

长链非编码 RNA H19 调节微小 RNA 影响 腹主动脉瘤形成的潜在机制

余皓, 冯松林, 施森

(西南医科大学附属医院血管外科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 长链非编码 RNA H19; 微小 RNA; 腹主动脉瘤

[摘要] 长链非编码 RNA H19(long non-coding RNA H19, H19)在腹主动脉瘤中过表达。在多种血管疾病模型中发现, H19 调节多种微小 RNA(如 miR-let-7、miR-29、miR-21 等)参与动脉硬化、平滑肌细胞凋亡和炎症反应等病理生理过程, 与腹主动脉瘤的发生发展关系密切。文章就 H19 调节微小 RNA 影响腹主动脉瘤形成的潜在机制进行综述。

[中图分类号] R6;R5

[文献标识码] A

Potential mechanism of long non-coding RNA H19 regulating microRNA and influencing abdominal aortic aneurysm formation

YU Hao, FENG Songlin, SHI Sen

(Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] long non-coding RNA h19; microRNA; abdominal aortic aneurysm

[ABSTRACT] Long non-coding RNA H19(H19) is overexpressed in abdominal aortic aneurysm. H19 regulates many microRNA (such as miR-let-7, miR-29, miR-21, etc.) and participates in pathophysiological processes such as atherosclerosis, smooth muscle cell apoptosis and inflammatory response etc, which is closely related to the formation and progress of abdominal aortic aneurysm. This paper presents an overview of potential mechanism of long non-coding RNA H19 regulating microRNA and influencing abdominal aortic aneurysm formation.

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysms, AAA)是指腹主动脉永久性节段性全层扩张,直径超过正常血管的150%,一般超过3 cm即可临床诊断。腹主动脉瘤早期多无临床症状,随着瘤体增大,可能出现腹部疼痛、腹部搏动性包块、邻近组织压迫症状等。动脉瘤体直径越大越容易破裂,瘤体破裂后死亡率为85%~90%^[1]。主要危险因素包括高龄、男性、吸烟和高血压,其他危险因素包括既往动脉硬化闭塞性疾病史、血脂异常、肥胖、创伤和慢性阻塞性肺疾病^[1-4],而糖尿病对AAA可能存在一定的保护作用^[1,5]。目前,暂无有效药物可以延缓AAA进展或降低破裂风险^[6-8]。

AAA是一种累及血管壁全层的退行性病变,主要病理特点包括淋巴细胞和巨噬细胞浸润血管壁、

蛋白酶破坏中膜和外膜中的弹性蛋白和胶原蛋白、平滑肌细胞凋亡以及新生血管形成^[2]。炎性细胞激活并分泌各种细胞因子和趋化因子诱导基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)活化,引起细胞外基质降解和平滑肌细胞凋亡,导致AAA形成及进展^[9]。

非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)包括19~25个核苷酸组成的微小RNA(microRNA, miRNA)和长度超过200个核苷酸的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA),参与多种生理和病理机制的调节^[10]。其中长链非编码RNA H19(long non-coding RNA H19, H19)调节miRNA参与细胞凋亡、炎症反应等多种病理过程,与AAA形成密切相关。本文就H19调节miRNA影响AAA形成的潜在机制

[收稿日期] 2020-06-18

[修回日期] 2020-10-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81500643)

[作者简介] 余皓, 硕士研究生, 研究方向为主动脉及周围血管疾病, E-mail 为 2810595584@qq.com。通信作者施森, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病血管病变、主动脉及周围血管疾病, E-mail 为 50242042@qq.com。

进行综述。

1 H19 与 miRNA 的作用

H19 是一种发育调节型长链非编码 RNA,主要表达在成人心肌和骨骼肌,在其他组织中的表达与炎症性疾病密切相关^[11]。miRNA 不会被翻译成蛋白质,但影响信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 的转录和稳定,并在转录后水平调控其靶基因的表

