

论著·基础研究

血管内皮生长因子A调控人脐静脉内皮细胞miRNA的全基因表达谱分析

刘 俐, 耿子龙, 陈嘉焕, 张沙沙[#], 张 冰[#]

上海交通大学系统生物医学研究院, 系统生物医学教育部重点实验室, 上海 200240

[摘要] **目的**·分析人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 中微小RNA (microRNA, miRNA) 在血管内皮生长因子A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 刺激下的变化, 探索miRNA在调节VEGFA下游基因表达变化中的作用, 并寻找新的血管新生调控miRNA。**方法**·通过NanoString nCounter分别检测了HUVEC在VEGFA刺激后0、1、4、12 h时miRNA的表达量, 将具有相同变化趋势的差异表达miRNA聚类并预测其靶基因。通过基因本体数据库富集分析和京都基因与基因组百科全书通路分析, 预测差异表达miRNA靶基因的相关功能, 并建立互作网络。**结果**·VEGFA刺激HUVEC后, 有39个miRNA的表达量发生了显著差异性变化。生物信息学分析结果显示差异表达miRNA所对应的靶mRNA有129个, 动态表达的miRNA与其靶基因间的调控参与了血管新生中多个生物过程和信号通路。**结论**·VEGFA刺激诱导HUVEC差异性表达miRNA, miRNA在调节血管新生中具有重要作用; 其中, miR-107和miR-21可能是血管新生的调控因子。

[关键词] 微小RNA; 血管内皮生长因子A; 人脐静脉内皮细胞; 生物信息学分析

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.09.008 **[中图分类号]** R34 **[文献标志码]** A

Whole gene expression profile analysis of miRNAs in human umbilical vein endothelial cells regulated by vascular endothelial growth factor A

LIU Li, GENG Zi-long, CHEN Jia-huan, ZHANG Sha-sha[#], ZHANG Bing[#]

Key Laboratory of Systems Biomedicine (Ministry of Education), Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective**·To analyze the changes of microRNA (miRNA) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) under the stimulation of vascular endothelial growth factor A (VEGFA), in order to further explore the roles of miRNA in regulating the expression of downstream genes of VEGFA, and to find new regulatory miRNAs for angiogenesis. **Methods**·The miRNA expression profile was analyzed by using NanoString nCounter in HUVECs 0, 1, 4, and 12 h after VEGFA stimulation. The differentially expressed miRNAs with the same trend were clustered and their target genes were predicted. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) were used to analyze and predict the functions of these target genes, and the interaction networks were established. **Results**·The expression of 39 miRNAs changed significantly after VEGFA stimulation in HUVECs. Bioinformatic analysis showed that there were 129 target mRNAs corresponding to the differentially expressed miRNAs which were involved in multiple biological processes and signal pathways related to angiogenesis. **Conclusion**·miRNAs are differentially expressed in HUVECs after stimulation by VEGFA, and miRNAs play important roles in regulating angiogenesis. MiR-107 and miR-21 may serve as candidate functional regulators of angiogenesis.

[Key words] microRNA (miRNA); vascular endothelial growth factor A (VEGFA); human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); bioinformatic analysis

血管新生是指在已有的血管基础上形成新血管的过程^[1], 该过程往往与许多癌症和心血管疾病的发生发展紧密相关。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是最重要的生长因子之一^[2], 已有研究表明 VEGF 及其相关受体 VEGFR (VEGF

receptor) 在调节血管形成的过程中起着关键作用。其二者的结合可激活下游信号通路, 诱导内皮细胞的生长、迁移与血管形成^[3]。VEGF家族包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD、VEGFE 和胎盘生长因子 (placental growth factor, PIGF)^[4]。VEGFA是该家族中诱导血管形

[基金项目] 国家自然科学基金 (31671503, 31872836)。

[作者简介] 刘 俐 (1997—), 女, 硕士生; 电子信箱: liulili@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 张 冰, 电子信箱: bingzhang@sjtu.edu.cn。张沙沙, 电子信箱: zhangshasha309@sjtu.edu.cn。[#]为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (31671503, 31872836)。

[Corresponding Author] ZHANG Bing, E-mail: bingzhang@sjtu.edu.cn. ZHANG Sha-sha, E-mail: zhangshasha309@sjtu.edu.cn.[#]Co-corresponding authors.



