

文章编号: 1004-0374(2010)02-0133-06

microRNA 在肌肉发育中的功能研究进展

王星果^{1, 2}, 郁建锋¹, 顾志良^{1*}

(1 常熟理工学院生物科学与工程系, 常熟 215500; 2 苏州大学基础医学与生物科学学院, 苏州 215123)

摘要: microRNA (miRNA) 是一类非编码的小 RNA 分子, 它通过对靶 mRNA 的翻译抑制和降解对基因表达起负调节作用。现在人们已经清楚地知道 miRNA 参与了增殖、分化、凋亡、发育等许多生物过程。一些 miRNA 在肌肉中特异表达, 参与肌肉发育。该文重点介绍了参与肌肉发育的 miRNA。已有证据表明肌肉 miRNA 在肌肉的增殖和分化过程中起了重要的调节作用, miRNA 的调节异常和肌肉疾病有关。因此, miRNA 是一类新的肌肉调控因子, 它有可能成为畜禽肉产量提高和肌肉相关疾病治疗的新型靶标。

关键词: miRNA; 骨骼肌; 心肌; 发育

中图分类号: Q341; Q522.2; Q445 **文献标识码:** A

Function of microRNA in muscle development

WANG Xing-guo^{1,2}, YU Jian-feng¹, GU Zhi-liang^{1*}

(1 Department of Life Science and Technology, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China; 2 College of Basic Medicine and Life Science, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: microRNAs (miRNA), a class of small noncoding RNAs, negatively regulate gene expression by translational repression and degradation of target mRNA. Now it has been clear that miRNAs are involved in many biological processes, including proliferation, differentiation, apoptosis and development. Some miRNAs are specifically expressed in muscle and involved in muscle development. In this review, we show the miRNAs involved in muscle development. There are evidences demonstrating that muscle miRNAs play an important role in regulating muscle proliferation and differentiation. Dysregulation of muscle miRNAs is related to muscle diseases. Therefore, miRNAs are a new class of regulators of muscle. They may become novel targets in optimization of muscle quantity of domestic animals and therapy of muscle related diseases.

Key words: miRNA; skeletal muscle; cardiac muscle; development

microRNA 是一类非编码的约 22 个核苷酸长度的 RNA 分子, 是基因表达的重要调控因子^[1]。miRNA 广泛存在于各种生物体中, 它们通常在进化上是保守的, 而有一些 miRNA 特定存在于某种生物体或其某种组织。miRNA 在细胞增殖、分化、凋亡和肿瘤发生等基本生物过程中起作用。研究发现一个亚类 miRNA 在肌肉组织中特异存在, 特别是在骨骼肌和心肌中起着十分重要的作用^[2, 3]。本文对这些肌肉中的 miRNA 功能的最新研究进展做一综述。

1 miRNA 的生成和作用机制

成熟 miRNA 是一条长度大约为 18~24 nt 单链 RNA, 由转录本 primary-miRNA (pri-miRNA) 加工而成: 首先, miRNA 基因通过 RNA 聚合酶 II 转录出 pri-miRNA, pri-miRNA 含有 5' 帽子结构和 3' 多聚腺苷酸尾巴^[4-6]; 接着, 微加工复合体 (microprocessor

收稿日期: 2009-07-14; 修回日期: 2009-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871789)

*通讯作者 E-mail: zhiliangu88@hotmail.com

complex)切割 pri-miRNA, 在 RNase 酶III Droscha 和 DGCR8 作用下产生约 70 nt 长度的中间体 pre-miRNA (precursor-miRNA), 它具有茎环样特征结构^[7, 8]; 然后 Exportin-5 识别 pre-miRNA, 在 G 蛋白 Ran 的帮助下, 将 pre-miRNA 从细胞核运输到细胞质中^[9, 10]。而另一种内含子型 miRNA 基因 *mirtron* 被转录成 pri-miRNA 后, 内含子被切割、释放, 此内含子精确模仿 pre-miRNA 结构特征。它的加工过程不需要 Microprocessor^[5]。在细胞质中, pre-miRNA 的两条链均被另一种 RNase 酶III Dicer 切割, 形成 22 nt 的双链^[11, 12], 解链后, 成熟的 miRNA 进入一种核糖核蛋白复合体, 即 R N A 沉默复合体 (RISC)。RISC 含有一个 miRNA 和一个 mRNA 靶点, 还包含 Argonaute 蛋白家族成员和辅助因子^[13], 它通过 miRNA 与靶 mRNA 3'-UTR 内的靶序列互补配对介导对靶基因表达的调节^[14]。一般不完全互补导致翻译抑制, miRNA 5' 端第 2~8 个核苷酸序列, 也被称为种子序列, 往往和 mRNA 完全互补^[1]。而完全或近完全互补导致 mRNA 直接切割, 但也有些动物 miRNA 能靶向 mRNA 3'-UTR 的局部互补序列, 介导 mRNA 降解^[15]。miRNA 介导的翻译抑制或 mRNA 降解有可能在一种 P 小体 (processing bodies, P-bodies) 中进行^[16]。

