

文章编号 1006-8147(2022)03-0235-07

论著

心肌缺血预适应大鼠循环血微囊泡中 miRNAs 表达谱分析

赵俊玉, 祝倩, 尚曼, 李烨仪, 刘森, 王艺璐, 吴艳娜, 刘艳霞, 宋君秋
(天津医科大学基础医学院药理学系, 天津 300070)

摘要 目的: 分离提取心肌缺血预适应(IPC)模型大鼠循环血中的细胞微囊泡(MVs), 探究 IPC 处理对循环血 MVs 中 microRNAs (miRNAs) 表达的影响。方法: 健康雄性 Wistar 大鼠 8 只, 随机分为 IPC-MVs 组和假手术对照(Sham-MVs)组, 每组 4 只。建立大鼠心肌 IPC 模型, 提取循环血 IPC-MVs, 采用 Microarray 分析两组循环血 MVs 中的 miRNAs, 利用生物信息学进行靶基因预测及功能分析。结果: 与 Sham-MVs 组比较, IPC-MVs 组中循环血差异表达显著上调的 miRNAs 共 3 个($P < 0.01$, $FER < 0.05$): miR-1-3p、miR-133a-3p 和 miR-133b-3p($t = 3.194, 3.002, 3.389$, 均 $P < 0.05$)。基因本体研究会数据库(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析显示, 这些 miRNAs 可能通过调节心肌细胞中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和 Ras 信号通路, 发挥抗心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的保护作用, 可能参与调控的核心靶基因包括 Ntrk2、Igf1、Gnai3 和 Bcl2l1。结论: IPC 处理可使大鼠循环血 MVs 中 miR-1-3p、miR-133a-3p 和 miR-133b-3p 表达显著上调。

关键词 微囊泡; 缺血预适应; miRNAs; 差异表达

中图分类号 R54

文献标志码 A

Expression profiling of circulating microvesicles miRNAs derived from myocardial ischemic preconditioning in rats

ZHAO Jun-yu, ZHU Qian, SHANG Man, LI Ye-yi, LIU Miao, WANG Yi-lu, WU Yan-na, LIU Yan-xia, SONG Jun-qiu
(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To isolate and extract the cellular microvesicles (MVs) derived from the circulating blood of myocardial ischemic preconditioning (IPC) in rats, and analyze the effect of IPC treatment on microRNA (miRNAs) expression in circulating MVs.

Methods: Eight healthy male Wistar rats were randomly divided into IPC-MVs group and sham-MVs group, with 4 rats in each group. IPC model was established in rats, IPC-MVs were isolated by ultracentrifugation from the peripheral blood. The miRNAs in the two groups of circulating MVs were analyzed using Microarray, then target genes were predicted and functional analysis was performed through bioinformatics. **Results:** There were 3 miRNAs up-regulated significantly in IPC-MVs compared with Sham-MVs ($P < 0.01$, $FER < 0.05$): miR-1-3p, miR-133a-3p and miR-133b-3p ($t = 3.194, 3.002, 3.389$, all $P < 0.05$). Gene Ontology Research Association Database (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis showed that these miRNAs might play a protective role against myocardial ischemia / reperfusion (I/R) injury by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and Ras signaling pathway in cardiomyocytes. The core target genes that may be involved in the regulation including Ntrk2, Igf1, Gnai3 and Bcl2l1.

Conclusion: The expressions of miR-1-3p, miR-133a-3p and miR-133b-3p in circulating MVs are upregulated significantly when treated with IPC in rats.

Key words microvesicles; ischemic preconditioning; miRNAs; differential expression

心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是导致缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)患者心肌组织损伤加重的主要原因, 缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)被认为是减轻心肌 I/R 损伤的一种有效治疗策略^[1]。研究发现, IPC 能够诱导损伤的心脏细胞释放细胞微囊泡(microvesicles, 基金项目 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20110106); 高校博士学科专项科研基金(2010120211005); 天津市自然科学基金(11JCZDJC18300)

作者简介 赵俊玉(1992-), 女, 药师, 硕士在读, 研究方向: 心血管药理学; 通信作者: 宋君秋, E-mail: songjunqiu@tmu.edu.cn。

MVs)和外泌体等细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs), 介导 IPC 抗心肌 I/R 损伤的心脏保护作用^[2]。MVs 是细胞受到组织缺氧、氧化损伤等外来刺激后, 以出芽的方式从质膜脱落后形成的具有脂质双分子层结构的囊泡, 直径 100~1 000 nm, 主要通过携带蛋白质、细胞因子、RNAs 和 microRNAs (miRNAs) 等物质到靶细胞, 发挥细胞间通讯的作用^[3]。研究表明, 循环血中的 miRNAs 主要富集在 MVs 等 EVs 中, 而 MVs 作为载体运输 miRNAs 时, 不仅可以促进 miRNAs 在细胞间的信息传递, 而且可以保

