

# LncRNA SETD5-AS1在缺血性脑卒中患者血浆中表达上调并通过PI3K-AKT通路抑制细胞增殖

李海鹏<sup>1,2</sup> 刘一帆<sup>1,2</sup> 范辉辉<sup>1,2</sup> 雷京霖<sup>1,2</sup> 胡政<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>南华大学衡阳医学院, 郴州市第一人民医院, 郴州 423000; <sup>2</sup>湘南学院第一临床学院, 郴州市第一人民医院神经内科, 郴州 423000; <sup>3</sup>湘南学院第一临床学院, 郴州市第一人民医院转化医学研究所, 郴州 423000)

**摘要** 为探讨长链非编码RNA SETD5-AS1(lncRNA SETD5-AS1)在缺血性脑卒中(IS)血浆中的表达及其对细胞的影响, 该研究通过血浆转录组学测序, 动态分析3例缺血性脑卒中高危人群发病前后血浆lncRNA表达变化, 筛选出发病后显著上调的lncRNA SETD5-AS1。在氧糖剥夺/复氧复糖(OGD/R)细胞模型中, 过表达及敲低SETD5-AS1后, 采用CCK-8与EDU法检测SH-SY5Y细胞活力与增殖变化; 通过KEGG通路分析差异lncRNA涉及的关键信号通路; 利用Western blot检测PI3K-AKT通路蛋白及其磷酸化水平。进一步收集54例高危人群和56例发病24 h内卒中患者血浆, 通过荧光定量PCR(RT-qPCR)检测SETD5-AS1表达并绘制ROC曲线评估其早期诊断价值; 另外, 对16例留存有发病前后血样的患者也进行lncRNA表达验证。研究发现3例IS患者发病前后SETD5-AS1表达差异最为显著; 过表达lncRNA SETD5-AS1可降低OGD/R后细胞活力、增殖能力及p-AKT和p-PI3K的表达水平, 敲低lncRNA SETD5-AS1结果则相反; 在IS病人组及同一病人IS发病后血浆中SETD5-AS1表达显著上调, ROC曲线提示其可能有较好的预测价值。该研究表明血浆lncRNA SETD5-AS1在IS病人血浆中表达上调, 并通过抑制PI3K-AKT通路介导缺血性脑卒中发病, 在IS发病预警及早期诊断上具有一定临床价值。

**关键词** lncRNA; SETD5-AS1; 缺血性脑卒中; 细胞增殖

## LncRNA SETD5-AS1 is Upregulated in the Plasma of Ischemic Stroke Patients and Inhibits Cell Proliferation through the PI3K-AKT Pathway

LI Haipeng<sup>1,2</sup>, LIU Yifan<sup>1,2</sup>, FAN Huihui<sup>1,2</sup>, LEI Jinglin<sup>1,2</sup>, HU Zheng<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Translational Medicine Institute, the First People's Hospital of Chenzhou, Hengyang Medical School, University of South China, Chenzhou 423000, China; <sup>2</sup>Department of Neurology, the First People's Hospital of Chenzhou, the First Clinical College, University of Xiangnan, Chenzhou 423000, China; <sup>3</sup>Translational Medicine Institute, the First People's Hospital of Chenzhou, the First Clinical College, University of Xiangnan, Chenzhou 423000, China)

**Abstract** This study was to investigate the expression of long non-coding RNA SETD5-AS1 in plasma from IS (ischemic stroke) patients and its effects on IS cells, dynamic analysis of plasma transcriptome by sequencing was performed to investigate changes in plasma lncRNA expression in three high-risk individuals before and

收稿日期: 2025-09-29 接受日期: 2026-02-09

湖南省卫生健康委国家临床重点专科重大科研专项(批准号: Z2023127)、湖南省自然科学基金(批准号: 2023JJ50372)、湖南省卫生健康委科研计划(批准号: D202303077684)和湘南学院校级科研项目(批准号: 2022JX109)资助的课题

\*通信作者。Tel: 18229336273, E-mail: hu48005@163.com

Received: September 29, 2025 Accepted: February 9, 2026

This work was supported by the Major Research Project of National Clinical Key Specialties of Hunan Provincial Health Commission (Grant No.Z2023127), the Hunan Provincial Natural Science Foundation Regional Joint Fund (Grant No.2023JJ50372), the Research Project of Hunan Provincial Health Commission (Grant No.D202303077684) and the Xiangnan University College-Level Research Project (Grant No.2022JX109)

\*Corresponding author. Tel: +86-18229336273, E-mail: hu48005@163.com

after the onset of stroke. The lncRNA SETD5-AS1 was identified as significantly upregulated in post-stroke plasma of IS patients. In an OGD/R (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation) cell model, the effects of overexpression and knockdown of SETD5-AS1 on the viability and proliferation of SH-SY5Y cells were assessed using CCK-8 and EDU assays. KEGG pathway analysis was conducted to identify key signaling pathways associated with differentially expressed lncRNAs. Western blot was employed to examine the protein levels and phosphorylation status of the AKT and PI3K. Furthermore, plasma samples from 54 high-risk IS individuals and 56 stroke patients within 24 h of onset were collected, and RT-qPCR was performed to detect SETD5-AS1 expression. ROC (receiver operating characteristic) curve analysis was carried out to evaluate its early diagnostic value. Additionally, validation of this lncRNA expression was conducted in 16 patients with paired plasma samples collected before and after stroke onset. The results of this study found the expression of SETD5-AS1 showed the most significant difference before and after the onset of IS in three patients. Overexpression of lncRNA SETD5-AS1 reduced cell viability, proliferation capacity, and the expression of p-AKT and p-PI3K protein phosphorylation levels following OGD/R; while knockdown of lncRNA SETD5-AS1 resulted in the opposite effects. In the plasma of IS patients, SETD5-AS1 expression was significantly upregulated after onset compared to before onset. ROC curve analysis indicated that SETD5-AS1 possesses favorable diagnostic and predictive value. This study demonstrates lncRNA SETD5-AS1 of IS plasma is markedly up-regulated after IS onset and contributes to the pathogenesis of IS by inhibiting cell proliferation through blocking the PI3K-AKT signaling pathway, indicating its potential clinical value in early warning and diagnosis for IS.

**Keywords** lncRNA; SETD5-AS1; ischemic stroke; cell proliferation

脑卒中是各种脑血管病变引发的局限性或弥漫性脑功能障碍的临床事件,包括缺血性卒中和出血性卒中,其中缺血性脑卒中约占80%<sup>[1]</sup>。最新《中国卒中中心报告2022年》表明:在我国40岁以上人群中,卒中患者约为1 780万,卒中新发患者约为340万,卒中相关的死亡患者约为230万<sup>[2]</sup>。当前缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)的诊断主要依赖临床症状和神经影像学检查,缺少高效可靠的生物标志物来协助该疾病的筛查与诊断。因此,探索具有临床应用前景的生物标志物以协助缺血性脑卒中患者的早期诊断具有重要的临床意义。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)由超过200个核苷酸组成,约占非编码RNA的80%左右,可通过多种不同机制在基因层面参与调控多种生物过程<sup>[3]</sup>。近年来,因lncRNA具有相对稳定性、特异性和可重复性等特点,且作为转录后调节基因表达的重要调控介质,使其在缺血性脑卒中相关研究中崭露头角。Lnc\_AABR07044470.1通过IS中的miR-214-3p/PERM1轴促进对神经元损伤的炎症反应<sup>[4]</sup>。上调lnc\_000048间接调节MAP2K2的ERK磷酸化,并最终通过MAPK通路激活炎症反应,促进动脉粥样硬化,增加缺血性卒中的发病风险<sup>[5]</sup>。LncRNA000587竞争性结合miR-128-2-

