

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.050

MicroRNA-126 (miR-126)对血管调节的分子机制*

齐东华 葛红岩 罗鑫 薛大喜 王朝 刘平[△]

(哈尔滨医科大学 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:脉管系统的结构,维护及重塑的精确调节对于血管的正常发育,组织损伤的应答和肿瘤的生长都是必不可少的。最近,越来越多的研究报道了非编码的 RNAs,又叫做 microRNAs 调节内皮细胞对血管原刺激的应答反应。在体内,维持血管内皮细胞和血管的完整性方面 miR-126 是一种重要的血管生成信号调节因子。miR-126 通过负性调控血管生长因子促进血管发生反应,这些血管因子包括血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。因此,miR-126 表达的靶向作用也许对于血管过多或缺乏引起的相关疾病开辟了一种新的治疗方法,这些发现也证实了单一 miRNA 能够调节血管的完整性及血管生成,为调整血管的形态和功能提供了一个新的靶点。本文就当前 miR-126 对血管的调节及分子机制进行综述。

关键词:miR-126;新生血管;靶基因;分子机制

中图分类号:Q75;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)28-5586-05

Molecular Mechanisms of microRNA-126 (miR-126) Regulate Vascular*

QI Dong-hua, GE Hong-yan, LUO Xin, XUE Da-xi, WANG Zhao, LIU Ping[△]

(Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT: Precise regulation of the formation, maintenance, and remodeling of the vasculature is required for normal development, tissue response to injury, and tumor progression. Recently, more and more researchers reported that the response of the vascular endothelium to angiogenic stimuli is modulated by noncoding RNAs called microRNAs. miR-126 is a key regulator of angiogenic signaling in endothelial cells and of vascular integrity in vivo. miR-126 promotes angiogenesis in response to angiogenic growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) or basic fibroblast growth factor (bFGF), by repressing negative regulators of signal transduction pathways. Thus, targeting the expression of miR-126 may be a novel therapeutic approach for diseases involving excess or insufficient vasculature. These findings illustrate that a single miRNA can regulate vascular integrity and angiogenesis, providing a new target for modulating vascular formation and function. We will summarize the current knowledge of molecular mechanisms of miR-126 regulate vascular.

Key words: MiR-126; Angiogenesis; Target Genetic; Molecular Mechanisms

Chinese Library Classification(CLC): Q75; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5586-05

血管系统在维持血流量以提供组织器官营养和氧气是至关重要的。内皮细胞在维护组织和功能性血管动态平衡中发挥核心作用。内皮细胞的定型,增殖,迁移,和组合对于胚胎发育和器官发生是不可避免的^[1]。血管内皮细胞最初从成血管细胞的前体分化,并且通过血管发生的方式进行增殖和移行,形成原始血管丛。血管网由一系列错综复杂的血管组成的,作为血流管道,调节器官的生长及调整损伤后的应答。血管网通过进一步聚集周细胞和血管平滑肌细胞的血管生成和稳定,形成一个有效的循环系统。有几种血管原刺激素在新生血管形成过程及对成熟的血管病理生理调节过程中是不可避免的。例如,分泌生长因子,包括血管内皮生长因子(VEGF),血小板衍生的生长因子(PDGF)和碱性成纤维细胞生长因子(FGF)的家族,绑

定结合到膜结合受体的成员和发送信号通过激酶依赖性信号级联反应等等。这些信号最终导致基因表达的变化,影响内皮细胞的迁移,形态和功能。然而,在内皮细胞微环境中各种各样的血管生成的信号是如何选择性地应答却知之甚少。例如,在血管生成的萌芽过程中血管尖端的柄细胞受到血管内皮生长因子诱导呈定向迁移,而不是增殖。内皮细胞对生长因子应答的调节机制之一是通过对其下游激酶信号级联的抑制^[2-3]。

最近,许多国内外的研究者发现,另一个对血管系统潜在的调节机制可能是通过 microRNA 调节血管内皮细胞生长因子的应答。microRNA 是一类小分子 RNA(约 20-25 核苷酸),其作用是调节靶 mRNA 转录后表达或者使靶 mRNA 的翻译抑制或对靶 mRNA 有去稳定作用^[4-5]。microRNA 的 5' 末端被称

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30973275);黑龙江省自然科学基金项目(QC2010113)

