

LncRNA NEAT1 通过调节 miR-125b-5p/IGFBP5 轴对血管瘤内皮细胞增殖、凋亡、迁移的实验研究

廖 烘, 刘 伟, 龙运峰 (邵阳学院附属第一医院儿科, 湖南邵阳 417000)

摘要: 目的 探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 核富集转录本 1 (nuclear enriched abundant transcript 1, NEAT1) 通过调节微小核糖核酸 (micro RNAs, miR) -125b-5p/胰岛素样生长因子结合蛋白 5 (insulin-like growth factor binding protein 5, IGFBP5) 轴对血管瘤内皮细胞增殖、凋亡和迁移的影响。方法 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)、蛋白免疫印迹 (Western blot) 分别检测血管瘤组织 (2016 年 3 月~2019 年 3 月收集, $n=18$)、瘤旁组织样本 (2016 年 3 月~2019 年 3 月收集, $n=18$) 以及人脐静脉内皮细胞 HUVECs, 人血管瘤内皮细胞 HemECs, HDEC 中 NEAT1, miR-125b-5p 及 IGFBP5 蛋白表达。构建沉默 NEAT1, 同时沉默 NEAT1 和 miR-125b-5p 的 HemECs 细胞系, 通过细胞活力检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8)、台盼蓝染色、流式细胞术、划痕愈合实验、Western blot 分别观察 NEAT1 和 miR-125b-5p 对 HemECs 细胞增殖、凋亡、迁移及 IGFBP5, 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 和基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 蛋白表达的影响; 双荧光素酶报告基因实验检测 NEAT1 与 miR-125b-5p, miR-125b-5p 与 IGFBP5 的关系。结果 与瘤旁组织比较, 血管瘤组织中 NEAT1 (2.87 ± 0.22 vs 1.00 ± 0.00), IGFBP5 蛋白 (1.45 ± 0.14 vs 0.27 ± 0.02) 表达水平升高, miR-125b-5p (0.24 ± 0.02 vs 1.00 ± 0.00) 表达水平降低, 差异具有统计学意义 ($t = 35.400 \sim 161.220$, 均 $P < 0.05$); 与 HUVECs 细胞比较, HemECs, HDEC 细胞中 NEAT1 (2.76 ± 0.24 , 1.78 ± 0.13 vs 1.00 ± 0.00), IGFBP5 蛋白 (1.31 ± 0.15 , 0.78 ± 0.06 vs 0.24 ± 0.02) 表达升高, miR-125b-5p 表达 (0.19 ± 0.02 , 0.45 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.00) 降低, 差异具有统计学意义 ($t = 17.320 \sim 99.204$, $14.697 \sim 33.680$, 均 $P < 0.05$), 且 HemECs 细胞中 NEAT1 和 IGFBP5 蛋白表达量最高, miR-125b-5p 表达量最低, 因此, 选取 HemECs 细胞为研究对象; 与 si-NC 组比较, si-NEAT1 组 NEAT1 (0.32 ± 0.02 vs 1.01 ± 0.12) 表达、A 值 (0.45 ± 0.04 vs 1.13 ± 0.11)、细胞生长率 ($32.28\% \pm 2.79\%$ vs $99.41\% \pm 0.22\%$)、划痕愈合率 ($20.33\% \pm 1.23\%$ vs $49.24\% \pm 2.43\%$) 及 IGFBP5 (0.41 ± 0.04 vs 1.31 ± 0.20), PCNA (0.36 ± 0.04 vs 1.27 ± 0.14), Bcl-2 (0.48 ± 0.04 vs 1.39 ± 0.16) 和 MMP-9 (0.21 ± 0.02 vs 1.09 ± 0.10) 蛋白表达降低, miR-125b-5p (1.87 ± 0.15 vs 1.02 ± 0.10) 表达、细胞凋亡率 ($45.58\% \pm 3.34\%$ vs $12.36\% \pm 1.07\%$) 升高, 差异具有统计学意义 ($t = 10.809 \sim 58.755$, 均 $P < 0.05$); 下调 miR-125b-5p 减弱了沉默 NEAT1 对 HemECs 细胞增殖、迁移的抑制及对细胞凋亡的促进作用 ($t = 9.218 \sim 15.010$, 均 $P < 0.05$); NEAT1 与 miR-125b-5p, miR-125b-5p 与 IGFBP5 存在靶向调控关系。结论 沉默 NEAT1 通过上调 miR-125b-5p 来抑制 IGFBP5 表达, 从而抑制 HemECs 细胞增殖、迁移, 并促进细胞凋亡。

关键词: 长链非编码 RNA 核富集转录本 1; 微小核糖核酸 -125b-5p; 胰岛素样生长因子结合蛋白 5; 血管瘤; 凋亡

中图分类号: R543; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2023) 03-065-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.03.012