5p上调TGFβ1和Bcl2的表达,抑制氧糖剥夺/复氧复糖(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导的PC12细胞凋亡,介导RIP脑保护作用<sup>[6]</sup>。体内敲减lncRNA NEAT1可以上调miR-488-3p的表达,并下调RAC1和GFAP的水平,减轻脑缺血再灌注损伤<sup>[7]</sup>。越来越多的证据表明,lncRNA广泛参与缺血性脑卒中的多个病理生理过程,显示出其作为缺血性脑卒中诊断、治疗靶点的潜在作用<sup>[8-9]</sup>。

本研究通过高通量测序筛选出lncRNA SETD5-AS1进行研究,采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测高危人群以及发病24 h内缺血性脑卒中患者外周血lncRNA SETD5-AS1水平并分析lncRNA SETD5-AS1在急性缺血性卒中的诊断价值,并在SH-SY5Y细胞上进一步研究作用机制,为急性缺血性脑卒中的早期诊断及治疗提供理论依据。

## 1 研究对象与方法

### 1.1 研究对象

1.1.1 高通量测序研究对象 本研究选取曾参与脑卒中筛查与干预项目且被评估为脑卒中高危人群并留存有外周静脉血样本至郴州市第一人民医院生

表1 用于高通量测序分析的3例脑卒中患者临床资料

Table 1 Clinical data of three stroke patients for high-throughput sequencing analysis

项目 Project	#1	#2	#3
Age	71	66	68
Gender	Male	Male	Male
Hypertension	+	+	+
Diabetes	-	+	-
High blood lipids	+	-	+
Coronary heart disease	-	+	-
Previous stroke history	-	+	-
Smoking history	+	+	+

#1、#2、#3分别代表3例患者。+: 具备该高危因素; -: 不具备该高危因素。

#1, #2, and #3 represent the three patients, respectively. +: presence of the high-risk factor; -: absence of the high-risk factor.

表2 研究对象的一般临床资料

Table 2 General clinical data of the study subjects

项目 Project	高危人群组(n=54) High-risk group (n=54)	缺血性脑卒中组(n=56) Ischemic stroke group (n=56)
Age	60.35±9.16	62.76±11.57
Gender (male/female)	25/29	36/20
Hypertension	34 (63.0%)	48 (85.1%)
Diabetes	16 (29.6%)	22 (39.3%)
High blood lipids	12 (22.2%)	21 (37.5%)
Coronary heart disease	7 (13.0%)	12 (21.4%)
Previous stroke history	0	4 (7.1%)
Smoking history	8 (14.8%)	10 (17.6%)

物标本库,且在发病24 h内至该院就诊且明确诊断为缺血性脑卒中的患者3例,于发病后24 h内采集外周静脉血样,并收集其基本资料和临床资料(表1)。

1.1.2 验证实验研究对象 缺血性脑卒中患者组:连续纳入2020年3月—2020年10月发病24 h内至郴州市第一人民医院就诊且确诊为急性缺血性脑卒中的患者56例。纳入标准:缺血性脑卒中患者符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2018》诊断标准,而且经头颅CT或MRI检查发现相对应的责任病灶;对入选的缺血性脑卒中患者于发病后24 h内采集外周静脉血样并收集个人基本资料、脑卒中高危因素及临床资料(表2)。

脑卒中高危人群组:纳入选取2018年度参与了脑卒中筛查与干预项目,24 h内未发生脑卒中及短暂脑缺血发作(transient ischemic attack, TIA)等疾病,且被评估为脑卒中高危人群的筛查对象54例(标准为同时存在糖尿病、高血压这2项及以上者;或存在糖尿病和高血压中任意1项,同时存在高血脂、体重

超标、吸烟、心房颤动、运动不足、卒中家族史这6项脑卒中高危因素中的任意2项及以上者,需排除既往有患脑卒中病史者)。

选取脑卒中高危人群后续发展为缺血性脑卒中16名患者进行研究,发病前后血样保存完整。

排除标准:(1)患者或家属拒绝,或不愿意留存血液样本;(2)患有血管炎者;(3)有严重的自身免疫性疾病患者;(4)严重血液系统疾病患者或严重贫血者;(5)恶性肿瘤;(6)近期有妊娠时、手术史;(7)患有严重传染性疾病,如艾滋病、梅毒等;(8)存在寄生虫病史者。

本研究已获得郴州市第一人民医院医学伦理委员会批准(批准号:第2024036号),所有患者均签署知情同意书。

## 1.2 主要试剂和仪器

SH-SY5Y细胞购自中国科学院上海细胞库;SETD5-AS1过表达质粒合成自南京金斯瑞生物科技有限公司;敲低siRNA合成自上海吉玛基因有限公

司; RNA定量检测试剂盒购自瑞士Roche公司; CCK-8、EDU检测试剂盒、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT一抗及相应二抗均购自上海碧云天生物技术公司;  $\beta$ -actin抗体购自美国Proteintech公司; 细胞培养用培养基和胎牛血清购自新西兰NEWZERUM公司; 离心机购自美国Eppendorf公司; SDS-PAGE凝胶电泳及转膜装置购自美国Bio-Rad公司; 显影仪购自上海普诺森生物科技有限公司; 细胞缺氧装置购自加拿大STEMCELL公司。

### 1.3 3例缺血性脑卒中患者发病前后血浆RNA转录样本二代测序

取3例患者发病前后外周静脉血浆总RNA, 将提取的血浆总RNA浓度、28S/18S、RIN值及片段大小在Agilent 2100 Bioanalyzer上机检测后准确记录, 取适量检测后样品通过冷链运输至武汉华大基因医学检验所进行lncRNA文库构建与Illumina测序。使用DESeq2及PossionDis差异分析法对高通量测序结果进行分析, 筛选两组间具有显著差异表达的lncRNA, 取表达差异倍数改变(fold change, FC) $\geq 2$ , 即 $\log_2FC \geq 2$ , 同时满足FDR $\leq 0.001$ 且 $P \leq 0.05$ , 及FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments)值至少在一个样品中 $\geq 0.5$ 作为差异基因筛选的标准。

### 1.4 血浆lncRNA SETD5-AS1测定

采用Trizol法提取人外周静脉血浆总RNA, 逆转录合成cDNA, 采用RT-qPCR检测血浆lncRNA SETAD5-AS1, 所有操作按照试剂说明书步骤进行。基因的相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法, 用内参 $\beta$ -actin值进行归一化处理。

### 1.5 细胞培养、转染及分组

SH-SY5Y细胞用15%胎牛血清、84% MEM/F12培养基于37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养, 根据细胞生长情况更换培养基以及传代。取对数期SH-SY5Y细胞接种至6孔板细胞培养皿, 按照说明书要求转染SETD5-AS1过表达质粒及敲低siRNA。靶向lncRNA SETD5-AS1的3条siRNA合成自苏州吉玛基因股份有限公司, 序列如下: siRNA1: 5'-GCC GCU GUU GAG UGA UAA ATT-3'; siRNA2: 5'-CCU AGC C CU GAG UGA UCU UTT-3'; siRNA3: 5'-GGU AGG UUU AGG UAU GCA UTT-3'。

### 1.6 构建OGD/R细胞模型

选择处于生长对数期SH-SY5Y细胞, 更换为无

血清低糖培养液, 将培养皿置于缺氧装置中, 将氮气流速调整为25 L/min, 氮气置换5 min后立即夹闭缺氧装置, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中4 h后将细胞从装置中取出, 更换新鲜培养基24 h后收取细胞待检。

### 1.7 CCK-8细胞活性测定

将SH-SY5Y细胞接种于96孔板中, 每孔3 000个细胞, 每组至少设置5个复孔, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱培养; 待细胞密度达到80%左右时进行OGD/R处理, 向孔板中依次加入10  $\mu$ L CCK-8溶液, 放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中避光孵育2 h; 采用多功能酶标仪检测450 nm下的吸光度(D)值, 计算细胞存活率, 细胞存活率=[(实验孔D值-空白孔D值)/(对照孔D值-空白孔D值)] $\times 100\%$ 。

