

本文引用: 龚翠兰, 杨仁义, 傅馨莹, 周德生. LncRNA-H19 靶向 miR-145-5p 通过 JAK2/STAT3 调节大鼠脑血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(3): 373-379.

LncRNA-H19 靶向 miR-145-5p 通过 JAK2/STAT3 调节大鼠脑血管平滑肌细胞增殖和迁移

龚翠兰^{1,2}, 杨仁义¹, 傅馨莹¹, 周德生^{3*}

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学附属常德医院, 湖南 常德 415000;
3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

〔摘要〕目的 探讨 LncRNA-H19 靶向 miR-145-5p 通过 JAK2/STAT3 信号通路调节 TNF- α 诱导大鼠脑血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖和迁移。方法 培养 VSMC, 对照组的细胞正常培养, TNF- α 组的细胞用 100 ng/mL TNF- α 处理; 将 si-NC、si-H19、miR-NC、miR-145-5p mimics 转染至 TNF- α 诱导的 VSMC, 分别记为 TNF- α +si-NC 组、TNF- α +si-H19 组、TNF- α +miR-NC 组、TNF- α +miR-145-5p 组; 将 si-H19 和 anti-miR-NC、si-H19 和 anti-miR-145-5p 共转染至 TNF- α 诱导的 VSMC, 记为 TNF- α +si-H19+anti-miR-NC 组、TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p 组。RT-qPCR 法检测 LncRNA-H19 和 miR-145-5p 表达水平; MTT 法检测细胞增殖能力; Transwell 法检测细胞迁移能力; 荧光素酶报告实验检测 LncRNA-H19 和 miR-145-5p 的靶向关系; Western blot 法检测细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、p21、基质金属蛋白酶 2 (matrix metallo proteinase 2, MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metallo proteinase 9, MMP-9)、磷酸化 JAK2 (phosphorylated JAK2, p-JAK2)、磷酸化 STAT3 (phosphorylated STAT3, p-STAT3) 蛋白表达水平。结果 与对照组比较, LncRNA-H19 在 TNF- α 组中的表达水平显著升高, miR-145-5p 在 TNF- α 组中的表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与 TNF- α +si-NC 组比较, TNF- α +si-H19 组 H19 表达水平显著降低, OD 值、Cyclin D1、细胞迁移数、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达水平显著降低, P21 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与 TNF- α +miR-NC 组比较, TNF- α +miR-145-5p 组 miR-145-5p 表达水平显著降低, OD 值、Cyclin D1、细胞迁移数、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达水平显著降低, P21 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与 TNF- α +si-H19+anti-miR-NC 组比较, TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p 组 OD 值、Cyclin D1、细胞迁移数、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达水平显著升高, P21 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 TNF- α +si-NC 组比较, TNF- α +si-H19 组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 TNF- α +si-H19+anti-miR-NC 组比较, TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p 组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。结论 干扰 LncRNA-H19 表达、上调 miR-145-5p 表达可抑制 TNF- α 组的 VSMC 增殖和迁移, 其与阻断 JAK2/STAT3 信号通路的磷酸化有关。

〔关键词〕 LncRNA-H19; miR-145-5p; JAK2/STAT3 信号通路; TNF- α ; 血管平滑肌细胞; 增殖; 迁移

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.03.005

LncRNA-H19 targeting miR-145-5p regulates rat cerebral vascular smooth muscle cell proliferation and migration through JAK2/STAT3

GONG Cuilan^{1,2}, YANG Renyi¹, FU Xinying¹, ZHOU Desheng^{3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Changde Hospital Affiliated to Hunan University of Chinese Medicine, Changde, Hunan 415000, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔收稿日期〕 2021-04-20

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目 (81874463); 湖南省科技厅科技创新平台与人才计划 (2017SK4005); 湖南省财政中医药项目名院工程 (rsk-010-013/006-09); 湖南省教育厅一般项目 (20C1405); 湖南省卫健委科研项目 (202103071190); 湖南省中医药管理局资助项目 (202038, 202046, 2021218); 湖南省研究生创新项目 (CX20190587); 湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目 (2019ZXYJH08, 2018ZXYJH10); 湖南中医药大学研究生培养质量工程专项 (2020CX62)。

〔第一作者〕 龚翠兰, 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 神经系统疾病的中西医结合防治。

