

长链非编码RNA IFNG-AS1靶向miR-19b-1-5p调控oxLDL诱导的血管内皮细胞增殖、凋亡的机制研究

霍鑫¹ 蔡许超^{1*} 肖敏²¹柳州市人民医院血管外科, 柳州 545000; ²柳州市人民医院皮肤科, 柳州 545000

摘要 为了探讨长链非编码RNA干扰素活化基因的反义核糖核酸(lncRNA IFNG-AS1)对氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)诱导的人脐静脉血管内皮细胞EVC-304增殖、凋亡的影响和调控机制, 该研究采用100 μg/mL的oxLDL分别处理转染si-IFNG-AS1、miR-19b-1-5p mimics或共转染si-IFNG-AS1与anti-miR-19b-1-5p的EVC-304细胞, 利用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中IFNG-AS1和miR-19b-1-5p表达, 细胞计数(CCK-8)法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, 蛋白免疫印迹(Western blot)检测细胞中细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A(P21)、多肿瘤抑制基因1(P16)、剪切的DNA修复酶(cleaved-PARP)、剪切的半胱天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)的蛋白表达情况; 利用双荧光素酶报告基因实验验证IFNG-AS1和miR-19b-1-5p的靶向关系。结果显示, oxLDL促进了EVC-304细胞中IFNG-AS1的表达, 而抑制了miR-19b-1-5p的表达($P<0.05$); 抑制IFNG-AS1或过表达miR-19b-1-5p提高了oxLDL处理的EVC-304细胞增殖活性及细胞中P21和P16蛋白表达, 而降低了细胞凋亡率及cleaved-PARP和cleaved-caspase-3的蛋白表达($P<0.05$); 抑制miR-19b-1-5p逆转了抑制IFNG-AS1对oxLDL处理的EVC-304细胞增殖和凋亡的影响($P<0.05$); 双荧光素酶报告基因实验证实IFNG-AS1靶向调控miR-19b-1-5p表达。这提示抑制IFNG-AS1表达可促进oxLDL处理的EVC-304细胞增殖, 并抑制细胞凋亡, 其作用机制与靶向上调miR-19b-1-5p表达有关, IFNG-AS1/miR-19b-1-5p轴可能为动脉粥样硬化的治疗提供新的靶点。

关键词 长链非编码RNA IFNG-AS1; miR-19b-1-5p; 冠状动脉粥样硬化

Long Non-Coding RNA IFNG-AS1 Regulates oxLDL-Induced Proliferation and Apoptosis of Vascular Endothelial Cells by Targeting miR-19b-1-5p

HUO Xin¹, CAI Xuchao^{1*}, XIAO Min²¹Department of Vascular Surgery, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545000, China;²Department of Dermatology, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545000, China)

Abstract To investigate the effect and mechanism of lncRNA IFNG-AS1 on the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells EVC-304 induced by oxLDL, 100 μg/mL oxLDL was used to treat

收稿日期: 2020-08-11 接受日期: 2020-11-16

广西壮族自治区卫生健康委员会自筹科研课题(批准号: Z20200281)、广西卫生厅科研项目(批准号: Z2013215)和柳州市人民医院博士硕士医学基础研究基金(批准号: lryjj201504)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18560290836, E-mail: ccoo1007@163.com

Received: August 11, 2020 Accepted: November 16, 2020

This work was supported by the Guangxi Zhuang Autonomous Region Health Commission Self-Funded Research Project (Grant No.Z20200281), the Scientific Research Project of Guangxi Department of Health (Grant No.Z2013215) and the Foundation of Basic Medical Research for Doctor and Master Degree of Liuzhou People's Hospital (Grant No.lryjj201504)

*Corresponding author. Tel: +86-18560290836, E-mail: ccoo1007@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5453>

the EVC-304 cells transfected with si-IFNG-AS1, miR-19b-1-5p mimics or co-transfected with si-IFNG-AS1 and anti-miR-19b-1-5p. Then, qRT-PCR was used to detect the expression of IFNG-AS1 and miR-19b-1-5p in the cells. CCK-8 method was used to detect cell proliferation, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to detect the protein expression of P21, P16, cleaved-PARP and cleaved-caspase-3. Dual luciferase reporter gene experiment was applied for verifying the targeting relationship between IFNG-AS1 and miR-19b-1-5p. The results showed that oxLDL promoted the expression of IFNG-AS1 in EVC-304 cells, but inhibited the expression of miR-19b-1-5p ($P < 0.05$); IFNG-AS1 inhibition or miR-19b-1-5p overexpression increased the proliferation activity of EVC-304 cells induced by oxLDL and the protein expression of P21 and P16, while reduced the apoptosis rate and the protein expression of cleaved-PARP and cleaved-caspase-3 ($P < 0.05$); miR-19b-1-5p inhibition reversed the effect of IFNG-AS1 inhibition on the proliferation and apoptosis of EVC-304 cells induced by oxLDL; dual luciferase reporter gene experiments confirmed that IFNG-AS1 negatively regulated the expression of miR-19b-1-5p. These results suggested that inhibition of IFNG-AS1 might enhance the proliferation of EVC-304 cells treated with oxLDL and inhibit their apoptosis, and its action mechanism was related to the up-regulation of miR-19b-1-5p. The IFNG-AS1/miR-19b-1-5p axis may provide new targets for the treatment of atherosclerosis.