### 1.8 细胞增殖检测(EDU)

用EDU培养基替换掉原培养基, 放入细胞培养箱继续培养2 h, 弃去EDU培养基, 加入适量PBS, 置于摇床上洗涤2次, 每次5 min, 每孔加入适量体积的4%多聚甲醛, 室温下对细胞进行固定, 时间为30 min, 弃去固定液, 往每孔加入500  $\mu$ L 2 mg/mL甘氨酸, 摇床脱色5 min, 弃去废液, PBS清洗5 min, 加入500  $\mu$ L渗透剂摇床孵育10 min, PBS清洗1次, 5 min; 每孔加入300  $\mu$ L染色反应液, 室温避光孵育30 min, 弃反应液, 加入500  $\mu$ L渗透剂清洗3次, 每次5 min, 弃渗透剂; 每孔加入300  $\mu$ L制备好的1 $\times$  Hoechst反应液, 室温避光孵育1 h, 弃反应液, 用PBS清洗3次, 每次5 min。

### 1.9 蛋白免疫印迹(Western blot)实验

提取细胞蛋白后进行电泳, 恒压80 V持续30 min, 再调整为120 V持续60 min; 之后进行转膜(250 mA、30 min)和室温封闭1 h(5%脱脂牛奶); 封闭完成后, 4 °C一抗[ $\beta$ -actin(1:5 000)、PI3K(1:500)、p-PI3K(1:1 000)、AKT(1:500)、p-AKT(1:500)]孵育过夜, 以 $\beta$ -actin作为内参; 第二天进行膜洗涤, 然后进行二抗(1:4 000)室温孵育1 h, 再次进行膜洗涤。最后使用超敏发光显色液进行显色, 最后使用显影仪获取条带图片。

Western blot结果应用ImageJ软件进行定量分析, 具体方法为: 通过灰度扫描获得每个条带的灰度值, 再将磷酸化蛋白条带灰度值与非磷酸化蛋白灰度值相比, 获得比值, 再对3次Western blot灰度比值进行统计分析。

### 1.10 统计学方法

采用SPSS 23.0软件对各组lncRNA的相对表达

量进行统计分析。若为连续性变量资料,用单样本K-S检验进行正态性检验,计数资料以率(%)表示,对资料比较采用 $\chi^2$ 检验。服从正态分布的定量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,不服从正态分布则应用中位数(四分位数间距)表示,两样本之间的均数比较用独立样本 $t$ 检验,两组及以上样本间比较采用Mann-Whitney  $U$ 检验,采用ROC曲线评价目的lncRNA的诊断价值。本实验所有检验均为双侧检验, $P<0.05$ 时差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3例研究对象一般临床资料及危险因素

用于高通量测序的3例患者符合临床缺血性脑卒中的入组标准,其临床参数特征见表1;通过脑卒中高危筛查,收集到了3例患者在发病前后的外周血样本,分离血浆后提取RNA样本,对其中的lncRNA进行了高通量测序筛查,筛选缺血性脑卒中患者在发病前后血浆差异表达lncRNA。

### 2.2 高通量测序结果及差异性lncRNA筛选

通过对3例脑卒中高危状态血浆样本及其缺血性脑卒中发病24 h内的血浆样本进行RNA转录组高通量测序,使用DESeq2及PossionDis差异分析方法,筛选两组之间具有显著表达差异的lncRNA。3例患者依次被命名为#1、#2和#3,其高危状态血浆样本为a组,发病24 h内的血浆样本为b组。测序结果显示a组与b组样本之间差异lncRNA共96个,其中上调lncRNA有80个,下调lncRNA有16个,见差异基因聚类热图(图1);根据每个差异lncRNA在整个3例患者中的统计结果,筛选在每个病例发病前后都有差异的lncRNA;对其中6个lncRNA(SETD5-AS1、LOC100288069、LOC105377989、MIR133A1HG、XIST及RNFT1-DT)再次用这3例测序剩余RNA样本进行验证,发现lncRNA SETD5-AS1上调差异最为显著(图1B)。

### 2.3 lncRNA SETD5-AS1在OGD/R后SH-SY5Y细胞中表达上调

将实验分为Control组、OGD2H组、OGD4H组、OGD6H组、OGD8H组,通过CCK-8检测OGD后细胞活力。结果显示,与对照组相比,随着OGD时间的延长,细胞活力逐渐下降,通过查阅相关文献,我们最终选择细胞活力在50%左右,即OGD4H作为氧糖剥夺时间(图2A)。复氧复糖实验完成OGD/R后,收集细胞提取总RNA进行RT-qPCR实验。结果显示,

随着复氧复糖时间的延长,lncRNA SETD5-AS1的相对表达量表现为先升高再下降且在复氧复糖24 h时显著升高(图2B)。因此,我们选择OGD4H/R24H作为后续实验条件。

### 2.4 上调lncRNA SETD5-AS1表达显著降低OGD/R后细胞增殖活力

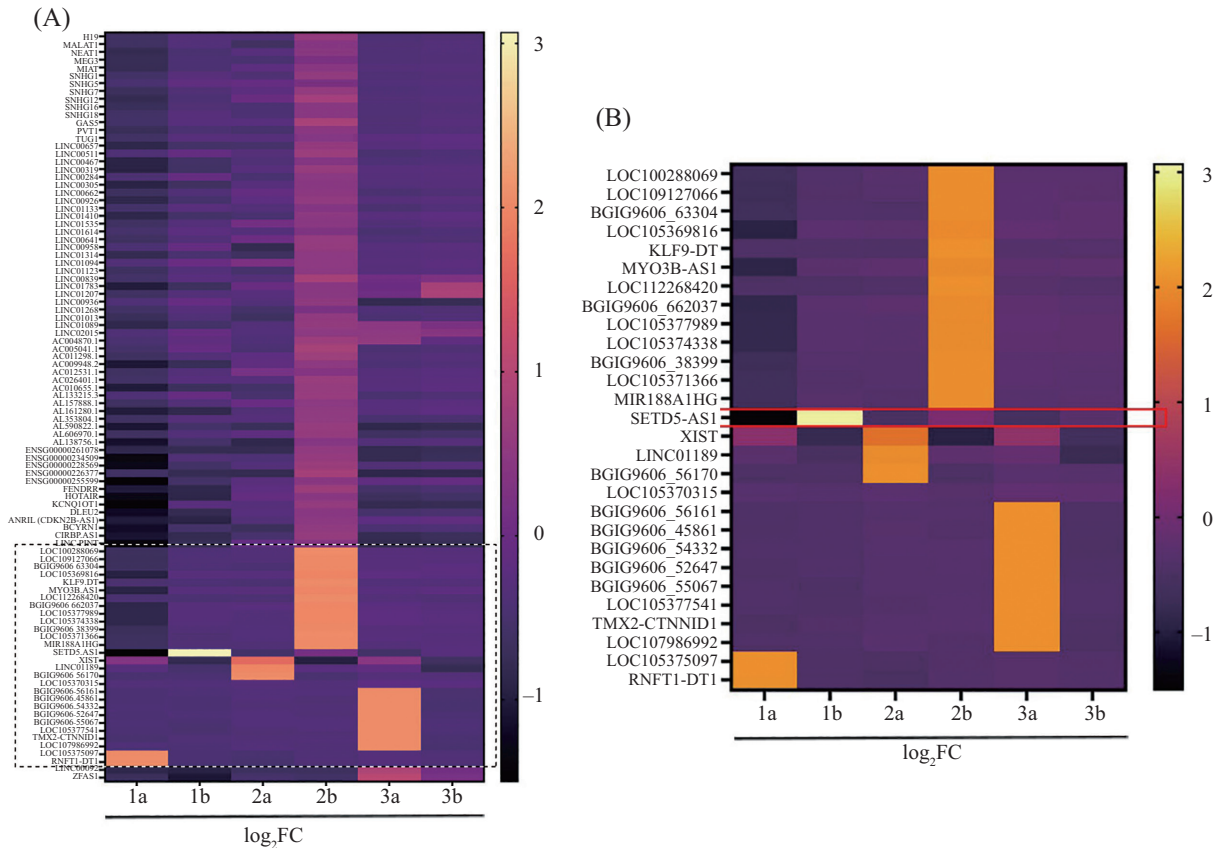
通过脂质体转染pcDNA3.1-SETD5-AS1过表达质粒上调lncRNA SET5D-AS1的表达,通过RT-qPCR验证转染效率,结果显示转染pcDNA3.1 SETD5-AS1后lncRNA SETD5-AS1表达水平显著升高(图3A;  $P<0.001$ );进一步发现在OGD/R处理组中,CCK-8结果显示过表达SETD5-AS1降低了OGD/R后的细胞活力(图3B;  $P<0.01$ )。同时,EDU检测结果也表明,与对照组相比,OGD/R组EDU阳性细胞数显著降低,表明lncRNA SETD5-AS1表达上调显著降低OGD/R后细胞增殖活力(图3C和图3D;  $P<0.01$ )。