成作用最强、特异性最高的血管生长因子,是血管发生和造血系统中的关键调控因子^[5]。

微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类进化上高度保守的非编码单链小RNA,长度为18~25个核苷酸^[6],结合靶 mRNA 的3'端非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)后,可降解靶 mRNA 或抑制其翻译。成熟的miRNA能在转录和转录后加工修饰等阶段调控基因表达^[7]。miRNAs参与多种细胞过程,如分化、细胞周期调控、代谢和凋亡等。近年来miRNA异常表达已被证实与血管新生相关疾病有关,如部分癌症和心血管疾病^[8-9]。因此,探究miRNA对血管新生的调控能够帮助人们更深入地了解微血管异常生长性疾病的发生机制,为相关疾病的治疗提供新的思路和靶标。本课题组前期研究^[10]已证实,VEGFA刺激能引起人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)转录水平显著变化,共发现874个mRNAs和61个长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)发生显著差异表达。但是,与lncRNA和mRNA关系密切的miRNA在VEGFA刺激后的变化尚未清晰。

基于此,本研究探索在VEGFA刺激下HUVEC内miRNA的动态性,分析动态表达的miRNA与其靶基因的调控,并讨论miRNA与血管新生的调控关系。

1 材料与方法

1.1 HUVEC培养及体外刺激

从美国Lonza公司购买的原代HUVEC在EGM2完全培养基(CC-3162, Lonza, 美国)中生长。实验前1d,将HUVEC用全培养基铺板,待细胞融合度达90%左右时换成低血清无生长因子培养液(EBM2+1%血清);过夜饥饿培养使细胞的VEGFA耗尽,第2日加入50 ng/mL的VEGFA-165(VEGFA最主要的活性剪切体)刺激,在添加VEGFA-165后的0(未处理)、1、4和12 h收集细胞用于下游分析。

1.2 miRNA的获取与测定

使用具有柱上脱氧核糖核酸酶I消化功能的Purelink™ miRNA试剂盒(Life Technologies, 美国)收集HUVEC的miRNA。使用nCounter Human V2 miRNA表达测定试剂盒(Nano String Technologies, 美国),检测818条带注释的人类miRNA的探针,即每个时间点做2组生物学重复,并对每组获取的miRNA进行测定。

1.3 差异性表达miRNA的分析

NanoString nCounter分析可测量818种内源性miRNA。此外,还有6个阳性对照探针、6个阴性对照探针、5个管家对照探针以及5个插入对照探针。DESeq R包^[11]用于数据归一化和差异性表达分析。去除计数值在任何时间点均小于阴性对照平均计数值的内源性miRNA。使用Wald成对检验;与0 h比较, $P<0.05$ 的miRNA作为差异性表达miRNA(miDEGs),并根据其瞬时表达模式将miDEGs分为3个簇。

1.4 miRNA的靶基因预测

由于检测得到的miDEGs中多数miRNA未曾报道,因此其可能的功能需要通过下游靶基因做功能预测分析。miRTargetLink Human是一个在线的以交互作用网络形式提供人源miRNA-mRNA相互作用的详细信息网站。使用miRTargetLink Human网站默认的设置,预测miRNA的靶基因。以查询miR-221靶mRNA为例:点击“search by microRNA”,填写“miRNA-221”,选择“hsa-miRNA-221-3p”,网站会自动呈现出互作网络,包括64个强关系的互作、293个弱关系的互作、91个预测(未经实验证实)的互作关系。

1.5 miRNA功能分析

使用DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)资源库^[12]对VEGFA刺激后差异表达的miRNA进行基因本体数据库(gene ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析。综合miDEGs的靶基因交集,根据GO注释中的生物学过程进行注释层次分类和富集分析,用Fisher精确分析,得到基因集合相对于背景具有统计学意义的高频率注释;基于KEGG的信号转导通路富集分析预测miDEGs的靶基因功能,从而推导上游miDEGs相关功能。以 $P<0.05$ 为显著性阈值。

1.6 miDEGs-靶基因相互作用网络构建

构建miDEGs与其靶基因调节网络可以更直观地显示miDEGs与靶基因互作关系,寻找关键miDEGs。使用Cytoscape软件构建miDEGs-靶基因相互作用网络,并计算网络中各节点的连接(degree)值。

1.7 统计学方法

实验重复2次,所得的数据使用GraphPad Prism软

件进行统计学分析。采用负二项分布进行统计学验证。所有数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGFA 刺激引起 HUVEC 中 miRNA 表达的改变