作者简介:齐东华(1983-),男,硕士研究生,主要研究方向:MicroRNAs 的生物学功能,电话:15134568102,

E-mail:Donghuaqi@hotmail.com

[△] 通讯作者:刘平, E-mail:Ping_liu53@hotmail.com

(收稿日期:2013-11-25 接受日期:2013-12-21)

为“种子”序列,其与 mRNA 之间高度保守序列的结合是决定 microRNA 靶基因的一个重要因素,这些高度保守序列作为 mRNA 的可访问性的潜在的结合位点^[67]。在体外培养的血管内皮细胞的 microRNA 表达谱已经确定 microRNAs 可能有助于血管新生的过程^[8-10]。在 microRNAs 中,miR-126 是内皮细胞含量丰富的 microRNA,功能是通过影响血管的完整性和血管基因信号转导通路调节血管发育和血管生成^[11-13]。

虽然一些广泛表达的 microRNA 调节在体外内皮细胞的反应,包括增殖,迁移和形成的毛细血管网络的能力,但内皮细胞特定的 microRNA 在体内功能或他们的靶点应加以说明^[8-10,14,15]。

1 Mir-126 的来源及生物学特性

在分子生物学中的 miR-126 是一个很短的非编码 RNA 分子。小分子 RNA 的功能由几个转录前和转录后调节机制来调节其他基因的表达水平。miR-126 是一个表达在整个毛细血管以及较大的血管内皮细胞的小分子 RNA,作用于不同的转录因子控制血管生成。在内皮细胞中 miR-126 是位于宿主基因 EGFL7 内含子 7 中的 miRNA,miR-126 和 EGFL7 共表达在全血管的发育过程中,在血管内皮细胞中表达量丰富^[9,10,19,20]。

已经证实 miR-126 是血管内皮细胞中表达最丰富的 miRNA,尤其在心脏,肺和其他高度血管化的小鼠组织中^[11,23,24]。此外,从胚胎干细胞或分离的小鼠胚胎内皮细胞中一些 microRNAs 表达量丰富,其中就包括 miR-126,也证明它是一种内皮细胞特定的 microRNA^[12]。在体内,维持血管内皮细胞和血管的完整性方面 miR-126 发挥着重要的积极的血管生成信号调节因子作用^[11-13]。在敲减 miR-126 的斑马鱼和敲除 miR-126 小鼠的试验中发现能够导致血管发育缺陷。例如,降低 miR-126 表达量的斑马鱼中出现血管的破坏和颅内出血,而抑制 miR-126 的小鼠模型中出现新生血管萌芽的延迟,广泛出血及部分胚胎致死^[11-13]。此外,miR-126 成功地完成心肌梗死的模型的突变小鼠的胚胎发育,展示了减少血管生成和增加冠状动脉结扎后的死亡率^[11]。

2 MiR-126 与靶基因的调节机制

2.1 MiR-126 与 VEGF,VCAM-1,SPRED1 和 PIK3R2

已经证实 miR-126 对促血管生成因子 VEGF,EGF 和的失应答会出现内皮细胞的缺陷^[11-13]。通过对胚胎干细胞衍生的内皮细胞 microRNA 的分析,研究者发现了一组内皮细胞表达丰富的 microRNA 包括 miR-126、miR-146、miR-197 和 miR-625。这些小分子 RNA 在小鼠胚胎内皮细胞的发育中也表达丰富。通过 miR-126 在体外和体内的表达模型中表明 miR-126 抑制直接靶基因 SPRED1,VCAM1 和 PIK3R2。

在细胞核中,血管生长因子如 VEGF 和 FGF 通过激活 MAP 激酶途径调节 EC 增殖,迁移和黏附,因此加强 VEGF 和 FGF 基因的表达对于血管发生和维持血管完整性是非常必要的。在内皮细胞中抑制 MAP 激酶信号产生的内皮细胞的缺陷与 miR-126 功能丢失的异常结果类似^[29]。此外,进一步研究证实了 miR-126 对血管内皮生长因子(VEGF)依赖的 PI3 激酶和 MAP 激酶信号的调节是通过它的直接靶基因 PI3KR2 和 SPRED1

来完成的,这两种调节因子分别负调控 VEGF 信号通路。该实验通过敲除 miR-126 的斑马鱼导致胚胎发育过程中血管的完整性的缺失和出血表明了上述机制^[12]。