### 2.5 下调lncRNA SETD5-AS1表达显著增加OGD/R后细胞增殖活力

为了敲减lncRNA SETD5-AS1表达,对从公司购买的3条siRNA的敲降效果进行筛选,统计3次实验结果发现si-SETD5-AS1-3干扰效率最为显著,最终选取si-SETD5-AS1-3用于后续实验(图4A;  $P<0.001$ )。在转染si-SETD5-AS1-3后,经过OGD/R处理,然后对细胞增殖情况进行分析,CCK-8检测结果显示敲减SETD5-AS1表达提高了OGD/R后的细胞的活力,差异具有统计学意义(图4B;  $P<0.05$ );同时EDU实验结果也表明,与对照组相比,敲减SETD5-AS1表达的OGD/R组EDU阳性细胞数明显增加(图4C和图4D;  $P<0.01$ );以上结果表明,下调lncRNA SETD5-AS1表达显著增加OGD/R后细胞增殖活力。

### 2.6 lncRNA SETD5-AS1通过抑制PI3K-AKT通路参与缺血性脑卒中

对3例缺血性脑卒中患者发病前后血浆lncRNA高通量测序筛选到的96个差异基因进行KEGG通路富集分析,结果显示相关lncRNA可能与癌症、神经退行性疾病、PI3K-AKT、cGMP-PKG、FOXO等信号通路相关,而其中PI3K-AKT通路富集程度相对较高,同时富集的靶基因数相对较多(图5A)。有文献报道MAPK/PI3K-AKT通路可通过调控细胞凋亡增强缺血性脑卒中神经元的功能,而lncRNA SETD5-AS1可通过抑制PI3K-AKT通路促进神经元凋亡<sup>[4-6]</sup>。据此,本研究运用Western blot方法对OGD/R后SH-SY5Y



运用DESeq2及PoissonDis差异分析方法分析差异lncRNA。A: 筛选到的差异变化的96条lncRNA表达热图。B: 包含lncRNA SETD5-AS1在内的28条差异lncRNA表达热图。横轴为样本的log<sub>2</sub>(表达量值), 纵轴为lncRNA。色块的颜色黄与黑分别表示表达量的高与低。1a、1b、2a、2b、3a、3b分别表示3例AIS卒中中病例发病前后(高危状态血样&发病24h血样) lncRNA测序结果。

Using DESeq2 and PoissonDis difference analysis methods to analyze differential lncRNAs. A: heatmap of the expression of 96 differential lncRNAs identified. B: heatmap of the expression of 28 differential lncRNAs, including lncRNA SETD5-AS1. The horizontal axis represents the log<sub>2</sub>FC of the samples, and the vertical axis represents the lncRNAs. The colors of the blocks, yellow and black, indicate high and low expression levels, respectively. 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b represent the lncRNA sequencing results of three AIS stroke patients before and after onset (high-risk state blood samples & blood samples collected within 24 h of onset), respectively.

图1 差异表达基因表达量聚类热图

Fig.1 Clustering heatmap of differentially expressed gene expression levels

细胞中PI3K、磷酸化PI3K(p-PI3K)、AKT及磷酸化AKT(p-AKT)蛋白表达水平进行检测, 结果显示相比对照组, 过表达lncRNA SETD5-AS1后, p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平均有明显下降(图5A、5D和图5E); 而敲低lncRNA SETD5-AS1表达后, 结果则相反(图5B、5D和5E); 上述结果证实, lncRNA SETD5-AS1可能通过抑制PI3K-AKT通路参与缺血性脑卒中的进展。

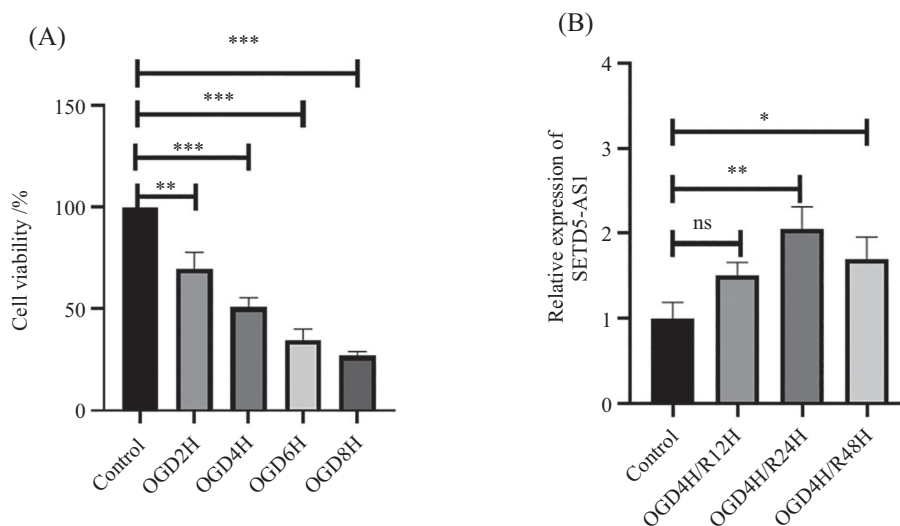
## 2.7 脑卒中高危人群和缺血性脑卒中患者两组研究对象的一般临床资料及危险因素比较

脑卒中高危人群和缺血性脑卒中患者两组人群lncRNA SETD5-AS1的相对表达水平与高血压、糖尿病、高血脂、冠心病、既往卒中史、吸烟等脑卒中危险因素差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 两组人群在性别及年龄组成的差异无统计学意义( $P>0.05$ )

(计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 计量资料采用两独立样本 $t$ 检验)(表2)。

## 2.8 lncRNA SETD5-AS1对缺血性脑卒中的早期诊断价值

lncRNA SETD5-AS1在缺血性脑卒中组与高危人群组中的相对表达量分别为369.281(1 617.35)和19.776(65.65), 两者间的差异具有统计学意义( $P<0.01$ )(图6A), 提示lncRNA SETD5-AS1在缺血性脑卒中患者中显著性上调表达, 具有成为缺血性脑卒中早期预警及诊断的生物标志物的潜能。ROC曲线分析SETD5-AS1在缺血性脑卒中组与高危人群组间的差异具有统计学意义( $P<0.01$ ), 约登指数为0.58, ROC曲线下面积为0.860(图6B), 提示lncRNA SETD5-AS1对缺血性脑卒中发病的早期诊断具有较



A: 不同OGD后细胞活力变化(独立样本 $t$ 检验); B: OGD/R后lncRNA SETD5-AS1相对表达量(独立样本 $t$ 检验)(Control为对照组, OGD4H/R12H、OGD4H/R24H、OGD4H/R48H分别为氧糖剥夺4 h, 复氧复糖12 h、24 h、48 h。ns: 无显著性差异; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001)。

A: changes in cell viability after different OGD treatments (independent sample  $t$ -test); B: relative expression of lncRNA SETD5-AS1 after OGD/R (independent sample  $t$ -test) (Control represents the control group; OGD4H/R12H, OGD4H/R24H, and OGD4H/R48H represent oxygen-glucose deprivation for 4 h, followed by reoxygenation and reperfusion for 12, 24, and 48 h, respectively. ns indicates no significant difference; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001).

