累积性肌病 (Polysaccharide storage myopathy, PSSM) 和反复劳损性横纹肌溶解综合征 (Recurrent exertional rhabdomyolysis, RER) 的对比性研究, 结果显示, miRNAs 表达量在患病马与对照马及患 PSSM 马与患 RER 马之间均有差异^[57]。在 RER 中检测到 eca-miR-23a、miR-30b、miR-133、miR-195 和 miR-339 表达量增加, 而在 PSSM 中检测到 eca-miR-193 表达量增加。此外, eca-miR-181、eca-miR-188 和 eca-miR-206 表达量在 French Trotters 和 Norman Cobs 马品种之间存在差异^[57]。肌腱损伤在运动员和赛马中非常常见, 是胶原基质紊乱导致的肌腱损伤。在小鼠和人类肌腱损伤中 miR29a 转录后调节表达 III 型胶原蛋白。在肌腱病变马匹采用局部注射 miR29a 或类似物安慰剂治疗。治疗后在第 2 周 III 型胶原转录水平降低, 而 I 型胶原没有显著变化。与对照组相比, miR29a 治疗后的肌腱相对损伤横断面积明显降低。这些数据支持了 miRNAs 可介导促进损伤后肌腱组织重塑的早期病理生理调节机制, 证实 miR-29a 治疗可促进肌腱愈合^[58]。

3.2 miRNA 在马疾病诊断中的潜在应用

自从 miRNAs 在疾病中基因表达的负调控功能被证实, 学者们就在不断研究其在疾病诊断中的潜在应用, 但由于过程复杂, 应用起来较为困难。miRNA 生物标志物位于调控的上游, 容易在早期诊断出来。同时, 在细针穿刺抽吸物、血液以及唾液和尿液等体液中均发现了高浓度的 miRNAs, 容易检测出来。并且 miRNAs 非常稳定, 不易降解, 为随时检测提供了可能性。

血清中的 miRNAs 在高温煮沸、极端 pH 和冻融条件下具有耐受性, 在储存 10 年的标本中仍可检测到^[59]。人类血清或血浆中 miRNome 的改变与癌症等疾病有关, 虽然血浆中与病变相关的 microRNA 表达谱会受到所含血小板的干扰^[60], 但仍可用于早期诊断, 甚至帮助检测癌变^[61]。与肿瘤极其相关的 miRNA 在福尔马林固定的石蜡组织标本中表达量仍具有稳定性^[62], 这是诊断中提取的最常见的组织活检标本。这些标志物在治疗马癌症检测中可以起到一定的借鉴。某些 miRNAs 已证实可在组织中特异表达, 例如马血浆^[63], 这可能会增加未来 miRNAs 在诊断中潜在应用的可能性。相同 miRNA 在不同品种间的表达也存在差异, 根据

在矮种马和温血马血清中检测到的差异 miRNAs, 有 50 个 miRNAs 可作为潜在的种特异性生物标记^[64]。值得关注的是, 全血中表达的 miRNAs 仅有 33% 可在血清中检测到^[64], 说明全血中检测到的大部分 miRNAs 并没有被运输到细胞外, 这一发现值得进行深入研究。

亨德拉病毒 (Hendra virus, HeV) 通过蝙蝠传播, 是一种新型人畜共患病原体, 可导致人类和其他哺乳动物产生致命疾病。迄今为止, 人类戊型肝炎病例大多是由于接触了已经感染 HeV 的马所致, 人类 HeV 病的所有病例都是由于与受感染马密切接触而导致的, 病毒传播是由于接触受感染马的分泌物、血液、唾液或尿液而引起的。受感染的马在分泌物中检测到病毒基因组后才会表现出疾病症状 (例如心率升高、体温升高), 马在潜伏期后期和临床发病后都有传播风险^[65]。目前, 对马急性 HeV 感染的诊断还依赖于感染初始阶段可能发生的病毒脱落, 这样的方式发现时间较晚, 如果可以尽早确诊并隔离患病马匹, 可大幅降低人畜共患病毒传播的风险。在运用常规手段确诊病毒之前就开始进行检测, HeV 感染的马匹血液中 miR-146a 会上调, 说明测量宿主 miRNAs 表达水平可能有助于及早进行感染性疾病的诊断^[65]。miR-181 可促进 HeV 感染, 感染主要是通过 miR-181 抑制 EPHB4 (EPH receptor B4) 蛋白表达, 最终增强了 HeV 病毒与宿主细胞间的膜融合。因而调控 miR-181 表达进而抑制病毒融合, 抑制感染可能是未来抗病毒治疗的有效方案^[66]。