Sprouty 是一类在全身组织广泛表达的软脂酰化磷蛋白,在机体的信号转导,尤其是受体酪氨酸激酶途径中具有重要调节作用,Mason 等人证明 sprouty 和 sprouty 相关蛋白(SPRED)对生长因子信号呈负调节^[31]。特别是,Sprouty 相关 EVH1 域的含蛋白 1(SPRED1)通过结合和灭活该通路的上游激酶 RAF1 负向调节激活的 MAP 激酶通路^[32-34]。Raf 激酶是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)信号传递的关键调节者。SPRED1 抑制细胞运动和 Rho 介导的 - 肌动蛋白的重组与 miR-126 通过抑制 SPRED1 的表达促进血管生成的结论相一致,这对血管发生的进程很重要^[35]。SPRED1 和其他的 SPRED 家族成员的功能是对生长因子诱导 ERK 活化的膜联合性抑制,并且通过抑制细胞对生长因子的应答信号的方式抑制细胞增殖和迁移的功能^[34]。

三个 SPRED 蛋白中只有 SPRED-1 包含 miR-126 预测的靶序列。虽然研究结果表明,miR-126 在激活前血管原的生成中 SPRED1 发挥了重要的介质作用,但 miR-126 有可能通过与多个靶蛋白联合功能来调节血管生成和血管的完整性。最近 miR-126 已经被证实血管生成过程中有重要作用^[36],和 Wang 等人在小鼠模型实验中也进一步表明通过抑制细胞内血管生成信号抑制剂 SPRED1 的表达增强了 VEGF 和 FGF-1 的促进血管形成的活性^[11]。

在使白细胞运输到炎症部位调节中活化的内皮细胞黏附分子的表达发挥了关键作用。静止的内皮细胞通常不表达粘附分子,但是细胞因子激活内皮细胞表达血管细胞粘附分子-1(VCAM-1),它介导白细胞粘附于血管内皮细胞。研究表明,内皮细胞表达的 microRNA 126(miR-126 的)抑制 VCAM-1 的表达。转染一种寡核苷酸降低 miR-126 在内皮细胞的表达,使 TNF- α 刺激的 VCAM-1 表达的增加。相反,过度的前体的 miR-126 增加了 miR-126 的水平,并降低 VCAM-1 的表达。此外,减少内源性 miR-126 的水平,增加对内皮细胞的白细胞粘附。这些数据表明,microRNA 可以调节黏附分子的表达,并可能提供额外的血管炎症的控制^[38]。

2.2 MiR-126 与 PAK1

p21 激活行激酶(PAK 基因)是丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶,他们通过小的活化形式 Rho GTP 酶 Cdc42 和 Rac1 绑定和激活^[39]。这些基因已经被证明是通过 MAP 激酶级联的转录对细胞骨架动态和细胞活力,细胞死亡和生存信号和细胞周期的进程有重要调节^[40]。靶基因预测分析表明,发现 miR-126a 和 miR-126b 存在共有靶基因,但在本质上是不同的靶基因。通过报告基因分析,确定了新的靶基因 PAK1 受这两种 miRNAs 的不同调控^[41]。在体内的功能获得和功能缺失分析验证 PAK1 在内皮细胞表达受 miR-126 依赖的调节,功能是 miR-126s 下调 PAK1^[41]。这两种 miR-126s 通过相同或不同的靶基因 Pak1 调节血管完整性有其共有功能,PAK1 在细胞与细胞连接的更新调节中是一种重要的骨架调节因子,被确定为 miR-126s 的一个新的靶点。这些结果增加了有关 miR-126s 调节血管的完整性的新的数据,为进一步了解内皮细胞的 miRNA 在血管发育

的功能提供了新的依据^[41]。

2.3 MiR-126 与 P85 β , p38 和 ERK

在培养的内皮细胞中进一步探讨 miR-126 调节血管生成的机制。在人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中转染的 miR-126 发夹抑制剂诱导的大于 95% 的成熟 miR-126 的缺失后,通过划痕试验检测与对照组相比 HUVECs 迁徙能力明显下降,同时发现 miR-126 的缺失后血管内皮生长因子依赖的下游激酶 Akt 激活受损^[42]。miR-126 缺失的内皮细胞中血管内皮生长因子依赖的下游激酶 Akt 激活受损的理论在 miRNA 的靶基因水平得到验证。在共转染实验中,miR-126 的直接抑制 PIK3R2 编码的 PI3 激酶(PI3K)亚单位 p85 β 的表达,而 P85 β 的蛋白质在 miR-126 表达正常的内皮细胞和敲除 miR-126 的 HUVEC 中表达量都增加^[42]。