基于 NanoString 结果, 共计有 173 个 miRNA 表达。与 0 h (未处理) 相比, 在 VEGFA 刺激后 1、4 和 12 h, 有 39 个 miRNA 的表达量发生了显著差异性变化 (绝对差异倍数 ≥ 2 , $P<0.05$)。使用 miRTargetLink Human 在线平台依次查找这 39 个 miDEGs 的靶基因, 共计有 129 个靶 mRNA (图 1), 其中有 17.05% (22/129) 的 mRNA 在我们前期基于相同 HUVEC 血管新生模型的 RNA-Seq 数据 [10] 中呈差异表达。

根据这 4 个时间点表达量的不同, 将相同变化趋势的 miRNA 聚类在一起 (图 2, 矫正 $P<0.01$; $n=2$)。

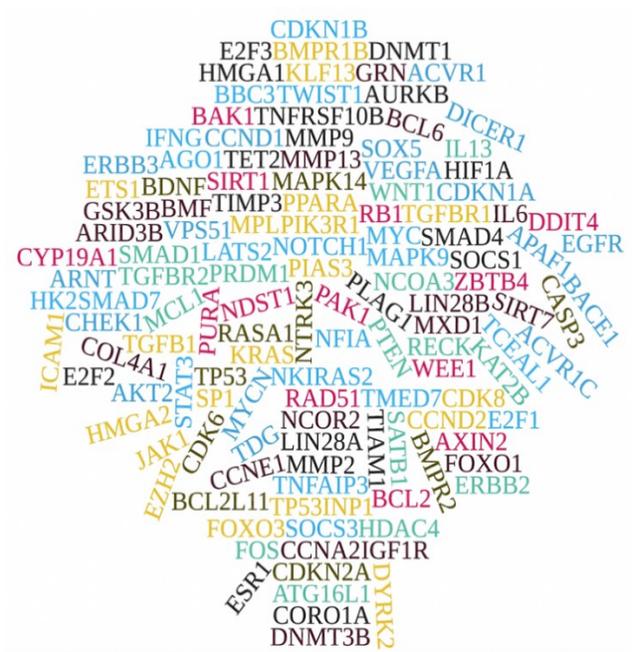
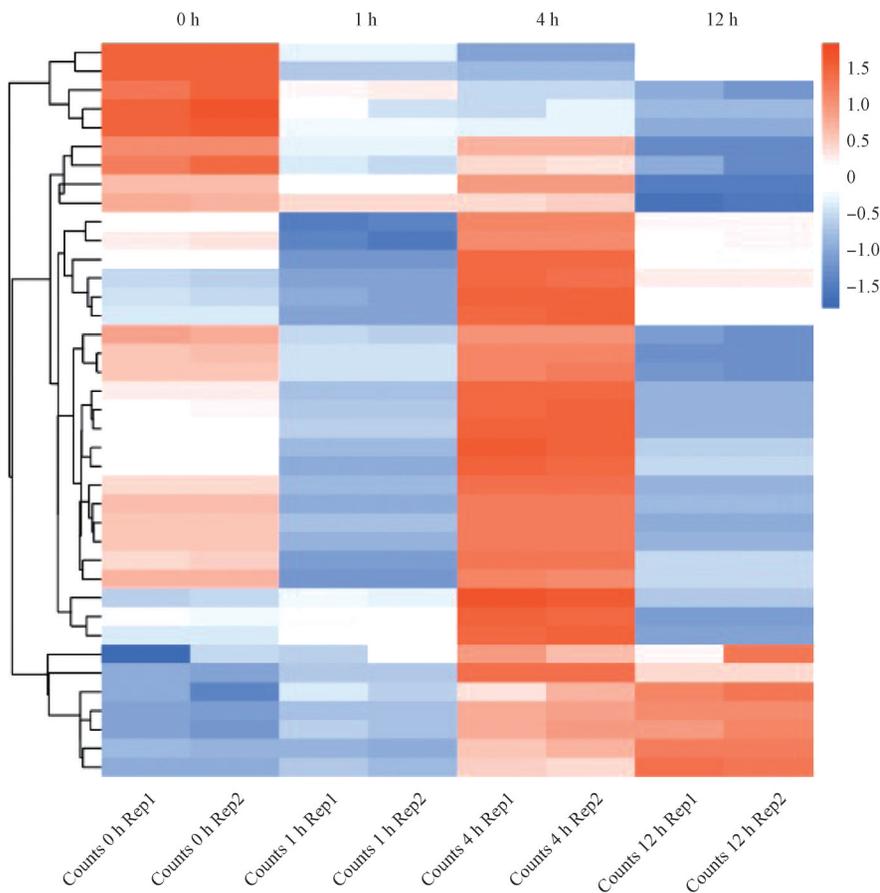


图 1 miDEGs 的靶基因
Fig 1 Target genes of miDEGs



Note: Adjusted P value < 0.01 . Pearson's r of counts 0 h, counts 1 h, counts 4 h and counts 12 h are 0.999 905 4, 0.999 899 1, 0.999 587 0, 0.999 643 5, respectively.