达。miRNA 可以在组织或循环血液中被检测,且存储期间稳定,使得 miRNA 成为潜在的生物标记物^[12]。

在血管疾病模型研究中,H19 和多种 miRNA 之间存在内源性竞争性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 作用,即 H19 可通过与 miRNA 反应元件结合调节 mRNA 表达(图 1)。此外,H19 可通过转录因子调节 DNA 转录影响蛋白合成。

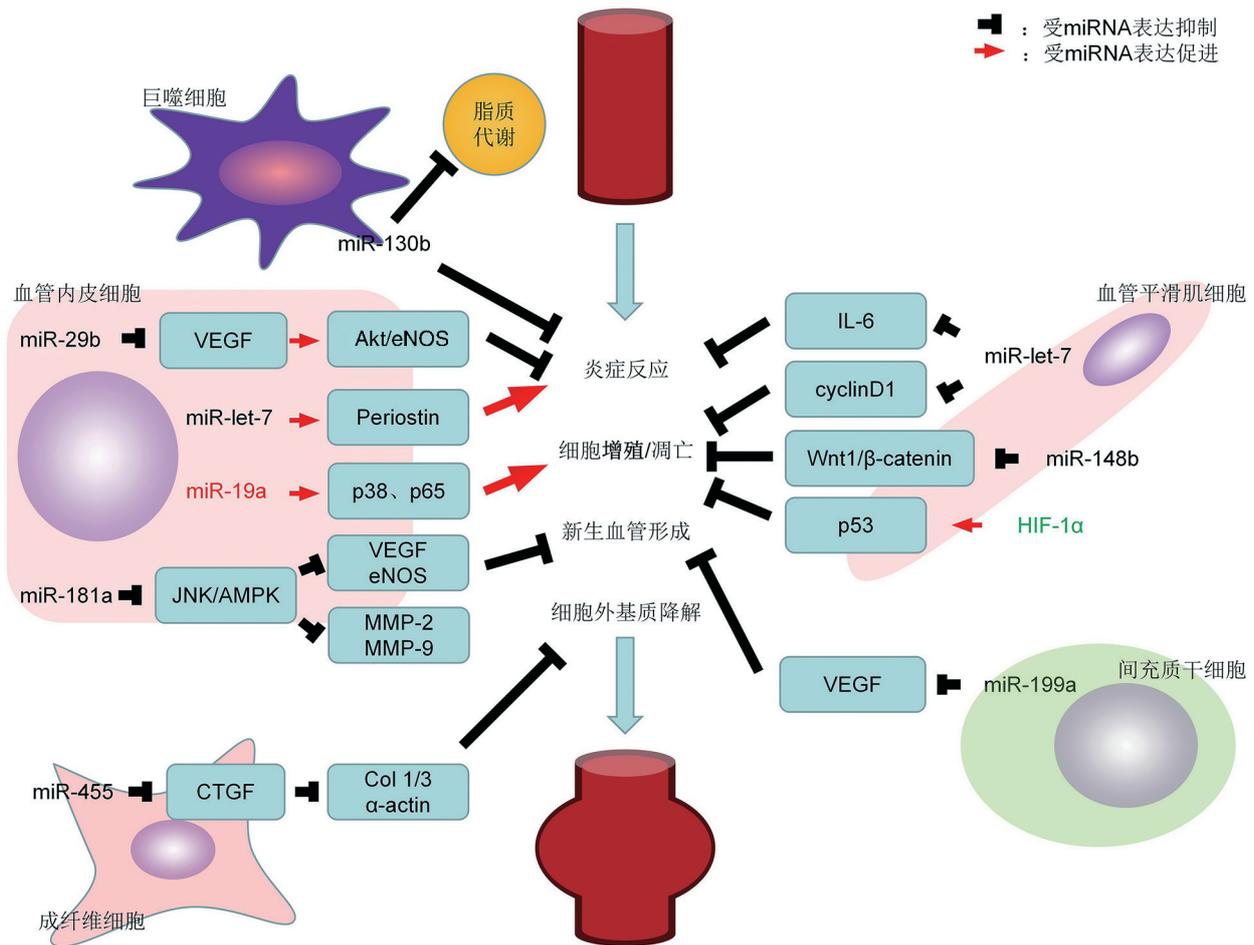


图 1. 长链非编码 RNA H19 调节微小 RNA 影响腹主动脉瘤形成的潜在机制

H19 可通过 miRNA(黑色表示 H19 抑制 miRNA 表达;红色表示 H19 促进 miRNA 表达)调节 mRNA 表达影响蛋白合成,也可通过转录因子(绿色)调节 DNA 转录过程影响蛋白合成。