3.3 miRNA 在马疾病治疗中的潜在应用

miRNAs 在许多细胞过程中通过转录后调控调节基因表达来发挥关键作用, 从而利用 miRNAs 的这一特性来抑制疾病的发生和发展是一种可行的治疗方案。从理论的角度看, miRNA 可使诱发疾病的相关靶点 mRNA 降解或翻译过程受到抑制, 而 miRNA 抑制剂 anti-miRs 则可与成熟 miRNA 序列互补结合, 从而降低过表达 miRNA 的活性, 这种调控与整个疾病过程息息相关^[67-68]。但目前使用 miRNA 进行靶向治疗面临重大挑战, 无法保证足够数量的治疗药物特异性递送到目标组织, 因为这些 RNA 分子可能受体内血清核酸酶降解和内吞作用的影响。

miRNA 被抑制的方式可分为 3 种, 其中前 2 种方式均以 mRNA 充当诱饵, 减少 miRNA 与靶

mRNA 相互作用的数量;而第 3 种方法则为一段寡核苷酸序列占据了靶 mRNA 与 miRNA 的结合位点,屏蔽了 miRNA 与靶 mRNA 的相互作用^[68]。当 miRNA 基因表达下调有助于疾病发展时,通过设计合成 miR-mimics 可与内源性受抑制的 miRNA 的靶 mRNA 结合来模拟发挥同样的作用^[68]。一些化学物质也会改变 miRNome 的表达^[69],反之,miRNA 也会改变细胞对药物治疗的敏感性^[70]。同时调节多个 miRNA 可能比靶向单个 miRNA 更有效^[71]。然而,由于 miRNA 可能靶向不同途径中涉及的多个 mRNA,因此在临床应用前应仔细检测选择治疗方案中的 miRNA,可预防有害“靶外效应”。

针对 miRNA 靶向治疗的相关研究表明,通过化学修饰法合成的 RNA 稳定性有所提高^[72],后续逐步研发出的胶囊缓释方法^[73-74],使得少量基于 miRNA 的治疗方法得以进行临床试验。在成功进行临床研究后,制药公司正在针对丙肝感染病例进行 II 期 anti-miRs 试验,利用 miR-122 结合丙肝病毒 RNA 基因组,使其降解无法继续进行感染^[75]。在 miR-155 依赖型淋巴瘤和非小细胞肺癌的小鼠模型中正在进行的 I 期试验分别通过 anti-miR-155 和 miR-16 类似物减轻肿瘤症状^[76]。而通过 miR-29 类似物治疗一类硬皮病的方法也正在进行 I 期试验中,miR-29 在成纤维细胞中下调表达导致胶原 COL1A1 和 COL3A1 的表达上调,最后致使蛋白纤维化^[77]。胰岛素抗肥胖小鼠模型的临床前研究证实了 anti-miR 如何沉默 miR-103/107 表达对胰岛素敏感性产生作用^[78],进而推广运用 anti-miR 降低胰岛素敏感性 II 型糖尿病患者发展为非酒精脂肪肝类疾病的几率。这些治疗方案不断完善,可为将来马疾病 miRNA 治疗方案提供参考。

4 结 语

miRNA 通过转录后调控基因表达,在多种细胞过程中发挥关键作用。特异性 miRNA 的失调与疾病的发生发展有关,因而监测或调节 miRNA 在多种疾病中的表达对人类医学临床诊断、预测和治疗非常重要,是一个具有研究价值的领域。随着我国马科学研究的深入及马产业发展的壮大,miRNA 在马体内的表达分析也必将成为一个非常活跃的研究领域,随着对 miRNA 在马健康和疾病机制了解的增加,miRNA 在马中的应用也会相应增加。临床诊断样本中的 miRNA 有很好的稳定性,在不同

