

- [9] 普星宇, 骆文远, 钱耀文, 等. 单髁置换治疗中青年患者膝内侧间室骨关节炎的近期随访[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(8): 1161-1166.
- [10] 王波, 罗建成, 魏增永, 等. 胫骨近端双平面开放截骨术联合关节镜清理治疗膝关节内侧间室骨性关节炎[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2019, 34(2): 172-174.
- [11] LEITH KM, BIRMINGHAM TB, DUNNING CE, et al. Medial opening wedge high tibial osteotomy alters knee moments in multiple planes during walking and stair ascent[J]. Gait Posture, 2015, 42(2): 165-171.
- [12] 杨波, 姜鑫. 单髁置换术与胫骨高位截骨术治疗膝关节内侧间室骨关节炎的近期疗效比较[J]. 中国修复重建外科杂志, 2015, 29(5): 548-552.
- [13] 谢悦胜, 张晓, 罗日强, 等. 微创针刀镜在膝关节痛风性关节炎中的应用价值及安全性[J]. 安徽医药, 2018, 22(4): 635-638.
- [14] WIRTH W, MASCHEK S, BERINGER P, et al. Subregional laminar cartilage MR spin-spin relaxation times (T2) in osteoarthritic knees with and without medial femorotibial cartilage loss - data from the Osteoarthritis Initiative (OAI) [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2017, 25(8): 1313-1323.
- [15] 徐子涵, 蔡佳宇, 李婧, 等. 姜黄素对类风湿关节炎破骨细胞分化中核因子 κ B受体活化因子基因及蛋白表达的影响[J]. 安徽医药, 2019, 23(10): 1917-1920.
- [16] KIM YJ, KIM BH, YOO SH, et al. Mid-term results of oxford medial unicompartmental knee arthroplasty in young asian patients less than 60 years of age: a minimum 5-year follow-up [J]. Knee Surg Relat Res, 2017, 29(2): 122-128.
- [17] VERONESE N, TEGOLA LLA, CREPALDI G, et al. The association between the Mediterranean diet and magnetic resonance parameters for knee osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative [J]. Clin Rheumatol, 2018, 37(8): 2187-2193.
- [18] LIST JPVAN DER, CHAWLA H, VILLA JC, et al. The role of patient characteristics on the choice of unicompartmental versus total knee arthroplasty in patients with medial osteoarthritis [J]. J Arthroplasty, 2017, 32(3): 761-766.
- [19] 梁庆晨, 孙凤龙. 不同术式治疗膝关节内侧间室骨性关节炎的对比研究[J]. 医学综述, 2019, 25(1): 175-179.

(收稿日期: 2019-10-17, 修回日期: 2019-12-26)

引用本文: 张蕾, 林莹波, 乔娟, 等. 长链非编码RNA母系表达基因8靶向微小RNA-497-5p调控血管瘤血管内皮细胞的增殖和凋亡[J]. 安徽医药, 2021, 25(9): 1756-1761. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.09.014.

◇临床医学◇



长链非编码RNA母系表达基因8靶向微小RNA-497-5p调控血管瘤血管内皮细胞的增殖和凋亡

张蕾¹, 林莹波², 乔娟¹, 王云璐¹

作者单位:¹河南中医药大学护理学院, 河南 郑州 450046; ²广东茂名健康职业学院, 广东 茂名 525000

基金项目: 广东省科技创新战略专项基金(2018S001412)