Figure 1. Potential mechanism of long non-coding RNA H19 regulating microRNA and influencing abdominal aortic aneurysm formation

1.1 miRNA 与血管内皮细胞

在血管内皮细胞的功能研究中发现,过表达 H19 会下调 miR-181a 表达水平,激活 JNK 和 AMPK 信号转导,上调 MMP-2、MMP-9、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase,

eNOS) 的蛋白水平,显著提高了人微血管内皮细胞 1 (human microvascular endothelial cell-1, HMEC-1) 的存活率、迁移能力和成管能力^[13]。过表达 miR-181a 可抵消上述改变,抑制 miR-181a 则可增强上述改变。腹主动脉中,H19 过表达可能通过下调 miR-181a 激活 JNK 和 AMPK 信号通路促进血管生

成,提高 HMEC-1 的细胞活力、迁移能力和血管生成能力^[13],上调 MMP-2、MMP-9 表达引起细胞外基质降解,促进 AAA 形成^[5]。

糖尿病患者血液及高糖环境诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)中, H19 表达上调, miR-29b 表达下调。通过下调 H19,增加 miR-29b 的表达,可抑制血管内皮生长因子 A(VEGFA)表达^[9]。通过荧光素酶报告和 RNA 免疫沉淀,证明 H19 和 miR-29b 之间存在直接结合位点。miR-29b 抑制剂可逆转 H19 或 VEGFA 沉默引起的 Akt/eNOS 信号通路磷酸化增加及肿瘤坏死因子 α 、活性氧、NADPH 氧化酶活性的降低^[9]。Akt/eNOS 信号通路磷酸化可以降低内皮细胞炎症反应和氧化应激。因此,上调 H19 可能通过 miR-29b/VEGFA 抑制 Akt/eNOS 信号通路的磷酸化过程,促进内皮细胞的炎症反应和氧化应激^[9]。在 AAA 组织样本研究中,miR-29b 下调,可促进胶原蛋白和弹性蛋白沉积影响纤维化,延缓瘤体扩张^[12]。H19 可能通过 miR-29b 影响内皮细胞的炎症反应、氧化应激及调节纤维化过程影响 AAA 形成,具体机制有待进一步研究。

在动脉硬化闭塞症患者和载脂蛋白 E 基因缺陷的动脉硬化小鼠血清中 H19 表达上调。转染 HUVEC 过表达 H19 后,细胞增殖能力增强,凋亡蛋白 Caspase-3 的表达下调, NF- κ B 信号通路的关键因子 p38 和 p65 的表达上调^[14]。转染上调 miR-19a, p65 的表达同样出现上调。H19 和 miR-19a 均可通过 NF- κ B 信号通路促进动脉硬化的血管内皮细胞增殖,抑制其凋亡^[14]。动脉硬化引起血管壁缺血导致中膜坏死进而损伤弹性蛋白是 AAA 形成的危险因素^[2], H19 与 miR-19a 可能存在相互作用并调节 NF- κ B 信号通路影响 AAA 形成。

在动脉硬化性疾病患者血清和氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的 HUVEC 的研究中发现, H19 表达上调;敲除 H19 基因,白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的分泌被抑制,血管细胞黏附分子 1、细胞间黏附分子 1 和 E 选择素的表达降低,活性氧和丙二醛水平降低,超氧化物歧化酶水平升高,内皮细胞存活率提高^[15]。骨膜素(Periostin)是一种分泌型基质蛋白,可在组织损伤时重塑细胞外基质,同时 Periostin 基因也是 let-7 的基因靶点。在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中,敲除 H19 基因后, Periostin 表达显著下调,过表达 Periostin 可以部分逆转敲除 H19 基因的生物效应,而这一效应与 miR-let-7a 过表