2 骨骼肌和心肌中 miRNA 的表达

肌肉 miRNA 的表达调节在很大程度上受到 MyoD、MEF2、SRF、myocardin 和 Twist 等肌肉转录因子的调控^[17-19]。研究发现, 一些 miRNA 在骨骼肌和心肌中均有表达, 另一些 miRNA 只在骨骼

肌或心肌中特异表达, 而 miR-1 和 miR-133 在骨骼肌和心肌中都有表达, 进一步发现 *miR-1-1* 和 *miR-133a-2* 基因簇位于同一条染色体上, *miR-1-2* 和 *miR-133a-1* 基因簇位于另一条染色体上^[20]。Zhao 等^[17]发现 SRF 可结合 *miR-1/miR-133* 基因的上游增强子, 从而促进 miR1、miR-133 表达, 当 myocardin 同时存在, 表达会增强。在 *miR-1-2* 和 *miR-133a-1* 编码区之间的内含子中含有基因内增强子, MEF2 通过与这个增强子结合直接调节这些 miRNA 的表达。在生肌节和骨骼肌纤维中, MEF2 和 MyoD 一起调节 *miR-1-2/miR-133a-1* 的基因内增强子, 在骨骼肌的这个增强子中含有一个保守性的 E-box 区, 它是 MyoD 和它的搭档蛋白 E12 结合的部位。另外, 在 *miR-1-1/miR-133a-2* 基因中也含有类似的基因内增强子^[20]。miRNA 在骨骼肌中的特异表达主要受转录因子 MyoD/MEF2 调控, 在心肌中的特异表达主要受转录因子 SRF/myocardin 调控。miRNA 的表达除了在转录水平上受到调控, 可能也在转录后 pre-miRNA 分化加工过程中受到调控。如在由功能超载引起的骨骼肌肥大中, pri-miR-1-2、pri-miR-133a-2 表达增加, 而成熟 miR-1、miR133a 表达反而下降, 提示 miRNA 的表达可能还受到转录后调节^[21]。

3 miRNA 在骨骼肌中的功能

骨骼肌的发育是肌肉发育研究的重要课题, 表 1 中列出了一些在肌肉生长发育中起作用的 miRNA 及其作用靶标和功能。在体外培养的肌细胞中, 过表达 (over-expression) 和敲低 (knock-down) 实验已经发现了 miR-1、miR-133、miR-206 等一些肌肉

表 1 miRNA 与肌肉发育

miRNA	表达组织	靶标	功能
miR-1	骨骼肌、心肌	HDAC4、Hand2、Delta、HSP60、HSP70、Kend2、HCN2、HCN4	促进肌肉分化, 控制心肌电传, 调控心脏自动节律性 ^[17, 18, 33, 35, 36, 38]
miR-133	骨骼肌、心肌	SRF、nPTB、HERG、RhoA、Cdc42、Nelf-A/WHSC2、HCN4	促进肌细胞增殖, 调控可变剪接, 控制心肌电传导, 抑制心肌肥大, 调控心脏自动节律性 ^[18, 28, 34, 37, 38]
miR-206	骨骼肌	Polr1a1、Cx43、Fstl1、Utrn	促进骨骼肌分化 ^[22, 26, 27]
miR-181	骨骼肌、心肌	Hox-A11	促进肌肉分化和再生 ^[31]
miR-214	体节	su(fu)	指定肌细胞命运 ^[32]
miR-208	心肌	THRAP1	调节压力应答下的心脏生理 ^[39]
miR-21	心脏成纤维细胞	Spry1	促进心肌肥大 ^[40]
miR-195	心肌		促进心肌肥大 ^[41]
miR-29	骨骼肌、心肌	YY1	促进肌肉祖细胞成熟 ^[42]