护 miRNAs 免受细胞外 RNA 酶的降解,提高 miRNAs 的稳定性^[4]。前期研究已经证明缺血预适应循环血中 MVs(IPC-MVs)可能通过抑制心肌细胞内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)信号通路,发挥抗心肌 I/R 损伤的保护作用^[5]。但在基因水平上,IPC-MVs 抗心肌 I/R 损伤的作用机制还未完全阐明。本研究利用 Microarray 分析 IPC-MVs 中含有的 miRNAs,并利用生物信息学分析并筛选核心靶基因,拟从 miRNAs 水平初步探讨 IPC 抗心肌 I/R 损伤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:健康雄性 Wistar 大鼠,8~10 周,体重(230±12)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[批号:11400700316046,生产许可证号:SCXK(京)2016-0006]。实验试剂:枸橼酸钠(天津市光复科技发展有限公司),Gene Expression Wash Pack(Agilent),miRNA complete Labeling and Hyb Kit(24×)(Agilent)。仪器:BL-420E 生物功能实验系统及 HX-100E 型小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司),Optima L-100XP 制备型超速离心机(Beckman Coulter),HT 7700 透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM,HITACHI 公司),杂交炉(Agilent G2545A),PCR 仪(ABI 9700)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌 IPC 模型的建立 采用简单随机抽样方法将大鼠随机分为两组:Sham-MVs 组和 IPC-MVs 组,每组 4 只,麻醉后取仰卧位固定,连接心电图仪,颈动脉插管监测平均动脉压(MAP),而后行开胸处理。(1) Sham-MVs 组:于冠状动脉左前降支(LAD)下穿线后旷置 45 min,立即自腹主动脉取血。(2) IPC-MVs 组:LAD 下穿线后稳定 15 min,再行缺血 5 min/再灌注 5 min 的处理,循环 3 次后立即自腹主动脉取血。

1.2.2 循环血中 MVs 的提取及形态鉴定 上述两组血液样本经枸橼酸钠抗凝,室温条件下,采用两步离心法收集无血小板血浆(platelet-free plasma,PFP):2 600×g 离心 15 min;取上清,10 000×g 离心 5 min。将 PFP 置于超速离心管中,4℃,100 000×g 离心 148 min,弃去上清,获得沉淀即为 MVs。用无菌生理盐水重悬沉淀,BCA 法测定蛋白质浓度;分装,-80℃冷冻保存。采用 TEM 对 MVs 进行形态学鉴定。

1.2.3 MVs 中总 RNA 的提取与纯化 采用 miRNeasy kit(Qiagen,German),参照说明书标准操作流程提取 MVs 中总 RNA,利用 NanoDrop ND-2000(Thermo Scientific)定量,通过 Agilent Bioana-

lyzer 2100(Agilent Technologies)检测 RNA 完整性。

1.2.4 miRNAs 芯片分析 采用 Agilent Rat miRNAs,Release 21.0(8*15K,Design ID:070154)芯片进行实验。具体操作如下:分别取两组总 RNA 100 ng,定容至 2 μL,去磷酸化后,加入 DMSO 使其变性,随后用 Cyanine-3-CTP(Cy3)进行荧光标记,RNA 纯化后和芯片杂交,55℃,20 r/min,滚动杂交 20 h。杂交完成后在洗缸中洗脱。利用 Agilent Scanner G2505C(Agilent Technologies)进行图像扫描,获得芯片结果。

芯片结果分析:采用 Feature Extraction 软件(version10.7.1.1,Agilent Technologies)处理原始图像提取原始数据。Genespring 软件(version14.8,Agilent Technologies)进行 quantile 标准化和差异 miRNAs 筛选,上调或者下调倍数变化值(FC)绝对值≥2.0 且 $P \leq 0.05$ 纳入标准。

1.2.5 荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证差异表达的 miRNAs 采用 qRT-PCR 技术验证芯片检测结果的可靠性。使用 miScript 逆转录酶试剂盒(Qiagen,Germany)进行逆转录,使用 QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit(Qiagen)对 miRNAs 进行定量。PCR 扩增条件:95℃变性 10 min,95℃变性 10 s,60℃退火 20 s,72℃延伸 15 s,30~45 个循环。每个样品重复 3 次。以 U6 作为内参,采用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行相对分析。

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{Target miRNAs}} - Ct_{U6}) \text{ IPC-MVs} - (Ct_{\text{Target miRNAs}} - Ct_{U6}) \text{ Sham-MVs}。$$

1.2.6 差异表达 miRNAs 的生物信息学分析 通过 TargetScan,miRWalk 和 microRNA.org 数据库预测差异表达 miRNAs 的潜在靶基因,利用 Cytoscape 软件(version3.1.1)建立 miRNA-mRNA 调控网络图,分析差异表达 miRNAs 与潜在靶 mRNA 之间的关系。通过 DAVID 网站对差异表达 miRNAs 的潜在靶基因进行基因本体研究会数据库(GO)、生物学过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)分析和 KEGG 富集分析,预测差异表达 miRNAs 主要影响的生物学功能或通路。