疾病间存在特异性,以及进行无创取样时有很大优势,意味着使用单个动物的 miRNA 图谱来进行疾病诊断是一个非常有趣的新概念。目前 miRNA 用于治疗人类疾病已发展到临床试验阶段,利用 miRNA 靶向治疗马疾病也在不断探索中。

参考文献 References

- [1] Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(2): 99-110
- [2] Friedman R C, Farh K K H, Burge C B, Bartel D P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Research*, 2009, 19(1): 92-105
- [3] Baek D, Villén J, Shin C, Camargo F D, Gygi S P, Bartel D P. The impact of microRNAs on protein output[J]. *Nature*, 2008, 455(7209): 64-71
- [4] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease[J]. *Physiological Reviews*, 2011, 91(3): 827-887
- [5] Lim L P, Glasner M E, Yekta S, Burge C B, Bartel D P. Vertebrate microRNA genes[J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1540
- [6] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J L, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units[J]. *Genome Research*, 2004, 14(10): 1902-1910
- [7] Lee Y, Jeon K, Lee J T, Kim S, Kim V N. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization [J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(17): 4663-4670
- [8] Lee Y, Ahn C, Han J J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Narry Kim V N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-419
- [9] Yi R, Qin Y, Macara I G, Cullen B R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs [J]. *Genes & Development*, 2003, 17(24): 3011-3016
- [10] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli A E, Bálint E, Tuschl T, Zamore P D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA[J]. *Science*, 2001, 293(5531): 834-838
- [11] Höck J, Meister G. The Argonaute protein family[J]. *Genome Biology*, 2008, 9(2): 210
- [12] Chen X, Liang H W, Zhang J F, Zen K, Zhang C Y. Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication[J]. *Trends in Cell Biology*, 2012, 22(3): 125-132
- [13] Vickers K C, Palmisano B T, Shoucri B M, Shamburek R D, Remaley A T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(4): 423-433
- [14] Hata T, Murakami K, Nakatani H, Yamamoto Y, Matsuda