Keywords long non-coding RNA IFNG-AS1; miR-19b-1-5p; coronary atherosclerosis

冠状动脉粥样硬化 (coronary atherosclerosis, CAS) 是心血管疾病的主要病因, 也是世界范围内的主要死亡原因之一。CAS 是一种发生在主动脉内的慢性疾病, 可由血脂异常、糖代谢异常、内皮细胞功能障碍、血管平滑肌细胞或纤维结缔组织增生、免疫炎性反应等多种因素引起^[1-2]。CAS 是一种复杂的病变, 涉及多种因素。损伤-反应理论认为内皮细胞损伤是引起颈动脉狭窄的启动因素, 而脂质代谢紊乱可增强单核细胞黏附, 促进成纤维细胞和血管平滑肌细胞的增殖和迁移, 加快 CAS 的发展^[3]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度为 200 个核苷酸以上的小分子非编码 RNA, 参与调控细胞增殖、凋亡、炎症反应等生理或病理过程, 在冠状动脉粥样硬化的发展进程中发挥重要调控作用^[4-6]。干扰素 γ 反义 RNA1 (interferon γ -antisense RNA1, IFNG-AS1) 属于 lncRNA, 其在心血管疾病中的作用虽已有研究报道, 但是其在冠状动脉粥样硬化中的功能及机制尚未十分清楚。本研究旨在探索 lncRNA IFNG-AS1 对氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 诱导的人脐静脉血管内皮细胞 EVC-304 增殖、凋亡的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉血管内皮细胞 EVC-304 购自中国科学院细胞库; pmirGLO 载体购自上海钰博生物科

技有限公司; oxLDL 购自广州奕源生物科技有限公司; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自日本同仁化学研究所; 膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒均购自上海碧云天研究所; 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购自上海迈博瑞生物膜技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养与转染 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 EVC-304 细胞, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行常规培养, 传代。将对数生长期的 EVC-304 细胞以 1.0×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体法, 分别转染 si-NC、si-IFNG-AS1、miR-NC、miR-19b-1-5p mimics, 共转染 si-IFNG-AS1 与 anti-miR-NC、si-IFNG-AS1 与 anti-miR-19b-1-5p。转染 6 h 后, 更换培养基。再培养 24 h, 收集细胞备用。

1.2.2 qRT-PCR 法检测细胞中 IFNG-AS1、miR-19b-1-5p 的表达 将未转染的 EVC-304 细胞以 1.0×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 将其分为对照组 (Con 组) 和 oxLDL 组, 其中 Con 组细胞常规培养 24 h, oxLDL 组细胞用含 100 $\mu\text{g/mL}$ oxLDL 的培养基处理 24 h, 培养结

束后收集细胞, qRT-PCR法检测 Con组和 oxLDL组细胞中 IFNG-AS1 和 miR-19b-1-5p 的表达水平。转染 si-NC、si-IFNG-AS1、miR-NC、miR-19b-1-5p mimics, 共转染 si-IFNG-AS1 与 anti-miR-NC、si-IFNG-AS1 与 anti-miR-19b-1-5p 的细胞均以 1.0×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 用含 $100 \mu\text{g/mL}$ oxLDL 的培养基处理 24 h, 并分别记为 si-NC 组、si-IFNG-AS1 组、miR-NC 组、miR-19b-1-5p 组、si-IFNG-AS1+anti-miR-NC 组、si-IFNG-AS1+anti-miR-19b-1-5p 组, 培养结束后, 用 qRT-PCR 法检测 si-NC 组、si-IFNG-AS1 组中 IFNG-AS1 的表达水平, 并检测 miR-NC 组、miR-19b-1-5p 组、si-IFNG-AS1+anti-miR-NC 组、si-IFNG-AS1+anti-miR-19b-1-5p 组中 miR-19b-1-5p 的表达水平。用 RNA 提取试剂盒提取各组细胞中总 RNA, 反转录试剂盒将其逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算细胞中 IFNG-AS1 相对于 *GAPDH*、miR-19b-1-5p 相对于 *U6* 的表达。引物信息: IFNG-AS1 正向引物 5'-GCT GAT GAT GGT GGT GGC AAT CT-3', 反向引物 5'-TTA GCA GTT GGT GGG CTT CT-3'; miR-19b-1-5p 正向引物 5'-AGT TTT GCA GGT TTG CAT CCA GC-3', 反向引物 5'-TAC TCA GGA CTC ATC GTC-3'; *GAPDH* 正向引物 5'-TCC CTC AAG ATT GCT AGC AA-3', 反向引物 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'; *U6* 正向引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 反向引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖 转染 si-NC、si-IFNG-AS1、miR-NC、miR-19b-1-5p mimics, 共转染 si-IFNG-AS1 与 anti-miR-NC、si-IFNG-AS1 与 anti-miR-19b-1-5p 的细胞均以 1.0×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 用含 $100 \mu\text{g/mL}$ oxLDL 的培养基分别处理 24 h、48 h 和 72 h, 分别记为 si-NC 组、si-IFNG-AS1 组、miR-NC 组、miR-19b-1-5p 组、si-IFNG-AS1+anti-miR-NC 组、si-IFNG-AS1+anti-miR-19b-1-5p 组。培养结束后, 加 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 37°C 孵育 2 h 后, 用酶标仪于 450 nm 波长处检测细胞吸光度 (D) 值。