Experimental Study on LncRNA NEAT1 on Proliferation, Apoptosis and Migration of Hemangioma Endothelial Cells by Regulating miR-125b-5p/IGFBP5 Axis

LIAO Hong, LIU Wei, LONG Yun-feng

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Shaoyang University, Hunan Shaoyang 417000, China)

Abstract: Objective To investigate the impacts of long non-coding RNA nuclear enriched abundant transcript 1 (LncRNA NEAT1) on the proliferation, apoptosis, and proliferation of hemangioendothelial cells by regulating the micro RNAs (miRNA, miR) -125b-5p/insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) axis. **Methods** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and western blot were performed to detect the protein expressions of NEAT1, miR-125b-5p and IGFBP5 in hemangioma tissue (collected from March 2016 to March 2019, $n=18$), paratumor tissue samples (collected from March 2016 to March 2019, $n=18$),

human umbilical vein endothelial cells HUVEs, human hemangioma endothelial cells HemECs, and HDEC, respectively. HemECs cell lines that silence NEAT1 and simultaneously silence NEAT1 and miR-125b-5p were constructed, the effects of NEAT1 and miR-125b-5p on the proliferation, apoptosis and migration of HemECs cells and the expression of IGFBP5, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) proteins were observed by cell counting kit-8 (CCK-8) method, trypan blue staining, flow cytometry, scratch healing test and western blot, respectively. Dual-luciferase reporter assays were performed to examine the relationship between NEAT1 and miR-125b-5p, and between miR-125b-5p and IGFBP5. **Results** The expression levels of NEAT1 (2.87 ± 0.22 vs 1.00 ± 0.00) and IGFBP5 (1.45 ± 0.14 vs 0.27 ± 0.02) in hemangioma tissues were higher than those in paratumoral tissues, the expression level of miR-125b-5p was decreased (0.24 ± 0.02 vs 1.00 ± 0.00), and the difference was statistically significant ($t = 35.400 \sim 161.220$, all $P < 0.05$). Compared with HUVEs cells, the expression of NEAT1 (2.76 ± 0.24 , 1.78 ± 0.13 vs 1.00 ± 0.00), IGFBP5 protein (1.31 ± 0.15 , 0.78 ± 0.06 vs 0.24 ± 0.02) in HemECs and HDEC cells increased, the expression of miR-125b-5p (0.19 ± 0.02 , 0.45 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.00) was decreased, and the differences were statistically significant ($t = 17.320 \sim 99.204$, $14.697 \sim 33.680$, all $P < 0.05$). The expression of NEAT1 and IGFBP5 protein was the highest in HemECs cells, and the expression of miR-125b-5p was the lowest. Therefore, HemECs cells were selected as the research object. Compared with the si-NC group, the expression of NEAT1 (0.32 ± 0.02 vs 1.01 ± 0.12), A value (0.45 ± 0.04 vs 1.13 ± 0.11), cell growth rate ($32.28\% \pm 2.79\%$ vs $99.41\% \pm 0.22\%$), scratch healing rate ($20.33\% \pm 1.23\%$ vs $49.24\% \pm 2.43\%$), IGFBP5 (0.41 ± 0.04 vs 1.31 ± 0.20), PCNA (0.36 ± 0.04 vs 1.27 ± 0.14), Bcl-2 (0.48 ± 0.04 vs 1.39 ± 0.16) and MMP-9 protein (0.21 ± 0.02 vs 1.09 ± 0.10) in the si-NEAT1 group reduced. The expression of miR-125b-5p (1.87 ± 0.15 vs 1.02 ± 0.10) and the rate of apoptosis ($45.58\% \pm 3.34\%$ vs $12.36\% \pm 1.07\%$) were significantly increased ($t = 10.809 \sim 58.755$, all $P < 0.05$). Downregulation of miR-125b-5p attenuated the inhibition of NEAT1 silencing on the proliferation and migration of HemECs cells and the promotion of apoptosis ($t = 9.218 \sim 15.010$, all $P < 0.05$). there was a targeted regulatory relationship between NEAT1 and miR-125b-5p, and between miR-125b-5p and IGFBP5. **Conclusion** Silencing NEAT1 inhibits the expression of IGFBP5 by up-regulating miR-125b-5p, thereby inhibiting proliferation and migration of HemECs cells, and promoting cell apoptosis.