摘要: **目的** 探讨长链非编码RNA母系表达基因8(MEG8)靶向微小RNA(miR)-497-5p对血管瘤血管内皮细胞的增殖和凋亡的影响。**方法** 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测河南中医药大学第一附属医院2017年1月至2018年6月收集的52例血管瘤组织和与其对应的瘤旁正常皮肤组织中MEG8和miR-497-5p的表达水平。血管瘤血管内皮细胞HemEC分为si-NC组、si-MEG8组、miR-NC组、miR-497-5p组、si-MEG8+anti-miR-NC组、si-MEG8+anti-miR-497-5p组。四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞周期蛋白D1(cyclin D1)和P21、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和Bcl相关X(Bax)蛋白的表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证MEG8和miR-497-5p的靶向关系。**结果** 与瘤旁正常皮肤组织相比, 血管瘤组织中MEG8表达水平[(0.82±0.08)比(0.33±0.03)]升高($P<0.05$), miR-497-5p表达水平[(0.34±0.03)比(0.84±0.08)]降低($P<0.05$)。与si-NC组比较, si-MEG8组HemEC细胞存活率[(39.61±4.06)%比(103.50±11.04)%]、cyclin D1和Bcl-2蛋白表达降低($P<0.05$), 凋亡率[(26.57±2.73)%比(8.33±0.85)%]、P21和Bax蛋白表达升高($P<0.05$)。与miR-NC组比较, miR-497-5p组HemEC细胞存活率[(48.87±5.09)%比(104.11±10.64)%]、cyclin D1和Bcl-2蛋白表达降低($P<0.05$), 凋亡率[(21.26±2.45)%比(8.33±0.85)%]、P21和Bax蛋白表达升高($P<0.05$)。MEG8和miR-497-5p直接特异性结合。与si-MEG8+anti-miR-NC组比较, si-MEG8+anti-miR-497-5p组HemEC细胞存活率[(86.10±8.81)%比(40.23±4.35)%]、cyclin D1和Bcl-2蛋白表达升高($P<0.05$), 凋亡率[(15.32±1.67)%比(26.81±2.94)%]、P21和Bax蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 抑制MEG8通过靶向miR-497-5p能够抑制血管瘤血管内皮细胞增殖, 促进细胞凋亡, 进而遏制血管瘤的发生发展。

关键词: 内皮细胞; 血管瘤; 母系表达基因8; 微小RNA-497-5p; 细胞增殖; 凋亡

Long non-coding RNA maternal expression gene 8 regulates the proliferation and apoptosis of hemangioma vascular endothelial cells by targeting microRNA-497-5p

ZHANG Lei¹, LIN Yingbo², QIAO Juan¹, WANG Yunlu¹

Author Affiliations:¹School of Nursing, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450046, China; ²Guangdong Maoming Health Vocational College, Maoming, Guangdong 525000, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of long non-coding RNA maternal expression gene 8 (MEG8) on proliferation and apoptosis of hemangioma vascular endothelial cells through targeting microRNA (miR)-497-5p. **Methods** Quantitative real-time PCR polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of MEG8 and miR-497-5p in 52 cases of hemangioma tissues and their corresponding adjacent normal skin tissues collected from The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine from January 2017 to June 2018. Hemangioma vascular endothelial cells HemEC were assigned into si-NC group, si-MEG8 group, miR-NC group, miR-497-5p group, si-MEG8+anti-miR-NC group, and si-MEG8+anti-miR-497-5p group. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect cell viability, and flow cytometry was used to detect apoptosis rate, and the expression levels of cyclin D1, P21, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-associated X protein (Bax) were detected by Western blotting. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeted relationship between MEG8 and miR-497-5p. **Results** Compared with normal skin tissue adjacent to the tumor, the expression level of MEG8 [(0.82±0.08) vs. (0.33±0.03)] in hemangioma tissue was increased ($P<0.05$), and the expression level of miR-497-5p [(0.34±0.03) vs. (0.84±0.08)] was decreased ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the survival rate of HemEC cells in the si-MEG8 group [(39.61±4.06)% vs. (103.50±11.04)%], the expression of cyclin D1 and Bcl-2 protein were decreased, and the apoptosis rate [(26.57±2.73) % vs. (8.33±0.85)%], P21 and Bax protein expression were increased ($P<0.05$). Compared with the miR-NC group, the survival rate of HemEC cells in the miR-497-5p group [(48.87±5.09)% vs. (104.11±10.64)%], cyclin D1 and Bcl-2 protein expression were decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate [(21.26±2.45)% vs. (8.33±0.85)%], P21 and Bax protein expression were increased ($P<0.05$). MEG8 was directly and specifically bound to miR-497-5p. Compared with the si-MEG8+anti-miR-NC group, the survival rate of HemEC cells in the si-MEG8+anti-miR-497-5p group [(86.10±8.81)% vs. (40.23±4.35)%], cyclin D1 and Bcl-2 protein expression were increased ($P<0.05$), and the apoptotic rate [(15.32±1.67)% vs. (26.81±2.94)%], the expression of P21 and Bax protein were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Inhibition of MEG8 could inhibit the proliferation of hemangioma vascular endothelial cells and promote apoptosis by targeting miR-497-5p, thereby inhibiting the occurrence and development of hemangioma.