1.2.4 Western blot 检测细胞中 P21、P16、cleaved-PARP、cleaved-caspase-3 的蛋白表达 转染 si-NC、si-IFNG-AS1、miR-NC、miR-19b-1-5p mimics, 共转染 si-IFNG-AS1 与 anti-miR-NC、si-IFNG-AS1 与 anti-miR-19b-1-5p 的细胞均以 2.5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中, 用含 $100 \mu\text{g/mL}$ oxLDL 的培养基分别处理 48 h, 分别记为

si-NC 组、si-IFNG-AS1 组、miR-NC 组、miR-19b-1-5p 组、si-IFNG-AS1+anti-miR-NC 组、si-IFNG-AS1+anti-miR-19b-1-5p 组。培养结束后, 用 RIPA 试剂提取细胞中总蛋白, BCA 法对蛋白进行定量, 行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 用转膜仪将分离蛋白转移至 PVDF 膜上, 再用脱脂奶粉进行室温封闭处理 2 h。封闭结束后, 将各凝胶分别置于稀释的 P21(1:500)、P16(1:500)、cleaved-PARP(1:1 000)、cleaved-caspase-3(1:1 000) 一抗溶液中, 4°C 冰箱中孵育过夜。再置于稀释好的二抗反应液(1:2 000)中, 37°C 反应 2 h。最后用 ECL 试剂盒进行显影, 凝胶成像系统曝光拍照。用 Quantity One 4.62 软件进行图像的条带分析, 以目的条带灰度值与 GAPDH 的灰度值的比值表示目的蛋白的表达。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞接种、分组和处理方法同 1.2.4。收集各组细胞, 用培养液调整细胞密度至 1.0×10^6 个/mL, 取 1 mL 细胞悬液, $1 500 \text{ r/min}$ 离心 5 min, 收集沉淀。加 $500 \mu\text{L}$ 结合缓冲液, 悬浮细胞。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒操作说明, 依次加入 $10 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ PI, 室温避光孵育 15 min 后, 立即上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。细胞凋亡率(%)=早期凋亡率+晚期凋亡率。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性 通过生物信息学在线预测网站 LncBase Predicted v.2 预测 IFNG-AS1 与 miR-19b-1-5p 之间的靶向结合位点。构建含有 miR-19b-1-5p 互补结合位点的 WT-IFNG-AS1 序列和不含结合位点的突变体序列 MUT-IFNG-AS1。然后将 pmirGLO 载体进行 *Xho* I 和 *Not* I 的双酶切, 并回收纯化。将 WT-IFNG-AS1、MUT-IFNG-AS1 与 pmirGLO 载体进行连接, 将其插入感受态细胞 DH5 α 中, 选取优势菌落扩大培养, 提取质粒。注意: WT-IFNG-AS1、MUT-IFNG-AS1 插入了 pmirGLO 载体中的萤火虫荧光素酶报告基因下游的多克隆位点。将 pmirGLO-WT-IFNG-AS1、pmirGLO-MUT-IFNG-AS1 用脂质体法分别与 miR-NC 或 miR-19b-1-5p mimics 共转染至 EVC-304 细胞。按照双荧光素酶报告基因检测实验试剂盒操作步骤和要求检测细胞的荧光活性, 结果以海肾荧光素酶的发光强度与萤火虫荧光素酶发光强度的比值表示细胞的荧光活性。

1.3 统计学处理

实验中所有数据均采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多

组间数据比较采用单因素方差分析, 两组比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IFNG-AS1、miR-19b-1-5p在oxLDL诱导的EVC-304细胞中的表达

与Con组相比, oxLDL组EVC-304细胞中IFNG-AS1表达显著升高($P < 0.05$), miR-19b-1-5p表达显著降低($P < 0.05$)(表1)。

2.2 抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖的影响

与si-NC组相比, si-IFNG-AS1组细胞中IFNG-

AS1表达显著降低($P < 0.05$), 48 h、72 h时的细胞 D 值显著升高($P < 0.05$), 与增殖相关的蛋白P21和P16的表达均显著升高($P < 0.05$)(图1和表2)。

2.3 抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞凋亡的影响

与si-NC组相比, si-IFNG-AS1组细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$), 与凋亡相关的蛋白cleaved-PARP、cleaved-caspase-3的表达均显著降低($P < 0.05$)(图2和表3)。

2.4 IFNG-AS1靶向miR-19b-1-5p

LncBase Predicted v.2靶基因在线预测软件显示, IFNG-AS1与miR-19b-1-5p存在靶向结合位点(图

表1 IFNG-AS1、miR-19b-1-5p在oxLDL诱导的EVC-304细胞中的表达

分组 Group	IFNG-AS1	miR-19b-1-5p
Con	1.00±0.06	1.02±0.09
oxLDL	4.62±0.32*	0.34±0.03*
t	33.356	21.503
P	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, 与Con组比较。

* $P < 0.05$ compared with Con group.

