

本文引用: 张辉, 曲成良, 杨生平. 长链非编码 RNA HOTAIR 对冠心病的作用及机制研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(10): 871-877. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.10.006.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-10-0871-07

· 实验研究 ·

## 长链非编码 RNA HOTAIR 对冠心病的作用及机制研究

张辉<sup>1</sup>, 曲成良<sup>2</sup>, 杨生平<sup>1</sup>

(宁夏医科大学总医院 1. 心内科, 2. 心脏中心大血管外科, 宁夏银川市 750003)

**[摘要]** **[目的]** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)HOX 转录反义 RNA(HOTAIR)对冠心病(CHD)的影响及其作用机制。**[方法]** 通过实时定量 PCR 检测 CHD 患者和健康志愿者外周血血样和内皮祖细胞(EPC)中 lncRNA HOTAIR、微小 RNA-126(miR-126)和 Polo 样蛋白激酶 4(PLK4)的表达水平;噻唑蓝法检测 EPC 细胞活力;流式细胞仪检测细胞凋亡率;Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3-II 和 Beclin1 的表达。激光共聚焦显微镜观察细胞自噬情况。miRcode 软件和双荧光素酶报告基因实验分析 lncRNA HOTAIR 和 miR-126 的相互关系。TargetScan 软件和双荧光素酶报告基因实验分析 miR-126 和 PLK4 的相互关系。Western blot 检测 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 对 EPC 细胞哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路的影响。**[结果]** lncRNA HOTAIR 和 PLK4 在 CHD 血样和 EPC 细胞中的表达明显上调( $P<0.01$ ),miR-126 表达明显下调( $P<0.01$ )。下调 lncRNA HOTAIR 或 PLK4 促进 EPC 细胞自噬,抑制 CHD 进展。上调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 抑制了 EPC 细胞自噬,促进细胞凋亡。lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 激活了 EPC 内 mTOR 通路。**[结论]** HOTAIR/miR-126/PLK4 轴介导 EPC 细胞自噬,通过 mTOR 信号通路影响 CHD。

**[关键词]** 长链非编码 RNA; lncRNA HOTAIR; 微小 RNA-126; Polo 样蛋白激酶 4; 冠心病

**[中图分类号]** R54

**[文献标识码]** A

### Effect of long non-coding RNA HOTAIR on coronary heart disease and its mechanism

ZHANG Hui<sup>1</sup>, QU Chengliang<sup>2</sup>, YANG Shengping<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Heart Center Macrovascular Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750003, China)

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) on coronary heart disease (CHD) and its mechanism. **Methods** The expression levels of lncRNA HOTAIR, microRNA-126 (miR-126) and Polo-like kinase 4 (PLK4) in peripheral blood samples and endothelial progenitor cells (EPC) of CHD patients and healthy volunteers were detected by quantitative real-time PCR. EPC cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium assay. Apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expressions of autophagy-related proteins LC3-II and Beclin1 were detected by Western blot. Cell autophagy was observed by confocal microscopy. The relationship between lncRNA HOTAIR and miR-126 was analyzed by miRcode software and dual-luciferase reporter gene assay. The relationship between miR-126 and PLK4 was analyzed by TargetScan software and dual-luciferase reporter gene assay. The effect of lncRNA HOTAIR on mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway through miR-126 in EPC was detected by Western blot. **Results** The expressions of lncRNA HOTAIR and PLK4 were significantly up-regulated in CHD blood samples and EPC ( $P<0.01$ ), and the expression of miR-126 was significantly down-regulated ( $P<0.01$ ). Down-regulation of lncRNA HOTAIR or PLK4 promoted autophagy in EPC, and inhibited CHD progression. Up-regulation of lncRNA HOTAIR inhibited EPC autophagy and promoted apoptosis through miR-126. The lncRNA HOTAIR activated the mTOR pathway in EPC via miR-126. **Conclusion** HOTAIR/miR-126/PLK4 axis mediates autophagy in EPC and affects CHD via mTOR signaling pathway.

**[KEY WORDS]** long non-coding RNA; lncRNA HOTAIR; microRNA-126; Polo-like kinase 4; coronary heart disease

[收稿日期] 2021-03-25

[修回日期] 2021-12-27

[基金项目] 宁夏回族自治区自然科学基金项目(0110190022)

[作者简介] 张辉, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管重症, E-mail: zhanghui0605@126.com。通信作者杨生平, 硕士, 主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail: sorharly@163.com。

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞, 造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病<sup>[1-2]</sup>, 近年来 CHD 的发病率逐渐增加。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一种非编码 RNA 的形式, 其长度超过 200 个核苷酸, 近年受到临床广泛关注<sup>[3-5]</sup>。研究表明, lncRNA 在癌症组织中有异常表达, 而且它们通常与肿瘤抑制或致癌过程有关<sup>[6-7]</sup>。对于心脑血管疾病, lncRNA 作为动脉粥样硬化发病的重要调节因子出现。HOX 转录反义 RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR) 是最近发现的一种 lncRNA, 在生物学领域得到了广泛的研究, 例如, lncRNA HOTAIR 增强雄激素受体介导的转录程序, 并驱动去势抵抗性前列腺癌<sup>[8]</sup>; lncRNA HOTAIR 敲除抑制胃癌细胞的生物活性<sup>[9]</sup>; Lu 等<sup>[10]</sup> 研究表明, 在胆管癌中, lncRNA HOTAIR 通过调控 miR-204-5p/高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 轴抑制细胞凋亡、自噬并诱导细胞增殖。然而, lncRNA HOTAIR 在 CHD 病变过程中的生物学功能尚不明了。因此本实验主要探讨 lncRNA HOTAIR 对 CHD 发展的影响, 进一步阐明 CHD 的发病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 血样采集及主要材料