- T, Aoki N. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 396(2): 528-533
- [15] Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill C L, Medina R J, Simpson D A. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 357
- [16] Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González M Á, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 282
- [17] Turchinovich A, Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma [J]. *RNA Biology*, 2012, 9(8): 1066-1075
- [18] Miller K J, Brown D A, Ibrahim M M, Ramchal T D, Levinson H. microRNAs in skin tissue engineering [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 88: 16-36
- [19] Saunders M A, Liang H, Li W H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites[J]. *PNAS*, 2007, 104(9): 3300-3305
- [20] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20
- [21] Lee C T, Risom T, Strauss W M. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: An examination of MicroRNA gene complexity and conserved MicroRNA-target interactions through metazoan phylogeny[J]. *DNA and Cell Biology*, 2007, 26(4): 209-218
- [22] Artzi S, Kiezun A, Shomron N. miRNAMiner: A tool for homologous microRNA gene search[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1): 1-7
- [23] Syed S N, Frank A C, Raue R, Brüne B. MicroRNA—A tumor Trojan horse for tumor-associated macrophages [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1482
- [24] Pollard D, Wylie C E, Newton J R, Verheyen K L P. Factors associated with euthanasia in horses and ponies enrolled in a laminitis cohort study in Great Britain [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 174: 104833
- [25] Knottenbelt D C, Kelly D F. The diagnosis and treatment of periorbital sarcoid in the horse: 445 cases from 1974 to 1999 [J]. *Veterinary Ophthalmology*, 2000, 3(2-3): 169-191
- [26] Olson C, Cook R H. Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine Papilloma [J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*, 1951, 77(2): 281-284
- [27] Terron-Canedo N, Weir W, Nicolson L, Britton C, Nasir L. Differential expression of microRNAs in bovine papillomavirus type 1 transformed equine cells [J]. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2017, 15(3): 764-774
- [28] Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs: microRNAs with a role in cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(4): 259-269
- [29] Bogedale K, Jagannathan V, Gerber V, Unger L. Differentially expressed microRNAs, including a large microRNA cluster on chromosome 24, are associated with equine sarcoid and squamous cell carcinoma[J]. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2019, 17(2): 155-164
- [30] Unger L, Jagannathan V, Pacholewska A, Leeb T, Gerber V. Differences in miRNA differential expression in whole blood between horses with sarcoid regression and progression [J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2019, 33(1): 241-250
- [31] Unger L, Gerber V, Pacholewska A, Leeb T, Jagannathan V. MicroRNA fingerprints in serum and whole blood of sarcoid-affected horses as potential non-invasive diagnostic biomarkers[J]. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2019, 17(1): 107-117
- [32] Issouf M, Vargas A, Boivin R, Lavoie J P. MicroRNA-221 is overexpressed in the equine asthmatic airway smooth muscle and modulates smooth muscle cell proliferation[J]. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2019, 317(6): L748-L757
- [33] Kim S W, Jo A, Im J, Lee H E, Kim H S. Expression analysis of miR-221-3p and its target genes in horses[J]. *Genes & Genomics*, 2019, 41(4): 459-465
- [34] Carossino M, Dini P, Kalbfleisch T S, Loynachan A T, Canisso I F, Shuck K M, Timoney P J, Cook R F, Balasuriya U B R. Downregulation of microRNA eca-mir-128 in seminal exosomes and enhanced expression of excl16 in the stallion reproductive tract are associated with long-term persistence of equine arteritis virus[J]. *Journal of virology*, 2018, 92(9): 11-12
- [35] Mach N, Ramayo-Caldas Y, Clark A, Moroldo M, Robert C, Barrey E, López J M, Le Moyec L. Understanding the response to endurance exercise using a systems biology approach: Combining blood metabolomics, transcriptomics and miRNomics in horses[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 187
- [36] Kim H A, Kim M C, Kim N Y, Ryu D Y, Lee H S, Kim Y. Integrated analysis of microRNA and mRNA expressions in peripheral blood leukocytes of Warmblood horses before and after exercise[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2018, 19(1): 99-106
- [37] Mach N, Placade S, Pacholewska A, Lecardonnel J, Rivière J, Moroldo M, Vaiman A, Morgenthaler C, Beinat M, Nevot A, Robert C, Barrey E. Integrated mRNA and miRNA expression profiling in blood reveals candidate biomarkers associated with endurance exercise in the horse[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22932
- [38] Oliveira G P Jr, Porto W F, Palu C C, Pereira L M, Reis A M