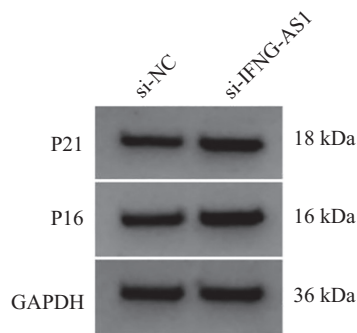


图1 抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞中P21、P16蛋白表达的影响

Fig.1 The effects of IFNG-AS1 inhibition on the protein expression of P21 and P16 in oxLDL-induced EVC-304 cells

表2 抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖的影响

Table 2 The effect of IFNG-AS1 inhibition on the proliferation of EVC-304 cells induced by oxLDL

分组 Group	IFNG-AS1	D 值(490 nm) D value (490 nm)			相对蛋白表达 Relative protein expression	
		24 h	48 h	72 h	P21	P16
si-NC	0.98±0.07	0.26±0.02	0.58±0.05	1.15±0.09	1.00±0.07	1.00±0.07
si-IFNG-AS1	0.25±0.02*	0.27±0.02	0.79±0.06*	1.56±0.09*	1.56±0.08*	1.79±0.09*
t	30.082	1.061	8.066	9.664	15.804	20.786
P	<0.001	0.304	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, 与si-NC组比较。

* $P < 0.05$ compared with si-NC group.

3)。与共转染IFNG-AS1-WT与miR-NC的细胞相比, 共转染IFNG-AS1-WT与miR-19b-1-5p mimics的细胞的荧光活性显著降低($P<0.05$); 而与共转染IFNG-AS1-MUT与miR-NC的细胞相比, 共转染IFNG-AS1-MUT与miR-19b-1-5p mimics的细胞的荧光活性无显著变化($P>0.05$)(表4)。

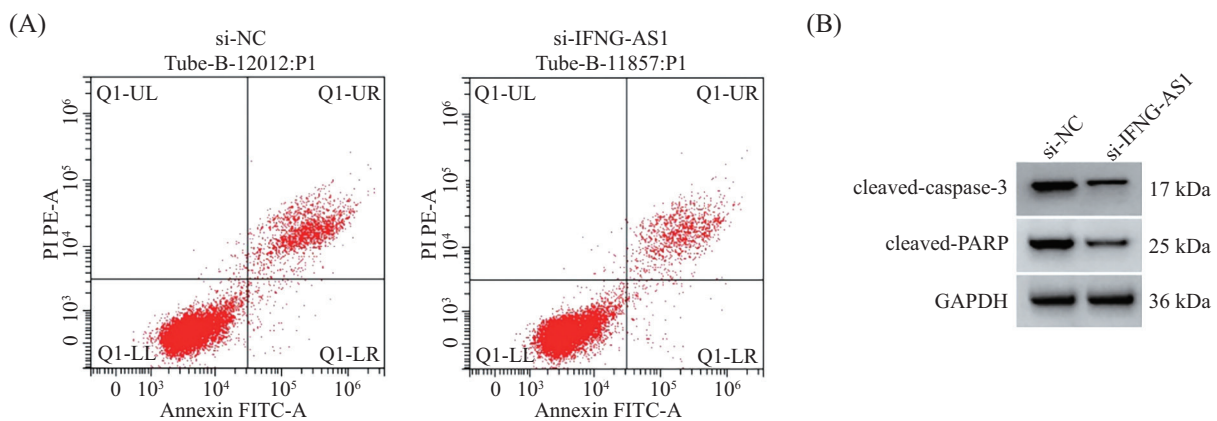
2.5 过表达miR-19b-1-5p对oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖、凋亡的影响

与miR-NC组相比, miR-19b-1-5p组细胞中miR-19b-1-5p表达显著升高($P<0.05$), 48 h、72 h

时的细胞D值显著升高($P<0.05$), 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$), 与增殖相关的蛋白P21、P16的表达显著升高($P<0.05$), 与凋亡相关的蛋白cleaved-PARP、cleaved-caspase-3的表达显著降低($P<0.05$)(图4和表5)。

2.6 抑制miR-19b-1-5p逆转了下调IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖、凋亡的调控作用

与si-NC组相比, si-IFNG-AS1组细胞中miR-19b-1-5p表达显著升高($P<0.05$), 48 h、72 h时的细胞D值显著升高($P<0.05$), 细胞凋亡率显著降低



A: 抑制IFNG-AS1的oxLDL诱导的EVC-304细胞的凋亡图; B: 抑制IFNG-AS1的oxLDL诱导的EVC-304细胞中cleaved-PARP、cleaved-caspase-3的蛋白表达图。

A: apoptosis of EVC-304 cells induced by oxLDL that inhibits IFNG-AS1; B: protein expression of cleaved-PARP and cleaved-caspase-3 in EVC-304 cells induced by oxLDL that inhibits IFNG-AS1.