2020 年 7 月—2021 年 1 月, 从本院 50 例 CHD 患者中采集外周血血样, 另从 20 名健康志愿者中采集血样作为对照。均获得受试者书面同意, 研究方案获得本院伦理委员会许可。

人胚胎肾 293T 细胞 (human embryo kidney 293T cell, HEK293T) 购自 ATCC (American Type Culture Collection)。氨基酸和 DMEM 培养基 (dulbecco's modified eagle medium) 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 检测试剂盒来自上海纪宁实业有限公司。内皮细胞基础培养基 (endothelial cell growth medium-2, EGM-2) 购自瑞士 LON2A 公司。青霉素和链霉素为北京雷根生物公司产品。HOTAIR siRNA、HOTAIR-CMV、Polo 样蛋白激酶 4 (Polo-like kinase 4, PLK4) siRNA 等质粒由北京擎科生物公司合成。微小 RNA-126 (miRNA-126, miR-126) 抑制剂 (miR-126 inhibitor)、miR-126 模拟物 (miR-126 mimic) 来自 Genepharma 公司。上皮细胞黏附分子 (E-cadherin, E-cad)、神经、骨骼及心肌细胞黏附分子 (N-cadherin, N-cad)、

GAPDH 和 PLK4 抗体购自美国 CST 公司。基质胶来自重庆市华雅干细胞技术有限公司。

### 1.2 血浆的收集和储存

将 CHD 患者和对照组的外周血收集在乙二胺四乙酸抗凝管中, 并在 2 h 内进行处理, 在 4 °C 下 1 000 g 离心力离心 10 min。血浆转移到无核糖核酸酶 (ribonuclease, RNase)、脱氧核糖核酸酶 (deoxyribonuclease, DNase) 容积为 1.5 mL 的 EP 管中, 在 4 °C 下 16 000 g 离心力离心 10 min。上清液被转移到另一个无 RNase、DNase 的 EP 管中, 并储存在 -80 °C。

### 1.3 细胞培养

采用细胞分离介质密度梯度离心法分离培养 CHD 患者和对照组的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC)。将细胞在含有血管表皮生长因子、重组人胰岛素样生长因子 1、抗坏血酸、皮质醇和 20% 胎牛血清的 EGM-2 培养基中培养, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养于纤连蛋白包被的 6 孔板上。细胞接种时呈小圆形, 24 h 后可见细胞贴壁生长, 并逐渐变为梭形, 不贴壁细胞仍呈圆形, 体积较小; 4 天后, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 清洗, 去除非黏附细胞。4 天左右细胞明显增殖, 细胞体积增大; 5 天左右见类似血岛结构的细胞集落形成, 集落边缘细胞呈纺锤形和不规则梭形, 呈放射状单层生长, 集落中心细胞密集, 呈多层生长; 5~6 天时梭形细胞首尾相连接形成线样结构, 少量细胞连接成明显的管壁管腔, 管壁由单层细胞组成; 至第 7 天, 细胞体积变大, 细胞伸展呈纺锤形。黏附细胞培养过程中每隔 3 天更换新鲜培养基, 用于随后的实验。HEK293T 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 培养基进行培养, 细胞长满后传代培养。

### 1.4 细胞转染

取对数生长期的 EPC、HEK293T 细胞按  $5 \times 10^4$  个/mL 稀释后接种于 12 孔板, 12 h 后弃培养液, 采用 Turbofect 转染试剂用含质粒培养基与上述细胞在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C、饱和湿度的培养箱共培养, 转染 48 h, 弃去培养液, 收集转染细胞进行下一步实验。

### 1.5 细胞活力测定

用 MTT 法检测细胞活力。细胞转染成功后铺于 96 孔板, 细胞在 96 孔板中培养 3 天, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu$ L, 再孵育 4 h, 加入二甲基亚砜, 漩涡混合器上震荡 8 min。用酶标仪在 570 nm 处测定光密度 (OD) 值。生长图以细胞活力为 Y

轴,时间间隔为 X 轴。

### 1.6 双荧光素酶报告基因活性检测

通过 PCR 扩增 HOTAIR 及 PLK4 的 3'-非翻译区(3'-UTR),并分别构建 HOTAIR WT[WT:野生型(wild type)]及 PLK4 WT 载体。利用快速位点定向突变试剂盒进行定点突变,构建 HOTAIR MT[MT:突变型(mutant type)]及 PLK4 MT 载体。在双荧光素酶报告基因实验中,使用 Turbofect 将 lncRNA HOTAIR WT、lncRNA HOTAIR MT 分别与 miR-126 mimic、mimic NC,PLK4 WT、PLK4 MT 分别与 miR-126 mimic、mimic NC 共转染至 HEK293T 细胞,细胞转染后 48 h 通过双荧光素酶检测系统检测荧光素酶活性。