miRNA 的功能^[18,22]。miR-1 和 miR-206 促进成肌细胞分化,而 miR-133 则抑制成肌细胞分化,促进成肌细胞增殖。miR-1 和 miR-206 含有共同的种子序列,它们属于同一个基因家族,而 miR-133 跟它们不同。将 miR-1、miR-133 注射进胚胎的在体实验也证实,miR-1 促进肌肉分化,而 miR-133 抑制肌肉分化,促进成肌细胞增殖^[18]。值得注意的是,miR-1 和 miR-133 虽然起相反的作用,但它们却来自相同的 miRNA 多顺反子,而且一起转录。这看似矛盾,要解释这种现象,需要对它们的靶点进行鉴定和研究分析。

由于用同源性检索的方法鉴定动物 miRNA 的靶点比较困难(因为大多数 miRNA 与它们的靶点并非完全互补),近年来,开发了一些利用软件分析 miRNA 靶点的方法,虽然各有侧重点,但它们主要是根据已知 miRNA 靶点序列保守性和特征来预测新的 miRNA 靶点^[23-25]。

miR-1 在骨骼肌中的一个重要靶点是组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC4),HDAC4 抑制肌肉分化和骨骼肌基因表达,该作用主要是通过抑制 MEF2C(一种重要的肌肉相关转录因子)完成的,因此,miR-1 在分化过程中上调会减少 HDAC4 表达,给予 MEF2C 前肌源活性,促进肌肉分化。miR-133 的一个重要靶点是血清应答因子(serum response factor, SRF),miR-133 通过降低 SRF 蛋白水平促进成肌细胞增殖,与 miR-1 的功能相反^[18]。miR-206 靶向 DNA 聚合酶 α (DNA pol α)的 p180 亚基(Pola 1),介导 DNA pol α 的 mRNA 的切割^[22],从而负调控 DNA pol α 的翻译,抑制 DNA 合成,最终促进肌肉分化;miR-206 靶向 connexin43(Cx43),因为骨骼肌细胞融合需要 Cx43 表达,所以对它的抑制能够促进肌肉细胞分化^[26]。在肌肉分化中,miR-206 还介导 MyoD 依赖的对类滤泡抑素1(follistatin-like 1, Fstl 1)和 Utrophin(Utrn)基因的抑制^[27]。miR-133、miR-1/206 也抑制多聚嘧啶束结合蛋白(poly pyrimidine tract-binding protein, PTB)和它的同源物 nPTB 的翻译。nPTB/PTB 是可变剪接的一类调节因子,抑制多种转录本的可变剪接,miR-133、miR-1/206 通过对它们的调节从而影响肌肉分化程序^[28]。但除了 nPTB/PTB,miR-133、miR-1/206 可能还通过其他机制调节可变剪接,因为抑制 miR-133 比抑制 miR-133 和 miR-1/206 对可变剪接的影响更大^[29]。肌肉特异性 miRNA 参与控制骨骼肌生长的另一

个证据来自对 Texel 羊的研究,Clop 等^[30]的研究发现,在羊的 Texel 品种中造成肌肉异常发达的突变是由于编码肌肉生长抑制素(Myostatin)的 mRNA 3'-UTR 的一个位置上的 G 变为 A,该突变制造了一个 miR-1 和 miR-206 的靶位,从而导致 Myostatin 的翻译受到抑制,Myostatin 水平降低,使得 Texel 羊肌肉发达。除了这些在肌肉中特异表达的 miRNA,还有一些非特异表达的 miRNA 在肌肉发育中发挥作用,譬如 miR-181 就是一种在多种组织中广泛表达的 miRNA,研究发现,它在再生骨骼肌中表达增加,说明它在骨骼肌再生中起作用。miR-181 的一个靶点是同源盒蛋白 Hox-A11, Hox-A11 能抑制肌肉转录因子 MyoD 的表达。在骨骼肌中 miR-181 在分化过程中上调并靶向 Hox-A11,允许新的肌肉生长,而去除 miR-181 则会抑制成肌细胞分化^[31]。还有一些短暂表达的 miRNA 对肌肉的发育起作用,如斑马鱼的 miR-214 在早期分节运动阶段的体节中表达,它的靶点是 su(fu),su(fu)是 Hedgehog 信号的负性调控子。Hedgehog 信号是肌细胞特化所必需的,所以 miR-214 通过调节 Hedgehog 信号进而指定肌细胞命运^[32]。