Keywords: long non-coding RNA nuclear enriched abundant transcript 1; miR-125b-5p; insulin-like growth factor binding protein 5; hemangi endothelial cells; apoptosis

血管瘤是婴儿时期常见的一种良性血管肿瘤^[1]。婴儿血管瘤始于内皮细胞的增生,随后经历一段时间的增殖期后过渡到退化期^[2]。在增殖性生长阶段,血管瘤会出现多种临床症状,包括溃疡、出血、身体功能受损和皮肤表面破裂,退化期阶段大多数血管瘤停止生长并开始缩小,目前的治疗方法主要包括药物治疗、激光治疗和手术切除^[3]。然而,在临床上严重的血管瘤难以治愈。因此,需要进一步了解血管瘤进展的机制。越来越多的证据表明,长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)在癌症进展中具有多种调节功能,包括增殖、凋亡和迁移^[4]。核富集转录本1(nuclear enriched abundant transcript 1, NEAT1)是一种致癌LncRNA,已有研究报道,沉默NEAT1可抑制人血管瘤内皮细胞HemECs增殖、迁移与侵袭^[5]。但沉默NEAT1抑制血管瘤进展的分子机制尚不完全明确。LncRNA作为海绵可通过竞争性结合miRNA进而调节mRNA表达,该作用是其发挥调控作用的常见方式之一^[6]。本研究通过生物信息学分析发现NEAT1与微小RNA(micro RNAs, miR)-125b-5p, miR-125b-5p与胰岛素样生长因子结合蛋白5(insulin-like growth factor binding

protein 5, IGFBP5)存在靶向关系。相关研究显示,miR-125b-5p在血管瘤组织和细胞中低表达,过表达miR-125b-5p可抑制HemECs细胞增殖、促进细胞凋亡^[7];下调IGFBP5可抑制血管瘤的进展^[8]。而NEAT1能否通过调节miR-125b-5p/IGFBP5轴影响血管瘤进展尚不清楚。因此,本研究主要探究NEAT1对血管瘤内皮细胞增殖、凋亡、迁移的影响以及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2016年3月~2019年3月在邵阳学院附属第一医院接受手术切除血管瘤的婴儿血管瘤组织和瘤旁组织,共18对。标本立即冷冻于 -80°C 中。所有参与者的法定监护人均已签署知情同意书。人脐静脉内皮细胞HUVEs(上海拜力生物公司);人血管瘤内皮细胞HemECs, HDEC(上海泽叶生物公司)。将HUVEs, HemECs, HDEC细胞在补充有10g/dl胎牛血清的DMEM培养液中培养。

1.2 试剂与仪器 siRNA NEAT1 (si-NEAT1)及其阴性对照 (si-NC), miR-125b-5p抑制物 (miR-125b-5p inhibitor)及其阴性对照 (inhibitor-NC) (上海美轩生物公司); CCK-8试剂盒(深圳市纽邦生

物公司, 货号: CK04); Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒(温州科森生物公司, 货号: KMR0212222); 兔源一抗 IGFBP5, 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) (货号: ab29), B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) (货号: ab32124), 基质金属蛋白酶 -9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9) (货号: ab76003), GAPDH (货号: ab9485) 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (货号: ab109489) (美国 Abcam 公司)。FK-SY96A 多功能酶标仪 (山东方科仪器有限公司); 奥林巴斯 BX53 光学显微镜 [奥林巴斯 (中国) 有限公司]; Agilent NovoCyte Quanteon 流式细胞仪 [安捷伦科技 (中国) 有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组: 取对数生长期的 HemECs 细

表 1 qRT-PCR 引物序列		
基因名称	正向引物	反向引物
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
miR-125b-5p	5'-CTCAGTCCTGAGACCCTAAC-3'	5'-CAAGAGCCTAACCCGTGGAT-3'
GAPDH	5'-GTGGACCTGACCTGCCGTCT-3'	5'-GGAGGAGTGGGTCTCGCTGT-3'
NEAT1	5'-GUCUGUGUGGAAGGAGGAATT-3'	5'-UUCCUCCUCCACACAGACTT-3'

1.3.3 细胞活力检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 及台盼蓝染色检测细胞增殖: 在 96 孔板的每个孔中接种大约 1×10^4 个 HemEC 细胞。接种 48 h 后, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h。通过使用酶标仪测量 450 nm 处吸光度来确定细胞增殖能力。将接种于 96 孔板中的细胞培养 2h 后, 弃上清、PBS 洗涤、0.4g/dl 台盼蓝溶液染色 2 min, 染色呈蓝色的细胞为死细胞, 显微镜观察细胞生长情况。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡: 收集各组细胞并将细胞浓度调整为 1×10^6 个 /ml。取 200 μ l 细胞悬液重悬于 300 μ l 结合缓冲液中, 与 5 μ l Annexin V-FITC/PI 轻轻混匀, 避光 15 min, 流式细胞仪观察细胞凋亡情况。

1.3.5 划痕试验检测细胞迁移: 将 HemECs 细胞以 1×10^6 个 /孔接种到 6 孔板中, 达到 100% 融合后, 使用移液器吸头对 HemECs 细胞单层进行划痕。用显微镜观察划痕后 0, 24 h 的划痕面积, 分别记录划痕面积为 M0, M24, 划痕愈合率 (%) = $(1 - M24 / M0) \times 100\%$ 。