### 1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率

用 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒检测细胞凋亡率。将 EPC 接种于 24 孔板中,孵育过夜;胰酶消化后收集细胞,用 PBS 洗涤,离心;细胞沉淀重悬于结合缓冲液中,与膜联蛋白 V-FITC 孵育,再次离心;PBS 洗涤,在暗室中重悬于含碘化丙啶溶液的结合缓冲液中。最后,采用流式细胞仪对细胞凋亡率进行分析。每个实验都独立进行了 3 次。

### 1.8 实时定量 PCR

使用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA,然后将总 RNA 反转成 cDNA。使用 SYBR Green 定量试剂盒用实时定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)方法检测基因的相对表达量,GAPDH 作为内参对照,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析结果。实验所用的引物见表 1。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequence

引物	序列(5'-3')
lncRNA HOTAIR	F:CAGTGGGAACTCTGACTCG R:GTGCCTGGTCTCTCTTACC
miR-126	F:GGCTCGTACCGTGAGTAAT R:GTGCAGGTCGGAGGT
PLK4	F:ACGACCGCTGAGTTATCCAC R:GGCACCCACTTTCTTTCACG
GAPDH	F:ATGTTTCGTCATGGGTGTGAA R:GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT

### 1.9 Western blot

取转染成功的细胞样品,使用裂解缓冲液 RIPA 进行裂解,30 min 后离心收集上清。用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并在聚偏二氟

乙烯(polyvinylidene difluoride,PVDF)膜上进行蛋白印迹,在室温封闭 PVDF 膜 3 h,PVDF 膜与对应一抗[抗哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)(ab2732,1:2 000)、抗 p-mTOR(ab137133,1:1 000)、抗 Beclin1(ab210498,1:1 000)、抗 LC3-II(ab48394,1 mg/L)、抗 GAPDH(ab8235,1:3 000)]进行孵育,膜用 TBST 冲洗 3 次,然后加入相应的二抗再孵育 1 h,TBST 再次冲洗 3 次。滴加增强化学发光试剂进行蛋白曝光,使用 Image J 软件进行灰度分析并计算相对蛋白表达量。

### 1.10 细胞自噬的检测

使用 Cyto-ID 自噬检测试剂盒检测细胞自噬。细胞成功转染 48 h 后按照试剂盒说明书处理细胞,将细胞置于激光共聚焦显微镜下,观察 LC3-II 阳性点状斑点。

### 1.11 统计学处理

收集所有数据,用 SPSS 17.0 软件分析,数据用  $\bar{x}\pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 下调 lncRNA HOTAIR 促进 EPC 细胞自噬并抑制 CHD 进展

由图 1A、B 的 qRT-PCR 结果可知,lncRNA HOTAIR 在 CHD 血样和 EPC 中的表达明显上调( $P<0.01$ );HOTAIR siRNA 组 lncRNA HOTAIR 表达量明显低于 siRNA NC 组( $P<0.01$ ),说明 HOTAIR siRNA 在 EPC 中明显抑制了 HOTAIR mRNA 的表达。由图 1C 的 MTT 结果可知,HOTAIR siRNA 组 EPC 细胞活力明显高于 siRNA NC 组( $P<0.05$ )。由图 1D、E 的流式细胞仪检测结果可知,HOTAIR siRNA 组细胞凋亡率明显低于 siRNA NC 组( $P<0.01$ )。由图 1F-H 的结果可知,和 siRNA NC 组相比,HOTAIR siRNA 组 LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达量明显升高( $P<0.01$ ),下调 HOTAIR 促进 EPC 细胞自噬。以上结果表明下调 lncRNA HOTAIR 能够促进 EPC 细胞自噬,抑制 CHD 进展。

### 2.2 lncRNA HOTAIR 与 miR-126 之间的靶向关系

图 2A 为 miRcode 软件预测的 HOTAIR 和 miR-126 之间的结合位点。由图 2B 结果可知,和 mimic NC+HOTAIR WT 组相比,miR-126 mimic+HOTAIR WT 组细胞的荧光素酶活性显著降低( $P<0.01$ );和 mimic NC+HOTAIR MT 组相比,miR-126 mimic+HO-