4 miRNA 在心肌中的功能

心脏的功能主要由心肌完成,心肌中的 miRNA 对心肌的发育起重要作用。miR-1 调控心肌细胞的大小和数量,促进心肌分化。它的一个靶点是心脏转录因子 Hand2, Hand2 可促进心室肌细胞扩大。miR-1 可以抑制 Hand2 的表达,所以 miR-1 在心脏中的过表达使 Hand2 蛋白水平下降,从而减少心室肌细胞扩大,减少增殖的肌细胞数量,促进心肌分化^[17]。在果蝇中,miR-1 靶向 Notch 的配体 Delta 的 mRNA,抑制 Delta 的翻译,进而影响 Notch 信号通路,对心肌细胞的分化起促进作用^[33]。miR-133 在心脏中的过表达也会减少心肌肥大,RhoA(一种 GDP-GTP 交换蛋白)、Cdc42(一种信号转导激酶)、Nelf-A/WHSC2(一种参与心脏发生的细胞核因子)都是 miR-133 的靶位,它们在心肌肥大中发挥作用,其中 RhoA 和 Cdc42 参与细胞骨架和肌纤维的重排,miR-133 对它们起抑制作用,从而减少心肌肥大^[34]。线粒体死亡是细胞凋亡的一个主要机制,HSP60、HSP70 抑制线粒体死亡,caspase9 促进线粒体死亡。在心肌细胞中,miR-1 抑制 HSP60、HSP70 表达,促进凋亡;miR-133 抑制 caspase9 表达,抑

制凋亡。miR-1 和 miR-133 在心肌细胞命运的调节中起相反的作用^[35]。

miR-1 和 miR-133 也参与调节心脏中的电传导。miR-1 基因缺失导致钾通道 Kcnd2 的下调, 从而表现心脏电传导的异常^[36]。miR-1 还调节心脏节律性, miR-1 在心肌中的过表达促进缺血性心律失常, 而 miR-1 的降低则会阻抑由心肌梗塞引起的心律失常。miR-133 也调节心脏节律性, miR-133 在心肌中的过表达抑制 HERG 的表达, HERG 编码一种负责快速延迟整流 K⁺ 电流 (I_{Kr}) 的 K⁺ 通道。在糖尿病小鼠心脏中, miR-133 抑制 HERG K⁺, 从而导致 I_{Kr} 表达下降, 致使复极化变慢, QT 期延长^[37]。HCN2 和 HCN4 是心脏中的两个起搏点通道蛋白, 它们的增加会导致心律失常, 而 miR-1 靶向 HCN2 和 HCN4, miR-133 靶向 HCN2, 这样, 在肥大心脏中由于 miR-1 和 miR-133 的下调, 使得 HCN2 和 HCN4 再表达, 从而影响心脏的自动节律性^[38]。

另外, 心脏疾病的一个标志是肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MHC) 的表达从 α -MHC (一种快收缩肌球蛋白) 向 β -MHC (一种慢的胚胎肌球蛋白) 的转变, 它受到 miR-208 的调节, 而 miR-208 又是由 α -MHC 基因的内含子 29 编码的, 由此可见 miR-208 和 α -MHC 的联系很紧密, miR-208 还在心肌细胞肥大和纤维化中起重要作用。在 miR-208 靶位中有一个是甲状腺激素受体相关蛋白 1 (thyroid hormone receptor associated protein 1, THRAP1), 它是甲状腺激素受体的一个辅因子, 对 β -MHC 的启动子有抑制效应。因为甲状腺激素 T3 诱导 α -MHC, 而甲状腺功能减退则导致 β -MHC 表达过度增加, 所以, 在压力应答和甲状腺功能减退的成年心脏中, miR-208 能特异性活化 β -MHC, 进而调节心脏生理^[39]。最近有研究显示, 心脏成纤维细胞中的 miRNA 也会对心肌起调节作用。在受损心脏中, miR-21 表达水平选择性地成纤维细胞中上升, 通过抑制 Spry1 蛋白的表达, 从而增强 ERK-MAP 激酶 (细胞外信号调节激酶-促分裂原活化蛋白激酶) 活性。这种机制促进成纤维细胞存活和生长因子分泌, 显著促进间质纤维化和心肌肥大。而特异性反义寡核苷酸对 miR-21 的沉默可降低心脏 ERK-MAP 激酶活性, 抑制间质纤维化和心肌肥大, 减缓心脏功能失调^[40]。