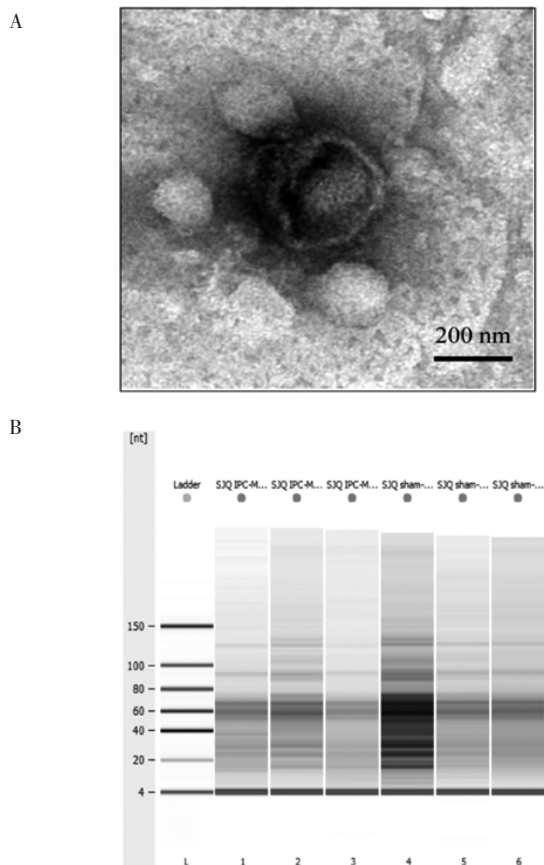
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.00 进行统计学分析,符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IPC-MVs 的形态学鉴定及 RNA 含量分析 通过低温超速离心法可在大鼠循环血中成功提取得到 IPC-MVs。负染法处理 IPC-MVs 后,于 TEM 下观察,IPC-MVs 呈圆形或椭圆形的膜性结构,平均直径 100~1 000 nm,其内容物中未见明显的细胞器结

构(图 1A)。

RNA 定量结果显示,IPC-MVs 组中含有的总 RNA 浓度为 $(1.13 \pm 0.06) \text{ g/L}$,其中 miRNAs 的含量占其总 RNA 的 $(57.00 \pm 4.24) \%$,Sham-MVs 组中含有的总 RNA 浓度为 $(1.88 \pm 1.00) \text{ g/L}$,miRNAs 的含量占总 RNA 的 $(53.00 \pm 2.05) \%$ (图 1B)。



注:A:TEM 下 IPC-MVs 的结构(负染法,×6.0 K);B:各样本 RNA 含量(1,2,3: IPC-MVs;4,5,6: Sham-MVs);IPC:缺血预适应;MV:细胞微囊泡