图2 SH-SY5Y细胞OGD/R后lncRNA SETD5-AS1的相对表达变化

Fig.2 Relative expression changes of lncRNA SETD5-AS1 in SH-SY5Y cells after OGD/R

好水平的预测价值;为进一步验证lncRNA SETD5-AS1在AIS病人发病过程中的表达变化,本研究从依托单位样本库中筛选到了16例发病前和发病24 h的血样均完好的AIS病例,应用实时定量PCR方法检测了lncRNA SETD5-AS1的表达,结果显示lncRNA SETD5-AS1在AIS发病后在血浆中表达显著上调(图6C)。

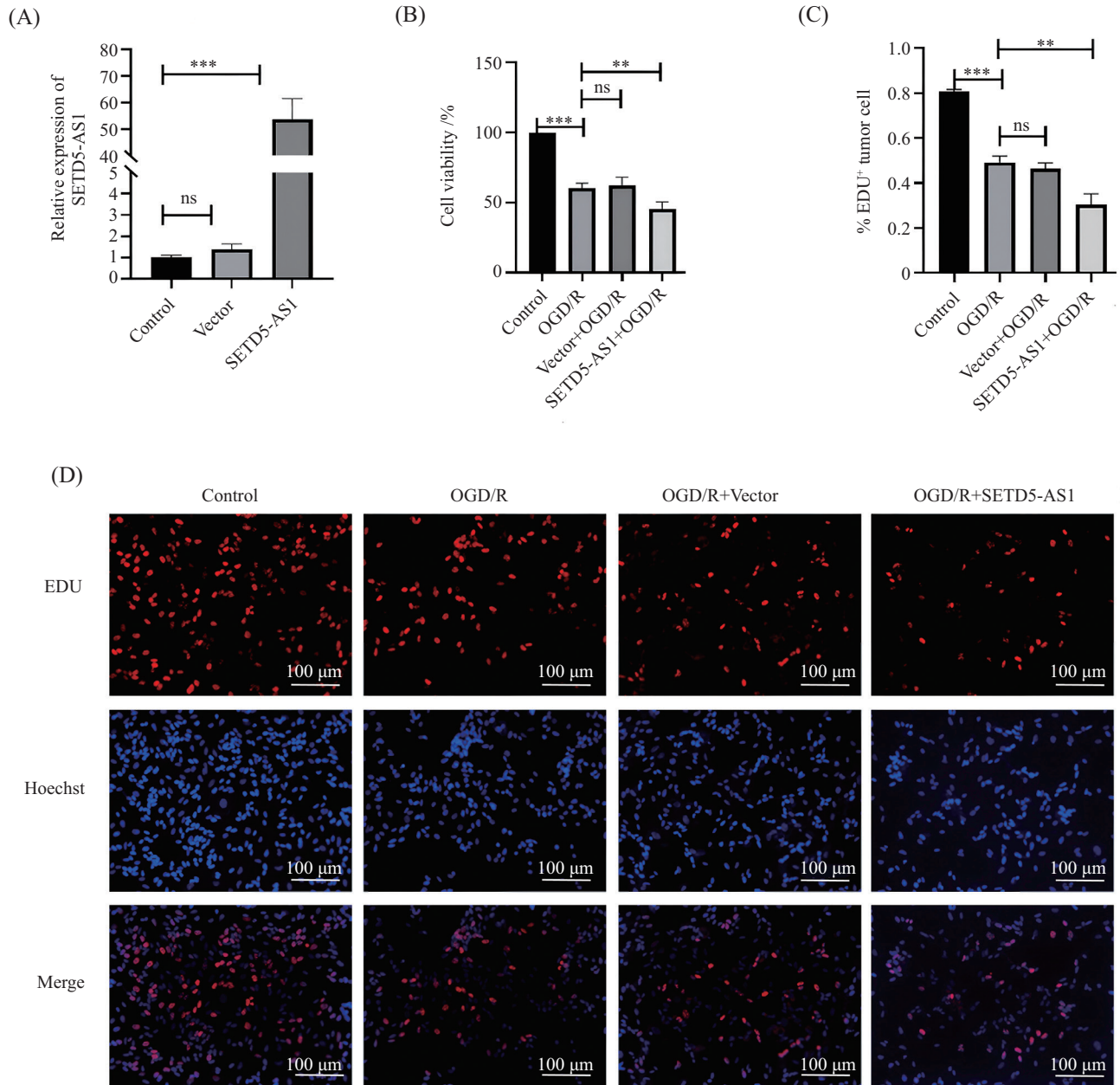
本研究结果表明, lncRNA SETD5-AS1在缺血性脑卒中病人血浆中表达上调,通过抑制细胞增殖参与AIS发病,可能是一种潜在的AIS预警标志物。

### 3 讨论

缺血性脑卒中是由于脑的供血动脉狭窄或闭塞、脑供血不足导致的脑组织坏死的总称,目前确诊急性缺血性脑卒中中仍然主要依据临床症状及头颅影像学检查,难以鉴别早期缺血性脑卒中及其他“类卒中”疾病,无法对早期缺血性脑卒中患者做出迅速的判断而延误救治。在局灶性脑缺血动物模型和缺血性脑卒中临床研究中发现了大量显著差异表达的lncRNA,这表明lncRNA在缺血性脑卒中的病理生理过程中发挥着重要的作用,提示其作为缺血性脑卒中早期诊断的生物标志物和新的治疗靶点的巨大

潜能<sup>[10]</sup>。近年来,利用RNA-Seq技术,在缺血性脑卒中患者或缺血性损伤动物模型中筛选出了大量差异表达的lncRNAs<sup>[11-12]</sup>。关键的lncRNA可能与缺血性脑卒中的风险和临床预后有关<sup>[13]</sup>, lncRNA TUG1和miR-542-3p与缺血性脑卒中的严重程度和预后密切相关,具有作为预测患者预后的血清学指标的潜力<sup>[14]</sup>。LncRNA CEBPA-AS1与miR-139-5pACI均为急性缺血性脑卒中患者认知功能障碍的影响因素,且联合诊断的效能较高<sup>[15]</sup>。Lnc\_000048/PKR/STAT1轴在M1巨噬细胞的极化中起着至关重要的作用,可能是缓解卒中动脉粥样硬化的新治疗靶点<sup>[16]</sup>。急性缺血性脑卒中患者血清lncRNA KCNQ1OT1与miR-489-3p与神经功能损伤程度和预后相关,二者的联合检测对预后评估具有一定的参考价值<sup>[17]</sup>。在急性缺血性脑卒中患者血清lncRNA HCG11与miR-26b-5p对患者脑梗死面积及功能预后具有一定的诊断及预测价值<sup>[18]</sup>。

在本研究中我们选取了3例脑卒中高危患者发病前后的外周静脉血血浆,利用高通量测序技术,首次动态分析缺血性脑卒中高危人群及其缺血性脑卒中发病24 h内血浆转录组lncRNA的表达水平变化差异情况,筛选出了差异表达最为显著的lncRNA