5 miRNA 与肌肉疾病

在肌肉中, miRNA 的异常表达与某些肌肉相关

疾病有紧密联系。Digeorge 综合征是一种由染色体缺失引起的先天性疾病, 它与 *DGCR8* 基因缺失有关, 症状包括心脏缺陷和颅面异常。*DGCR8* 基因的表达产物 DGCR8 和 Drosha 相互作用形成微加工复合体。DGCR8 能指导 Drosha 切割, 对 pri-miRNA 加工成 pre-miRNA 起关键作用^[3, 8], 它的缺失导致 miRNA 功能的衰减, 这可能是 Digeorge 综合征的一个致病原因。前面提到的几种心脏疾病也与 miRNA 关系密切, 如心肌肥大、心律失常, 都与 miR-1、miR-133、miR-208、miR-21 的一种或几种的表达异常有关, 另外 miR-195 在心肌肥大过程中表达上调, 它诱导培养的心肌细胞的肥大生长^[41]。在心力衰竭的患者中也发现 miRNA 表达的失调。miRNA 也与一些肌肉癌相关, 最近的一项研究显示, 肌细胞需要 miR-29 以达到成熟状态, 而横纹肌肉瘤的细胞中几乎不存在 miR-29。横纹肌肉瘤是由未成熟肌细胞增殖导致的一种癌症, 横纹肌肉瘤细胞中含有高浓度的 NF- κ B 蛋白, 这种蛋白和 YY1 能沉默 miR-29 基因的活性, 使 miR-29 的作用被切断, 从而阻止肌肉祖细胞的成熟, 而 miR-29 能靶向 YY1, 抑制肿瘤生长并刺激分化^[42]。由此可见, miRNA 可作为肌肉相关疾病潜在的治疗靶标, 比如用反义 miRNA 抑制参与发病机制的 miRNA 的表达, 对 miRNA 互补的寡核苷酸进行化学修饰 (如 2'-O-甲基修饰)^[43], 还可以用专门指向特异 mRNA 靶位的 miRNA 或 miRNA 类似物增强有益 miRNA 的表达。另一个有希望的治疗性方法是开发能调节疾病相关 miRNA 的表达和活性的药物。

6 展望

miRNA 代表了一类新的基因表达的调控因子, 但目前在这方面的研究还很少。我们对 miRNA 的机制、功能还没有系统、深入的了解, 对肌肉 miRNA 的了解也非常有限。在肌肉中, 鉴定新的 miRNA、寻找 miRNA 的靶标、确定 miRNA 的功能, 这些都是需要去做的工作。

肌肉生长发育的研究是生命科学研究中的一个重要课题。由于 miRNA 在肌肉发育中的作用越来越突出, 而 miRNA 参与肌肉发育调控的细节仍不是很清楚, 这就需要我们加大这方面的研究力度。在各种动物的肌肉中, 寻找新的 miRNA, 对 miRNA 的不同靶基因进行标识, 鉴定 miRNA 的各种功能, 将使我们肌肉细胞的增殖、肌肉细胞的定向分化、