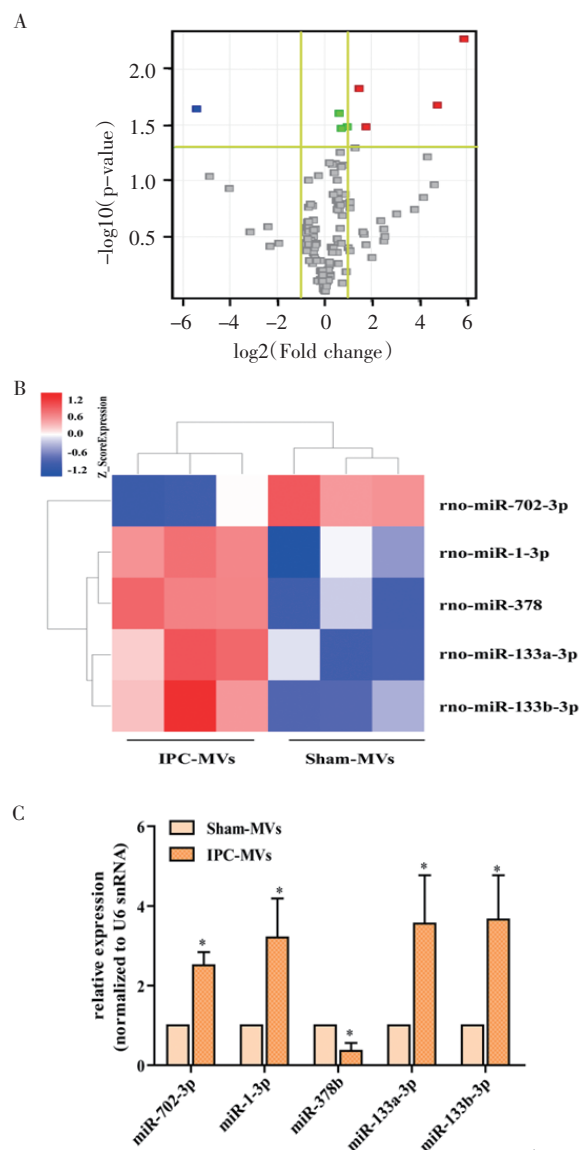
图 1 IPC-MVs 的形态学鉴定及 RNA 含量分析

Fig 1 Identification of morphology and RNA content analysis of IPC-MVs

2.2 循环血 MVs 中差异表达 miRNAs 的筛选及 qRT-PCR 验证 采用 Microarray 筛选循环血 IPC-MVs 组和 Sham-MVs 组中差异表达的 miRNAs。选取 $P < 0.05$, 差异倍数(Fold change)绝对值 ≥ 2 且具有统计学意义的 miRNAs 定义为显著性差异表达的 miRNAs。聚类分析结果显示,与 Sham-MVs 组相比,IPC-MVs 中有 5 个表达差异显著的 miRNAs ($P < 0.01$, $FDR < 0.05$) (图 2A), 其中 miR-1-3p、miR-378b、miR-133a-3p 和 miR-133b-3p 表达显著上调,miR-702-3p 表达显著下调(图 2B)。

qRT-PCR 结果显示,miR-1-3p、miR-378b、miR-133a-3p、miR-133b-3p 和 miR-702-3p 在

IPC-MVs 组和 Sham-MVs 组中均有表达。与 Sham-MVs 组相比,miR-1-3p ($t=3.194$)、miR-133a-3p ($t=3.002$)、miR-133b-3p ($t=3.389$) 显著上调,表达趋势与芯片结果一致。但 miR-378b、miR-702-3p 表达与芯片结果趋势相反,表现为 miR-378b ($t=4.455$) 下调,miR-702-3p ($t=6.443$) 上调(图 2C)。芯片检测与 qRT-PCR 共同验证的结果表明,循环血 MVs 中差异表达显著的 miRNAs 共 3 个: miR-1-3p、miR-133a-3p 和 miR-133b-3p, 且其在 IPC-MVs 中的表达量均显著高于 Sham-MVs。



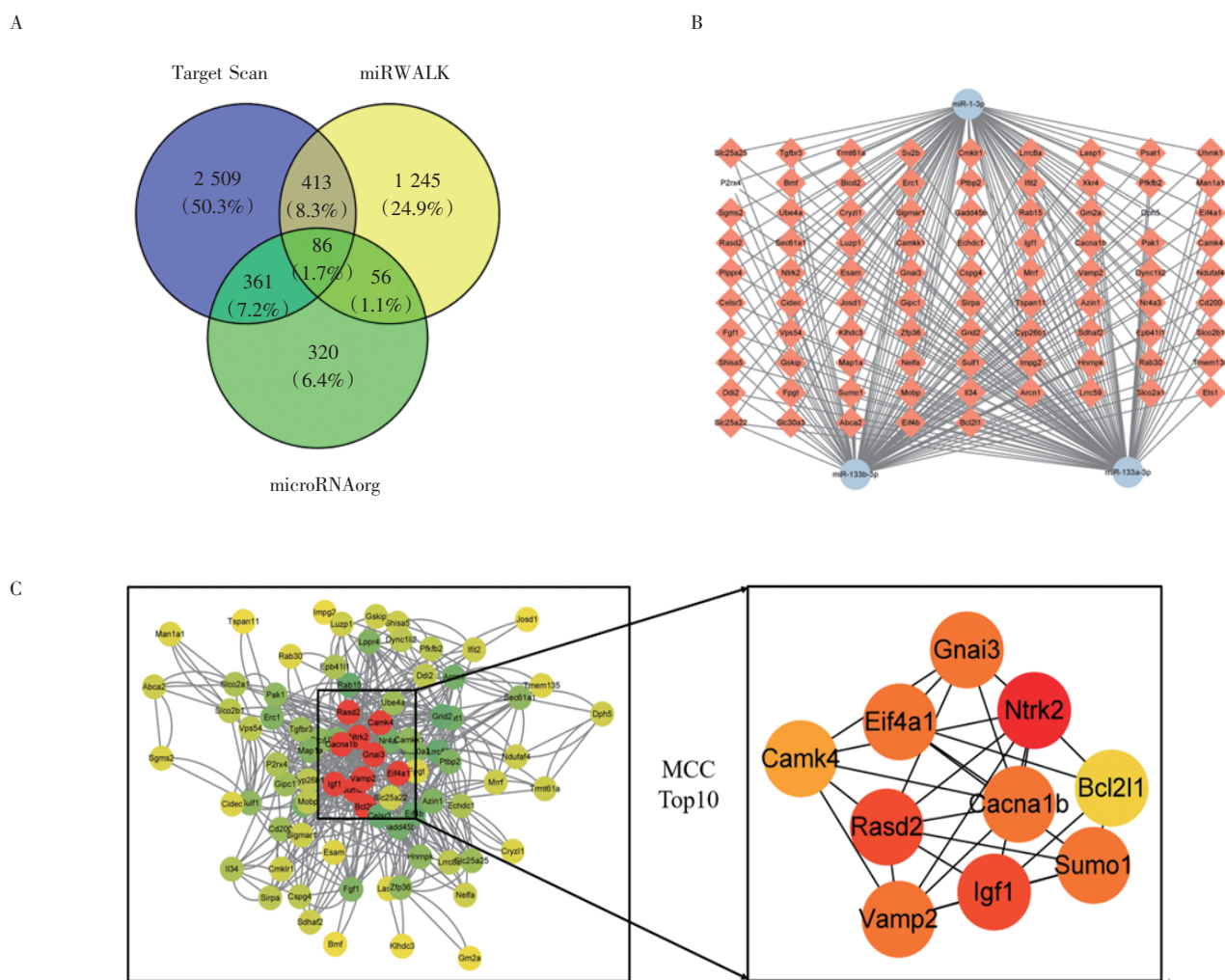
注:A:火山图(灰色点: $P > 0.05$; 绿色点: $|FC| < 2$, $P \leq 0.05$; 红色点: $FC \geq 2$, $P \leq 0.05$; 蓝色点: $FC \leq -2$, $P \leq 0.05$); B: 聚类分析(与 Sham-MVs 组相比,IPC-MVs 组中 miRNAs 上调用红色标记,下调用蓝色标记); C: qRT-PCR (* $P < 0.05$ vs. Sham-MVs; $n=3$); IPC: 缺血预适应; MVs: 细胞微囊泡