〔通信作者〕 * 周德生, 博士, 主任医师, 教授, E-mail: zds1101@foxmail.com。

[Abstract] Objective To investigate the LncRNA-H19 targeting miR-145-5p through JAK2/STAT3 signaling pathway to regulate TNF- α -induced rat cerebral vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration. **Methods** Culture VSMC, cells in the control group were cultured normally, cells in the TNF- α group were treated with 100 ng/mL TNF- α ; si-NC, si-H19, miR-NC, miR-145-5p mimics were transfected into TNF- α -induced VSMC, which were marked as TNF- α +si-NC group, TNF- α +si-H19 group, TNF- α +miR-NC group, TNF- α +miR-145-5p group; si-H19 and anti-miR-NC, si-H19 and anti-miR-145-5p were co-transfected into TNF- α -induced VSMC, and denoted as TNF- α +si-H19+anti-miR-NC group, TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p group. RT-qPCR was used to detect the expression levels of LncRNA-H19 and miR-145-5p; MTT was used to detect cell proliferation; Transwell was used to detect cell migration; luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between LncRNA-H19 and miR-145-5p; Western blot was used to detect Cyclin D1, p21, matrix metallo proteinase 2 (MMP-2), matrix metallo proteinase 9 (MMP-9), phosphorylated JAK2 (p-JAK2), phosphorylated STAT3 (p-STAT3) protein expression levels. **Results** Compared with the control group, the expression level of LncRNA-H19 was significantly increased while miR-145-5p was significantly decreased in TNF- α group ($P<0.01$). Compared with the TNF- α +si-NC group, the H19 expression level in the TNF- α +si-H19 group was significantly reduced, and the OD value, Cyclin D1, cell migration number, MMP-2 and MMP-9 protein expression levels were significantly reduced, and the P21 protein expression level was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the TNF- α +miR-NC group, the expression level of miR-145-5p in the TNF- α +miR-145-5p group was significantly decreased, while levels of OD value, Cyclin D1, cell migration number, MMP-2, MMP-9 protein were significantly decreased, and the expression level of P21 protein increased significantly ($P<0.01$). Compared with TNF- α +si-H19+anti-miR-NC group, the expression levels of OD value, Cyclin D1, cell migration number, MMP-2, MMP-9 protein were increased significantly in TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p group, and the expression level of P21 protein decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the TNF- α +si-NC group, the p-JAK2 and p-STAT3 protein expression in the TNF- α +si-H19 group were significantly reduced ($P<0.05$); compared with TNF- α +si-H19+anti-miR-NC group, p-JAK2 and p-STAT3 protein expression in TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p group were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Interfering the expression of LncRNA-H19 and up-regulating the expression of miR-145-5p can inhibit the VSMC proliferation and migration of TNF- α group, which is related to blocking the phosphorylation of JAK2/STAT3 signaling pathway.

[Keywords] LncRNA-H19; miR-145-5p; JAK2/STAT3 signaling pathway; TNF- α ; vascular smooth muscle cell; proliferation; migration

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)是构成血管壁组织结构及维持血管张力的主要细胞,具有表型重塑的特征,其生物学行为的改变(如各种原因引起的增殖、凋亡等)可引起高血压、动脉粥样硬化和血管再狭窄等血管重塑性疾病^[1-3]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是长度大于200个核苷酸的非编码RNA,无蛋白质编码功能,生物学性能发挥作用可调节细胞的增殖和凋亡^[4-5]。microRNA(miRNA)是一类长度约19~24 nt的非编码单链RNA,通过碱基互补配对的方式与靶基因的3'-UTR区部分或完全互补,剪切靶基因的转录产物或者抑制转录产物的翻译,从而起到转录后调控靶基因表达的作用^[6-7],其中miRNA-145在VSMCs中特异性高表达,可特异性抑制kruppel样因子4(kruppel like factor 4, KLF4),对VSM-

Cs表型变化及分化具有重要作用^[8],JAK2-STAT3信号通路是参与细胞增殖、迁移、代谢、血管再生的重要信号途径,多种因子及药物可通过激活此通路促进血管内皮细胞新生,改善缺血^[9-10]。本实验主要探讨LncRNA-H19靶向miR-145-5p通过JAK2/STAT3信号通路调节TNF- α 诱导大鼠脑VSMC增殖和迁移。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10~12周龄雄性SPF级SD大鼠40只,体重250~280 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004,合格证号:4307272011011151067,饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心(昼夜交替12 h,温度21~