Key words: Endothelial cells; Hemangioma; MEG8; miR-497-5p; Cell proliferation; Apoptosis

血管瘤是婴幼儿最常见的良性肿瘤,通常发生在婴儿出生时或出生后两周,约75%~80%的血管瘤病人为女性^[1]。虽然血管瘤是一种良性肿瘤,但严重的血管瘤会影响皮肤的功能,给病人及其近亲属带来沉重的身心负担,部分血管瘤的快速生长和侵袭甚至威胁儿童的生命^[2]。因此,了解血管瘤发生发展的分子机制对于血管瘤的早期诊断和有效的联合治疗具有至关重要的作用。长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNA)是一类长度超过200个核苷酸与肿瘤细胞的增殖、凋亡、扩散转移以及血管生成有关的非编码RNA^[3-4]。刘筱雯^[5]通过转录组芯片技术进行婴幼儿血管瘤组织lncRNAs表达谱分析发现,lncRNA母系表达基因8(maternally expressed gene 8, MEG8)在血管瘤中表达上调,且通过定量聚合酶链反应(qPCR)验证表达存在明显差异。此外,有研究报道MEG8在转化生长因子- β (TGF- β)诱导的肺癌A549细胞和胰腺癌Panc1细胞中表达上调,参与肺癌、胰腺癌细胞上皮间质转化

的表观遗传学进程^[6]。但目前MEG8在血管瘤发生发展中的作用尚不明确。因此,本研究分析了MEG8在血管瘤组织中的表达,研究MEG8对血管瘤内皮细胞增殖、凋亡的影响及其可能的分子机制,以期MEG8作为血管瘤的诊疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 血管瘤组织(52例,均为增殖期肿瘤组织)和与其对应的瘤旁正常皮肤组织(52例)由河南中医药大学第一附属医院于2017年1月至2018年6月间收集。52例样本来源于婴幼儿,其中男性15例,女性37例,年龄为3个月至12岁之间。在开展本研究之前所有病人近亲属均签署知情同意书,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。血管瘤血管内皮细胞HemEC细胞购于上海柯雷生物科技有限公司;EBM-2培养基购于Lonza公司;胎牛血清购于杭州四季青公司;Lipofectamine™ 2000购于Invitrogen公司;双荧光素酶报告基因

检测试剂盒购于 Promega 公司; Trizol 试剂和蛋白质印迹法(Western blotting)相关试剂购于上海碧云天生物技术有限公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; PCR 引物、si-MEG8、si-NC、微小 RNA(miR)-497-5p mimics、miR-NC、anti-miR-497-5p、anti-miR-NC、pcDNA3.1、pcDNA3.1-MEG8 以及 WT-MEG8、MUT-MEG8 的构建和测序均由北京华大基因公司提供; 兔源细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)单克隆抗体、兔源 P21 单克隆抗体、兔源 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)单克隆抗体、兔源 Bcl 相关 X(Bax)蛋白多克隆抗体、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 II 抗均购于 Abcam 公司。

1.2 细胞培养、转染和分组 用含有 10% 胎牛血清的 EBM-2 培养基培养 HemEC 细胞。培养箱环境条件是 37 ℃, 二氧化碳体积分数为 5%, 湿度 90%。取对数生长期的 HemEC 细胞, 按照每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板, 利用 Lipofectamine™ 2000 分别将 si-MEG8、si-NC、miR-497-5p mimics、miR-NC 转染至生长融合度为 80% 的 HemEC 细胞, 并依次标记为 si-MEG8 组、si-NC 组、miR-497-5p 组、miR-NC 组, 培养 24~72 h 后, 检测转染效果, 进行后续实验。为验证 MEG8 能够通过调控 miR-497-5p 表达, 将 anti-miR-497-5p、anti-miR-NC 分别和 si-MEG8 共转染至 HemEC 细胞, 并依次标记为 anti-miR-497-5p 组、anti-miR-NC 组, 培养 24~72 h 后, 检测 HemEC 细胞的增殖和凋亡情况。