1.3.6 蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测 IGFBP5, PCNA, Bcl-2, MMP-9 蛋白表达: 使用 RIPA 裂解缓冲液提取组织和细胞的总蛋白。在 12g/dl SDS-PAGE 上分离约 30 μ g 蛋白质样品并转移到 PVDF

膜, 分为 Ct 组、si-NC 组、si-NEAT1 组、si-NEAT1+inhibitor-NC 组和 si-NEAT1+miR-125b-5p inhibitor 组。si-NC 组、si-NEAT1 组、si-NEAT1+inhibitor-NC 组和 si-NEAT1+miR-125b-5p inhibitor 组分别转染 si-NC, si-NEAT1, si-NEAT1 和 inhibitor-NC, si-NEAT1 和 miR-125b-5p inhibitor 于 HemECs 细胞中, Ct 组为未转染的 HemECs 细胞, 转染 48 h 后进行后续实验。

1.3.2 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测组织和细胞中 NEAT1, miR-125b-5p 表达: 使用 Trizol 试剂提取组织和细胞的总 RNA。将 1 μ g RNA 逆转录为 cDNA 后, 使用 Power SYBRTM Green PCR master mix 在 ABI 7500 PCR 系统上分析基因表达。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量。引物序列见表 1。

膜上。用 5g/dl 脱脂牛奶封闭后, 将膜与抗 IGFBP5 (1 : 1 000), PCNA (1 : 1 000), Bcl-2 (1 : 2 000), MMP-9 (1 : 2 000), GAPDH (1 : 2 000) 的一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再将膜暴露于 HRP 偶联的二抗 (1 : 2 000) 2 h。使用 ECL 试剂检测蛋白信号, Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验: 构建 NEAT1 野生型质粒 (NEAT1-WT) 和突变型质粒 (NEAT1-MUT), 将 NEAT1-WT 和 NEAT1-MUT 分别与 mimic NC 或 miR-125b-5p mimic 共转染于 HemECs 细胞, 48 h 后, 观察荧光素酶活性变化。构建 IGFBP5 野生型质粒 (IGFBP5-WT) 和突变型质粒 (IGFBP5-MUT), 将 IGFBP5-WT 和 IGFBP5-MUT 分别与 mimic NC 或 miR-125b-5p mimic 共转染于 HemECs 细胞, 48 h 后, 监测荧光素酶活性变化。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 19.0 进行统计分析, 符合正态分布的数据表示为均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 独立样本 *t* 检验用于测试两组之间的差异, 单因素方差分析用于评估多组之间的差异, 进一步两组间的比较采用 SNK-*q* 检验。瘤旁组织及血管瘤组织中的差异比较采用配对 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NEAT1, miR-125b-5p, IGFBP5 蛋白在血管瘤

组织和细胞中的表达 见表2。与瘤旁组织比较, 血管瘤组织中 NEAT1, IGFBP5 蛋白表达水平升高, miR-125b-5p 表达水平降低, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与 HUVES 细胞比较, HemECs, HDEC 细胞中 NEAT1, IGFBP5 蛋白表达升高, miR-125b-5p 表达降低, 差异具有统计学意义 ($t=17.963, 17.320, 99.204; 14.697, 20.914,$

33.680, 均 $P<0.05$) ; 与 HemECs 细胞比较, HDEC 细胞中 NEAT1, IGFBP5 蛋白表达降低, miR-125b-5p 表达升高, 差异具有统计学意义 ($t=8.795, 8.036, 14.241$, 均 $P<0.05$) ; 且 HemECs 细胞中 NEAT1, IGFBP5 蛋白表达量最高, miR-125b-5p 表达量最低, 因此, 选取 HemECs 细胞为研究对象。

表2 NEAT1, miR-125b-5p, IGFBP5 蛋白在组织、细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s, n=18$)

项目	组织		<i>t</i>	<i>P</i>	细胞			<i>F</i>	<i>P</i>
	瘤旁组织	血管瘤组织			HUVES 细胞	HemECs 细胞	HDEC 细胞		
NEAT1	1.00 ± 0.00	2.87 ± 0.22	36.062	<0.001	1.00 ± 0.00	2.76 ± 0.24	1.78 ± 0.13	187.909	<0.001
miR-125b-5p	1.00 ± 0.00	0.24 ± 0.02	161.220	<0.001	1.00 ± 0.00	0.19 ± 0.02	0.45 ± 0.04	1539.300	<0.001
IGFBP5/GAPDH	0.27 ± 0.02	1.45 ± 0.14	35.400	<0.001	0.24 ± 0.02	1.31 ± 0.15	0.78 ± 0.06	194.423	<0.001