图 2 循环血中 MVs 差异表达 miRNAs 的筛选及 qRT-PCR 验证
Fig 2 Screening and qRT-PCR validation of miRNAs differentially expressed in MVs of circulating blood

2.3 差异表达 miRNAs 的靶基因预测 通过 TargetScan、miRWalk 和 microRNA.org 网站对差异表达显著上调的 3 个 miRNAs 进行靶基因预测,共得到 86 个潜在靶基因(图 3A)。为进一步探究这些潜在靶基因与疾病的关系,利用 Cytoscape 软件建立 miRNA-mRNA 网络调控图(图 3B),通过度值(Degree)大小筛选核心靶基因,并利用 STRING 数据库构建靶基因之间的 PPI 网络,Cytoscape 可视化分析结果显示度值排名前 10 的核心靶基因为:Ntrk2、Rasd2、Igf1、Vamp2、Eif4a1、Gnai3、Sumo1、Cacna1b、Camk4、Bcl2l1(图 3C)。其中 Ntrk2、Igf1、Gnai3、Bcl2l1 均与心肌 I/R 损伤密切相关,而且与 miR-1-3p、miR-133a-3p、miR-133b-3p 均有潜在的靶向关系。

2.4 GO 和 KEGG 通路富集分析 进一步对筛选

出的 86 个潜在靶基因进行生物学功能分析。GO 分析结果显示,这些靶基因主要参与 33 个生物学过程(图 4A)、25 个细胞成分的组成(图 4B)和 11 个分子功能(图 4C)。其中前 10 个核心靶基因的生物学过程主要富集在细胞增殖的正向调节、小 GTP 酶介导的信号转导、蛋白质运输、应对缺氧反应和细胞对胰岛素刺激的反应等;细胞成分主要富集在细胞质、膜、细胞外泌体、胞质和细胞连接等。分子功能主要富集在蛋白结合、肌凝蛋白结合、钙调蛋白结合和蛋白激酶结合中。KEGG 信号通路富集结果显示,这些差异表达的 miRNAs 靶基因显著富集在丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和 Ras 信号通路(图 4D)。其中 MAPK 信号通路涉及核心靶基因 Ntrk2、Cacna1b、Ras 信号通路涉及核心靶基因 Igf1、Bcl2l1。



注:A: 维恩图;B: miRNA 与靶 mRNA 网络图;C: 核心靶基因 PPI 网络图(背景颜色由深到浅表示度值由高到低)