TAIR MT 组细胞的荧光素酶活性无明显变化 ( $P > 0.05$ )。结果表明 lncRNA HOTAIR 与 miR-126 之间具有直接的靶向关系。

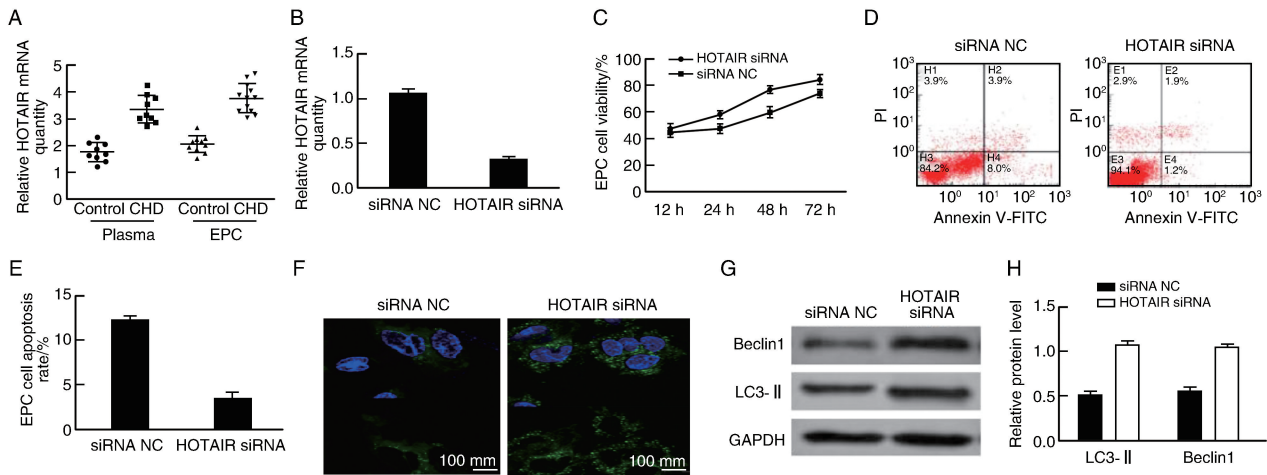


图 1. 下调 lncRNA HOTAIR 促进 EPC 细胞自噬并抑制 CHD 进展

A、B 为 qRT-PCR 检测 HOTAIR mRNA 的表达; C 为 MTT 法检测下调 lncRNA HOTAIR 对 EPC 细胞增殖的影响; D、E 为流式细胞仪检测下调 lncRNA HOTAIR 对 EPC 细胞凋亡的影响; F 为激光共聚焦显微镜观察下调 lncRNA HOTAIR 对 EPC 细胞自噬的影响; G、H 为 Western blot 检测下调 lncRNA HOTAIR 对 EPC 细胞 LC3-II、Beclin1 表达的影响。

Figure 1. Down-regulation of lncRNA HOTAIR promotes EPC cell autophagy and suppresses CHD progression

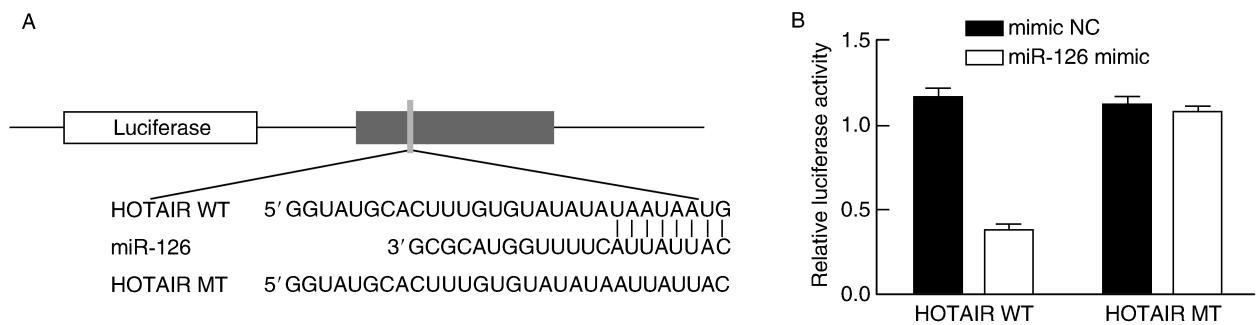


图 2. lncRNA HOTAIR 与 miR-126 之间的靶向关系

A 为 miRcode 软件预测 lncRNA HOTAIR 与 miR-126 之间的结合位点; B 为双荧光素酶报告基因实验检测 lncRNA HOTAIR 与 miR-126 之间的相互作用。

Figure 2. Targeting relationship between lncRNA HOTAIR and miR-126

### 2.3 上调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 抑制细胞自噬并促进 CHD 进展

由图 3A、B 的 qRT-PCR 结果可知, miR-126 在 CHD 血样和 EPC 细胞中的表达明显降低 ( $P < 0.01$ ); HOTAIR-CMV 细胞中 lncRNA HOTAIR 表达量明显高于 pCDH-CMV 细胞 ( $P < 0.01$ ), miR-126 mimic 细胞中 miR-126 表达量明显高于 mimic NC 细胞 ( $P < 0.01$ )。由图 3C-H 的结果可知, 与 pCDH-CMV + mimic NC 组相比, HOTAIR-CMV + mimic NC 组细胞活力明显降低 ( $P < 0.01$ ), 细胞凋亡率明显上升 ( $P < 0.01$ ), 细胞自噬明显减少,

LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.01$ ), pCDH-CMV + miR-126 mimic 组细胞活力明显升高 ( $P < 0.01$ ), 细胞凋亡率明显降低 ( $P < 0.01$ ), 细胞自噬明显增加, LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达量明显上升 ( $P < 0.01$ ); 和 pCDH-CMV + miR-126 mimic 组相比, HOTAIR-CMV + miR-126 mimic 组细胞活力明显降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率明显上升 ( $P < 0.01$ ), 细胞自噬明显减少, LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明上调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 抑制细胞自噬, 促进 CHD 进展。