图2 抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞凋亡和cleaved-PARP、cleaved-caspase-3蛋白表达的影响

Fig.2 The effects of IFNG-AS1 inhibition on the apoptosis and protein expression of cleaved-PARP and cleaved-caspase-3 of oxLDL-induced EVC-304 cells

表3 抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞凋亡的影响

Table 3 The effect of IFNG-AS1 inhibition on the apoptosis of oxLDL-induced EVC-304 cells

分组 Group	凋亡率/% Apoptosis rate /%	相对蛋白表达 Relative protein expression	
		cleaved-PARP	cleaved-caspase-3
si-NC	19.16±1.02	1.00±0.07	1.02±0.08
si-IFNG-AS1	12.32±0.89*	0.35±0.03*	0.26±0.02*
<i>t</i>	15.158	25.604	27.649
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

* $P<0.05$, 与si-NC组比较。

* $P<0.05$ compared with si-NC group.

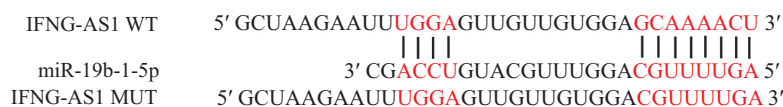


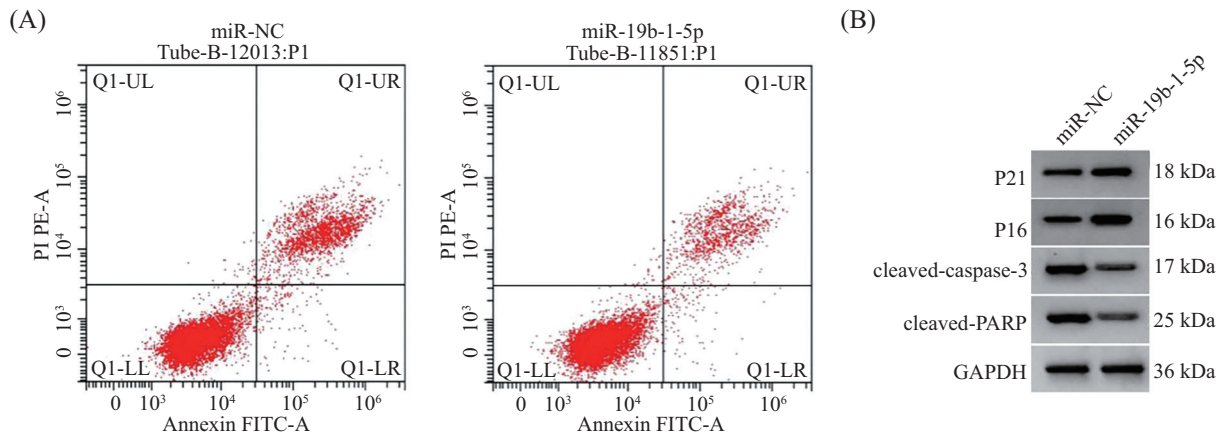
图3 IFNG-AS1与miR-19b-1-5p核苷酸序列的结合位点

Fig.3 The binding sites of nucleotide sequences between IFNG-AS1 and miR-19b-1-5p

表4 双荧光素酶报告实验结果

Table 4 The results of dual luciferase report experiment

分组 Group	荧光活性 Fluorescence activity	
	IFNG-AS1-WT	IFNG-AS1-MUT
miR-NC	1.01±0.08	1.00±0.09
miR-19b-1-5p	0.31±0.03*	0.97±0.07
<i>t</i>	24.579	0.789
<i>P</i>	<0.001	0.441

P*<0.05, 与miR-NC组比较。P*<0.05 compared with miR-NC group.

A: 过表达miR-19b-1-5p的oxLDL诱导的EVC-304细胞的凋亡图; B: 过表达miR-19b-1-5p的oxLDL诱导的EVC-304细胞P21、P16、cleaved-PARP、cleaved-caspase-3的蛋白表达图。

A: apoptosis of oxLDL-induced EVC-304 cells with miR-19b-1-5p overexpression; B: protein expression of P21, P16, cleaved-PARP and cleaved-caspase-3 in oxLDL-induced EVC-304 cells with miR-19b-1-5p overexpression.

图4 过表达miR-19b-1-5p对oxLDL诱导的EVC-304细胞凋亡及蛋白表达的影响

Fig.4 The effects of miR-19b-1-5p overexpression on the apoptosis and protein expression of P21, P16, cleaved-PARP and cleaved-caspase-3 of oxLDL-induced EVC-304 cells