图 3 差异表达的 miRNAs 靶基因预测

Fig 3 Target genes prediction of differentially expressed miRNAs

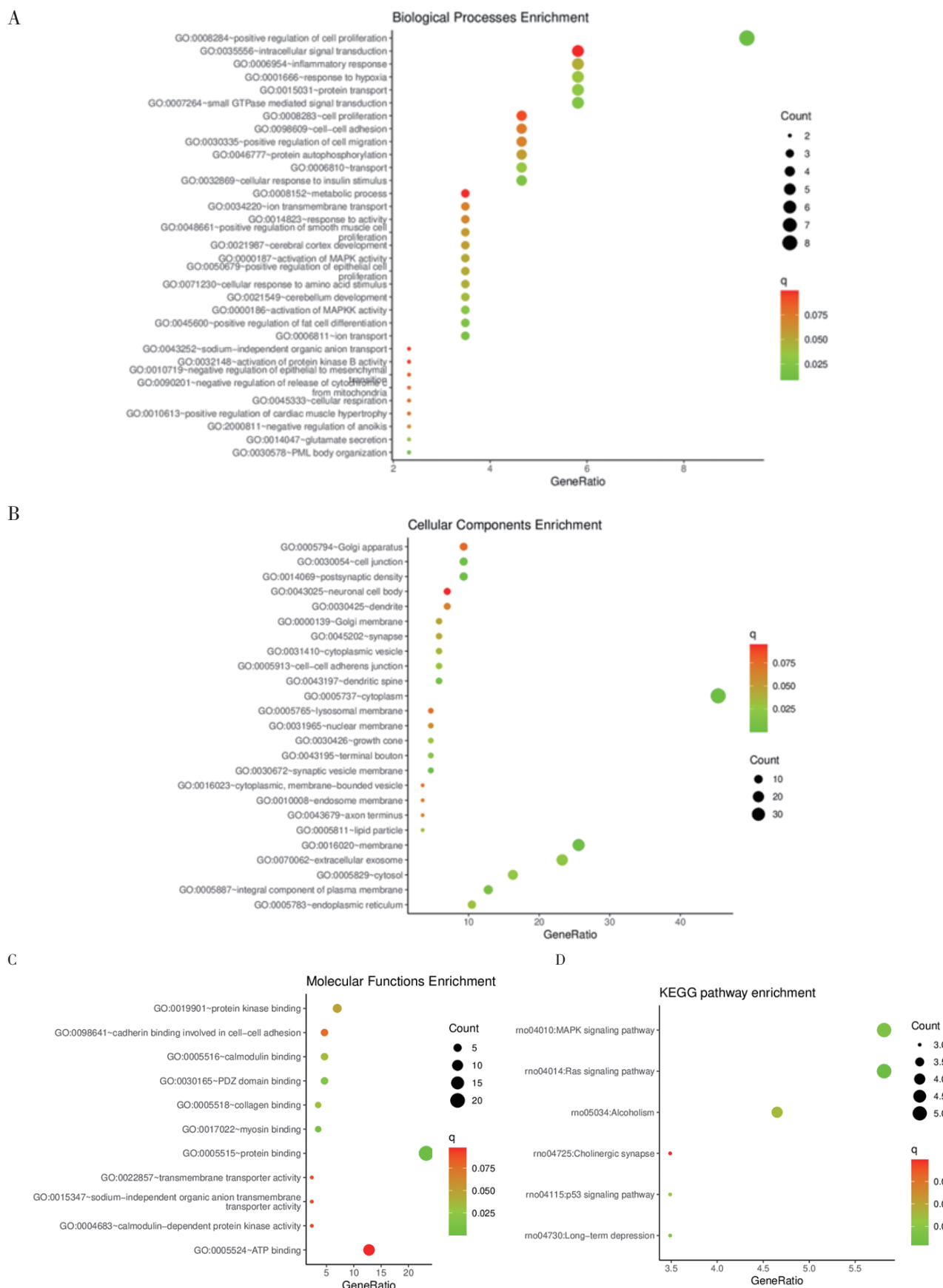


图4 差异表达的 miRNAs 靶基因 GO 和 KEGG 分析

Fig 4 GO and KEGG analysis of differentially expressed miRNAs target genes

3 讨论

近年来研究发现,MVs参与调控IPC的心脏保护作用。MVs从细胞质膜脱落过程中会携带许多母体细胞的活性物质,而不同的细胞类型、不同的刺激因素,MVs释放时所携带的活性物质组成有所不同。在心肌缺血或缺氧期间,心肌组织中某些特定miRNAs(如miR-1、miR-133、miR-139、miR-208等)的表达迅速受到干扰,干预心肌缺血性损伤的诊断和治疗^[6]。作为有效载体,在缺血性心脏病患者循环血中的MVs可以将具有生物学功能的miRNAs转运至内皮细胞、心肌细胞、平滑肌细胞或成纤维细胞内,通过与靶细胞受体结合而发挥生物学效应^[7]。本实验采用梯度差速离心法,成功地从循环血样本中提取到IPC-MVs和Sham-MVs,TEM观察到MVs呈现圆形或椭圆形的双层膜囊泡样结构。提取两组MVs中总RNA,结果显示IPC-MVs和Sham-MVs中均含有一定浓度的RNA,其中miRNAs的含量平均占总RNA的50%以上,表明IPC-MVs可以是miRNAs的运输载体,为IHD提供了一种新的治疗策略。