2.2 各转染组 HemECs 细胞中 IGFBP5 蛋白、NEAT1, miR-125b-5p 表达比较 见表3。与 si-NC 组比较, si-NEAT1 组 NEAT1, IGFBP5 蛋白表达降低, miR-125b-5p 表达升高, 差异具有统计学意义 ($t=13.893, 10.809, 11.549$, 均 $P<0.05$) ; 与 si-NEAT1+

inhibitor-NC 组比较, si-NEAT1+miR-125b-5p inhibitor 组 NEAT1 表达量变化差异无统计学意义 ($t=0.577, P>0.05$) , miR-125b-5p 表达降低, IGFBP5 蛋白表达量升高, 差异具有统计学意义 ($t=9.218, 13.188$, 均 $P<0.05$) 。

表3 NEAT1, miR-125b-5p, IGFBP5 蛋白在 HemECs 细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

项目	Ct 组	si-NC 组	si-NEAT1 组	si-NEAT1+inhibitor-NC 组	si-NEAT1+miR-125b-5p inhibitor 组	<i>F</i>	<i>P</i>
NEAT1	1.00 ± 0.00	1.01 ± 0.12	0.32 ± 0.02 [*]	0.34 ± 0.03	0.33 ± 0.03	247.139	<0.001
miR-125b-5p	1.00 ± 0.00	1.02 ± 0.10	1.87 ± 0.15 [*]	1.86 ± 0.14	1.19 ± 0.11 [Ⓢ]	91.154	<0.001
IGFBP5/GAPDH	1.29 ± 0.18	1.31 ± 0.20	0.41 ± 0.04 [*]	0.43 ± 0.03	0.89 ± 0.08 [Ⓢ]	71.542	<0.001

注: 与 Ct 组比较 ^{*} $t=83.283, 14.207, 11.690$, 均 $P<0.05$; 与 si-NC 组比较 ^{*} $t=13.893, 11.549, 10.809$, 均 $P<0.05$; 与 si-NEAT1 组比较 ^{*} $t=8.955, 13.145$, 均 $P<0.05$; 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组比较 [Ⓢ] $t=9.218, 13.188$, 均 $P<0.05$ 。

2.3 沉默 NEAT1 对 HemECs 细胞增殖、凋亡的影响 见表4。与 si-NC 组比较, si-NEAT1 组 *A* 值、细胞生长率降低, 细胞凋亡率升高, 差异均有统计学意义 ($t=14.231, 58.755, 23.201$, 均 $P<0.05$) ;

与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组比较, si-NEAT1+miR-125b-5p inhibitor 组 *A* 值、细胞生长率升高, 细胞凋亡率降低, 差异均有统计学意义 ($t=13.830, 13.644, 9.818$, 均 $P<0.05$) ,

表4 沉默 NEAT1 对 HemECs 细胞 *A* 值、细胞生长率及凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

类别	Ct 组	si-NC 组	si-NEAT1 组	si-NEAT1+inhibitor-NC 组	si-NEAT1+miR-125b-5p inhibitor 组	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>A</i> 值	1.12 ± 0.13	1.13 ± 0.11	0.45 ± 0.04 [*]	0.44 ± 0.03	0.87 ± 0.07 [Ⓢ]	96.486	<0.001
细胞生长率 (%)	99.37 ± 0.28	99.41 ± 0.22	32.28 ± 2.79 [*]	33.45 ± 2.94	69.77 ± 5.82 [Ⓢ]	659.897	<0.001
细胞凋亡率 (%)	12.25 ± 1.03	12.36 ± 1.07	45.58 ± 3.34 [*]	46.03 ± 3.25	30.14 ± 2.27 [Ⓢ]	289.741	<0.001

注: 与 Ct 组比较 ^{*} $t=12.066, 58.607, 23.358$, 均 $P<0.05$; 与 si-NC 组比较 ^{*} $t=14.231, 58.755, 23.201$, 均 $P<0.05$; 与 si-NEAT1 组比较 ^{*} $t=12.761, 14.278, 9.365$, 均 $P<0.05$; 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组比较 [Ⓢ] $t=13.830, 13.644, 9.818$, 均 $P<0.05$ 。

2.4 沉默 NEAT1 对 HemECs 细胞迁移的影响 与 si-NC 组比较, si-NEAT1 组 (20.33 ± 1.23 vs 49.24 ± 2.43) 细胞划痕愈合率降低 ($t=26.001, P<0.05$) ; 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组比较, si-NEAT1+miR-125b-5p inhibitor 组 (35.58 ± 2.36 vs 21.04 ± 1.21) 细胞划痕愈合率升高 ($t=13.429, P<0.05$) , 差异均有统计学意义。

达降低 ($t=15.309, 13.516, 21.137$, 均 $P<0.05$) , 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组比较, si-NEAT1+miR-125b-5pinhibitor 组 PCNA, Bcl-2, MMP-9 蛋白表达升高 ($t=13.188, 11.182, 15.010$, 均 $P<0.05$) , 差异具有统计学意义。

2.5 沉默 NEAT1 对各组 HemECs 细胞中增殖、凋亡、迁移相关蛋白表达的影响 见表5。与 si-NC 组比较, si-NEAT1 组 PCNA, Bcl-2, MMP-9 蛋白表