26 ℃,湿度 40%~50%),实验经湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(20201010-8)。

1.2 材料、试剂与主要仪器

TNF- α 试剂盒(上海生博生物医药科技有限公司,批号:430904);胎牛血清(批号:SN201909)、DMEM 培养基(批号:200101)均购自美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑盐比色法(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂盒(上海拜力生物科技有限公司,批号:PH0533);RNA 提取试剂盒(批号:SD1412)、反转录试剂盒(批号:AKA1709)、荧光定量试剂盒(批号:AK1301)均购自 TaKaRa Bio 公司;MMP-9(批号:ab48392)、P21(批号:ab91527)、Cyclin D1(批号:ab186738)均购自北京百奥莱博科技有限公司;RIPA 蛋白裂解液(批号:J150003)、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒(批号:GUC0066)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Transwell 小室(美国 BD 公司,批号:6225968);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(上海善然生物科技有限公司,批号:20160831);Power PacTM Basic 基础电泳仪(电源)(型号:1645050)、化学凝胶成像分析仪(型号:Chemi DocTM XRS+)、荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96TM)均购自美国 Bio-Rad 公司;台式高速冷冻型微量离心机(型号:D3024R,中国 DragonLab 公司)。

1.3 大鼠脑 VSMC 培养

取 3~4 只雄性 SD 大鼠,麻醉后处死,迅速取出整脑,在解剖显微镜下分离大脑基底动脉,将其反复剪碎后置于细胞培养瓶中,加入含 20%胎牛血清和 1%青链霉素的 DMEM 培养液,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待组织块与瓶底黏附后将培养瓶轻轻翻转平放,继续培养 3 d 可见细胞爬出,换液后继续培养 10 d 时观察到组织块周围细胞相互融合且融合度达 80%左右,进行传代,取培养 3 代后细胞用于实验。

1.4 细胞处理与分组

培养大鼠脑 VSMC,对照组的细胞正常培养,TNF- α 组的细胞用 100 ng/mL TNF- α 处理;将 si-NC、si-H19、miR-NC、miR-145-5p mimics 转染至 TNF- α 诱导的大鼠脑 VSMC,分别记为 TNF- α +si-NC 组、TNF- α +si-H19 组、TNF- α +miR-NC 组、TNF- α +miR-145-5p 组;将 si-H19 和 anti-miR-NC、si-H19 和 anti-miR-145-5p 共转染至 TNF- α 诱导的大鼠脑 VSMC,记为 TNF- α +si-H19+anti-miR-NC

组、TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p 组。

1.5 RT-qPCR 法检测 LncRNA-H19 和 miR-145-5p 表达水平

细胞培养 48 h 后,提取总 RNA,用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,按照荧光定量试剂盒说明进行实验,每个样品设 3 个重复,循环条件为 95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s;72 ℃ 30 s,共 40 个循环;60 ℃ 延长 5 min。LncRNA-H19 和 miR-145-5p 分别以 GAPDH 和 U6 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。所需引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 所需引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	长度/bp
LncRNA-H19	反向 GTCCAGTTTTCCAGGAATCC	169
	正向 TCGCTTCGGCAGCACATAT	
miR-145-5p	反向 ACCATTTTCAGCCACCAGAG	126
	正向 GTCTGCTGGGAGCTGAAGA	
U6	反向 CTCAACTGCTGCTGGAGTCGGCA	103
	正向 ACACTCCAGCTGGGGCCTGCTGGGGTG	
GAPDH	反向 CTCGCTTCGGCAGCACA	138
	正向 AACGCTTACGAATTTGCGT	
p-STAT3	反向 TTAACATTCTGGGCACGAACA	85
	正向 TGACAATCAAGGAGGCATCAC	
p-JAK2	反向 CAGCAAATAAAGAAGGCAGGA	79
	正向 TTCTCGCTCAACGGCAAAG	