在脐静脉内皮细胞中无论是敲除 miR-126 的或者是过表达 miR-126 的靶点 P85 β 足以损害血管内皮生长因子介导 PI3K 的下游靶点 Akt 的活化,通过 p85 的过表达并抑制胰岛素受体酪氨酸激酶信号^[43-45]。miR-126 的敲减增加了 VEGF 对 Erk 激活的破坏,在体外试验中进一步证实了,敲减 miR-126 后血管生成的信号转导缺陷。在试验中,Erk 信号通路的抑制剂 SPRED1 被共转染的 miR-126 直接抑制,并在敲减 miR-126 的 HUVEC 中表达上调^[46]。在敲除 miR-126 的小鼠和敲减 miR-126 的斑马鱼的表型中,描述了 miR-126 通过下调 SPRED1 和 p85 β 破坏了血管生成和血管的完整性^[11,12]。

进来,有研究者用氧诱导的视网膜病变(OIR)建立视网膜 NV 模型,探讨一个单一的 microRNA 在缺血诱导的视网膜新生血管(NV)机制中潜在的转录调控和信号转导通路,用质粒 pCMV-MIR-126 与脂质体混合物在小鼠玻璃体内注射进行治疗,对照组使用 pCMV-MIR 与脂质体混合物。分析了 OIR 小鼠的视网膜中 VEGF,IGF-2,HIF-1 α ,磷酸化 p38,ERK 表达水平和 miR-126 的改变。结果发现,miR-126 的玻璃体内注射对进行 CD31 染色部分的视网膜血管无影响,而来自 OIR 小鼠的视网膜 miR-126 显着下降。通过进一步实验确认,在 OIR 模型中 miR-126 通过下调信号分子 p38 和 ERK 在视网膜中的恢复克服了高水平的 VEGF,IGF-2 和 HIF-1 α 的作用,同时 miR-126 的玻璃体内注射减少 OIR 模型的视网膜新生血管的生成。这些结果表明,miR-126 在糖尿病性视网膜病变的发病机制中可能发挥的潜在的转录作用^[47]。

2.4 MiR-126 与 Ets-1 和 Ets-2

转录因子 Ets(E26 转型的特定序列)是一个具有高度保守的 DNA 结合结构域的转录因子家族,调节细胞的发育,衰老,死亡和肿瘤的发生^[48-50]。Ets 家族的几个成员在血管内皮细胞中表达,并已在血管生成,炎症反应和血管重塑过程中发挥作用^[48-51]。例如,Ets-1^{-/-} 的小鼠对血管紧张素 II 诱导的炎症反应缺陷,在发育的鸡中将 Ets-1 和 Ets-2 都敲除会导致心脏发育受损^[16,52]。为了确定 Ets 家族的哪些成员可以调控 miR-126 的表达,在血管内皮细胞中过表达了几个 Ets 家族。结果发现,过表达的 Ets-1 或 Ets-2 能够使 miR-126 升高 15 倍。而在人脐静脉内皮细胞中敲减 Ets-1 后 miR-126 的表达降低约 15%。敲减 Ets-2 的 miR-126 的表达降低约 20%。共同敲减 Ets-1 和 Ets-2 的 miR-126 的表达降低约 35%,这些数据表明,这两个 Ets-1

和 Ets-2 调控 miR-126 的表达,但 Ets-2 发挥更重要的作用。这些数据也意味着,其他转录因子在内源性 miR-126 表达的方面也发挥作用,或 miR-126 的表达在非常稳定的水平,仅部分临时敲减 Ets-1 和 Ets-2 受到影响^[38]。

研究发现,Ets-1 和 Ets-2 调控 miR-126 的表达。Ets-1 和 Ets-2 相互与 mir-126/Egfl7 基因上游的基因组区域的 Ets 绑定位点结合。大量 Ets 绑定位的降低促进反式激活和降低 miR-126 的表达。沉默的 miR-126 也限定 Ets 抑制靶基因的能力^[38]。通过 Ets 基因敲除小鼠和 miR-126 基因敲除小鼠的表型研究表明两者之间的连接。Ets-1 和 Ets-2 的突变体小鼠导致血管形成异常^[16-18]。miR-126 的突变体也导致血管异常,部分胚胎致死的,和血管生成缺陷^[11-13]。Ets-1 和 Ets-2 转录基因如 miR-126 的缺失表达可能导致血管发生的异常。如 Ets-1 和 Ets-2 可能通过 miR-126 的靶基因 SPRED1 和 PI3KR 介导的在血管发育的影响^[11,12]。