表5 过表达miR-19b-1-5p对oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖、凋亡的影响

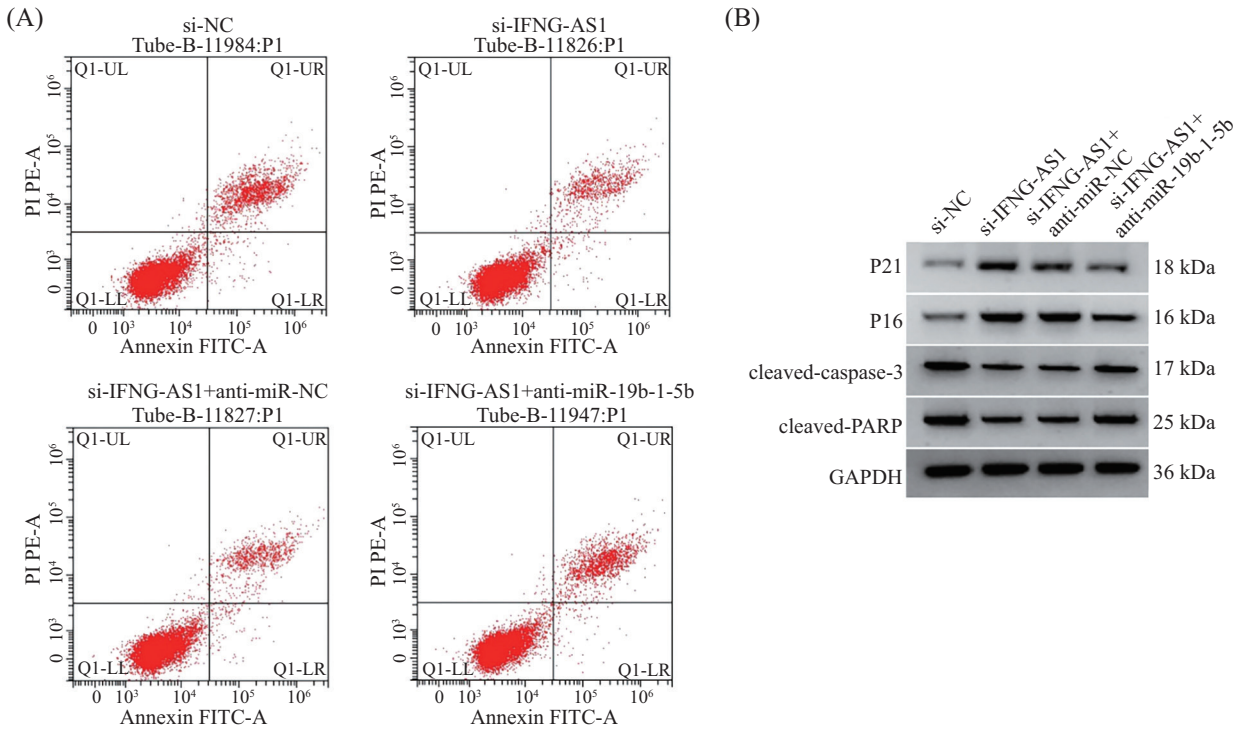
Table 5 The effects of miR-19b-1-5p overexpression on the proliferation and apoptosis of oxLDL-induced EVC-304 cells

分组 Group	miR-19b-1-5p	凋亡率/% Apoptosis rate /%	<i>D</i> 值(490 nm) <i>D</i> value (490 nm)			相对蛋白表达 Relative protein expression			
			24 h	48 h	72 h	P21	P16	cleaved-PARP	cleaved-caspase-3
miR-NC	0.98±0.07	20.18±1.68	0.26±0.02	0.58±0.05	1.15±0.09	0.97±0.08	1.01±0.06	0.98±0.05	0.99±0.06
miR-19b-1-5p	0.25±0.02*	10.98±0.94*	0.28±0.02	0.72±0.05*	1.44±0.08*	1.48±0.09*	1.61±0.08*	0.33±0.03*	0.38±0.03*
<i>t</i>	30.082	14.336	2.121	5.940	7.225	12.706	18.000	33.442	24.029
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.020	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0	0

P*<0.05, 与si-NC组比较。P*<0.05 compared with si-NC group.

(*P*<0.05), P21、P16的蛋白表达显著升高(*P*<0.05), cleaved-PARP、cleaved-caspase-3的蛋白表达显著降低(*P*<0.05); 与si-IFNG-AS1+anti-miR-NC组相比,

si-IFNG-AS1+anti-miR-19b-1-5p组细胞中miR-19b-1-5p表达显著降低, 48 h、72 h时的细胞*D*值显著降低(*P*<0.05), 细胞凋亡率显著升高(*P*<0.05), P21、



A: anti-miR-19b1-5p和si-IFNG-AS1共转染的oxLDL诱导的EVC-304细胞凋亡图; B: P21、P16、cleaved-PARP、cleaved-caspase-3的蛋白表达图。
A: cell apoptosis of oxLDL-induced EVC-304 cells co-transfected with si-IFNG-AS1 and anti-miR-19b-1-5p; B: protein expression of P21, P16, cleaved-PARP and cleaved-caspase-3.