- M, Marçola T G, Teixeira-Neto A R, Franco O L, Pereira R W. Effects of endurance racing on horse plasma extracellular particle miRNA[J]. *Equine Veterinary Journal*, 2021, 53(3): 618-627
- [39] Gim J A, Ayarpadikannan S, Eo J, Kwon Y J, Choi Y, Lee H K, Park K D, Yang Y M, Cho B W, Kim H S. Transcriptional expression changes of glucose metabolism genes after exercise in thoroughbred horses[J]. *Gene*, 2014, 547(1): 152-158
- [40] Mach N, Plancade S, Pacholewska A, Lecardonnel J, Rivière J, Moroldo M, Vaiman A, Morgenthaler C, Beinat M, Nevot A, Robert C, Barrey E. Integrated mRNA and miRNA expression profiling in blood reveals candidate biomarkers associated with endurance exercise in the horse[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22932
- [41] Mach N, Ramayo-Caldas Y, Clark A, Moroldo M, Robert C, Barrey E, López J M, Le Moyec L. Understanding the response to endurance exercise using a systems biology approach: Combining blood metabolomics, transcriptomics and miRNomics in horses[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 187
- [42] Ekici S, Ozmen O. Affecting lipid metabolism salivary MicroRNAs expressions in Arabian racehorses before and after the race[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2020, 93: 103218
- [43] Smits K, Gansemans Y, Tilleman L, van Nieuwerburgh F, van de Velde M, Gerits I, Ververs C, Roels K, Govaere J, Peelman L, Deforce D, van Soom A. Maternal recognition of pregnancy in the horse: Are MicroRNAs the secret messengers[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2): 419
- [44] Dini P Y, Daels P, Loux S C, Esteller-Vico A, Carossino M, Scoggin K E, Ball B A. Kinetics of the chromosome 14 microRNA cluster ortholog and its potential role during placental development in the pregnant mare [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 1-21
- [45] Dini P Y, El-Sheikh Ali H, Carossino M, Loux S C, Esteller-Vico A, Scoggin K E, Daels P, Ball B A. Expression profile of the chromosome 14 MicroRNA cluster (C14MC) ortholog in equine maternal circulation throughout pregnancy and its potential implications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(24): 6285
- [46] da Silveira J C, Veeramachaneni D N R, Winger Q A, Carnevale E M, Bouma G J. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle[J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 86(3): 71, 1-10
- [47] Schauer S N, Sontakke S D, Watson E D, Esteves C L, Donadeu F X. Involvement of miRNAs in equine follicle development [J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2013, 146(3): 273-282
- [48] Donadeu F X, Schauer S N. Differential miRNA expression between equine ovulatory and anovulatory follicles [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2013, 45(3): 122-125
- [49] Li B, He X L, Zhao Y P, Bai D Y, Du M, Song L J, Liu Z, Yin Z C, Manglai D. Transcriptome profiling of developing testes and spermatogenesis in the Mongolian horse[J]. *BMC Genetics*, 2020, 21(1): 46
- [50] Twenter H M, Klohonatz K M, Bass L D, Bouma G J, Bruemmer J E. MicroRNA expression in regions of stallion epididymal spermatozoa [J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2016, 43: S62-S63
- [51] Li B, He X L, Zhao Y P, Bai D Y, Li D D, Zhou Z Y, Manglai D. Analysis of the miRNA transcriptome during testicular development and spermatogenesis of the Mongolian horse[J]. *Reproduction, Fertility, and Development*, 2020, 32(6): 582-593
- [52] Desjardin C, Vaiman A, Mata X, Legendre R, Laubier J, Kennedy S P, Laloe D, Barrey E, Jacques C, Cribiu E P, Schibler L. Next-generation sequencing identifies equine cartilage and subchondral bone miRNAs and suggests their involvement in osteochondrosis physiopathology [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 798
- [53] Buechli M E, Lamarre J, Koch T G. MicroRNA-140 expression during chondrogenic differentiation of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Stem Cells and Development*, 2013, 22(8): 1288-1296
- [54] Lecchi C, Dalla Costa E, Lebelt D, Ferrante V, Canali E, Ceciliani F, Stucke D, Minero M. Circulating miR-23b-3p, miR-145-5p and miR-200b-3p are potential biomarkers to monitor acute pain associated with laminitis in horses [J]. *Animal*, 2018, 12(2): 366-375
- [55] Millar N L, Watts A E, Akbar M, Hughes T, Kitson S, Gilchrist D S. MicroRNA-29a in equine tendinopathy- A translational target[J]. *Equine Veterinary Journal*, 2016, 48: 27
- [56] Millar N L, Gilchrist D S, Akbar M, Reilly J H, Kerr S C, Campbell A L, Murrell G A C, Liew F Y, Kurowska-Stolarska M, McInnes I B. MicroRNA29a regulates IL-33-mediated tissue remodelling in tendon disease [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6774
- [57] Barrey E, Bonnamy B, Barrey E J, Mata X, Chaffaux S, Guerin G. Muscular microRNA expressions in healthy and myopathic horses suffering from polysaccharide storage myopathy or recurrent exertional rhabdomyolysis[J]. *Equine Veterinary Journal*, 2010(S38): 303-310
- [58] Watts A E, Millar N L, Platt J, Kitson S M, Akbar M, Rech R, Griffin J, Pool R, Hughes T, McInnes I B, Gilchrist D S. MicroRNA29a treatment improves early tendon injury [J]. *Molecular therapy*, 2017, 25(10): 2415-2426
- [59] Zhu W Z, Qin W Y, Atasoy U, Sauter E R. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects[J]. *BMC Research Notes*, 2009, 2(1): 1-5