研究数据还表明通过 Ets 和 miR-126 影响血管炎症一个负反馈回路。促炎激动剂如 TNF- α 和血管紧张素 II 受体诱导的 ET-1 的表达,从而激活转录的促炎性介质(如 MCP-1 和 VCAM-1)^[52]。然而,Ets-1 诱导 miR-126 的抑制 VCAM-1 的翻译^[23]。因此,Ets-1 在血管炎症的网络影响可能部分依赖于 Ets-1 诱导促炎症因子和 Ets-1 诱导的抗炎因子之间的平衡,如 miR-126^[38]。

2.5 MiR-126 与 Ang-1

血管形成依赖于各种血管生成调节因子的高度协调行激活。血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素 1(Ang-1 的)是两种有效的和必需的促血管生成因子,发挥血管发育和功能互补作用。VEGF 对于血管丛的形成是必要的,而 Ang-1 有助于血管生长的稳定和成熟^[21]。这一结果表明了一个新的 Ang-1 的信号调节的 miRNA 依赖的分子机制,其作用是稳定成熟血管。实验数据表明,成熟的血管内皮细胞高表达的 miR-126,主要靶点是磷酸肌醇 3 激酶调节亚基 p85 β 。在内皮细胞中下调的 miR-126 和 p85 β 的过度表达抑制 Ang-1 的生物学功能^[21]。此外,在敲除 miR-126 的斑马鱼导致血管的重构和成熟缺陷,表现为 Ang-1 的损失的功能表型^[21]。这一研究结果表明,miR-126 的介导的磷酸肌醇 3 激酶调节,不仅调节 VEGF 的信号,但它强烈地增强了 Ang-1 对血管的稳定和成熟的作用。

2.6 MiR-126 与 klf2a

循环系统内部,血流调节血管重塑,促进造血干细胞的形成,血管疾病的病理中起到了重要作用。在脊椎动物胚胎发育过程中,在形成循环系统之前血管图案受保守的基因通路的初步指导。随后,血管内皮细胞必须将这些早期信号的血流刺激机制合并来形成胚胎血管系统。然而,在循环系统发育过程中如何将信号都整合的一些细节却鲜为人知。

为了研究这个过程,研究者专注于主动脉弓(AA)的血管,众所周知这段血管的改造受血流的影响。通过使用光子成像仪器在活斑马鱼胚胎中观察到血管生成 AA 的过程中血流是必不可少。研究者进一步找到,AA 血管萌芽的生成需要血流诱导信号,该信号由机械敏感的锌指转录因子 klf2a 诱导内皮细胞特定的 microRNA 既 miR-126 的表达激活血管内皮细胞生长因子的信令^[22]。综上所述,该研究介绍了内皮细胞中的 microRNA

促进一种生理刺激与血管内皮细胞生长因子信号的整合来指导血管生成一种新的遗传机制。

Jian-Jun Chen, Sheng-Hua Zhou 等在小鼠心肌梗死模型中证实移植过表达 miR-126 的骨髓间充质干细胞(MSCs)能增强小鼠心肌梗死的血管生成。其机制可能是 miR-126 分别抑制 SPRED1 和 PIK3R2 的表达,SPRED1 和 PIK3R2 通过 ERK 和 AKT 负调控 VEGF 信号途径。这项研究表明,通过联合移植 miR-126 转染的细胞的治疗将能够为缺血性心脏病提供一种新的治疗策略^[25]。

2.7 MiR-126 与 EGFL7

miR-126 的也被定位于表皮生长因子样结构域 7(EGFL7)基因内。EGFL7 可能通过促进 VEGF 信号在血管生成和维持血管的完整性中有重要作用^[26]。

EGFL7 是内皮细胞分泌的细胞外基质蛋白,在斑马鱼中,有调节胚胎血管的组成作用^[27,28]。基于 miR-126 和 EGFL7 基因的共同表达,研究者发现,在哺乳动物中 miR-126 起源于 EGFL7 mRNA 前体的一个固定的内含子中。