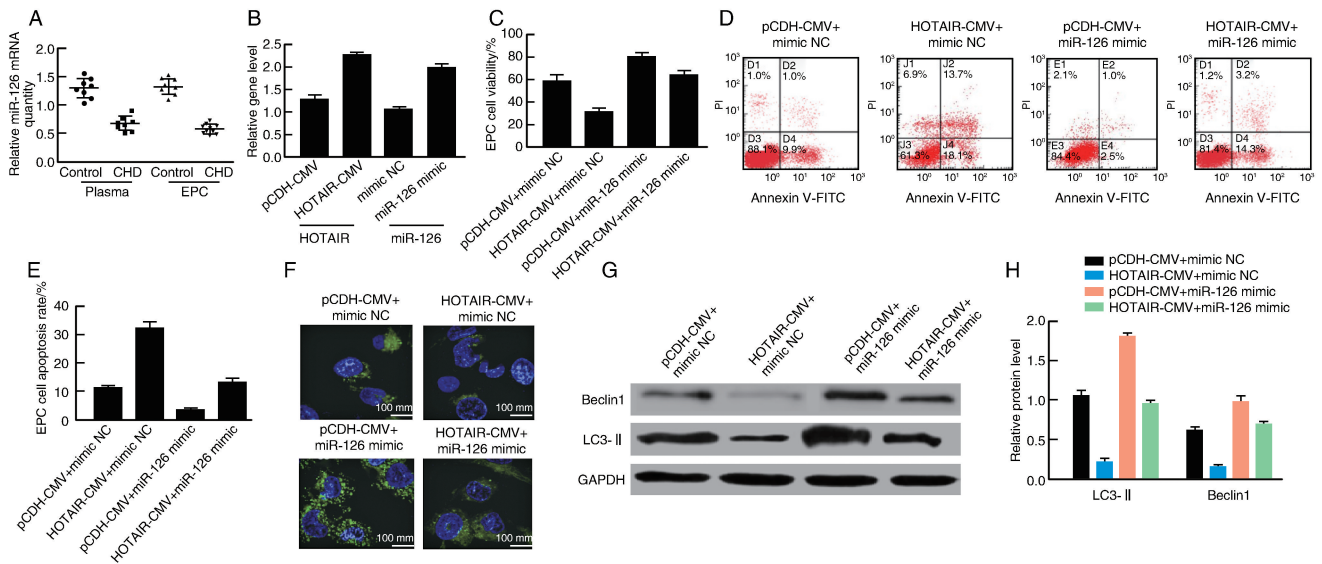


图 3. 上调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 抑制 EPC 细胞自噬并促进 CHD 进展

A、B 为 qRT-PCR 检测 miR-126、HOTAIR mRNA 的表达; C 为 MTT 法检测上调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 对 EPC 细胞增殖的影响; D、E 为流式细胞仪检测上调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 对 EPC 细胞凋亡的影响; F 为激光共聚焦显微镜观察上调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 对 EPC 细胞自噬的影响; G、H 为 Western blot 检测上调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 对 EPC 细胞 LC3-II、Beclin1 表达的影响。

Figure 3. Up-regulation of lncRNA HOTAIR inhibits EPC cell autophagy and promotes CHD progression via miR-126

### 2.4 miR-126 与 PLK4 之间的靶向关系

图 4A 为 TargetScan 软件预测的 miR-126 与 PLK4 的结合位点。由图 4B 可知, 和 mimic NC + PLK4 WT 组相比, PLK4 WT + miR-126 mimic 组细胞的荧光素酶活性显著降低 ( $P < 0.01$ ); 和 mimic NC + PLK4 MT 组相比, PLK4 MT + miR-126 mimic 组细胞的荧光素酶活性无明显变化 ( $P > 0.05$ )。结果说明 miR-126 与 PLK4 之间具有直接的靶向关系。

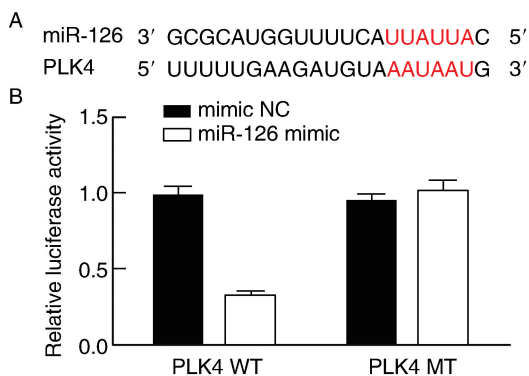


图 4. miR-126 与 PLK4 之间的靶向关系

A 为 TargetScan 信息学软件预测 miR-126 与 PLK4 之间的结合位点; B 为双荧光素酶报告基因实验检测 miR-126 与 PLK4 之间的相互作用。