1.6 MTT 法检测细胞增殖能力

在各组细胞培养至 48 h 时,每孔分别加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L,于培养箱中继续孵育 4 h 后弃去上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,振荡反应 10 min 使沉淀溶解,用酶标仪于波长 490 nm 处检测 OD 值。细胞存活率=实验组 OD 值/对照组 OD 值 \times 100%。

1.7 Transwell 法检测细胞迁移能力

调整各组细胞浓度为 5×10^4 个/mL,Transwell 上室加入 100 μ L 细胞悬液,下室加入 500 μ L 含 10% FBS 培养基。培养 24 h 后,4%多聚甲醛固定 30 min,0.1%结晶紫染色 15 min。倒置显微镜观察,随机选取 5 个视野,拍照并计数。

1.8 Western blot 法检测蛋白表达水平

根据蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,检测蛋白浓度后进行变性处理,取 30 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 反应,转膜,封闭,分别加入一抗(稀释比例 MMP-9 为 1:1000,P21 为 1:3000,Cyclin D1 为 1:2000),4 ℃孵育 24 h,TBST 洗涤,分别加入二

表4 过表达 miR-145-5p 影响 TNF- α 诱导的 VSMC 增殖和迁移相关蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	miR-145-5p	OD 值	Cyclin D1	P21	细胞迁移数/个	MMP-2	MMP-9
TNF- α +miR-NC 组	1.03 \pm 0.03	1.79 \pm 0.11	0.93 \pm 0.09	0.34 \pm 0.03	204.98 \pm 20.11	0.88 \pm 0.08	0.93 \pm 0.09
TNF- α +miR-145-5p 组	2.58 \pm 0.95	0.85 \pm 0.09	0.31 \pm 0.04	0.90 \pm 0.08	97.20 \pm 13.68	0.29 \pm 0.02	0.28 \pm 0.02
<i>t</i> 值	20.983	18.354	17.684	19.250	45.820	19.684	18.617
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

为 WT-H19 或 MUT-H19, 见图 3。双荧光素酶报告实验结果显示, TNF- α +miR-145-5p 组与 TNF- α +miR-NC 组比较, WT-H19 荧光素酶活性显著性增高 ($P < 0.01$), MUT-H19 荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

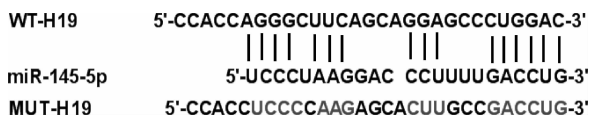


图3 生物信息学预测 LncRNA-H19 和 miR-145-5p 的靶向调控关系

表5 两组 WT-H19 和 MUT-H19 双荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	WT-H19	MUT-H19
TNF- α +miR-NC 组	1.01 \pm 0.09	1.01 \pm 0.10
TNF- α +miR-145-5p 组	0.33 \pm 0.04	1.00 \pm 0.08
<i>t</i> 值	19.682	0.284
<i>P</i> 值	0.000	0.820

2.5 miR-145-5p 表达对 TNF- α 诱导 VSMC 增殖和迁移相关蛋白的影响

与 TNF- α +si-H19+anti-miR-NC 组比较, TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p 组 OD 值、Cyclin D1、细胞迁移数、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达水平显著升高, P21 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图 4、表 6。

2.6 各组 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达

与 TNF- α +si-NC 组比较, TNF- α +si-H19 组 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与 TNF- α +si-H19+anti-miR-NC 组比较, TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p 组 p-JAK2 及 p-STAT3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。见图 5、表 7。

表6 干扰 miR-145-5p 表达后两组增殖和迁移相关蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	OD 值	Cyclin D1	P21	细胞迁移数/个	MMP-2	MMP-9
TNF- α +si-H19+anti-miR-NC 组	0.92 \pm 0.10	0.32 \pm 0.03	0.90 \pm 0.09	92.36 \pm 9.99	0.33 \pm 0.02	0.31 \pm 0.02
TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p 组	1.81 \pm 0.23	0.89 \pm 0.09	0.32 \pm 0.03	199.37 \pm 16.54	0.93 \pm 0.09	0.90 \pm 0.08
<i>t</i> 值	20.684	20.310	18.332	46.321	18.004	17.012
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