- [60] Wang K, Yuan Y, Cho J H, McClarty S, Baxter D, Galas D J. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41561
- [61] Wang F, Ying H Q, He B S, Pan Y Q, Sun H L, Wang S K. Circulating miR-148/152 family as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumour Biology*, 2016, 37(4): 4945-4953
- [62] Kakimoto Y, Kamiguchi H, Ochiai E, Satoh F, Osawa M. MicroRNA stability in postmortem FFPE tissues: Quantitative analysis using autoptic samples from acute myocardial infarction patients[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129338
- [63] Lee S, Hwang S, Yu H J, Oh D, Choi Y J, Kim M C, Kim Y, Ryu D Y. Expression of microRNAs in horse plasma and their characteristic nucleotide composition [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146374 DOI: 10.1371/journal.pone.0146374
- [64] Pacholewska A, Mach N, Mata X, Vaiman A, Schibler L, Barrey E, Gerber V. Novel equine tissue miRNAs and breed-related miRNA expressed in serum[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 831
- [65] Cowled C, Foo C H, Deffrasnes C, Rootes C L, Williams D T, Middleton D, Wang L F, Bean A G D, Stewart C R. Circulating microRNA profiles of Hendra virus infection in horses[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 7431
- [66] Foo C H, Rootes C L, Cowley K, Marsh G A, Gould C M, Deffrasnes C, Cowled C J, Klein R, Riddell S J, Middleton D, Simpson K J, Wang L F, Bean A G, Stewart C R. Dual microRNA screens reveal that the immune-responsive miR-181 promotes *Henipavirus* entry and cell-cell fusion [J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(10): e1005974
- [67] Galasso M, Sana M E, Volinia S. Non-coding RNAs: A key to future personalized molecular therapy [J]. *Genome Medicine*, 2010, 2(2):12
- [68] Bronze-Da-rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases [J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 985408
- [69] Scott G K, Mattie M D, Berger C E, Benz S C, Benz C C. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(3): 1277-1281
- [70] Meng F Y, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob S T, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(2): 647-658
- [71] Melo S A, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire [J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(13): 2087-2099
- [72] Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjörn M, Hansen H F, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup E M, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human Primates [J]. *Nature*, 2008, 452(7189): 896-899
- [73] Akhtar S, Benter I F. Nonviral delivery of synthetic siRNAs *in vivo* [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(12): 3623-3632
- [74] MacDiarmid J A, Mugridge N B, Weiss J C, Phillips L, Burn A L, Paulin R P, Haasdyk J E, Dickson K A, Brahmabhatt V N, Pattison S T, James A C, Al Bakri G, Straw R C, Stillman B, Graham R M, Brahmabhatt H. Bacterially derived 400 nm particles for encapsulation and cancer cell targeting of chemotherapeutics [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(5): 431-445
- [75] Elmén J, Lindow M, Silahatoglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, Hedtjörn M, Hansen J B, Hansen H F, Straarup E M, McCullagh K, Kearney P, Kauppinen S. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered INA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(4): 1153-1162
- [76] Babar I A, Cheng C J, Booth C J, Liang X, Weidhaas J B, Saltzman W M, Slack F J. Nanoparticle-based therapy in an *in vivo* microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma [J]. *PNAS*, 2012, 109(26): E1695-E1704 DOI: 10.1073/pnas.1201516109
- [77] Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay R E, Michel B A, Distler J H, Gay S, Distler O. microRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis [J]. *Arthritis and rheumatism*, 2010, 62(6): 1733-1743
- [78] Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim M H, Stoffel M. microRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity [J]. *Nature*, 2011, 474(7353): 649-653