Figure 4. Targeting relationship between miR-126 and PLK4

### 2.5 下调 PLK4 促进 EPC 细胞自噬并抑制 CHD 进展

由图 5A、B 的 qRT-PCR 结果可知, PLK4 在

CHD 血样和 EPC 中的表达明显上调 ( $P < 0.01$ ); PLK4 siRNA 细胞中 PLK4 表达量明显低于 siRNA NC 细胞 ( $P < 0.01$ ), 说明 PLK4 siRNA 在 EPC 中明显抑制了 PLK4 mRNA 的表达。由图 5C 的 MTT 结果可知, PLK4 siRNA 组 EPC 细胞活力明显高于 siRNA NC 组 ( $P < 0.05$ )。由图 5D、E 的流式细胞仪检测结果可知, PLK4 siRNA 组细胞凋亡率明显低于 siRNA NC 组 ( $P < 0.01$ )。由图 5F-H 的结果可知, 和 siRNA NC 组相比, PLK4 siRNA 组 LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达量明显升高 ( $P < 0.01$ ), 下调 PLK4 促进 EPC 细胞自噬。以上结果表明下调 PLK4 能够促进细胞自噬, 抑制 CHD 进展。

### 2.6 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 激活 EPC 内 mTOR 信号通路

由图 6A-D 的结果可知, 和 siRNA NC + inhibitor NC 组相比, HOTAIR siRNA + inhibitor NC 组 p-mTOR/mTOR、磷酸化真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, p-4EBP1)/4EBP1 比值明显降低, siRNA NC + miR-126 inhibitor 组 p-mTOR/mTOR、p-4EBP1/4EBP1 比值明显升高, HOTAIR siRNA + miR-126 inhibitor 组 p-mTOR/mTOR、p-4EBP1/4EBP1 比值明显低于 siRNA NC + miR-126 inhibitor 组 ( $P < 0.01$ )。和 pCDH-CMV + mimic NC 组相比, HOTAIR-CMV + mimic NC 组 p-mTOR/mTOR、p-4EBP1/4EBP1

比值明显升高, pCDH-CMV + miR-126 mimic 组 p-mTOR/mTOR、p-4EBP1/4EBP1 比值明显降低, HOTAIR-CMV + miR-126 mimic 组 p-mTOR/mTOR、p-

4EBP1/4EBP1 比值明显高于 pCDH-CMV + miR-126 mimic 组 ( $P < 0.01$ )。表明 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 激活了 EPC 内 mTOR 信号通路。

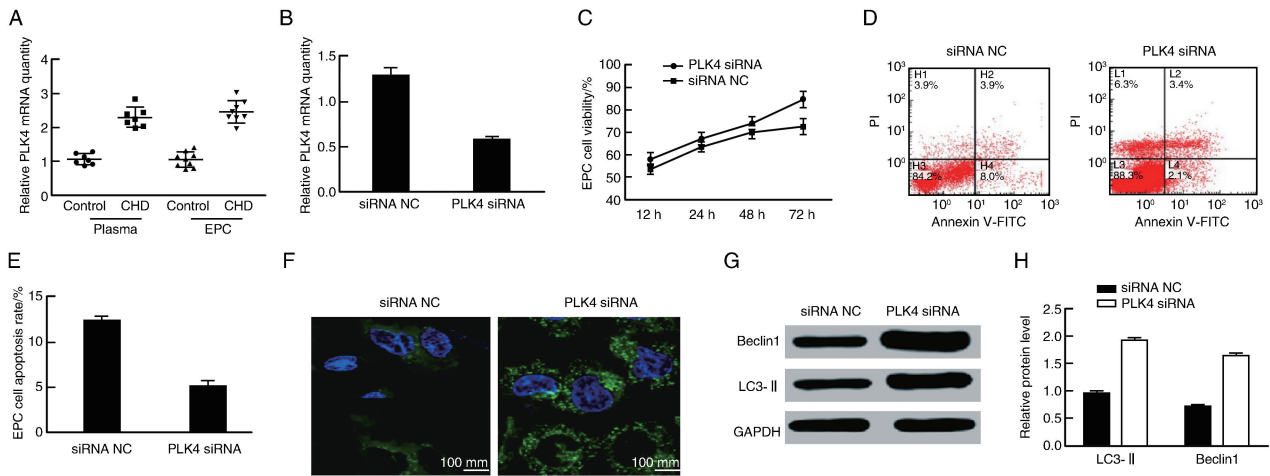


图 5. 下调 PLK4 促进 EPC 细胞自噬并抑制 CHD 进展

A、B 为 qRT-PCR 检测 PLK4 mRNA 的表达; C 为 MTT 法检测下调 PLK4 对 EPC 细胞增殖的影响; D、E 为流式细胞仪检测下调 PLK4 对 EPC 细胞凋亡的影响; F 为激光共聚焦显微镜观察下调 PLK4 对 EPC 细胞自噬的影响; G、H 为 Western blot 检测下调 PLK4 对 EPC 细胞 LC3-II、Beclin1 表达的影响。

Figure 5. Down-regulation of PLK4 promotes EPC autophagy and inhibits CHD progression