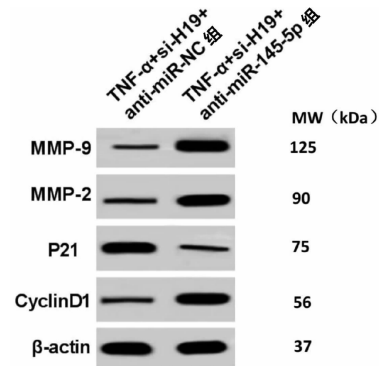
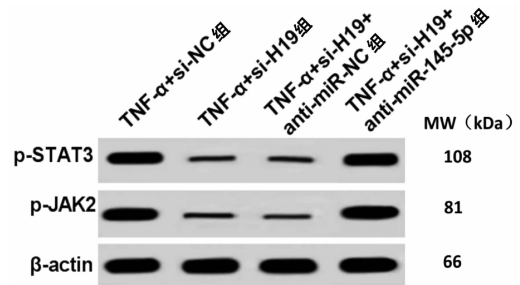
图4 干扰 miR-145-5p 逆转抑制 H19 对 TNF- α 诱导的 VSMC 增殖和迁移蛋白电泳图

图5 各组 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白电泳图

3 讨论

平滑肌即无纹肌的通称, 是被视为较横纹肌原始的一种肌肉。平滑肌除作为无脊椎动物的躯体肌而有广泛分布外, 在脊椎动物除心肌之外, 大部分内脏肌也是由平滑肌组成的。对于正常人, VSMC 调控着动脉血管壁的细胞数量和血管稳态, 在动脉粥样硬化发生发展过程中, VSMC 迁移、增殖与细胞凋亡并存。在临床上, VSMC 的结构一旦有所改变, 就会引发高血压等较为严重的病症出现^[11-12]。

LncRNA-H19 位于细胞核内或胞质中, H19 是最早被发现的有功能的 LncRNA 之一, 它的序列高

表7 各组 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达量比较
($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	p-JAK2	p-STAT3
TNF- α +si-NC 组	0.96 \pm 0.09	0.95 \pm 0.10
TNF- α +si-H19 组	0.26 \pm 0.02*	0.29 \pm 0.03*
TNF- α +si-H19+anti-miR-NC 组	0.27 \pm 0.03	0.31 \pm 0.03
TNF- α +si-H19+anti-miR-145-5p 组	0.94 \pm 0.07 [#]	0.92 \pm 0.08 [#]
F 值	89.621	96.370
P 值	0.000	0.000

注:与 TNF- α +si-NC 组比较,* $P<0.05$;与 TNF- α +si-H19+anti-miR-NC 组比较,[#] $P<0.05$

度保守,可通过多种模式参与调控生物学过程和疾病的发生发展,由于 H19 最早被证实在肺癌、卵巢癌、乳腺癌等多种癌症中表达上调,加速肿瘤细胞的增殖和侵袭,与肿瘤转移及预后密切相关,因此先前关于 H19 的研究大多集中在肿瘤领域。李峰等^[13]报道:在 MC3T3-E1 细胞中 LncRNA-H19 被抑制后,H19 表达量显著下降并激活 miR-185-5p 表达,验证了 LncRNA-H19 和 miR-185-5p 有较强结合性,调控网络可能存在于成骨细胞的增殖分化过程中,H19 通过 ceRNA 机制发挥作用,且 LncRNA-H19 可以有效降低 miR-185-5p 抑制 MC3T3-E1 细胞增殖和分化。

LncRNA-H19 在血管重塑中发挥着重要作用^[14]。近年来已有 H19 在心脑血管疾病中的研究报道:Vioreck 等^[15]指出 H19 基因疗法可预防和逆转实验性压力超负荷引起的心力衰竭,H19 充当抗心肌肥大的 LncRNA 代表,LncRNA-miRNA 网络在调节细胞功能,包括代谢过程中起着重要作用,H19 还可以通过竞争性结合 let-7a 促进 VSMC 增殖,导致血管负性重塑^[16];miR-145 是健康大鼠颈动脉平滑肌细胞中表达最丰富的 miRNA,在 VSMC 的分化和增殖过程中扮演着重要角色,其上调会促进平滑肌细胞分化,而在细胞增殖时表达下降^[17];miR-143/145 团簇是通过协同调控一个包括 kruppel 样因子 5 (kruppel like factor 5, KLF5)、KLF4、心肌素的转录网络,建立的调节血管平滑肌可塑性的调节因子,驱动增殖性 VSMC 表型变化,从而导致巨噬细胞样特征的发展和 VSMC 摄取氧化低密度脂蛋白^[18]。MiR-145 进一步牵涉到促进血管平滑肌肌动蛋白和钙桥蛋白等血管平滑肌收缩标志物的变化^[19],Lin 等^[20]发现 LncRNA 是通过直接靶向 miR-145 调控 VEGF-A 的表达促进卵巢癌的肿瘤生长与血管生成;研究^[21]证实 miRNA、hsa-mir-496、hsa-mir-151a、hsa-mir-