为进一步探究IPC处理对循环血MVs中miRNAs表达的影响,采用Microarray对IPC-MVs及Sham-MVs中所含miRNAs进行初步差异筛选。结果显示,两组MVs中5种miRNAs表达有显著差异。与Sham-MVs相比,IPC-MVs中miRNAs显著上调4个:miR-1-3p、miR-133a-3p、miR-133b-3p、miR-378b,下调1个:miR-702-3p。为进一步分析Microarray结果的可靠性,本研究采用qRT-PCR进行验证,结果显示,IPC-MVs中miR-1-3p、miR-133a-3p、miR-133b-3p相对表达量显著升高,与Microarray结果一致。由于miR-378b和miR-702-3p芯片检测与qRT-PCR验证结果不一致,可能因为这两个miRNAs在循环血MVs中含量较低,导致检测结果的不稳定性,暂不纳入本实验的后续研究。研究显示,这些差异表达显著上调的miRNAs均与心血管疾病的发生、发展有一定的关联。MiR-133a-3p和miR-133b-3p是心肌组织中特异性表达的miRNAs,具有调节心肌细胞分化、增殖和成熟的作用。当发生缺血性损伤时,心肌内miR-133a-3p和miR-133b-3p显著降低。心脏祖细胞中过表达的miR-133a-3p可以促进新生血管的形成和心肌细胞的增殖,显著改善心肌梗死大鼠的心脏功能^[8];通过抑制巨噬细胞迁移因子来上调急性心肌梗死大鼠模型中miR-133a-3p,间充质干细胞来源的外泌体可有效促进血管生成、抑制细胞凋亡、减少心肌纤维化面积和改善心脏功能^[9]。彭兴等^[10]体外和体

内研究表明,增加I/R损伤大鼠或H/R心肌细胞中miR-133b-3p的表达,可以显著抑制心肌细胞凋亡和活性氧簇积累。表明miR-133a-3p和miR-133b-3p的过表达在心肌I/R损伤中具有较高的治疗价值。心肌特异性miR-1-3p在心肌细胞生长中发挥关键的调节作用。促进miR-1-3p的释放可以有效增强间充质干细胞(MSC)的心脏分化能力,恢复梗死心肌功能^[11]。但也有研究显示,miR-1-3p具有促心肌细胞凋亡的作用,显著降低I/R处理大鼠心脏中抗凋亡蛋白Bcl-2,增加心肌损伤^[12]。因此,miR-1-3p的过表达是否可以作为IPC-MVs心肌I/R损伤的治疗靶标有待进一步研究。本实验发现,与Sham-MVs组相比,IPC-MVs组中miR-133a-3p、miR-133b-3p及miR-1-3p表达显著升高,显示了IPC处理产生的IPC-MVs通过携带这些特异性的miRNAs作用于靶细胞,升高损伤心肌组织中的miRNAs水平,从而减轻心肌I/R损伤的可能性。

靶基因预测结果显示,miR-1-3p、miR-133a-3p、miR-133b-3p的潜在靶基因共86个,利用Cytoscape软件筛选出4个与心肌I/R损伤相关的共同核心靶基因:Ntrk2、Igf1、Gnai3和Bcl2l1。生物学功能分析显示,这些潜在靶基因的表达产物主要富集在细胞质中,参与细胞增殖的正向调节、小GTP酶介导的信号转导、蛋白质运输、应对缺氧反应和细胞对胰岛素刺激的反应等生物学过程,主要参与MAPK信号通路和Ras信号通路,与心血管疾病的发生和发展密切相关。Ntrk2又称为原肌球蛋白相关激酶B(tropomyosin-related kinase B,TrkB),是神经营养酪氨酸受体激酶家族的成员之一,通过调节MAPK、Ras、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)和钙信号通路,在IHD中发挥重要的作用。Gong等^[13]研究显示,过表达心肌保护蛋白Caveolin-3,可以激活下游TrkB信号通路,减轻糖尿病引起的心肌I/R损伤。激活TrkB信号通路,可以有效抑制H₂O₂诱导的H9c2细胞线粒体过度分裂,从而增加细胞活力,减少细胞凋亡^[14]。Igf1是一种多功能生长因子,可以激活PI3K/Akt信号通路促进细胞增殖和存活^[15]。通过抑制Igf1降解,骨髓间充质干细胞以缺氧诱导因子-1 α 依赖机制,显著增加梗死心肌血管的生成,改善心脏功能,提高急性心肌梗死后干细胞治疗的有效性^[16]。Gnai3是多种跨膜信号通路的调制者和转导者,参与调节细胞内Ca²⁺信号级联反应,改善心力衰竭大鼠的心脏重塑^[17]。Bcl2l1是位于线粒体外膜的抗凋亡蛋白Bcl-2家族成员之一,具有控制线粒体活性氧的产生和细胞色素C释放的生物