1.3 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 MEG8 和 miR-497-5p 的表达水平 利用 Trizol 法分别提取 52 例血管瘤组织和与其对相应的瘤旁正常皮肤组织, 以及各组 HemEC 细胞的总 RNA, 紫外分光光度法测定其浓度后, 利用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为互补 DNA(cDNA), 随后进行 qRT-PCR 扩增。2^{-ΔΔCt} 法计算 MEG8 和 miR-497-5p 的相对表达水平。

1.4 双荧光素酶报告基因验证 MEG8 和 miR-497-5p 的靶向关系 利用生物信息软件预测 MEG8 的靶基因。发现 MEG8 与 miR-497-5p 能够特异性结合, 猜测 MEG8 和 miR-497-5p 存在靶向调控关系, 并利用双荧光素酶报告基因实验进行验证。利用 Lipofectamine™ 2000 将 miR-497-5p mimics 和 miR-NC 分别与 WT-MEG8 和 MUT-MEG8 共转染 HemEC 细胞, 转染 48 h 后, 测定各组 HemEC 细胞的荧光素酶活性。

1.5 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)

检测细胞活力 将对数期 HemEC 细胞按照 2×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板, 按照“1.2”方法转染后, 分别于转染后 24 h、48 h、72 h 时间点加入 10 μL 的质量分数为 5 g/L 的 MTT 试剂, 孵育 4 h 后, 弃去上清液, 各孔再加入二甲基亚砷试剂 150 μL, 震荡 10 min 至结晶充分溶解, 用酶标仪在 490 nm 波长处检测各孔的吸光度。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组对数期 HemEC 细胞, 用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞, 离心弃上清液后, 用适量的 1×结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 /mL。每管内加入 100 μL 细胞悬液, 再向管中加入 5 μL 的膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC), 室温避光轻轻地混匀 10 min, 加入 5 μL 的碘化丙啶(PI), 室温, 避光孵育 5 min, 加入 PBS 至 500 μL, 轻轻混匀, 在 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.7 蛋白质印迹法检测 利用 RIPA 裂解液裂解各组对数期 HemEC 细胞, 获得细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。取 30 μg 已变性的蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 电泳结束后, 利用转膜装置将已分离的细胞蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 转膜结束后, 用 Western 封闭液室温摇床封闭 30 min, 吸尽封闭液后, 用 Western 洗涤液漂洗膜(共 3 次, 10 分钟/次), 然后加入已稀释的抗 cyclin D1(1:500)、P21(1:1000)、Bcl-2(1:1000)、Bax(1:500)和 GAPDH(1:2500)蛋白的 I 抗, 室温孵育 2 h 后, 向已洗涤后的 PVDF 膜中加入稀释好的 II 抗, 孵育 1 h, ECL 发光试剂盒显色后进行拍照, 并用 Image J 软件对目的条带进行定量分析。

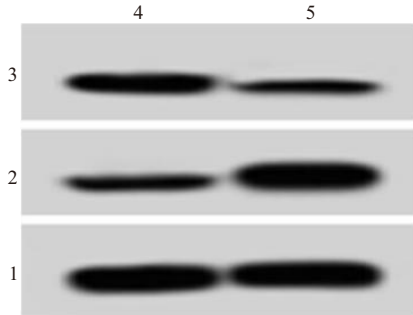
1.8 统计学方法 采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析, 实验中所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组之间两两比较采用 SNK-*q* 检验的方法。所有实验组均做 3 个平行实验, 重复 3 次。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MEG8 和 miR-497-5p 在血管瘤组织和瘤旁正常皮肤组织中的表达 qRT-PCR 检测显示, 与瘤旁正常皮肤组织相比, 血管瘤组织中 MEG8 的表达水平显著升高[(0.33±0.03)比(0.82±0.08), *t*=41.356, *P* < 0.001], miR-497-5p 的表达水平显著降低[(0.84±0.08)比(0.34±0.03), *t*=42.200, *P* < 0.001]。

2.2 抑制 MEG8 对细胞 HemEC 增殖的影响 如表 1 和图 1 所示, 与 si-NC 组比较, si-MEG8 组 HemEC 细胞 MEG8 的表达水平降低(*P* < 0.05), 表明成功构