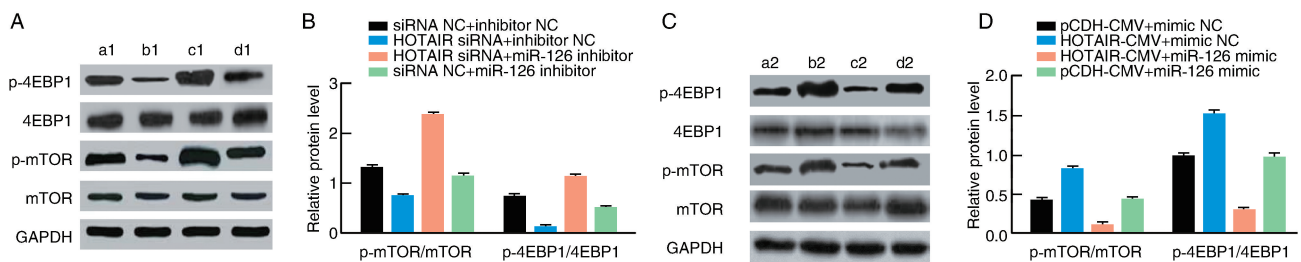


图 6. lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 激活 EPC 细胞内 mTOR 信号通路

A、C 为 Western blot 检测下调或过表达 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126 对 mTOR 信号通路的影响; B、D 为 p-mTOR/mTOR 和 p-4EBP1/4EBP1 比值。a1 为 siRNA NC+inhibitor NC 组; b1 为 HOTAIR siRNA+inhibitor NC 组; c1 为 siRNA NC+miR-126 inhibitor 组; d1 为 HOTAIR siRNA+miR-126 inhibitor 组; a2 为 pCDH-CMV+mimic NC 组; b2 为 HOTAIR-CMV+mimic NC 组; c2 为 pCDH-CMV+miR-126 mimic 组; d2 为 HOTAIR-CMV+miR-126 mimic 组。

Figure 6. The lncRNA HOTAIR activates the mTOR signaling pathway in EPC cells via miR-126

### 3 讨论

在本研究中, qRT-PCR 结果表明 HOTAIR 在 CHD 血样和 EPC 中表达上调。荧光素酶报告实验揭示了 HOTAIR/miR-126/PLK4 信号轴。lncRNA HOTAIR 对 EPC 细胞增殖、凋亡、自噬和 CHD 进展的影响可能与激活 mTOR 信号通路有关。本研究提示 lncRNA HOTAIR 有可能成为 CHD 患者预后的重要生物标志物。

研究人员发现, lncRNA 在各种疾病包括肿瘤在内的发生发展过程中发挥了重要作用。HOTAIR 首

先在乳腺癌细胞的细胞核中被发现, 特别是在转移性乳腺癌中, HOTAIR 能够与 Polycomb 抑制性复合体 2 结合, 改变赖氨酸-蛋氨酸甲基化和基因表达, 诱导肿瘤细胞侵袭转移<sup>[11]</sup>。此外, 有报道称 HOTAIR 在细胞质中充当支架, 通过促进 Ataxin-1 基因和 Snurportin-1 基因的泛素化, 诱导泛素介导的蛋白水解。另外发现 lncRNA HOTAIR 敲除可抑制胃癌细胞的生物活性<sup>[12]</sup>。心肌素相关转录因子通过 HOTAIR 调控非小细胞肺癌细胞 A549 的增殖及迁移<sup>[13]</sup>。以上报道均说明 lncRNA HOTAIR 与疾病的发生密切相关。然而 lncRNA HOTAIR 是否在

CHD 进展过程中发挥作用尚不明了。在本研究中,发现 lncRNA HOTAIR 在 CHD 血样和 EPC 细胞中的表达均明显上调,提示 HOTAIR 可能参与 CHD 进展。我们接着采用了 siRNA 技术,发现下调 lncRNA HOTAIR 能够促进 EPC 细胞自噬,抑制 CHD 进展。

最近的研究推测 HOTAIR 可以通过竞争内源性 RNA 活性,通过 miRNA 反应元件与其他 RNA 转录本竞争性结合,在疾病的发展中发挥作用<sup>[14]</sup>。之前的一项研究证实 HOTAIR 能够竞争性地结合 miR-331-3p 来调节胃癌的 HER2 表达。另外发现敲除 lncRNA HOTAIR 可通过抑制 miR-138-5p 调控的 EZH2 基因和 SIRT1 基因逆转卵巢癌细胞对顺铂的耐药性<sup>[15]</sup>。在本研究中,发现 HOTAIR 能够在体外与 miR-126 结合,体外数据证实 miR-126 在 CHD 血样和 EPC 中的表达明显下调,并发现 lncRNA HOTAIR 直接靶向 miR-126 以促进 CHD 的进展。其次,还检测到 miR-126 与 PLK4 之间的相互作用,且下调 PLK4 也会影响 CHD 的进展。mTOR 通路调节细胞生长,与能量、营养物质、生长因子等条件有关,在肿瘤的形成、发展、转移过程中起着重要的作用<sup>[16-17]</sup>。最近的研究表明,mTOR 蛋白激酶作为肾素-血管紧张素系统和磷脂酰肌醇 3 激酶下游刺激信号的接收器,是一个关键的生长控制节点。在本研究中,通过 Western blot 检测了 mTOR 通路相关蛋白 mTOR、p-mTOR 及其下游蛋白 p-4EBP1、4EBP1 的表达,发现 HOTAIR/miR-126 轴会影响 EPC 内 mTOR 信号通路的激活。据此推测 lncRNA HOTAIR 对 CHD 进展的调控作用可能与触发 mTOR 信号通路有关,但其作用机制还需要进一步研究。