A: 验证过表达效率(独立样本 $t$ 检验); B: CCK-8检测各组细胞活力情况(独立样本 $t$ 检验); C、D: EDU检测各组细胞增殖情况(独立样本 $t$ 检验)(Control为对照组, Vector为转染空载体组, SETD5-AS1为过表达组, OGD为氧糖剥夺/复氧复糖组; ns: 无显著性差异; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。A: verification of overexpression efficiency (independent sample  $t$ -test); B: cell viability in each group detected by CCK-8 assay (independent sample  $t$ -test); C,D: cell proliferation in each group detected by EDU assay (independent sample  $t$ -test) (Control represents the control group, Vector represents the empty vector transfection group, SETD5-AS1 represents the overexpression group, and OGD represents the oxygen-glucose deprivation/reoxygenation and reperfusion group; ns indicates no significant difference; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

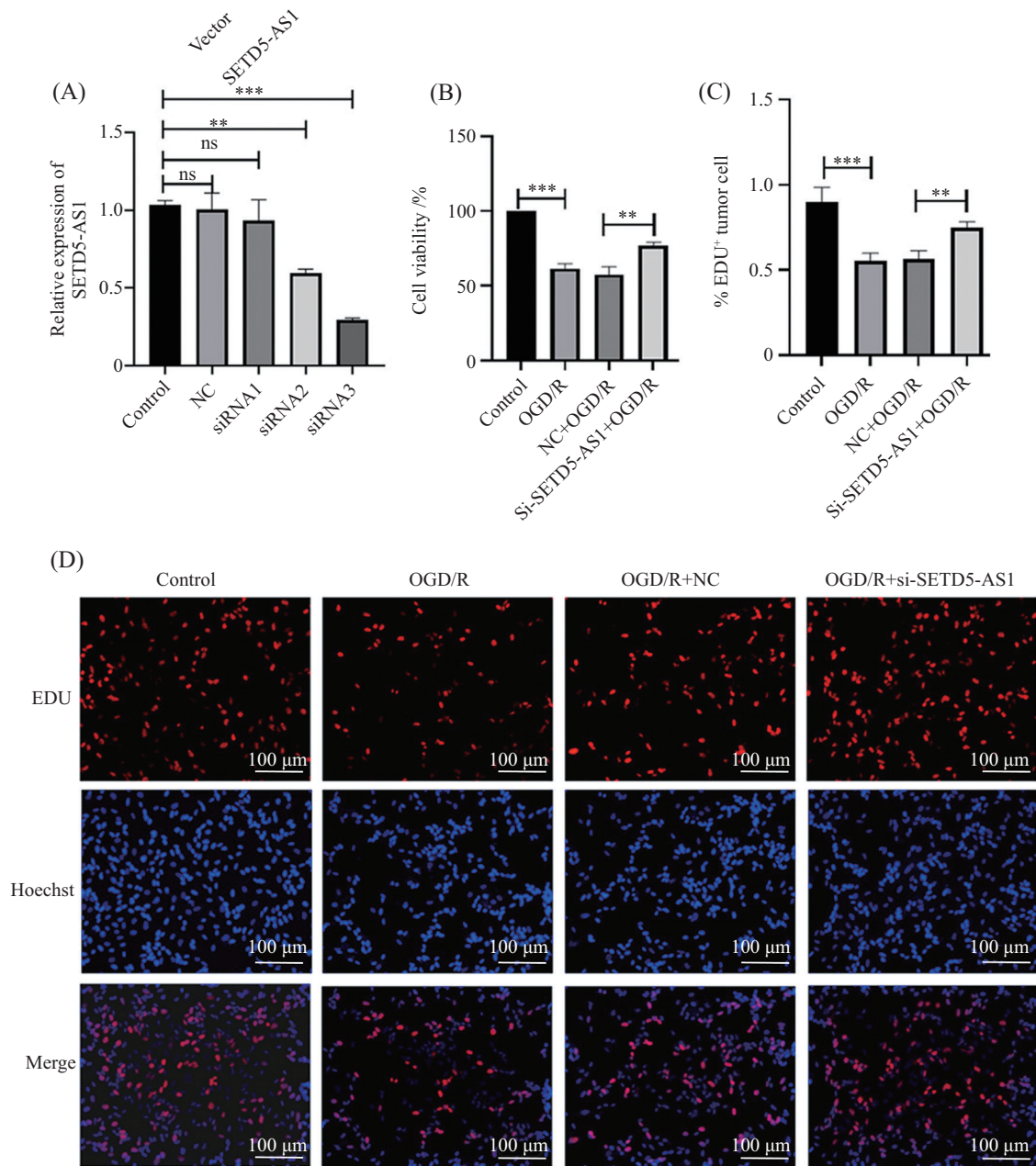
图3 过表达SETD5-AS1后细胞活力及增殖表现

Fig.3 Cell viability and proliferation performance after overexpression of SETD5-AS1

SETD5-AS1。随后扩大样本量进一步检测发现,缺血性脑卒中患者lncRNA SETD5-AS1的表达量显著高于高危人群,提示其或可作为缺血性脑卒中高危筛查与早期诊断的生物标志物。研究同时证实,过表达lncRNA SETD5-AS1能通过抑制PI3K-AKT通

路,降低OGD/R后SH-SY5Y细胞的活力与增殖能力,进而参与缺血性脑卒中的发生机制。

LncRNA SETD5-AS1是lncRNA SETD5的反义RNA1(SETD5 antisense RNA 1, SETD5-AS1)又名THUMP3-AS1,编码基因定位于3p25.3,来源于SETD5



A: 筛选si-SETD5-AS1及验证敲低效率(独立样本 $t$ 检验); B: CCK-8检测各组细胞活力情况(独立样本 $t$ 检验); C、D: EDU检测各组细胞增殖情况 [Control为对照组, NC为转染空siRNA组, si-SETD5-AS1为敲低组, OGD为氧糖剥夺/复氧复糖组; ns: 无显著性差异(独立样本 $t$ 检验); \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001]。