肌纤维膨大的启动的分子机制有更加深入的认识。其他组织细胞中的一些 miRNA 对肌肉发育也有间接的调控作用, 对这些 miRNA 进行研究也很有必要。另外, 在肌肉生长发育过程中, 有一些 miRNA 靶标的表达产物对于肌肉发育是否正常起着关键性作用, 对这些 miRNA 的研究则显得尤为重要。肌肉中有一些 miRNA 和靶标存在反馈作用, miRNA 调节靶标的表达, 靶标反过来也调节 miRNA 的表达, 在肌肉生长发育过程中, 它们处于动态平衡中, 这类反馈作用及其平衡的维持机制也是一项重要的研究课题。总之, 对于肌肉 miRNA 的研究, 其主要目的是阐明肌肉 miRNA 及其靶 mRNA 的信息网络, 弄清 miRNA 在肌肉生长速度和分化中的调控机制。在农业生产方面, 通过在畜禽中寻找影响肌肉产量和品质的 miRNA 及其关键靶基因, 弄清其调控机理。研究表明, 多萨特羊 2 号染色体上高产肉 QTL 的分子机理, 是由于 Myostatin 基因 3' -UTR 的一个碱基 G 突变为 A, 导致该区域突变为 miR-1 和 miR-206 的靶序列, 而 miR-1 和 miR-206 是在肌肉中表达量非常高的 miRNA, 从而造成 Myostatin 蛋白的表达量降低^[30], 这一结果使得数量遗传学和分子遗传学机制得到了有机的统一。在其他动物中是否也存在同样的机制, 这也是动物遗传育种工作者感兴趣的问题。microRNA 的研究为进一步提高畜禽肉产量和品质提供新的分子生物学方法。目前, 我们实验室正在致力于 miRNA 对鸡的骨骼肌生长发育功能的研究, 取得了一定的进展。在医学领域, 寻找肌肉疾病相关的 miRNA, 对这些 miRNA 的表达进行调控, 抑或对它们的结构进行化学修饰, 以调节其靶标的表达, 为肌肉疾病的治疗开辟一条新的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97
- [2] Callis TE, Chen JF, Wang DZ. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA Cell Biol*, 2007, 26(4): 219-25
- [3] van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet*, 2008, 24(4): 159-66
- [4] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051-60
- [5] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009, 136(4): 642-55
- [6] Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(5): 376-85
- [7] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-9
- [8] Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 2006, 125(5): 887-901
- [9] Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, 303(5654): 95-8
- [10] Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 2004, 10(2): 185-91
- [11] Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 2001, 106(1): 23-34
- [12] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, et al. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 2001, 293(5531): 834-8
- [13] Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, 2005, 122(1): 17-20
- [14] Doench JG, Sharp PA. Specificity of micro-RNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 2004, 18(5): 504-11
- [15] Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 2005, 122(4): 553-63
- [16] Liu J, Valencia-sanchez MA, Hannon GJ, et al. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(7): 719-23
- [17] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 2005, 436(7048): 214-20
- [18] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 228-33
- [19] Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, et al. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(23): 8721-6
- [20] Liu N, Williams AH, Kim Y, et al. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(52): 20844-9
- [21] McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*, 2007, 102(1): 306-13
- [22] Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, et al. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol*, 2006, 174(5): 677-87
- [23] Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, 2006, 126(6): 1203-17
- [24] Betel D, Wilson M, Gabow A, et al. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 149-53

- [25] Nam S, Kim B, Shin S, et al. miR-Gator: an integrated system for functional annotation of microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 159-64
- [26] Anderson C, Catoe H, Werner R. MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(20): 5863-71
- [27] Rosenberg MI, Georges SA, Asawachaicharn A, et al. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol*, 2006, 175(1): 77-85
- [28] Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, et al. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev*, 2007, 21(1): 71-84
- [29] Bland CS, Cooper TA. Micromanaging alternative splicing during muscle differentiation. *Dev Cell*, 2007, 12(2): 171-2
- [30] Clop A, Marcq F, Takeda H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813-8
- [31] Naguibneva I, Ameyar-zazoua M, Polesskaya A, et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(3): 278-84
- [32] Flynt AS, Li N, Thatcher EJ, et al. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat Genet*, 2007, 39(2): 259-63
- [33] Kwon C, Han Z, Olson EN, et al. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(52): 18986-91
- [34] Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 2007, 13(5): 613-8
- [35] Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci*, 2007, 120(17): 3045-52
- [36] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007, 129(2): 303-17
- [37] Xiao J, Luo X, Lin H, et al. MicroRNA miR-133 represses HERG K⁺ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. *J Biol Chem*, 2007, 282(17): 12363-7
- [38] Luo X, Lin H, Pan Z, et al. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20045-52
- [39] van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 2007, 316(5824): 575-9
- [40] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 2008, 456(7224): 980-6
- [41] Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(3): 219-30
- [42] Wang H, Garzon R, Sun H, et al. NF- κ B-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*, 2008, 14(5): 369-81
- [43] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*, 2005, 438(7068): 685-9