296-3p、hsa-mir-148a、hsa-mir-365b-5p、hsamiR-3687、hsa-mir-454、hsa-mir-155-5p 和 hsa-mir-145-5p 差异调节参与细胞黏附、血管生成、细胞周期、JAK-STAT 信号传导的基因、MAPK 信号传导、一氧化氮信号传导、VEGF 信号传导和伤口愈合途径。李文婷等^[22]研究指出 miR-145 靶向 MMP-9 表达抑制大鼠脑动脉 VSMC 增殖和迁移;另有研究^[23]阐述 IL-10 通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制 VSMC 凋亡;颜思阳等^[24]研究发现活血荣络方可抑制 miR-17 miRNA 的表达,上调 STAT3 mRNA 的表达,提示活血荣络方可能通过调节 STAT3-miR-17 调控下游相关通路发挥作用。

基于以上,笔者推测 LncRNA-H19 靶向 miR-145-5p 可能通过 JAK2/STAT3 信号通路调节 TNF- α 诱导的大鼠脑 VSMC 增殖和迁移,故以研究报道较少的 LncRNA-H19 和 miR-145-5p 两个指标作为切入点进行探讨,针对它们之间可能存在的靶向关系进行科学论证,本实验发现抑制 LncRNA-H19 和过表达 miR-145-5p 均可导致 TNF- α 组中增殖和迁移相关蛋白 Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 表达显著降低,说明 LncRNA-H19 过表达可以促进平滑肌细胞周期的进程,它的上调可显著促进 Cyclin D1 的表达;荧光素酶报告检测系统经常用于 RNA 结合靶点的验证,本实验中,与 TNF- α +miR-NC 组比较,TNF- α +miR-145-5p 组 WT-H19 荧光素酶活性增高,证实 miR-145-5p 已被 H19 靶向和调节,上调 LncRNA-H19 可以显著抑制 miR-145-5p 的表达,在 VSMC 中 LncRNA-H19 与 miR-145-5p 之间彼此抑制对方的表达,存在潜在的相互调控关系,故表明 LncRNA-H19 促进 VSMC 增殖、迁移及细胞活力的作用受 miR-145-5p 影响;在抑制 miR-145-5p 的同时过表达 LncRNA-H19 可见 TNF- α 组中 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达显著升高,反向验证了 LncRNA-H19 靶向 miR-145-5p 调节 TNF- α 诱导的大鼠脑 VSMC 增殖和迁移是通过 JAK2/STAT3 信号通路发挥作用的,且该过程可能受细胞外拮抗剂、膜受体、细胞质微环境和转录水平等多个层次的调控,但具体机制尚不明确且缺乏研究报道。

综上所述,干扰 LncRNA-H19 表达、上调 miR-145-5p 表达可抑制 TNF- α 诱导大鼠脑 VSMC 增殖和迁移,其作用机制可能与阻断 JAK2/STAT3 信号