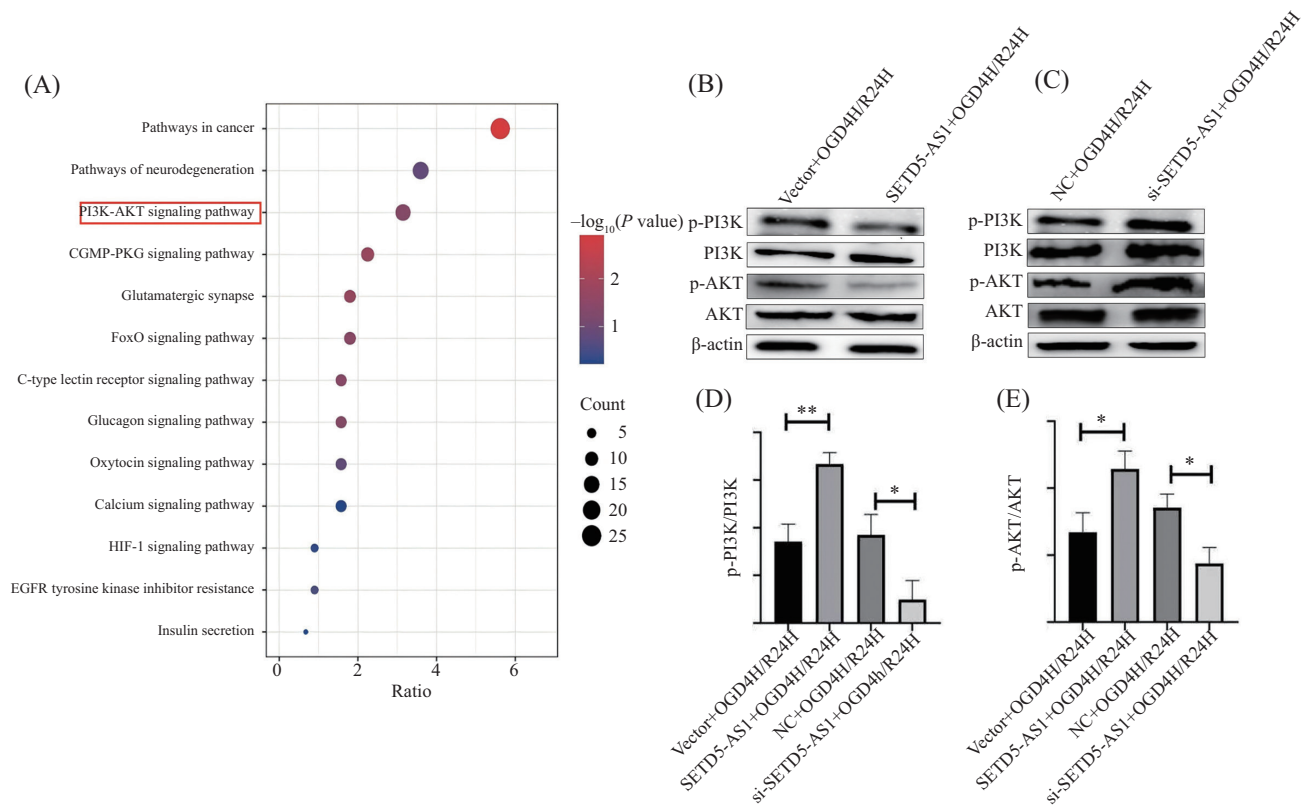
A: screening of si-SETD5-AS1 and verification of knockdown efficiency (independent sample  $t$ -test); B: cell viability in each group detected by CCK-8 assay (independent sample  $t$ -test); C,D: cell proliferation in each group detected by EDU assay [Control represents the control group, NC represents the empty siRNA transfection group, si-SETD5-AS1 represents the knockdown group, and OGD represents the oxygen-glucose deprivation/reoxygenation and reperfusion group; ns indicates no significant difference (independent sample  $t$ -test); \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001].

图4 敲低SETD5-AS1后细胞增殖表现

Fig.4 Cell proliferation performance after knockdown of SETD5-AS1

的反义链<sup>[19]</sup>。已有研究表明, lncRNA SETD5-AS1与多种疾病的发生与发展相关,可能也与缺血性脑卒中有关。SETD5-AS1通过调节miR-320d/ARF1轴抑制卵巢癌细胞的细胞凋亡,这可能为卵巢癌治疗提供前瞻性

靶点<sup>[20]</sup>。THUMP3-AS1/miR-29a-3p/ELK1/PRDX4轴在食管癌的增殖、迁移和侵袭中具有重要作用,揭示了其在增强肿瘤侵袭性方面的致癌作用<sup>[21]</sup>。相较于对照组,在小鼠中脑动脉阻塞模型及在细胞OGD/R模型



A: 靶基因KEGG通路富集分析气泡图。横坐标表示比率, 纵坐标表示富集的信号通路。气泡大小表示该通路富集的靶基因数目, 颜色深浅表示富集程度, 红色加框的PI3K-AKT通路为本研究所聚焦的细胞增殖和存活通路; B: lncRNA SETD5-AS1过表达及敲低后检测OGD/R诱导的SH-SY5Y细胞中磷酸化PI3K(p-PI3K)、磷酸化AKT(p-AKT)蛋白水平; C: lncRNA SETD5-AS1敲低后检测OGD/R诱导的SH-SY5Y细胞中p-PI3K, p-AKT蛋白水平; D: 磷酸化PI3K蛋白表达定量分析结果(独立样本 $t$ 检验); E: 磷酸化AKT蛋白表达定量分析结果(独立样本 $t$ 检验)。Vector为空载体转染组, SETD5-AS1为过表达组; NC为siRNA转染对照组, si-SETD5-AS1为敲低组, OGD/R为氧糖剥夺/复氧复糖; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: bubble plot of KEGG pathway enrichment analysis of target genes. The horizontal axis represents the ratio, and the vertical axis represents the enriched signaling pathways. The bubble size indicates the number of target genes enriched in the pathway, and the color depth represents the degree of enrichment, the PI3K-AKT pathway highlighted in red is the cell proliferation and survival pathway that this study focuses on; B: detection of p-PI3K (phosphorylated PI3K) and p-AKT (phosphorylated AKT) protein levels in OGD/R-induced SH-SY5Y cells after overexpression and knockdown of lncRNA SETD5-AS1; C: detection of p-PI3K and p-AKT protein levels in OGD/R-induced SH-SY5Y cells after knockdown of lncRNA SETD5-AS1; D: quantitative analysis of p-PI3K protein expression (independent sample  $t$ -test); E: quantitative analysis of p-AKT protein expression (independent sample  $t$ -test). Vector represents the empty vector transfection group, SETD5-AS1 represents the overexpression group; NC represents the siRNA transfection control group, si-SETD5-AS1 represents the knockdown group, and OGD/R represents oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 图5 lncRNA SETD5-AS1通过抑制PI3K-AKT通路参与缺血性脑卒中发病

Fig.5 lncRNA SETD5-AS1 contributes to ischemic stroke by inhibition of the PI3K-AKT pathway

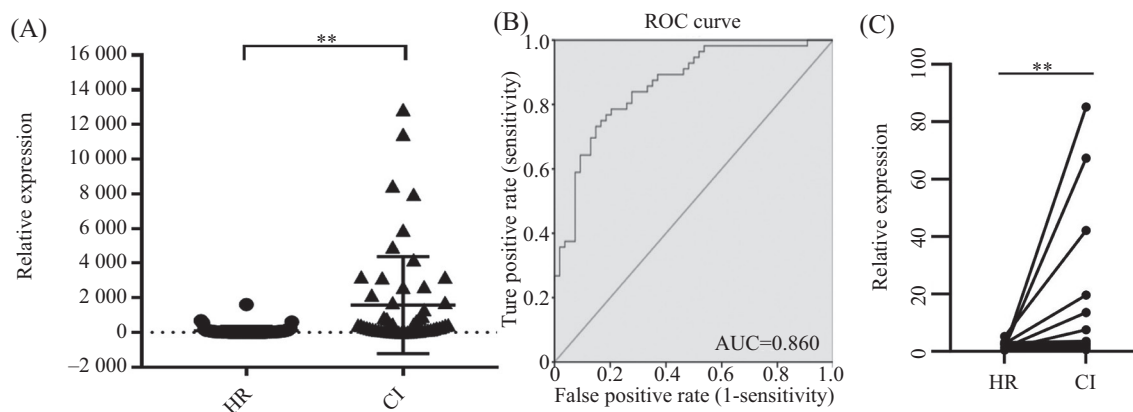
中, 通过RT-qPCR实验可观察到SETD5-AS1表达上调, 且SETD5-AS1在N2a细胞中过表达可促进细胞凋亡, 抑制增殖; 在N2a细胞中敲除SETD5-AS1, 发现AKT和PI3K的表达显著上调, 过表达SETD5-AS1则得到相反的结果, 表明SETD5-AS1可能通过PI3K-AKT通路参与脑卒中发生<sup>[22]</sup>。此研究结果与我们SETD5-AS1验证实验结果一致。

综上所述, 本研究首次运用高通量测序技术动态分析脑卒中高危人群及其缺血性脑卒中发病24 h内血浆lncRNA表达水平变化, 发现SETD5-AS1相对

于脑卒中高危人群, 在急性缺血性脑卒中患者血浆中表达上调, 预示着其对缺血性脑卒中的预警及早期诊断具有一定价值。过表达SETD5-AS1可抑制SH-SY5Y细胞增殖与活力, 敲降则结果相反, 并且SETD5-AS1与抑制PI3K-AKT信号通路的活化有一定关联。