达相似^[15]。综上所述,敲除 H19 可通过 let-7a/Periostin 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 炎症、凋亡和氧化应激。

1.2 miRNA 与血管平滑肌细胞

在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)中, H19 过表达可促进 VSMC 增殖和上调细胞周期蛋白 D1(cell cycle protein, cyclin D1)表达,而过表达 let-7a 可以抑制上述作用。H19 与 let-7a 的 ceRNA 作用可增强 Cyclin D1 表达,促进 VSMC 增殖和血管重塑^[16]。

在 AAA 患者和 AAA 小鼠的主动脉标本中, H19 表达上调,白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和巨噬细胞趋化蛋白 1 表达上调;通过 H19 和巨噬细胞标记物 MAC-2 的联合染色显示, H19 定位于 VSMC 和浸润主动脉的巨噬细胞;体内实验中,过表达 H19 增加了血管炎症反应,促进 AAA 的形成,沉默 H19 则作用相反;通过生物信息学分析和荧光素酶报告分析, H19 与 let-7a 的 ceRNA 作用诱导靶基因 IL-6 的转录。研究表明 H19/let-7a/IL-6 形成病理性的炎症反应可诱导 AAA 形成^[17]。

在动脉硬化性疾病患者的血清和 ox-LDL 诱导的人主动脉血管平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cell, HAVSMC)中 H19 表达上调, miR-148b 表达下调,二者呈负相关。敲除 H19,可抑制 HAVSMC 增殖并促进凋亡;下调 miR-148b 表达,抑制增殖作用被减弱。H19 作为 miR-148b 的 ceRNA,能够增强 Wnt1 在 HAVSMC 中的表达。Wnt1 是 miR-148b 的潜在结合靶点。在 ox-LDL 诱导的 HAVSMC 中, Wnt1/ β -catenin 信号通路被阻断,抑制 miR-148b 表达可激活 Wnt1/ β -catenin 信号通路促进 HAVSMC 增殖并抑制凋亡。ox-LDL 诱导的 HAVSMC 中,敲除 H19 诱导 miR-148b 上调,失活 Wnt1/ β -catenin 信号通路,抑制 SMC 增殖并促进凋亡^[18]。

1.3 miRNA 与其他细胞

血脂异常是导致 AAA 形成的危险因素之一。在 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞中, H19、甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇表达明显上调, miR-130b 和高密度脂蛋白胆固醇水平明显下调。沉默 H19 后, miR-130b 表达上调,抑制 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞的脂质积聚,降低促炎因子水平和升高抗炎因子水平。H19 和 miR-130b 之间存在结合位点,沉默 H19 可上调 miR-130b 的表达,抑制 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞脂质积聚和炎

症反应^[11]。

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)可通过抗炎和免疫调节作用调节血管内皮细胞和血管平滑肌细胞功能^[19]。在 C57BL/6 小鼠骨髓 MSC 的体外研究中发现,过表达 H19 提高了 MSC 在常氧(20% O₂)和缺氧(1% O₂)/血清剥夺条件下的存活率和血管生成能力,敲除 H19 则降低了细胞活力和血管生成能力。H19 可通过竞争性结合 miR-199a 靶向调节 VEGFA。H19 过表达使 miR-199a 表达下调,VEGFA 表达上调,沉默 H19 后二者出现相反变化。过表达 H19 与 MSC 中 miR-199a 结合,促进 VEGFA 表达,提高细胞活力并促进血管生成^[20],可能参与 AAA 形成。

研究^[21]表明,在糖尿病小鼠心肌和血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)诱导的心脏成纤维细胞(cardiac fibroblast, CF)中,miR-455 显著下调。在 Ang II 诱导的 CF 中 miR-455 的表达水平与 I 型和 III 型胶原蛋白的表达呈负相关。通过生物信息学分析,H19 和 miR-455 之间可能存在结合位点,miR-455 可靶向结合结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)。敲除 H19 基因,可增强 miR-455 的抗纤维化作用,降低 CTGF 表达,进而减少纤维化相关蛋白(I 型、III 型胶原蛋白和平滑肌 α 肌动蛋白)的合成。H19 通过与 CF 中 miR-455 竞争性结合,促进 CTGF 表达,促进纤维化相关蛋白合成进而影响纤维化过程。胶原蛋白减少可引起细胞外基质降解,参与促进 AAA 形成。