图5 抑制miR-19b-1-5p逆转了抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞的凋亡及P21、P16、cleaved-PARP、cleaved-caspase-3蛋白表达的影响

Fig.5 miR-19b-1-5p inhibition reverses the effects of IFNG-AS1 inhibition on the apoptosis of EVC-304 cells induced by ox-LDL and the protein expression of P21, P16, cleaved-PARP and cleaved-caspase-3

P16的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), cleaved-PARP、cleaved-caspase-3的蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$) (图5和表6)。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种复杂的血管壁炎症性疾病, 涉及血管平滑肌细胞、内皮细胞和巨噬细胞等多种类型细胞的相互作用。大规模的全基因组关联研究和新一代测序技术的快速发展增加了lncRNA转录本的数量, 对于预测lncRNA转录本在该病的发病机制中的作用很关键^[7-8]。内皮细胞损伤和死亡在动脉粥样硬化的发病机理中起着至关重要的作用。低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)通过血管壁渗入皮下组织, 发生氧化反应形成oxLDL, 这是发生冠状动脉粥样硬化的关键环节。oxLDL能够诱导血管内皮细胞的凋亡、坏死及调控细胞因子的表达和分泌^[9-10]。因此, oxLDL常被用作建立冠状动脉粥样硬化体外细胞模型的诱导剂^[11]。LUO等^[12]的研究中也报道了lncRNA IFNG-AS1水平在冠心病患者血液

中表现出异常的升高。XU等^[13]在冠状动脉疾病的研究中报道, lncRNA IFNG-AS1的表达水平显著升高, 并且与患者病情的严重程度和炎症水平的增加具有紧密的相关性。遗憾的是, 并未对lncRNA IFNG-AS1在冠状动脉疾病中的调控作用进行深入研究。本研究通过oxLDL诱导人脐静脉血管内皮细胞EVC-304损伤, 用qRT-PCR法检测其中IFNG-AS1的表达, 发现IFNG-AS1表达异常升高, 这与XU等^[13]的实验结果相一致, 这个结果再次证明了lncRNA IFNG-AS1在冠状动脉粥样硬化中的异常高表达, 为其在冠状动脉疾病中的后续研究奠定了基础。本研究进一步通过CCK-8、流式细胞术检测细胞增殖、凋亡, 发现抑制IFNG-AS1能够明显的抑制oxLDL诱导的EVC-304细胞的增殖和凋亡, 暗示IFNG-AS1参与冠状动脉粥样硬化的发展过程; 进一步通过生物信息学预测、双荧光素酶报告基因检测实验验证了IFNG-AS1负调控miR-129-5p, 猜测这也许与IFNG-AS1调控oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖、凋亡具有一定的相关性。

miRNA参与心血管疾病的发展进程, 但是其具

表6 抑制miR-19b-1-5p逆转了抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖、凋亡的影响

Table 6 miR-19b-1-5p inhibition reverses the effects of IFNG-AS1 inhibition on the proliferation and apoptosis of EVC-304 cells induced by oxLDL

分组 Group	miR-19b-1-5p	凋亡率/% Apoptosis rate /%	D值(490 nm) D value (490 nm)			相对蛋白表达 Relative protein expression			
			24 h	48 h	72 h	P21	P16	cleaved-PARP	cleaved-caspase-3
si-NC	1.00±0.09	18.17±1.37	0.31±0.03	0.53±0.05	0.97±0.09	0.99±0.06	1.00±0.07	1.02±0.08	1.03±0.09
si-IFNG-AS1	2.02±0.019*	9.82±0.76*	0.31±0.03	0.78±0.06*	1.57±0.09*	1.57±0.09*	1.82±0.08*	0.38±0.03*	0.42±0.04*
si-IFNG-AS1+anti-miR-NC	2.06±0.21	9.69±0.68	0.30±0.03	0.81±0.05	1.61±0.08	1.60±0.08	1.84±0.09	0.41±0.04	0.44±0.04
si-IFNG-AS1+anti-miR-19b-1-5p	1.54±0.11 [#]	16.65±1.19 [#]	0.32±0.03	0.60±0.04 [#]	1.05±0.09 [#]	1.12±0.07 [#]	1.21±0.07 [#]	0.71±0.07 [#]	0.73±0.07 [#]
F	88.386	164.927	0.666	66.647	133.055	151.200	270.556	234.261	183.481
P	<0.001	<0.001	0.578	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0	0

* $P < 0.05$, 与si-NC组比较; [#] $P < 0.05$, 与si-IFNG-AS1+anti-miR-NC组比较。

* $P < 0.05$ compared with si-NC group; [#] $P < 0.05$ compared with si-IFNG-AS1+anti-miR-NC group.

体的调控机制十分复杂,有待进一步深入研究^[14-15]。据报道,miR-19b-1能够通过阻断内皮细胞的细胞周期进程进而抑制心血管的生成^[16]。KOK等^[17]在研究中报道,在血小板miR-19b-1-5p低表达的心血管疾病患者中进行抗血液凝集药物阿司匹林治疗容易发生治疗抗性,提示miR-19b-1-5p与心血管疾病的诊断、治疗可能具有相关性。PASEBAN等^[18]在研究miRNAs、阿司匹林与心血管疾病之间的联系中也提及miR-19b-1-5p参与心血管疾病治疗过程中阿司匹林抗性的产生。SINGH等^[19]在研究中发现,miR-19b-1-5p表达较低的患者,其发生不良心血管疾病的风险较高,揭示了较低的miR-19b-1-5p表达与阿司匹林耐药、持续的血小板聚集、白细胞增加和急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者发生主要不良心脑血管事件(major adverse cardio-cerebrovascular event, MACCE)的风险有关,提示miR-19b-1-5p可能是阿司匹林耐药性的检测标志物,并可能被用于预测ACS患者的MACCE。因此,推测miR-19b-1-5p可能与冠状动脉粥样硬化的发生发展具有相关性。本研究检测了oxLDL诱导的EVC-304细胞中miR-19b-1-5p的表达,发现miR-19b-1-5p水平异常降低,提示miR-19b-1-5p可能在冠状动脉粥样硬化中出现异常表达,并且miR-19b-1-5p的低表达可能参与冠状动脉粥样硬化的病情加重。进一步研究发现,过表达miR-19b-1-5p具有与下调IFNG-AS1