建抑制MEG8表达的HemEC细胞株。与si-NC组比较, si-MEG8组HemEC细胞cyclin D1蛋白的表达水平降低, P21蛋白的表达水平升高; 细胞在24 h、48 h和72 h时间点细胞存活率降低($P<0.05$)。表明, 抑制MEG8能够抑制血管瘤血管内皮细胞增殖。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—P21蛋白; 3—细胞周期蛋白D1(cyclin D1); 4—si-NC组; 5—si-MEG8组。

图1 抑制母系表达基因8(MEG8)对血管瘤血管内皮细胞HemEC增殖蛋白表达的影响

2.3 抑制MEG8对细胞HemEC凋亡的影响 如表2所示, 与si-NC组相比, si-MEG8组HemEC细胞Bcl-2蛋白的表达水平降低, Bax蛋白表达水平升高, 细胞凋亡率增加($P<0.05$)。表明, 抑制MEG8能够促进血管瘤血管内皮细胞凋亡。

表2 抑制母系表达基因8(MEG8)对血管瘤血管内皮细胞HemEC凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Bcl-2蛋白	Bax蛋白	凋亡率/%
si-NC	3	0.65±0.06	0.26±0.02	8.33±0.85
si-MEG8	3	0.18±0.02	0.79±0.08	26.57±2.73
<i>t</i> 值		22.294	19.282	19.138
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2, Bax为Bcl相关X。

2.4 MEG8靶向调控miR-497-5p表达 利用生物学信息软件在线进行靶基因预测显示, 见图2, miR-497-5p和MEG8存在部分连续结合位点。与miR-NC和WT-MEG8共转染组相比, miR-497-5p和WT-MEG8共转染组HemEC细胞的荧光素酶活性降低[(0.37±0.04)比(1.05±0.10), $t=15.465$, $P<0.001$]; 与

miR-NC和MUT-MEG8共转染组相比, miR-497-5p和WT-MEG8共转染组HemEC细胞的荧光素酶活性差异无统计学意义[(1.07±0.10)比(1.08±0.10), $t=0.173$, $P=0.866$]。pcDNA3.1组、pcDNA3.1-MEG8组、si-NC组、si-MEG8组四组比较, $F=195.212$, $P<0.001$ 。pcDNA3.1-MEG8组HemEC细胞miR-497-5p表达水平低于pcDNA3.1组[(0.09±0.01)比(0.38±0.05), $P<0.05$]; si-MEG8组HemEC细胞miR-497-5p表达水平高于si-NC组[(0.88±0.09)比(0.39±0.05), $P<0.05$]。以上结果表明, miR-497-5p是MEG8的靶基因, MEG8可负性调控miR-497-5p的表达。

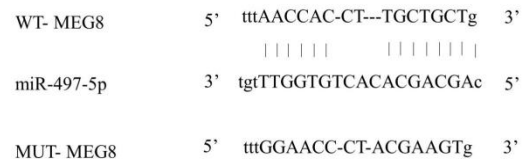


图2 生物学信息软件在线预测母系表达基因8(MEG8)与miR-497-5p结合位点

2.5 过表达miR-497-5p对细胞HemEC增殖、凋亡的影响 如表3、4所示, 与miR-NC组比较, miR-497-5p组HemEC细胞miR-497-5p的表达水平上调($P<0.05$), 表明已成功构建过表达miR-497-5p的HemEC细胞株。与miR-NC组比较, miR-497-5p组HemEC细胞cyclin D1和Bcl-2蛋白的表达水平降低, P21和Bax蛋白的表达水平升高($P<0.05$); 细胞在24 h、48 h和72 h时间点细胞存活率降低, 细胞凋亡率增加($P<0.05$)。表明, 过表达miR-497-5p能够抑制血管瘤血管内皮细胞增殖, 促进细胞凋亡。

表4 过表达miR-497-5p对血管瘤血管内皮细胞HemEC凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Bcl-2蛋白	Bax蛋白	凋亡率/%
miR-NC	3	0.65±0.06	0.26±0.02	8.33±0.85
miR-497-5p	3	0.26±0.03	0.71±0.07	21.26±2.45
<i>t</i> 值		14.241	15.141	12.213
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2, Bax为Bcl相关X。