图 2 差异性表达 miRNAs (miDEGs) 的热图

Fig 2 Heat map of differentially expressed miRNAs (miDEGs)

2.2 miDEG靶基因功能和通路的富集分析

结果显示这些 miDEGs 在细胞增殖正调控、细胞缺氧应激反应、细胞迁移正调控、伤口愈合、上皮细胞增殖正调控、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应激活、内皮细胞增殖正调控、血管形成模式决定、血管网形成、血管新生正调控等过程富集 (图3)。同样使用 DAVID 在线平台, 以 $P < 0.05$ 为显著性阈值, 差异表达 miRNA 所富集的 KEGG 通路有癌症中的 miRNAs、FOXO (Forkhead box) 信号通路、细胞周期、低氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 信号

通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/PKB, PI3K/AKT) 信号通路、MAPK 信号通路、Ras 信号通路、VEGF 信号通路、趋化因子信号通路、Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) /信号转导子和转录活化子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 信号通路 (图4)。

GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析证明 miDEGs 的靶基因参与细胞增殖和血管新生。VEGFA 刺激后, 胞内多种生理过程和信号通路受到影响, 与靶基因结合的 miRNAs 也随之差异性表达。

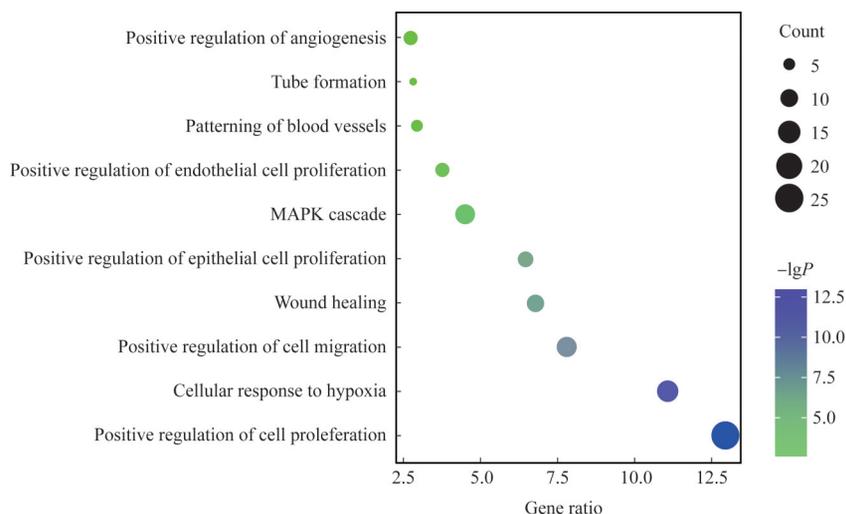


图3 miDEGs靶基因GO功能分析

Fig 3 GO function analysis of target genes of miDEGs

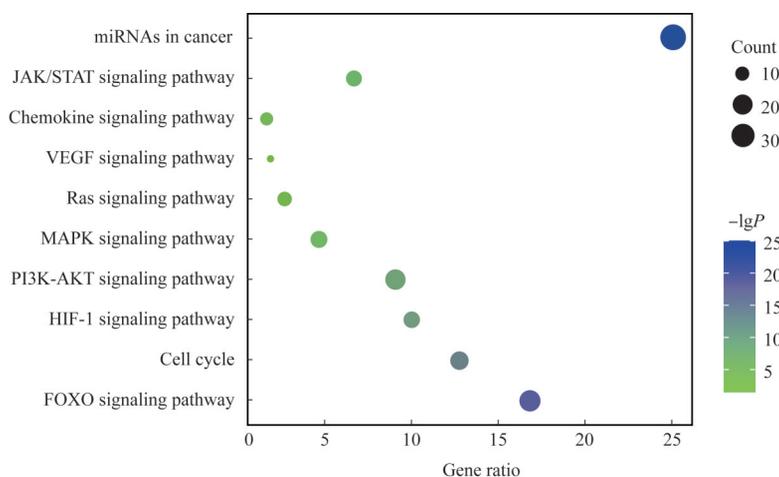


图4 miDEGs靶基因的KEGG通路分析

Fig 4 KEGG pathway analysis of target genes of miDEGs

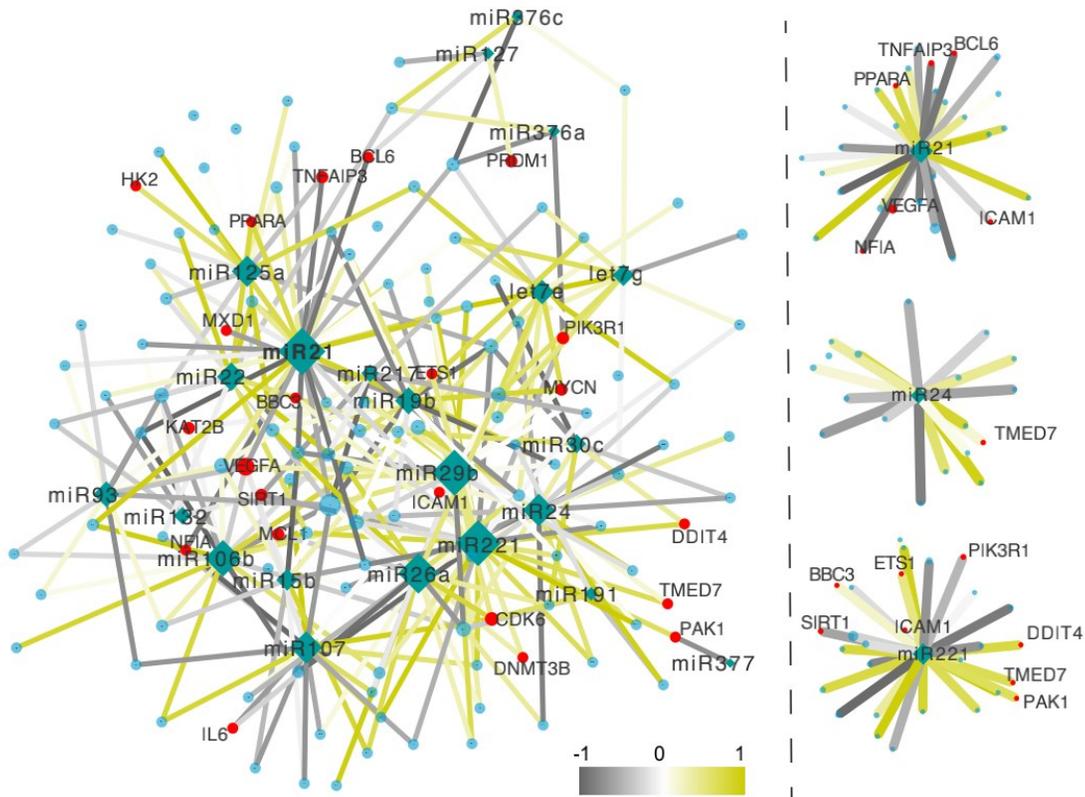
2.3 差异性表达miRNA与靶基因互作关系