通路的磷酸化有关,具体作用靶点和调控机制有待更深入的探讨,或可为相关疾病的诊治与研究提供新指标和新思路。

参考文献

- [1] ISLAM T. Impact of statins on vascular smooth muscle cells and relevance to atherosclerosis[J]. *The Journal of Physiology*, 2020, 598(12): 2295–2296.
- [2] MOKHASHI N, CHOI R Y, CICALESE S, et al. Transduction efficiency of adenovirus vectors in endothelial cells and vascular smooth muscle cells[J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2020, 75(6): 603–607.
- [3] OSMAN I, WANG L, HU G Q, et al. GFAP (glial fibrillary acidic protein)-positive progenitor cells contribute to the development of vascular smooth muscle cells and endothelial cells—brief report[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2020, 40(5): 1231–1238.
- [4] LI J, CAO L T, LIU H H, et al. Long non coding RNA H19: An emerging therapeutic target in fibrosing diseases[J]. *Autoimmunity*, 2020, 53(1): 1–7.
- [5] WANG Y F, DU L T, YANG X M, et al. A nomogram combining long non-coding RNA expression profiles and clinical factors predicts survival in patients with bladder cancer[J]. *Ageing*, 2020, 12(3): 2857–2879.
- [6] LIU H, YAN F. Gene regulation network modeling and mechanism analysis based on microRNA-disease related data[J]. *Systems Medicine*, 2021, 1:52–62.
- [7] 张 华,李晓波.microRNAs与脑血管疾病研究进展[J].*实用老年医学*,2020,34(6):526–529.
- [8] CHENG Y H, LIU X J, YANG J, et al. microRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation[J]. *Circulation Research*, 2009, 105(2): 158–166.
- [9] KABIRI M, HEMMATPOUR A, ZARE F, et al. Paroxetine modulates immune responses by activating a JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2020, 34(5): e22464.
- [10] CHEN K, ZHAO Z W, WANG G, et al. Interleukin-5 promotes ATP-binding cassette transporter A1 expression through miR-211/JAK2/STAT3 pathways in THP-1-derived macrophages[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2020, 52(8): 832–841.
- [11] WANG X, BHULLAR K S, FAN H B, et al. Regulatory effects of a pea-derived peptide leu-arg-trp (LRW) on dysfunction of rat aortic vascular smooth muscle cells against angiotensin II stimulation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(13): 3947–3953.
- [12] CHOU E L, CARDENAS C L, CONRAD M F, et al. Vascular smooth muscle cells release protease nexin-1 in cell models of atherosclerosis and human carotid tissue[J]. *Journal of Vascular Surgery*, 2020, 72(1): e262–e263.
- [13] 李 峰,刘翠中,伍 媛.LncRNA-H19通过抑制miR-185-5p的表达促进成骨细胞的增殖[J].*湖南师范大学学报(医学版)*,2021, 18(4):13–17.
- [15] VIREECK J, BüHRKE A, FOINQUINOS A, et al. Targeting muscle-enriched long non-coding RNA H19 reverses pathological cardiac hypertrophy[J]. *European Heart Journal*, 2020, 41(36): 3462–3474.
- [16] 孙伟峰. LncRNA H19通过靶向调控CyclinD1促进血管重塑的机制研究[D].沈阳:中国医科大学,2019.
- [17] NAZARI-JAHANTIGH M, WEI Y Y, NOELS H, et al. microRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(11): 4190–4202.
- [18] 向 龙. miRNA-145促进胚胎干细胞向血管平滑肌细胞诱导分化的实验研究[D].遵义:遵义医科大学,2020.
- [19] HUANG R S, HU G Q, LIN B, et al. microRNA-155 silencing enhances inflammatory response and lipid uptake in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human THP-1 macrophages[J]. *Journal of Investigative Medicine: the Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 2010, 58(8): 961–967.
- [20] LIN X J, YANG F, QI X R, et al. LncRNA DANCR promotes tumor growth and angiogenesis in ovarian cancer through direct targeting of miR-145 [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2019, 58(12): 2286–2296.
- [21] KASIVISWANATHAN D, CHINNASAMY PERUMAL R, BHUVANESWARI S, et al. Interactome of miRNAs and transcriptome of human umbilical cord endothelial cells exposed to short-term simulated microgravity [J]. *Nature Partner Journals Microgravity*, 2020, 6:18.
- [22] 李文婷,邹 伟,曹 琳,等. miR-145靶向抑制MMP-9表达对大鼠脑动脉血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响[J].*山东医药*,2017, 57(26): 25–28.
- [23] MA L, ZHENG H B, ZHANG T. IL-10 suppress vascular smooth muscle cell apoptosis via JAK2/STAT3 signaling pathway and its mechanism of action in atherosclerosis [J]. *Minerva Endocrinologica*, 2019, 44(4): 402–405.
- [24] 颜思阳,杨仁义,刘利娟,等.基于“STAT3/miR-17”反馈环探讨活血荣络方对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用机制[J].*湖南中医药大学学报*,2021,41(4):489–497.