表1 抑制母系表达基因8(MEG8)对血管瘤血管内皮细胞HemEC增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	MEG8	cyclin D1蛋白	P21蛋白	存活率/%		
					24 h	48 h	72 h
si-NC	3	0.83±0.08	0.74±0.07	0.31±0.03	100.28±10.12	100.52±10.09	103.50±11.04
si-MEG8	3	0.42±0.04	0.15±0.01	0.86±0.08	62.57±6.23	49.51±5.15	39.61±4.06
<i>t</i> 值		13.752	25.032	19.312	9.520	13.499	15.839
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: cyclin D1为细胞周期蛋白D1。

2.6 抑制 miR-497-5p 能逆转抑制 MEG8 对细胞 HemEC 增殖、凋亡的作用 如表 5, 6 所示, 与 si-NC 组相比, si- MEG8 组 HemEC 细胞 miR-497-5p、cyclin D1 和 Bcl-2 蛋白的表达水平降低, P21 和 Bax 蛋白的表达水平升高, 在 24 h、48 h 和 72 h 时间点细胞存活率降低, 细胞凋亡率增加 ($P<0.05$); 与 si- MEG8+anti-miR-NC 组相比, si- MEG8+anti-miR-497-5p 组 HemEC 细胞 miR-497-5p、cyclin D1 和 Bcl-2 蛋白的表达水平升高, P21 和 Bax 蛋白的表达水平降低, 在 24 h、48 h 和 72 h 时间点细胞存活率增加, 细胞凋亡率下降 ($P<0.05$)。以上结果表明, 抑制 miR-497-5p 表达能够逆转抑制 MEG8 对血管瘤血管内皮细胞增殖和凋亡的影响。

3 讨论

近年来, lncRNA 在血管瘤的发生发展中的作用受到越来越多研究者的关注。马从乾等^[7]研究发现, LINC00152 在血管瘤组织中的表达明显上调, LINC00152 可通过促进血管内皮生长因子受体 2

(VEGFR2) 表达促进血管瘤内皮细胞的增殖、迁移和侵袭^[8]; Zhao 等^[9]研究表明, 核内小 RNA 宿主基因 16 (SNHG16) 在血管瘤组织中呈高表达, SNHG16 通过调控 miR-520d-3p/信号转导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 轴, 作为细胞增殖、血管形成、迁移和侵袭的竞争性内源 RNA; Zhang 等^[10]报道沉默尿路上皮癌相关 1 (UCA1) 通过上调 miR-200c 表达抑制血管瘤内皮细胞存活, 诱导细胞凋亡, 进而抑制血管瘤生长; 此外, 肿瘤易感性候选基因 9 (CASC9) 和 opa 相互作用蛋白 5 反义转录本 1 (OIP5-AS1) 也参与对血管瘤细胞的增殖和转移的调控^[11-12]。以上研究提示, lncRNA 在血管瘤的进展中发挥至关重要的作用, 探索与血管瘤相关的 lncRNA, 对血管瘤病人的精准治疗具有重大意义。

MEG8 基因定位于人 14 号染色体和鼠 12 号染色体, 是最早在小鼠中鉴定的印记基因^[13]。其与父系表达基因 Dlk1 和 Dio3 以及若干母系表达基因 Gtl2、Meg3、Mirg 等构成 Dlk1-Dio3 印记区域, 参与调

表 3 过表达 miR-497-5p 对血管瘤血管内皮细胞 HemEC 增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-497-5p	cyclin D1 蛋白	P21 蛋白	存活率/%		
					24 h	48 h	72 h
miR-NC	3	0.36±0.04	0.74±0.07	0.31±0.03	100.14±10.08	100.21±10.39	104.11±10.64
miR-497-5p	3	0.75±0.08	0.25±0.03	0.80±0.08	67.25±6.83	56.64±5.76	48.87±5.09
t 值		10.681	15.760	14.048	8.104	11.003	14.050
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: cyclin D1 为细胞周期蛋白 D1。