图5中绿色菱形代表miDEGs, 红点代表差异性表达的预测靶基因, 蓝点表示非差异性表达的预测靶基因。

每个节点的大小对应于它与网络中其他节点的连接边的数目。差异性表达miRNA与每个预测靶基因之间连线的颜色表示基因表达的相关性, 由皮尔森相关系数来定量,

黄色和灰色分别表示正相关和负相关。整个网络由 156 个节点和 337 条连接边组成, 包含 39 个 miDEGs 和 22 个差异表达的靶基因。根据 miDEGs degree 的值并基于前期的

研究, 我们挑选并提取了 3 个 miDEGs [(miR-21 (degree=29), miR-24 (degree=18), miR-221 (degree=28))] 的子网络。



Note: *HK2*—hexokinase 2; *PPARA*—peroxisome proliferator activated receptor alpha; *TNFAIP3*—TNF alpha induced protein 3; *BCL6*—BCL6 transcription repressor; *PRDM1*—PR/SET domain 1; *MXD1*—MAX Dimerization Protein 1; *ETS1*—ETS proto-oncogene 1; *PIK3R1*—phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1; *KAT2B*—lysine acetyltransferase 2B; *BBC3*—BCL2 binding component 3; *MYCN*—MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor; *SIRT1*—sirtuin 1; *ICAM1*—intercellular adhesion molecule 1; *NFIA*—nuclear factor IA; *MCL1*—MCL1 apoptosis regulator; *CDK6*—cyclin dependent kinase 6; *DNMT3B*—DNA methyltransferase 3 beta; *IL6*—interleukin 6; *DDIT4*—DNA damage inducible transcript 4; *TMED7*—transmembrane p24 trafficking protein 7; *PAK1*—p21 (RAC1) activated kinase 1.