2.6 NEAT1 与 miR-125b-5p, miR-125b-5p 与 IGFBP5 存在靶向调控关系 Starbase 网站预测 NEAT1 与 miR-125b-5p, miR-125b-5p 与 IGFBP5 的结合位点, 见图1。与 mimic NC 和 NEAT1-WT 共转染组比较, miR-125b-5p mimic 和 NEAT1-WT 共转染组

的荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$) ; 与 mimic NC 和 NEAT1-MUT 共转染组比较, miR-125b-5p mimic 和 NEAT1-MUT 共转染组荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。与 mimic NC 和 IGFBP5-WT 共转染组比较, miR-125b-5p mimic 和 IGFBP5-WT 共

转染组的荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$) ; 与 mimic NC 和 IGFBP5-MUT 共转染组比较, miR-125b-5p mimic 和 IGFBP5-MUT 共转染组荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$) , 见表 6 。

表 5 沉默 NEAT1 对 HemECs 细胞中 PCNA, Bcl-2, MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

类别	Ct 组	si-NC 组	si-NEAT1 组	si-NEAT1+inhibitor-NC 组	si-NEAT1+miR-125b-5p inhibitor 组	F	P
PCNA/GAPDH	1.25 \pm 0.13	1.27 \pm 0.14	0.36 \pm 0.04 ^{*#}	0.35 \pm 0.03	0.81 \pm 0.08 ^{*@}	135.344	<0.001
Bcl-2/GAPDH	1.38 \pm 0.14	1.39 \pm 0.16	0.48 \pm 0.04 ^{*#}	0.50 \pm 0.05	0.97 \pm 0.09 ^{*@}	104.807	<0.001
MMP-9/GAPDH	1.07 \pm 0.11	1.09 \pm 0.10	0.21 \pm 0.02 ^{*#}	0.22 \pm 0.02	0.55 \pm 0.05 ^{*@}	223.252	<0.001

注: 与 Ct 组比较 ^{*} $t=16.028, 15.141, 18.842$, 均 $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较 [#] $t=15.309, 13.516, 21.137$, 均 $P < 0.05$; 与 si-NEAT1 组比较 [@] $t=12.324, 12.187, 15.465$, 均 $P < 0.05$; 与 si-NEAT1+inhibitor-NC 组比较 [@] $t=13.188, 11.182, 15.010$, 均 $P < 0.05$ 。

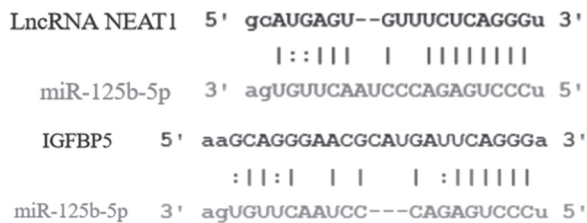


图 1 Starbase 网站预测 NEAT1 与 miR-125b-5p, miR-125b-5p 与 IGFBP5 的结合位点

表 6 荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

类别	mimic NC 组	miR-125b-5p mimic 组	t	P
NEAT1 WT	1.08 \pm 0.14	0.28 \pm 0.02	13.856	<0.001
MUT	1.06 \pm 0.15	1.08 \pm 0.13	0.247	<0.001
IGFBP5 WT	1.02 \pm 0.11	0.19 \pm 0.01	18.407	<0.001
MUT	1.04 \pm 0.12	1.03 \pm 0.11	0.150	<0.001

3 讨论

作为婴儿期最常见的血管性肿瘤, 血管瘤病变的位置和大小可能对婴儿视力甚至生命构成威胁^[9]。目前, 如何制定有效的血管瘤治疗策略在近年来受到极大关注, 这可能取决于对婴儿血管瘤发病机制的充分了解^[10]。因此探究婴儿血管瘤进展的分子机制具有重要意义。

LncRNA 属于长度超过 200 nt 的非编码 RNA 家族。虽然缺乏蛋白质编码潜力, 但 LncRNA 作为基因表达网络中的重要调节因子, 其在细胞增殖、发育和分化中发挥重要作用^[11]。越来越多的研究表明 LncRNA 在调控肿瘤进展中发挥重要的作用。NEAT1 作为一种 LncRNA, 参与癌症的不同生物学过程。如敲除 NEAT1 后, 胃癌细胞增殖和转移受到抑制, 而细胞凋亡速度加快^[12]; NEAT1 在胶质瘤组织和细胞中高表达, 敲低 NEAT1 可抑制胶质瘤进展^[13]; NEAT1 的下调显著抑制了 HemECs 细胞活力和细胞迁移, 但增加了凋亡细胞数量^[14]; 沉默 NEAT1 表达能够抑制胰腺癌细胞增殖, 并诱