2 H19 与转录因子的作用

在 Ang II 诱导的载脂蛋白 E 基因缺陷 C57BL/6 腹主动脉瘤模型和猪胰腺弹性蛋白酶诱导的 C57BL/6 腹主动脉瘤模型瘤体中,H19 表达上调与 SMC 含量及 SMC 凋亡相关。人腹主动脉瘤组织样本和猪胰腺弹性蛋白酶诱导的低密度脂蛋白受体缺陷小型猪腹主动脉瘤模型中可观察到类似情况。在体外,H19 基因敲除可显著降低 HAVSMC 的凋亡率,而 H19 基因的过表达则起到相反的作用。这一作用独立于嵌入在 H19 基因第一外显子中的 miR-675。用含有 miR-675 基因位点的野生型 H19 和 miR-675 缺失的突变型 H19 转染 SMC,SMC 的增殖和凋亡无显著差异。在 C57BL/6 的 Ang II 诱导的 AAA 模型中,H19 表达显著上调而 miR-675 表达无统计学意义。证明 Ang II 诱导的 AAA 模型中,H19 表达上调与 miR-675 表达无关。进一步实验发现,

在细胞核中,高水平的 H19 与缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)启动子区域结合,招募转录因子特异性蛋白,HIF-1 α 表达增加。在细胞质中,H19 与 HIF-1 α 蛋白结合维持 p53 稳定性,形成一个抑制 SMC 存活的结构。上述事件共同参与促进 SMC 凋亡,加速 AAA 进展^[22]。

3 小结

综上所述,血管壁炎症反应、炎症因子介导的细胞外基质降解、平滑肌细胞减少与新生血管形成是 AAA 形成的关键病理过程。内皮细胞中,H19、miR-19a 促进内皮细胞增殖,H19 通过抑制 miR-29b、miR-let-7a 表达抑制炎症反应、氧化应激及内皮细胞凋亡,通过 miR-29b、miR-181a 调节 VEGF、eNOS 水平提高内皮细胞活力、促进血管新生。巨噬细胞中,H19 与 miR-130b 结合,促进炎症反应和脂质积聚。上述反应构成了动脉硬化的基础,动脉硬化可引起血管壁缺血导致中膜坏死进而损伤弹性蛋白导致 AAA 形成^[2]。H19 通过 miR-29b、miR-455 调节纤维蛋白合成影响纤维化过程,调节 MMP-2、MMP-9 表达参与细胞外基质降解。平滑肌细胞中,H19 通过 let-7a、miR-148b 促进平滑肌细胞增殖并抑制凋亡,H19 与 HIF-1 α 结合促进平滑肌细胞凋亡。

近年研究发现,H19 不仅可以通过结合 miRNA 调节 mRNA 表达,还可以通过结合 HIF-1 α 促进 SMC 凋亡^[22]、转录因子 CCCTC 结合因子促进动脉硬化和血管内斑块生成^[23]。

由于 AAA 病理机制调节网络的复杂性,非编码 RNA 对于 AAA 调控机制的研究还在起步阶段。目前尚无有效靶点能够特异性的调控,因此需要更多更深入的研究。随着检测技术的进步和对非编码 RNA 的研究深入,非编码 RNA 有可能成为 AAA 的潜在生物标记物协助临床早期诊断与药物的靶向治疗。

[参考文献]

- [1] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2020, 141(9): e139-e596.
- [2] Kent KC. Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms [J]. N Engl J Med, 2014, 371(22): 2101-2108.
- [3] Howard DP, Banerjee A, Fairhead JF, et al. Age-specific