图5 差异性表达 miRNAs 和它们靶基因的互作网络
Fig 5 Network of miDEGs and their target genes

miR-21 在多种实体瘤中高表达, 也是最早确认的可促进癌症的 miRNAs 之一, 它靶向许多与增殖、凋亡和侵袭相关的肿瘤抑制基因^[13]。miR-21 在 HUVEC 中结合靶基因 *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) 和 *SMAD7* (SMAD family member 7) 的 mRNA, 即通过负调控 *PTEN* 和 *SMAD7* 的蛋白表达, 调控内皮细胞的增殖和侵袭, 进而影响血管新生^[14]。我们的靶基因预测发现: *PTEN* 是 miR-21 的靶基因。miR-221 表达在 4 h 时达到最高, 与靶基因 *ETS1* 和 *PIK3R1* 分别呈正调控与负调控关系。miR-221 可通过靶向转录因子 *ETS1* 抑制血管新生^[15], 且差异表达的 *ETS1* 也在 4h 时达到最高值^[10]。miR-221 在 1h 时表达量最低, 差异表达的 *PIK3R1* 在 1h 时表达量也最低, 靶向 *PIK3R1* 可以控制 VEGFA 下游的信号转导。

2.4 miR-107 和 miR-21 在 HUVEC 中受 VEGFA 调控

肿瘤的生长迁徙与血管新生密切相关。miR-107 的异常表达会影响肿瘤的发生和发展^[16-17], 目前已知在神经胶质瘤上调的 miR-107 可以抑制 VEGFA 的表达和血管新生^[18], 而 HUVEC 中 miR-107 和 VEGFA 的调控关系还没有相关研究报道。我们利用体外刺激模型发现, VEGFA 刺激可以引起 miR-107 表达量在 1 h 时稍下降, 在 4 h 时迅速上调。靶基因预测显示 miR-107 与其靶向的 *CDK6* 显示强关系; 在之前研究 DEGs 时, *CDK6* 表达在 4 h 达到最高值后逐渐减少^[10]。此结果提示在外源 VEGFA 刺激后, 可与 *CDK6* 结合的 miR-107 的表达量可能在 4 h 达到较高水平, miR-107 靶向 *CDK6* 导致其在 4 h 之后开始减少, 并影响内源 VEGFA 的表达。外源 VEGFA 刺激后 miR-21 的表达在 4 h 时显著上升, 靶基因

互作关系显示差异性表达的 miR-21 与内源 VEGFA 呈负相关。在此研究中我们发现了新的可能调控血管新生的 miR-107 和 miR-21。以上研究结果提示在血管新生中 VEGFA 可能通过改变 miRNA 来刺激血管生成。

3 讨论

心血管疾病和癌症是造成人类死亡的两大主要原因, 而血管新生是上述 2 类疾病发生发展过程中重要的生物学过程。miRNA 在细胞增殖、分化、凋亡等过程中具有重要作用, 也参与了其 2 类疾病的发生发展^[19]。miRNA 差异性表达属于异常表达中的一种, 是许多疾病研究中的研究热点和突破口^[20]。在本研究中, 通过对 VEGFA 刺激后差异性表达的 miRNA 进行研究讨论, 在预测其靶基因的基础上使用 GO 和 KEGG 分析, 推测这些 miRNA 可能的生物学功能, 并进一步结合生物信息学软件, 以网络结构呈现出整体互作的形式, 探究 miRNA 在调控 VEGFA 下游基因表达中的作用, 为进一步理解血管新生与 miRNA 的关系提供帮助。

VEGFA 刺激后 miDEGs 的靶基因中有 22 个在我们前期基于相同 HUVEC 血管新生模型的 RNA-Seq 数据中差异表达 ($P < 0.001$, χ^2 检验), 这也佐证了我们前期研究的结果。它们分别是 *DNMT3B*、*KAT2B*、*NFIA*、*PAK1*、*SIRT1*、*BCL6*、*TNFAIP3*、*IL6*、*MCL1*、*PIK3R1*、*MXD1*、*ICAM1*、*VEGFA*、*BBC3*、*CDK6*、*MYCN*、*ETS1*、*TMED7*、*HK2*、*DDIT4*、*PPARA*、*PRDMI*。其中, *ETS1* 是内皮细胞主转录调节因子, 可与启动子、增强子结合激活内皮基因促进血管新生^[21]。课题组前期研究^[10]发现, *ETS1* 在 VEGFA 刺激下也差异性表达。血管内皮细胞的血管新生需要 *ETS1* 介导的 VEGFA 信号转导来释放暂停的 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RNAP II)。VEGFA 的刺激能够增加 *ETS1* 的乙酰化, 增强 *ETS1* 与溴结构域蛋白 4 (bromodomain containing 4, BRD4) 的结合, 促进 RNAP II 的转录活性, 进而驱动血管新生^[22]。