表 5 抑制 miR-497-5p 能逆转抑制母系表达基因 8 (MEG8) 对血管瘤血管内皮细胞 HemEC 增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-497-5p	cyclin D1 蛋白	P21 蛋白	存活率/%		
					24 h	48 h	72 h
si-NC	3	0.35±0.03	0.74±0.07	0.31±0.03	100.25±10.06	102.97±10.42	103.46±10.64
si- MEG8	3	0.91±0.09 ^①	0.15±0.01 ^①	0.86±0.08 ^①	62.29±6.43 ^①	50.51±5.05 ^①	40.65±4.76 ^①
si- MEG8+anti-miR-NC	3	0.90±0.09	0.14±0.01	0.88±0.08	61.76±7.03	50.44±5.03	40.23±4.35
si- MEG8+anti-miR-497-5p	3	0.57±0.06 ^②	0.42±0.04 ^②	0.51±0.05 ^②	78.39±8.44 ^②	82.78±8.08 ^②	86.10±8.81 ^②
F 值		128.855	430.702	171.704	44.867	106.910	162.149
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: cyclin D1 为细胞周期蛋白 D1。

①与 si-NC 组比较, $P<0.05$ 。②与 si- MEG8+anti-miR-NC 组比较, $P<0.05$ 。

表 6 抑制 miR-497-5p 能逆转抑制母系表达基因 8 (MEG8) 对血管瘤血管内皮细胞 HemEC 凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	凋亡率/%
si-NC	3	0.65±0.06	0.26±0.02	8.33±0.85
si- SNHG16	3	0.18±0.02 ^①	0.79±0.08 ^①	26.57±2.73 ^①
si- MEG8+anti-miR-NC	3	0.17±0.02	0.81±0.08	26.81±2.94
si- MEG8+anti-miR-497-5p	3	0.41±0.04 ^②	0.51±0.05 ^②	15.32±1.67 ^②
F 值		309.750	155.675	150.201
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2, Bax 为 Bcl 相关 X。

①与 si-NC 组比较, $P<0.05$ 。②与 si- MEG8+anti-miR-NC 组比较, $P<0.05$ 。

控肌肉形成和胚胎发育。目前,关于MEG8基因在肿瘤的研究还比较少,仅发现MEG8在TGF- β 诱导的肺癌A549细胞和胰腺癌Panc1细胞中表达上调,MEG8通过与EZH2蛋白增强子结合,诱导其募集到miR-34a和miR-203的调节区域,促进H3甲基化,抑制转录^[6]。然而,其人类同系物Meg3基因在肿瘤中的作用被广泛报道。例如,在宫颈癌中,Meg3表达下调,过表达Meg3通过靶向miR-21-5p可抑制宫颈癌肿瘤的生长,促进肿瘤细胞凋亡^[14];在胃癌中,Meg3也呈低表达,过表达Meg3通过调控p53信号通路可抑制胃癌细胞的增殖和转移^[15];此外,Meg3还可发挥内源性miR-494分子海绵作用调控PTEN/PI3K/AKT通路抑制血管瘤的发生^[16]。本研究发现,MEG8在血管瘤组织中表达上调,抑制MEG8能够抑制血管瘤内皮细胞增殖,促进细胞凋亡。表明,MEG8在血管瘤中发挥癌基因作用。

为探索MEG8调控血管瘤发生的分子机制,利用生物信息学软件在线进行靶基因预测发现,miR-497-5p是MEG8的潜在靶基因。miR-497-5p是一种抑癌基因,研究发现,miR-497-5p在非小细胞肺癌^[17]、骨肉瘤^[18]等恶性肿瘤中表达下调,过表达miR-497-5p能够抑制肿瘤细胞增殖和侵袭能力。本研究结果显示,miR-497-5p在血管瘤组织中表达水平显著下调。同时通过双荧光素酶报告基因实验和蛋白质印迹法检测证实MEG8可靶向负性调控miR-497-5p表达,进一步研究发现,过表达miR-497-5p能够抑制cyclin D1和Bcl-2蛋白表达,促进P21和Bax蛋白表达,抑制血管瘤内皮细胞增殖,促进细胞凋亡。为进一步证实MEG8通过调控miR-497-5p表达参与对血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的调控,将si-MEG8和anti-miR-497-5p共转染至血管瘤内皮细胞,发现抑制miR-497-5p表达能够逆转抑制MEG8对血管瘤内皮细胞增殖和凋亡的影响。提示MEG8通过靶向调控miR-497-5p表达促进血管瘤的发生发展。