- incidence, risk factors and outcome of acute abdominal aortic aneurysms in a defined population[J]. *Br J Surg*, 2015, 102(8): 907-915.
- [4] Aggarwal S, Qamar A, Sharma V, et al. Abdominal aortic aneurysm: a comprehensive review[J]. *Exp Clin Cardiol*, 2011, 16(1): 11-15.
- [5] RESCAN Collaborators, Bown MJ, Sweeting MJ, et al. Surveillance intervals for small abdominal aortic aneurysms: a Meta-analysis[J]. *JAMA*, 2013, 309(8): 806-813.
- [6] Golledge J, Norman PE. Current status of medical management for abdominal aortic aneurysm[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 217(1): 57-63.
- [7] Lederle F. Abdominal aortic aneurysm: still no pill[J]. *Ann Intern Med*, 2013, 159(12): 852-853.
- [8] Meijer CA, Stijnen T, Wasser MN, et al. Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: a randomized trial[J]. *Ann Intern Med*, 2013, 159(12): 815-823.
- [9] Cheng XW, Chen ZF, Wan YF, et al. Long non-coding RNA H19 suppression protects the endothelium against hyperglycemic-induced inflammation via inhibiting expression of miR-29b target gene vascular endothelial growth factor A through activation of the protein kinase B/endothelial nitric oxide synthase pathway[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 263.
- [10] 杨秀红, 王玉强, 杜正任, 等. 高脂血症冠状动脉内皮损伤相关的微小 RNA 研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(8): 721-727.
- [11] Han Y, Ma J, Wang J, et al. Silencing of H19 inhibits the adipogenesis and inflammation response in ox-LDL-treated RAW264.7 cells by up-regulating miR-130b[J]. *Mol Immunol*, 2018, 93: 107-114.
- [12] Iyer V, Rowbotham S, Biros E, et al. A systematic review investigating the association of microRNAs with human abdominal aortic aneurysms[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 261: 78-89.
- [13] Zhu A, Chu L, Ma Q, et al. Long non-coding RNA H19 down-regulates miR-181a to facilitate endothelial angiogenic function[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2698-2705.
- [14] Li ZF, Shu XJ, Chang YW, et al. Effect of lncRNA H19 on the apoptosis of vascular endothelial cells in arteriosclerosis obliterans via the NF- κ B pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4491-4497.
- [15] Cao L, Zhang Z, Li Y, et al. LncRNA H19/miR-let-7 axis participates in the regulation of ox-LDL-induced endothelial cell injury via targeting periostin[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 496-503.
- [16] Sun WF, Lv JY, Duan LR, et al. Long noncoding RNA H19 promotes vascular remodeling by sponging let-7a to upregulate the expression of cyclin D1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(4): 1038-1042.
- [17] Sun Y, Zhong L, He X, et al. LncRNA H19 promotes vascular inflammation and abdominal aortic aneurysm formation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 131: 66-81.
- [18] Zhang L, Cheng H, Yue Y, et al. H19 knockdown suppresses proliferation and induces apoptosis by regulating miR-148b/Wnt/ β -catenin in ox-LDL-stimulated vascular smooth muscle cells[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 11.
- [19] Lin Y, Zhu W, Chen X. The involving progress of MSCs based therapy in atherosclerosis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 216.
- [20] Hou J, Wang L, Wu Q, et al. Long noncoding RNA H19 upregulates vascular endothelial growth factor A to enhance mesenchymal stem cells survival and angiogenic capacity by inhibiting miR-199a-5p[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 109.
- [21] Huang ZW, Tian LH, Yang B, et al. Long noncoding RNA H19 acts as a competing endogenous RNA to mediate CTGF expression by sponging miR-455 in cardiac fibrosis[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(9): 759-766.
- [22] Li DY, Busch A, Jin H, et al. H19 induces abdominal aortic aneurysm development and progression[J]. *Circulation*, 2018, 138(15): 1551-1568.
- [23] Yang Y, Tang F, Wei F, et al. Silencing of long non-coding RNA H19 downregulates CTCF to protect against atherosclerosis by upregulating PKD1 expression in ApoE knockout mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(22): 10016-10030.

(此文编辑 许雪梅)