VEGFA 在肿瘤生长和血管形成的过程中具有重要作用, 多种环境和细胞刺激因素可导致 VEGFA 的产生。VEGFA 的刺激不仅会引起 miRNA 的差异性表达, 这些差异性表达的 miRNA 也可通过靶基因反过来影响 VEGFA 的表达或者调控血管新生。模型中差异性表达的 miR-21 被证实与心脏疾病密切相关。miR-21 在心脏衰竭过程中表达升高, 通过靶向侧支发芽因子同源物 1 (sprouty RTK signaling antagonist 1, SPRY1) 蛋白激活 ERK (extracellular regulated protein kinase) -MAPK 信号通路,

可引起心脏纤维化和心肌肥厚^[23]; miR-221/22 簇可通过负调控促血管生成因子 C-KIT (KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase)、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 来抑制血管内皮细胞的血管生成能力, eNOS 在控制血管稳态、渗透性和舒张等方面具有重要作用^[24-25]。miR-221/22 簇也可靶向转录因子 ETS1、STAT5 来抑制血管新生^[15]; *TMED7* 是 miR-24 的靶基因, 在前期 VEGFA 刺激模型中 *TMED7* 也差异性表达^[10]。miR-24 还可通过抑制转录因子 GATA2 (GATA binding protein 2) 和 p21 活化激酶 (p21-activated kinase, PAKs) 的表达, 诱导内皮细胞凋亡和损伤血管, 进而导致心肌梗死^[26]。但目前没有文献报道靶基因 *TMED7* 与血管新生的关系, 我们推测 VEGFA 的刺激在一定程度上可影响 miR-24 与 *TMED7* 间互作, 改变 *TMED7* 在细胞分泌物的生物合成过程, 包括加工和翻译后修饰, 进而影响心脏发育。

近年来越来越多研究表明 miRNA 参与了 VEGFA 调控相关的肿瘤血管形成。由于 miRNA 的表达具有时序性^[27], 我们猜想 miRNA 的调控也具有一定的时序性, 即早期通过转录因子、晚期通过功能基因参与转录后调控。我们的 miDEGs 靶基因预测中发现, miR-21-5p、miR-22-3p、miR-29b-3p 显示与 *SP1* (SP1 transcription factor) 强关系。*SP1* 是 *VEGFA* 转录的调节因子, 与抑癌基因 *VHL* (von Hippel-Lindau tumor suppressor) 结合后会抑制 *SP1* 对 VEGFA 启动子的调控, 从而导致 VEGFA 的转录和表达水平降低^[28]。因此我们推测 miR-21-5p、miR-22-3p、miR-29b-3p 可能通过抑制转录因子 *SP1*, 减弱其促进 *VEGFA* 转录的作用, 抑制肿瘤血管形成; miRNA 晚期参与转录后调控, 主要是通过形成 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 再与靶 mRNA 结合抑制靶基因表达。多种 miRNA 能够通过抑制靶基因表达来影响 VEGFA 下游信号的传递, 从而调节肿瘤的血管新生。有研究^[29]表明, 促进 *VEGFA* 转录的 miRNA 有 *Let-7*、miR-103、miR-107 等。*Let-7* 家族是肿瘤抑制 miRNA, 其中 *let-7f*、*7e*、*7g* 在我们模型中 4 h 时表达量均显著增加。并且 *Let-7* 与我们发现的 VEGFA 新的调控因子 miR-107 之间存在互相作用, miR-107 可能通过结合 *let-7* 而降低其稳定性, 促进降解^[30]; *MXD1* 是肿瘤抑制因子, 已知 miR-19b 可以通过靶向 *MXD1* 促进胃癌细胞的迁移、侵袭和转移^[31]。miR-19b 的表达在 VEGFA 刺激后逐渐增加并在 12 h 时达到最高, 可能是在晚期通过 *MXD1* 调控血管新生。