相同的抑制oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖和凋亡的作用,这说明上调miR-19b-1-5p具有与下调IFNG-AS1相类似地减弱oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖、凋亡的损伤功能。除此之外,抑制miR-19b-1-5p还可逆转抑制IFNG-AS1对oxLDL诱导的EVC-304细胞增殖、凋亡的调控作用。不足之处为,这些结果仅在体外得到了初步证实,缺乏动物体内实验的充分验证,这也是本实验室即将进行的下一步研究计划。

综上所述, lncRNA IFNG-AS1可调控oxLDL诱导的人脐静脉血管内皮细胞EVC-304的增殖、凋亡,其机制与靶向miR-19b-1-5p相关,这为冠状动脉粥样硬化的治疗提供了新方向。

参考文献 (References)

- [1] PARSONS C, AGASTHI P, MOOKADAM F, et al. Reversal of coronary atherosclerosis: role of life style and medical management [J]. Trends Cardiovasc Med, 2018, 28(8): 524-31.
- [2] DALEN J E, ALPERT J S, GOLDBERG R J, et al. The epidemic of the 20(th) century: coronary heart disease [J]. Am J Med, 2014, 127(9): 807-12.
- [3] SCHAFTENAAR F, FRODERMANN V, KUIPER J, et al. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells [J]. Curr Opin Lipidol, 2016, 27(3): 209-15.
- [4] LI L, WANG L Y, LI H F, et al. Characterization of lncRNA expression profile and identification of novel lncRNA biomarkers to diagnose coronary artery disease [J]. Atherosclerosis, 2018, 275(8): 359-67.

- [5] WANG Y R, SONG X J, LI Z B, et al. Long non-coding RNAs in coronary atherosclerosis [J]. *Life Sci*, 2018, 211(10): 189-97.
- [6] YIN Q, WU A S, LIU M H. Plasma long non-coding RNA (lncRNA) GAS5 is a new biomarker for coronary artery disease [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23(12): 6042-8.
- [7] TURNER A W, WONG D, KHAN M D, et al. Multi-omics approaches to study long non-coding RNA function in atherosclerosis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2019, 6(2): 9-27.
- [8] ARSLAN S, BERKAN Ö, LALEM T, et al. Long non-coding RNAs in the atherosclerotic plaque [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 266(11): 176-81.
- [9] HUANG B S, CHEN Y, XIE Q, et al. CagA-positive *Helicobacter pylori* strains enhanced coronary atherosclerosis by increasing serum OxLDL and HsCRP in patients with coronary heart disease [J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(1): 109-14.
- [10] TRPKOVIC A, RESANOVIC I, STANIMIROVIC J, et al. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, 52(2): 70-85.
- [11] WANG X M, LI X W, WU Y H, et al. Upregulation of miR-223 abrogates NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis to attenuate oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced cell death in human vascular endothelial cells (ECs) [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2020, 56(8): 670-9.
- [12] LUO F, WANG T, ZENG L N, et al. Diagnostic potential of circulating lncRNAs in human cardiovascular disease: a meta-analysis [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): 1-11.
- [13] XU Y H, SHAO B B. Circulating lncRNA IFNG-AS1 expression correlates with increased disease risk, higher disease severity and elevated inflammation in patients with coronary artery disease [J]. *J Clin Lab Anal*, 2018, 32(7): e22452.
- [14] O'SULLIVAN J F, NEYLON A, MCGORRIAN C, et al. MicroRNA expression in coronary artery disease [J]. *Microna*, 2014, 2(3): 205-11.
- [15] FEINBERG M W, MOORE K J. MicroRNA regulation of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 703-20.
- [16] YIN R T, BAO W W, XING Y Y, et al. MiR-19b-1 inhibits angiogenesis by blocking cell cycle progression of endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(2): 771-6.
- [17] KOK M G, MANDOLINI C, MOERLAND P D, et al. Low miR-19b-1-5p expression in isolated platelets after aspirin use is related to aspirin insensitivity [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 203(1): 262-3.
- [18] PASEBAN M, MARJANEH R M, BANACH M, et al. Modulation of microRNAs by aspirin in cardiovascular disease [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2020, 30(5): 249-54.
- [19] SINGH S, DE RONDE M W J, CREEMERS E E, et al. Low miR-19B-1-5P expression in ACS patients is related to aspirin resistance and major adverse cardio-cerebrovascular event (macce) [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 287(5): e142.