综上所述,本研究表明 HOTAIR 在 CHD 血液和 EPC 中表达上调,通过 miR-126/PLK4 轴调控 CHD 发展,其作用机制可能与触发 mTOR 信号通路有关,HOTAIR 有望成为治疗 CHD 的一个潜在靶点。

#### [参考文献]

- [1] 赵彩云. 冠状动脉粥样硬化性心脏病患者心理健康状况调查及护理分析[J]. 实用医技杂志, 2020, 27(3): 386-387.  
ZHAO C Y. Investigation and nursing analysis of mental health status of patients with coronary atherosclerotic heart disease[J]. J Pract Med Tech, 2020, 27(3): 386-387.
- [2] 方叶青, 谢培益, 王磊, 等. 冠心病患者循环内皮祖细胞变化及功能的研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(8): 694-699.  
FANG Y Q, XIE P Y, WANG L, et al. Research on change and function of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary heart disease[J]. Chin J Arterioscler, 2019, 27(8): 694-699.
- [3] 汪羚利, 李昭屏, 于海奕, 等. 长链非编码 RNA 在冠心病发生发展中的作用机制[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2021,

13(6): 122-127.

- WANG L L, LI Z P, YU H Y, et al. The mechanism of long non-coding RNA in the development of coronary heart disease[J]. Chin J Frontiers of Med Sci (Elec Ver), 2021, 13(6): 122-127.
- [4] YAN Z S, ZHANG N C, LI K, et al. Upregulation of long non-coding RNA myocardial infarction-associated transcription is correlated with coronary artery stenosis and elevated inflammation in patients with coronary atherosclerotic heart disease[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2021, 37(12): 1038-1047.
  - [5] HAO N B, HE Y F, LI X Q, et al. The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 81572-81582.
  - [6] LIU S, ZHOU G, CHEN X, et al. Effect of lncRNA cancer upregulated drug resistant (CUDR) on osteoarthritis chondrocyte proliferation and apoptosis by regulating NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. J Biomater Tissue Eng, 2020, 10(12): 1871-1876.
  - [7] SONG W, MEI J Z, ZHANG M. Long noncoding RNA plncRNA-1 promotes colorectal cancer cell progression by regulating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Oncol Res, 2018, 26(2): 261-268.
  - [8] ZHANG A, ZHAO J C, KIM J, et al. LncRNA HOTAIR enhances the androgen-receptor-mediated transcriptional program and drives castration-resistant prostate cancer[J]. Cell Rep, 2015, 13(1): 209-221.
  - [9] CHANG Y T, LIN T P, TANG J T, et al. HOTAIR is a REST-regulated lncRNA that promotes neuroendocrine differentiation in castration resistant prostate cancer[J]. Cancer Lett, 2018, 433: 43-52.
  - [10] LU M, QIN X, ZHOU Y, et al. LncRNA HOTAIR suppresses cell apoptosis, autophagy and induces cell proliferation in cholangiocarcinoma by modulating the miR-204-5p/HMGB1 axis[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110566.
  - [11] 范方田, 沈存思, 裴昌松, 等. 肿瘤转移新靶点 HOTAIR 的研究进展[J]. 肿瘤, 2012, 32(10): 842-846.  
FAN F T, SHEN C S, PEI C S, et al. Review of a new tumor metastatic target HOTAIR[J]. Tumor, 2012, 32(10): 842-846.
  - [12] PAN C, FENG Y, ZHOU J, et al. LncRNA HOTAIR knockdown suppresses gastric cancer cell biological activities[J]. Food Sci Nutr, 2020, 9(1): 123-134.
  - [13] ZHANG K, ZHOU Y, FENG G, et al. MRTF-A regulates the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells of A549 through HOTAIR[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2019, 22(2): 82-89.
  - [14] LUAN W, LI R, LIANG L, et al. Long non-coding RNA HOTAIR acts as a competing endogenous RNA to promote malignant melanoma progression by sponging miR-152-3p[J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 85401-85414.
  - [15] ZHANG Y, AI H, FAN X, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR reverses cisplatin resistance of ovarian cancer cells through inhibiting miR-138-5p-regulated EZH2 and SIRT1[J]. Biol Res, 2020, 53(1): 18.
  - [16] NIN J, JIANG T, ROSEN D M, et al. Synergistic action of a RAF inhibitor and a dual PI3K/mTOR inhibitor in thyroid cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(20): 6482-6489.
  - [17] PAZHOOH R D, FARNOOD P R, ASEMI Z, et al. mTOR pathway and DNA damage response: a therapeutic strategy in cancer therapy[J]. DNA Repair (Amst), 2021, 104: 103142.

(此文编辑 曾学清)