学功能,在 I/R 诱导的心肌损伤中发挥抗凋亡作用^[8]。本实验前期研究表明,IPC-MVs 主要通过上调心肌组织中 Bcl-2 的表达,下调 Bax 和降低 caspase-3 的活力,减轻 I/R 大鼠心肌损伤^[19]。表明 IPC-MVs 通过抑制心肌细胞内 I/R 诱导的细胞凋亡通路,发挥心脏保护作用。因此,在 IPC-MVs 中表达显著升高的 miRNAs (miR-1-3p、miR-133a-3p、miR-133b-3p) 可能通过调控 Ntrk2、Igf1、Gnai3、Bcl2l1 的表达,影响心肌细胞的增殖、存活和血管生成等生物学进程,进而发挥抗心肌 I/R 损伤的保护作用。本研究发现,循环血 IPC-MVs 与 Sham-MVs 携带的 miRNAs 确实存在明显的差异表达,差异表达的 miRNAs 与 I/R 损伤时心肌保护作用相关,这为 IPC-MVs 通过转运 miRNAs 治疗心肌 I/R 损伤提供了理论依据,深入的机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] CHI H J, CHEN M L, YANG X C, et al. Progress in therapies for myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(15): 1712-1721.
- [2] SLUIJTER J P G, DAVIDSON S M, BOULANGER C M, et al. Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: position paper from the working group on cellular biology of the heart of the European Society of Cardiology[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(1): 19-34.
- [3] LUO H, LI X H, LI T Z M, et al. MicroRNA-423-3p exosomes derived from cardiac fibroblasts mediates the cardioprotective effects of ischaemic post-conditioning[J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1189-1204.
- [4] POE A J, KNOWLTON A A. Exosomes and cardiovascular cell-cell communication[J]. *Essays Biochem*, 2018, 62(2): 193-204.
- [5] LIU M, WANG Y, ZHU Q, et al. Protective effects of circulating microvesicles derived from ischemic preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Apoptosis*, 2018, 23(7/8): 436-448.
- [6] ONG S B, KATWADI K, KWEK X Y, et al. Non-coding RNAs as therapeutic targets for preventing myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(3): 247-261.
- [7] BELTRAMI C, BESNIER M, SHANTIKUMAR S, et al. Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(3): 679-693.
- [8] CHEN Y Q, ZHAO Y F, CHEN W Q, et al. MicroRNA-133 overexpression promotes the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells on acute myocardial infarction[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 268.
- [9] ZHU W W, SUN L, ZHAO P C, et al. Macrophage migration inhibitory factor facilitates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells derived exosomes in acute myocardial infarction through up-regulating miR-133a-3p[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 61.
- [10] 彭兴, 林玲, 周祥群, 等. miR-133b 靶向 YES1 抑制心肌缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡和活性氧簇的积累[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(10): 1390-1398.
- [11] JIN G R, LI W F, SONG F, et al. Fluorescent conjugated polymer nanovector for *in vivo* tracking and regulating the fate of stem cells for restoring infarcted myocardium[J]. *Acta Biomater*, 2020, 109: 195-207.
- [12] TROTTE M C, FERRARO B, MESSINA A, et al. Telmisartan cardioprotects from the ischaemic/hypoxic damage through a miR-1-dependent pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(10): 6635-6645.
- [13] GONG J J, ZHOU F, XIE S M, et al. Caveolin-3 protects diabetic hearts from acute myocardial infarction/reperfusion injury through β 2AR, cAMP/PKA, and BDNF/TrkB signaling pathways[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(14): 14300-14313.
- [14] WANG Z, WANG S P, SHAO Q, et al. Brain-derived neurotrophic factor mimetic, 7,8-dihydroxyflavone, protects against myocardial ischemia by rebalancing optic atrophy 1 processing[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 145: 187-197.
- [15] LI K S, BAI Y, LI J, et al. LncRNA HCP5 in hBMSC-derived exosomes alleviates myocardial ischemia reperfusion injury by sponging miR-497 to activate IGF1/PI3K/AKT pathway[J]. *Int J Cardiol*, 2021, 342: 72-81.
- [16] SUN Z X, XIE Y J, LEE R J, et al. Myocardium-targeted transplantation of PHD2 shRNA-modified bone mesenchymal stem cells through ultrasound-targeted microbubble destruction protects the heart from acute myocardial infarction[J]. *Theranostics*, 2020, 10(11): 4967-4982.
- [17] LIU Z B, TAO B, FAN S Z, et al. Over-expression of microRNA-145 drives alterations in beta-adrenergic signaling and attenuates cardiac remodeling in heart failure post myocardial infarction[J]. *Ag-ing (Albany NY)*, 2020, 12(12): 11603-11622.
- [18] ROZIER R, PAUL R, HOUNOUM B M, et al. Pharmacological preconditioning protects from ischemia/reperfusion-induced apoptosis by modulating Bcl-xL expression through a ROS-dependent mechanism[J]. *FEBS J*, 2021, 288(11): 3547-3569.
- [19] 王艺璐, 刘森, 尚曼, 等. 心肌缺血预适应循环血中微囊泡对大鼠心肌 I/R 损伤的作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(2): 97-101.

(2021-10-31 收稿)