综上所述,lncRNA MEG8在血管瘤组织中表达显著上调,miR-497-5p表达下调,抑制MEG8通过靶向miR-497-5p能够抑制血管瘤内皮细胞增殖,诱导细胞凋亡,MEG8有望成为血管瘤分子治疗的新靶点。

参考文献

[1] CHIBBARO S, CEBULA H, GANAU M, et al. Multidisciplinary management of an intra-sellar cavernous hemangioma: case report and review of the literature[J]. J Clin Neurosci, 2018, 52: 135-138.
[2] 李树林, 柳健, 秦耀维, 等. 侵袭性血管瘤病(Gorham病)1例报告[J]. 实用骨科杂志, 2011, 17(9): 859-861.

[3] LIU Y, YANG Y, LI L, et al. LncRNA SNHG1 enhances cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer[J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(1): 38-43.
[4] ZHANG W, YUAN W, SONG J, et al. LncRNA CPS1-IT1 suppresses cell proliferation, invasion and metastasis in colorectal cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(2): 567-580.
[5] 刘筱雯. 基于转录组芯片筛选的lncRNAs在婴幼儿血管瘤中的作用及其机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2017: 1-213.
[6] TERASHIMA M, ISHIMURA A, WANNA-UDOM S, et al. MEG8 long noncoding RNA contributes to epigenetic progression of the epithelial-mesenchymal transition of lung and pancreatic cancer cells[J]. J Biol Chem, 2018, 293(47): 18016-18030.
[7] 马从乾, 王雅, 王娜, 等. LINC00152通过调节VEGFR2的表达对血管瘤内皮细胞生长、增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 癌症进展, 2019, 17(3): 284-290.
[8] WANG Y, LI M, DONG C, et al. Linc00152 knockdown inactivates the Akt/mTOR and Notch1 pathways to exert its anti-hemangioma effect[J]. Life Sci, 2019, 223: 22-28.
[9] ZHAO W, FU H, ZHANG S, et al. LncRNA SNHG16 drives proliferation, migration, and invasion of hemangioma endothelial cell through modulation of miR-520d-3p/STAT3 axis[J]. Cancer Med, 2018, 7(7): 3311-3320.
[10] ZHANG J, ZHANG C. Silence of long non-coding RNA UCA1 inhibits hemangioma cells growth, migration and invasion by up-regulation of miR-200c[J]. Life Sci, 2019, 226(1): 33-46.
[11] LI X, CHEN B, CHI D, et al. lncRNA CASC9 regulates cell migration and invasion in hemangioma endothelial cells by targeting miR-125a-3p/Nrg1[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12(2): 423-432.
[12] ZHANG J, ZHAO T, TIAN L, et al. LncRNA OIP5-AS1 promotes the proliferation of hemangioma vascular endothelial cells via regulating miR-195-5p/NOB1 Axis [J]. Front Pharmacol, 2019, 10(1): 449.
[13] HATADA I, MORITA S, OBATA Y, et al. Identification of a new imprinted gene, Rian, on mouse chromosome 12 by fluorescent differential display screening[J]. Journal of Biochemistry, 2001, 130(2): 187-190.
[14] ZHANG J, YAO T, WANG Y, et al. Long noncoding RNA MEG3 is downregulated in cervical cancer and affects cell proliferation and apoptosis by regulating miR-21[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(1): 104-113.
[15] WEI GH, WANG X. lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(17): 3850-3856.
[16] DAI Y, WAN Y, QIU M, et al. lncRNA MEG3 suppresses the tumorigenesis of hemangioma by sponging miR-494 and regulating PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(6): 2872-2886.
[17] LI G, WANG K, WANG J, et al. miR-497-5p inhibits tumor cell growth and invasion by targeting SOX5 in non-small-cell lung cancer[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 10587-10595.
[18] SUN Z, LI A, YU Z, et al. MicroRNA-497-5p suppresses tumor cell growth of osteosarcoma by targeting ADP ribosylation factor-like protein 2[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2017, 32(10): 371-378.

(收稿日期:2019-09-26,修回日期:2019-10-23)