最近,EGFL7 基因敲除小鼠显示血管异常明显类似于 miR-126 敲除的小鼠^[29]。在这些小鼠突变模型报告中的结果表明缺乏 EGFL7 转录,表明 miR-126 的表达也被消除。然而,在实验中并没有检测 miR-126 的表达,因此这种模型鼠的表型用来解释 miR-126 的功能缺失的可能性还欠考虑。因此,miR-126 和 EGFL7 基因之间的调节关系还有待于进一步研究和证实。

3 展望

目前,miR-126 相关的靶基因已经有大量的文献报道,但其分子机制的研究还需要进一步的证实和完善,其生物学功能及作用仅限于理论水平的研究,如要将其应用于临床还需要更多的实验证实。

最近的研究报告指出,内皮细胞丰富的 miR-126 在缺血性心脏衰竭患者表现为循环水平较低^[30]。这对于缺血诱导新生血管和维持内皮细胞功能是必不可少的^[11,12]。miR-126 的水平与脑钠肽(BNP)血清水平呈负相关,在纽约心脏协会分类中也证明了缺血性心脏衰竭患者临床症状改善与 miR-126 水平的提高有相关性^[30]。虽然一些研究表明了血管内皮功能和血管生成的缺陷与心脏衰竭有关^[31],但是 miR-126 水平降低的生物学意义仍有待确定。在糖尿病患者中,分析了 822 个人的血清样品 miRNAs 发现 miR-126 的下调最显著,表明 miR-126 的水平降低与糖尿病的发病风险相关^[32]。这些研究结果与 miR-126 血管保护功能是一致的。此外,在暴露于葡萄糖微粒的体外内皮细胞和在糖尿病小鼠的体内模型中均进一步证实 miR-126 水平的下调^[33]。血管也是肿瘤生长必不可少的,所以抑制新血管的形成,也可以防止肿瘤的生长。支配血管的形成的信号和转录途径得到了很好的研究,在这些知识的基础上形成新的治疗方法^[34]。内皮细胞特有的 microRNA 调节血管生成的信号和血管完整性机制的证实,代表生物学的许多方面的进步,包括癌症的发展和组织损伤的应答。

经过大量实验研究表明了,miR-126 在血管生成及维持血管完整性方面发挥重要作用,在血管的病理及生理进程方面也起到重要的调节作用,这些发现为未来对血管相关性疾病的研

究开辟了新的道路。也提示 miR-126 未来可能成为血管性疾病治疗的新靶点。

参考文献(References)

- [1] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. Nature, 1997, 386: 671-674
- [2] Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis[J]. Nature, 2007,445:776-780
- [3] Jones CA, London NR, Chen H, et al. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability[J]. Nature medicine, 2008, 14: 448-453
- [4] Wu L, Belasco JG. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs[J]. Molecular cell, 2008, 29:1-7
- [5] Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. Trends in biochemical[J]. Sciences, 2007, 32: 189-197
- [6] Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition[J]. Nat Genet, 2007,39:1278-1284
- [7] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. Nature, 2005, 436: 214-220
- [8] Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, et al. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells[J]. Circ. Res, 2007, 100: 1164-1173
- [9] Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs[J]. Blood, 2006, 108: 3068-3071
- [10] Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis [J]. Circ Res, 2007, 101: 59-68
- [11] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. Dev Cell, 2008, 15: 261-271
- [12] Fish J E, Santoro MM, Morton SU, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. Dev Cell, 2008, 15: 272-284
- [13] Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Eglf7 locus to the microRNA miR-126[J]. Development, 2008, 135: 3989-3993
- [14] Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5[J]. Blood, 2008,111: 1217-1226
- [15] Lee DY, Deng Z, Wang CH, et al. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007a, 104: 20350-20355
- [16] Lie-Venema H, Gittenberger-de Groot AC, et al. Ets-1 and Ets-2 transcription factors are essential for normal coronary and myocardial development in chicken embryos[J]. Circ Res, 2003, 92:749-756
- [17] Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, et al. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2 [J]. Genes Dev, 1998, 12: 1315-1326
- [18] Barton K, Muthusamy N, Fischer C, et al. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice [J]. Immunity, 1998, 9: 555-563
- [19] Fitch, M. J. Campagnolo, L. Kuhnert, F, et al. Eglf7, a novel epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells [J]. Dev.