差异性表达的 miRNA 所富集的信号通路中大多都与血

管新生密切相关。例如,当肿瘤微环境缺氧时,激活的HIF-1 α 会促进VEGFA基因的上调表达^[32]。VEGFA与配体VEGFR结合后会引发下游细胞信号级联反应,如PI3K/AKT通路,当VEGFR2活化PI3K后,3,4,5三磷酸磷脂酰肌醇[phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate, PIP3]与AKT结合,参与细胞增殖、迁移、存活和血管生成^[33]。AKT也可磷酸化FOXO1,后者是内皮细胞增

殖和血管新生的重要调节因子^[34]。人们基于以往的研究成果,通过靶向VEGFA开发了许多抗血管新生的药物,如贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、酪氨酸激酶抑制剂等^[35]。但即使联合用药患者还是会出现预后较差或耐药等情况。因此研究miRNA调节VEGFA下游基因表达变化是非常有意义的,这些差异表达miRNA及其靶基因可能成为寻找新的血管新生过程中重要调控因子和治疗靶点。

参·考·文·献

- [1] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [2] Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. *Revue Roumaine De Morphol et Embryol*, 2018, 59(2): 455-467.
- [3] Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(10): 611-625.
- [4] Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 563-584.
- [5] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis[J]. *J Intern Med*, 2013, 273(2): 114-127.
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [7] Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis[J]. *RNA*, 2019, 25(1): 1-16.
- [8] Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2016, 1: 15004.
- [9] Zhao Z, Sun W, Guo ZY, et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis[J]. *Life Sci*, 2020, 254: 116900.
- [10] Wang SY, Chen JH, Garcia SP, et al. A dynamic and integrated epigenetic program at distal regions orchestrates transcriptional responses to VEGFA[J]. *Genome Res*, 2019, 29(2): 193-207.
- [11] Anders S, McCarthy DJ, Chen YS, et al. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(9): 1765-1786.
- [12] Blazek AD, Nam J, Gupta R, et al. Exercise-driven metabolic pathways in healthy cartilage[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(7): 1210-1222.
- [13] Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer[J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(4): 395-402.
- [14] Luo M, Tan XY, Mu L, et al. MiRNA-21 mediates the antiangiogenic activity of metformin through targeting PTEN and SMAD7 expression and PI3K/AKT pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43427.
- [15] Celic T, Metzinger-Le Meuth V, Six I, et al. The miR-221/222 cluster is a key player in vascular biology via the fine-tuning of endothelial cell physiology[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(1): 40-46.
- [16] Li XH, Zhang Y, Shi YQ, et al. MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(9): 1887-1895.
- [17] Chen JJ, Zhou X, Xiao QR, et al. MiR-107 suppresses cell proliferation and tube formation of Ewing sarcoma cells partly by targeting HIF-1 β [J]. *Hum Cell*, 2018, 31(1): 42-49.
- [18] Chen L, Li ZY, Xu SY, et al. Upregulation of miR-107 inhibits glioma angiogenesis and VEGF expression[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(1): 113-120.
- [19] Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509: 1-10.
- [20] Hydring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs[J]. *F1000Research*, 2013, 2: 136.
- [21] Garrett-Sinha LA. Review of Ets1 structure, function, and roles in immunity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(18): 3375-3390.
- [22] Chen J, Fu Y, Day DS, et al. VEGF amplifies transcription through ETS1 acetylation to enable angiogenesis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 383.
- [23] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAPK signalling in fibroblasts[J]. *Nature*, 2008, 456(7224): 980-984.
- [24] Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs[J]. *Blood*, 2006, 108(9): 3068-3071.
- [25] Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(50): 18081-18086.
- [26] Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2011, 124(6): 720-730.
- [27] 李洁,秦性良,邵宁生. MicroRNA及其靶基因的时空特异性与动态变化[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(7): 617-626.
- [28] Mukhopadhyay D, Knebelmann B, Cohen HT, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(9): 5629-5639.
- [29] Chen Z, Lai TC, Jan YH, et al. Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1057-1067.
- [30] Chen PS, Su JL, Cha ST, et al. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(3): 1116.
- [31] Wu Q, Yang Z, An Y, et al. MiR-19a/b modulate the metastasis of gastric cancer cells by targeting the tumour suppressor MXD1[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1144.
- [32] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(5): 1011-1027.
- [33] Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2002, 90(12): 1243-1250.
- [34] Wilhelm K, Happel K, Eelen G, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium[J]. *Nature*, 2016, 529(7585): 216-220.
- [35] Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, et al. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions[J]. *Lancet*, 2016, 388(10043): 518-529.

[收稿日期] 2021-01-27

[本文编辑] 徐 敏