### 参考文献 (References)

- [1] 宁珑, 孙航, 冯晋, 等. 急性缺血性脑卒中防治策略研究进展[J]. 医学综述(NING L, SUN H, FENG J, et al. Research prog-



A: SETD5-AS1在单独的脑卒中高危人群组(HR组,  $n=54$ )和缺血性脑卒中组(CI组,  $n=56$ )两组样本之间的表达差异(独立样本 $t$ 检验); B: 根据定量PCR对SETD5-AS1在缺血性脑卒中组与高危人群组检测的数值绘制SETD5-AS1表达的ROC曲线(Mann-Whitney  $U$ 检验); C: SETD5-AS1在AIS病人发病前后(HR高危状态与CI发病时)血浆中的表达( $n=16$ )(两组配对 $t$ 检验)(HR为高危人群, CI为缺血性脑卒中。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )。

A: expression differences of SETD5-AS1 between the high-risk stroke group (HR group,  $n=54$ ) and the ischemic stroke group (CI group,  $n=56$ ) (independent sample  $t$ -test); B: ROC curve of SETD5-AS1 expression based on quantitative PCR detection of SETD5-AS1 in the ischemic stroke group and the high-risk group (Mann-Whitney  $U$  test); C: plasma expression of SETD5-AS1 in AIS patients before and after onset (HR high-risk state and CI at onset) ( $n=16$ ) (paired  $t$ -test) (HR represents the high-risk population, CI represents ischemic stroke. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ).

图6 血浆SETD5-AS1在两组人群样本之间的表达差异及其对应的ROC曲线

Fig.6 Expression differences of plasma SETD5-AS1 between the two groups and the corresponding ROC curve

- ress on prevention and treatment strategies for acute ischemic stroke [J]. Medical Recapitulate, 2022, 28(1): 94-9.
- [2] 《中国卒中中心报告2022》概要[J]. 中国脑血管病杂志(《Overview of China stroke center report 2022》) [J]. Chinese Journal of Cerebrovascular Diseases, 2024, 21(8): 565-76.
  - [3] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. Lnc-ncation: lncRNA localization and function [J]. J Cell Biol, 2021, 220(2): e202009045.
  - [4] WANG M, LI H, QIAN Y, et al. The lncRNA lnc\_AABR07044470.1 promotes the mitochondrial-damaged inflammatory response to neuronal injury via miR-214-3p/PERM1 axis in acute ischemic stroke [J]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 412.
  - [5] ZHANG S, SUN Y, XIAO Q, et al. Lnc\_000048 promotes histone H3K4 methylation of MAP2K2 to reduce plaque stability by recruiting KDM1A in carotid atherosclerosis [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(5): 2572-86.
  - [6] 马微. 基于lncRNA000587/miRNA128-2-5p/TGF $\beta$ 1信号轴研究远隔缺血后适应对缺血性脑卒中大鼠脑保护作用机制[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2024.
  - [7] 郑海建. LncRNA NEAT1调控miR-488-3p参与脑缺血再灌注损伤的作用机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2023.
  - [8] ZHANG Y, WANG Z, HU Q, et al. Upregulation of lncRNA CASC2 alleviates neuroinflammation in acute ischemic stroke and exhibits protective effects by targeting miR-155 (CASC2 role in AIS) [J]. Eur J Med Res, 2025, 30(1): 1247.
  - [9] LU H, ZHANG Y. Values of lncRNA SNHG14 in the differential diagnosis and prognosis evaluation of acute ischemic stroke [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2025, 197(2): 1002-9.
  - [10] BAO M H, SZETO V, YANG B B, et al. Long non-coding RNAs in ischemic stroke [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 281.
  - [11] DENG Q W, LI S, WANG H, et al. Differential long noncoding RNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for detection of acute ischemic stroke [J]. Clin Sci, 2018, 132(14): 1597-614.
  - [12] BHATTARAI S, PONTARELLI F, PRENDERGAST E, et al. Discovery of novel stroke-responsive lncRNAs in the mouse cortex using genome-wide RNA-seq [J]. Neurobiol Dis, 2017, 108: 204-12.
  - [13] XU T, TAO M, LIN Y, et al. The regulation of messenger RNAs and biological pathways by long non-coding RNAs and circular RNAs in ischemic stroke [J]. Neurochem Res, 2025, 50(2): 87.
  - [14] 王瑞, 姜晓霞, 裴雯雯, 等. 血清lncRNA TUG1和miR-542-3p表达与急性脑梗死患者病情和预后的关系[J]. 中国实用神经疾病杂志(WANG R, JIANG X X, PEI W W, et al. Association of serum lncRNA TUG1 and miR-542-3p expression with disease severity and prognosis in patients with acute cerebral infarction [J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases), 2022, 25(12): 1464-9.
  - [15] 王培远, 王刚, 石军峰. 急性脑梗死患者血浆lncRNA CEBPA-AS1、miR-139-5p表达及与认知功能障碍的相关性分析[J]. 天津医药(WANG P Y, WANG G, SHI J F. Correlation analysis of plasma lncRNA CEBPA-AS1 and miR-139-5p expression with cognitive dysfunction in patients with acute cerebral infarction [J]. Tianjin Medical Journal), 2025, 53(1): 75-9.
  - [16] DING Y, SUN Y, WANG H, et al. Atherosclerosis-associated lnc\_000048 activates PKR to enhance STAT1-mediated polarization of THP-1 macrophages to M1 phenotype [J]. Neural Regen Res, 2024, 19(11): 2488-98.
  - [17] 刘进, 赵梦蝶, 黄薇隗, 等. 血清lncRNA KCNQ1OT1、miR-489-3p表达与急性脑梗死患者神经功能损伤程度关系及预后的预测价值[J]. 脑与神经疾病杂志(LIU J, ZHAO M D, HUANG W W, et al. Predictive value of serum lncRNA KCNQ1OT1 and miR-489-3p expression for neurological impairment severity and prognosis in patients with acute cerebral infarction [J]. Journal of Brain and Nervous Diseases), 2025, 33(10): 620-5.

- [18] 周静, 孙军, 汪宁, 等. 血清LncRNA HCG11及miR-26b-5p与急性缺血性脑卒中患者脑梗死面积及功能预后的相关性[J]. 西南医科大学学报(ZHOU J, SUN J, WANG N, et al. Correlation of serum LncRNA HCG11 and miR-26b-5p with cerebral infarct volume and functional prognosis in patients with acute ischemic stroke [J]. Journal of Southwest Medical University), 2025, 48(1): 81-6.
- [19] 黄晓慧, 何昭铸, 罗勤利, 等. 非小细胞肺癌组织的SETD5-AS1水平及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志(HUANG X H, HE Z Q, LUO Q L, et al. Expression level and clinical significance of SETD5-AS1 in non-small cell lung cancer tissues [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology), 2020, 25(5): 425-9.
- [20] MU Q, WANG X, HUANG K, et al. THUMP3-AS1 inhibits ovarian cancer cell apoptosis through the miR-320d/ARF1 axis [J]. FASEB J, 2024, 38(13): e23772.
- [21] TANG M, SUN J, CAI Z. LncRNA THUMP3-AS1 promotes the proliferation and migration of esophageal cancer cells through the miR-29a-3p/ELK1/PRDX4 signaling pathway [J]. Semin Oncol, 2025, 52(4): 152350.
- [22] MIAO S Y, MIAO S M, CUI R T, et al. SETD5-AS1 stimulates neuron death in stroke via promoting PTEN expression [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(18): 6035-41.