- Dyn, 2004, 230, 316-324
- [20] Kloosterman, W. P. and Plasterk, R. H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease [J]. *Dev Cell*, 2006, 11, 441-450
- [21] Sessa R, Seano G, di Blasio L, et al. The miR-126 regulates angiopoietin-1 signaling and vessel maturation by targeting p85 β [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(10): 1925-1935
- [22] Stefania Nicoli, Clive Standley, Paul Walker, et al. microRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signaling during angiogenesis[J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1196-1200
- [23] Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 1516-1521
- [24] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing [J]. *Cell*, 2007, 129: 1401-1414
- [25] Chen Jian-jun, Zhou Sheng-Hua. Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway[J]. *Cardiology Journal*, 2011, 18(6): 675-681
- [26] Nikolic I, Plate KH, Schmidt MH. EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance[J]. *J Angiogenesis Res*, 2010, 2: 9
- [27] De Maziere, A. Parker, L. Van Dijk, S. et al. Egfl7 knockdown causes defects in the extension and junctional arrangements of endothelial cells during zebrafish vasculogenesis[J]. *Dev. Dyn*, 2008, 237: 580-591
- [28] Parker, L. H. Schmidt, M. Jin, S. W. et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation[J]. *Nature*, 2004, 428: 754-758
- [29] Schmidt M, Paes K, De Maziere A, et al. EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution[J]. *Development*, 2007, 134: 2913-2923
- [30] Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, et al. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure[J]. *Circ J*, 2011, 75: 336-340
- [31] Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, et al. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling[J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16: 45-54
- [32] Nonami A, Kato R, Taniguchi K, et al. Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 52543-52551
- [33] Taniguchi K, Kohno R, Ayada T, et al. Spreds are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 4541-4550
- [34] Wakioka T, Sasaki A, Kato R, et al. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling[J]. *Nature*, 2001, 412: 647-651
- [35] Miyoshi K, Wakioka T, Nishinakamura H, et al. The Sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 5567-5576
- [36] Meister J, Schmidt MH. miR-126 and miR-126*: new players in cancer[J]. *ScientificWorldJournal*, 2010, 10: 2090-2100
- [37] Walsh K, Shiojima I. Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 3176-3179
- [38] Tamia A. Harris, Munekazu Yamakuchi, Marcella Ferlito, et al. Lowenstein. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1 [J]. *PNAS*, 2008, 105: 1516-1521
- [39] Manser E, Leung T, Salihuddin H, et al. A brain serine/ threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1 [J]. *Nature*, 1994, 367: 40-46
- [40] Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72: 743-781
- [41] Jun Zou, Wen-Qing Li, Qing Li, et al. Two Functional MicroRNA-126s Repress a Novel Target Gene p21-Activated Kinase 1 to Regulate Vascular Integrity in Zebrafish [J]. *Circ Res*, 2011, 108(2): 201-209
- [42] Frank Kuhnert, Michael R. Mancuso, et al. Attribution of vascular phenotypes of the murine Egfl7 locus to the microRNA miR-126[J]. *Development*, 2008, 135: 3989-3993
- [43] Barbour, L. A. Mizanoor Rahman, S. Gurevich, I., et al. Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess[J]. *J. Biol. Chem*, 2005, 280: 37489-37494
- [44] Brachmann, S. M., Ueki, K., Engelman, J. A., et al. Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice [J]. *Mol. Cell. Biol*, 2005, 25: 1596-1607
- [45] Ueki, K. Fruman, D. A., Brachmann, S. M., et al. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival [J]. *Mol. Cell. Biol*, 2002, 22: 965-977
- [46] Taniguchi K, Kohno R, Ayada T, et al. Spreds are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling[J]. *Mol. Cell. Biol*, 2007, 27: 4541-4550
- [47] Bai Y, Bai X, Wang Z, et al. MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(1): 471-477
- [48] Oettgen P. Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors[J]. *Circ Res*, 2006, 99: 1159-1166
- [49] Turner DP, Findlay VJ, Moussa O, et al. Defining ETS transcription regulatory networks and their contribution to breast cancer progression[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 102: 549-559
- [50] Dejana E, Taddei A, Randi AM. Foxs and Ets in the transcriptional regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775: 298-312
- [51] Sato Y. Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis[J]. *Cell Struct Funct*, 2001, 26: 19-24
- [52] Zhan Y, Brown C, Maynard E, et al. Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2508-2516
- [53] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes[J]. *Circ Res*, 2010, 107: 810-817
- [54] Lien S, Lowman HB. Therapeutic anti-VEGF antibodies [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, 131-150