导细胞凋亡^[15]; 转染 si-NEAT1 可抑制口腔鳞癌细胞增殖, 促进细胞凋亡^[16]。表明 NEAT1 在胃癌、胶质瘤、血管瘤、胰腺癌、肝癌等肿瘤中具有促癌的作用。本研究结果与其是一致的, 本研究显示, NEAT1 在血管瘤组织和细胞中均高表达, 且 NEAT1 在血管瘤细胞 HemECs 中的表达量最高, 因此, 选择 HemECs 细胞为研究对象。此外, 本研究还发现沉默 NEAT1 可抑制 HemECs 细胞增殖、迁移, 促进细胞凋亡, 表明沉默 NEAT1 抑制血管瘤的进展。提示 NEAT1 可能成为治疗血管瘤的潜在有效靶点。

LncRNA 可通过海绵化 miRNA 来发挥作用。为了进一步探究沉默 NEAT1 抑制血管瘤的进展的分子机制, 本研究通过 starBase 数据库预测 NEAT1 可能充当 miR-125b-5p 的海绵。miR-125b-5p 作为众多 miRNAs 中的一种, 已有研究报道, 过表达 miR-125b-5p 可抑制非小细胞肺癌细胞增殖和血管生成^[17]; 上调 miR-125b-5p 抑制了肝癌细胞的生长和转移^[18]; 上调 miR-125b 的表达可抑制婴儿血管瘤细胞的生长并促进细胞凋亡^[19]; 过表达 miR-125b-5p 可减弱胃癌细胞恶性表型^[20]; 下调 miR-125b-5p 可促进宫颈癌的进展^[21]。以上研究表明 miR-125b-5p 在多种肿瘤中发挥肿瘤抑制因子的作用。此外, 已有研究表明, 抑制 NEAT1 通过上调 miR-125b-5p 来抑制高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成^[22]。本研究结果与其是一致的, 本研究显示, NEAT1 与 miR-125b-5p 存在靶向关系, 沉默 NEAT1 可上调 HemECs 细胞中 miR-125b-5p 表达, 推测沉默 NEAT1 可能通过上调 miR-125b-5p 表达抑制 HemECs 细胞增殖、迁移, 促进细胞凋亡。为了验证该推测, 本研究在沉默 NEAT1 的基础上再进行 miR-125b-5p inhibitor 干预 HemECs 细胞, 结果显示, miR-125b-5p inhibitor 减弱了沉默 NEAT1 对 HemECs 细胞增殖、迁移的抑制作用, 以及细胞凋亡的促进作用。证实了沉默

NEAT1 可能通过上调 miR-125b-5p 抑制 HemECs 细胞增殖、迁移, 促进细胞凋亡。

miRNA 可通过与其靶基因的 3'-UTR 结合来调控癌症的进展^[23]。为了进一步探究 NEAT1/miR-125b-5p 轴抑制血管瘤进展的分子作用机制, 本研究通过双荧光素酶报告基因证实 miR-125b-5p 可靶向调控 IGFBP5 表达。IGFBP5 是生长促进肽胰岛素超家族的成员, 已被证实是最丰富的多肽生长因子。其在肿瘤中的作用已被广泛研究, 如 IGFBP5 在结直肠癌组织中高表达, 其高表达与血管生成和血管内皮生长因子等多种促癌机制有关^[24]; 抑制 IGFBP5 可抑制膀胱癌转移^[25]; IGFBP5 在 HemECs 细胞中高表达, 沉默 IGFBP5 可抑制 HemECs 细胞增殖、迁移和侵袭^[8]。本研究与其是一致的, 本研究显示 IGFBP5 在血管瘤组织和 HemECs 细胞中高表达, 沉默 NEAT1 后, miR-125b-5p 表达上调, IGFBP5 蛋白表达下调, 在沉默 NEAT1 的基础上再加 miR-125b-5p inhibitor 干预 HemECs 细胞, 结果显示, HemECs 细胞中 miR-125b-5p 表达降低, IGFBP5 蛋白表达升高, 提示沉默 NEAT1 可能通过海绵化 miR-125b-5p 进而下调 IGFBP5 来抑制 HemECs 细胞增殖、迁移, 促进细胞凋亡。NEAT1/miR-125b-5p/IGFBP5 是一条介导 HemECs 细胞增殖、迁移、凋亡发生的全新调控通路, 本研究首次阐明了通路中各分子之间的调控机制。这对于进一步完善血管瘤发生的分子机制具有重要意义。

综上所述, 沉默 NEAT1 可能通过海绵化 miR-125b-5p 进而下调 IGFBP5 表达来抑制 HemECs 细胞增殖、迁移, 促进细胞凋亡。NEAT1 可能成为治疗血管瘤的潜在靶点。未进行体内动物实验进行验证是本研究的不足之一, 后期将会进一步深入探究。

参考文献:

- [1] 符垂师, 云川, 冯业成, 等. 姜黄素对婴儿血管瘤内皮细胞增殖、凋亡的影响及机制 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(17): 2086-2090.
FU Chuishi, YUN Chuan, FENG Yecheng, et al. Effect of curcumin on proliferation and apoptosis of infant hemangioma endothelial cells and its mechanisms [J]. Chinese Journal of Immunology, 2020, 36(17): 2086-2090.
- [2] LI Xianwei, CHEN Bo, CHI Decai, 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: 423-432.
- [3] VALDEBRAN M, WINE LEE L. Hemangioma-related syndromes [J]. Current Opinion in Pediatrics, 2020, 32(4): 498-505.
- [4] 胡艳正, 牛彦杰, 石鹏飞. 长链非编码 RNA LINC00222 对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及作用机制的研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(5): 16-22.
- [5] HU Yanzheng, NIU Yanjie, SHI Pengfei. Effect of long non coding RNA LINC00222 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of lung adenocarcinoma cells and its mechanism [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(5): 16-22.
- [6] YU Li, SHU Hong, XING Lu, et al. Silencing long non-coding RNA NEAT1 suppresses the tumorigenesis of infantile hemangioma by competitively binding miR-33a-5p to stimulate HIF1 α /NF- κ B pathway [J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(4): 3358-3366.
- [7] ZHAO Wenyan, GENG Donghua, LI Shuqiang, et al. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer [J]. Cancer Medicine, 2018, 7(3): 842-855.
- [8] 王恬, 张福林, 赵越, 等. miR-125b-5p 对人血管瘤内皮细胞 HemES 增殖和凋亡的影响及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(3): 247-253.
WANG Tian, ZHANG Fulin, ZHAO Yue, et al. Effects of miR-125b-5p on the proliferation and apoptosis of human hemangioma endothelial cells HemES and its mechanism [J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2021, 37(3): 247-253.
- [9] ZHOU Lili, JIA Xiao, YANG Xiangzheng. LncRNA-TUG1 promotes the progression of infantile hemangioma by regulating miR-137/IGFBP5 axis [J]. Human Genomics, 2021, 15(1): 50.
- [10] SATTERFIELD K R, CHAMBERS C B. Current treatment and management of infantile hemangiomas [J]. Survey of Ophthalmology, 2019, 64(5): 608-618.
- [11] XU Mengnan, ZHANG Min, XU Yuan, et al. Individualized treatment for infantile hemangioma [J]. Journal of Craniofacial Surgery, 2018, 29(7): 1876-1879.
- [12] SUN Qiang, GONG Xueyi, WU Jianlong, et al. Effect of LncRNA PVT1/miR186/KLF5 axis on the occurrence and progression of cholangiocarcinoma [J]. Biomed Research International, 2021, 2021: 8893652.
- [13] WU Dianchao, LI Hui, WANG Junfeng, et al. LncRNA NEAT1 promotes gastric cancer progression via miR-1294/AKT1 axis [J]. Open Med (Wars), 2020, 15(1): 1028-1038.
- [14] LI Yabin, WANG Xirui, ZHAO Zhihuang, et al. LncRNA NEAT1 promotes glioma cancer progression via regulation of miR-98-5p/BZW1 [J]. Bioscience Reports, 2021, 41(7): BSR20200767.
- [15] YU Xueyuan, LIU Xiangyu, WANG Rui, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promotes the progression of hemangioma via the miR-361-5p/VEGFA pathway [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 512(4): 825-831.
- [16] 于文昊, 王海久. LncRNA NEAT1 靶向 miR-497-5p 对胰腺癌细胞增殖、凋亡及上皮-间质转化的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(18): 2246-2251.
YU Wenhao, WANG Haijiu. Effects of LncRNA NEAT1 targeting miR-497-5p on proliferation, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells [J]. Chinese Journal of Immunology, 2022, 38(18): 2246-2251.
- [17] 荣誉, 胡志东, 赵娜. LncRNA NEAT1 对口腔鳞癌细胞细胞周期停滞、凋亡及 Hippo/YAP 信号通路的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(18): 2246-2251.

- 影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2022, 38(4): 466-470.
- RONG Yu, HU Zhidong, ZHAO Na. The effects of LncRNA NEAT1 on cell cycle arrest, apoptosis and Hippo/YAP signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cells[J]. Journal of Practical Stomatology, 2022, 38(4): 466-470.
- [17] MA Changju, TANG Xiaojuan, TANG Qing, et al. Curcumin repressed cell proliferation and angiogenesis via SP1/miR-125b-5p/VEGFA axis in non-small cell lung cancer[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1044115.
- [18] CHENG Zhiqing, GONG Limei, CAI Qinghe. LncRNA00978 contributes to growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via mediating microRNA-125b-5p/SOX12 pathway[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 11228-11239.
- [19] HUANG Jiajia, JIANG Dongdong, ZHAO Shasha, et al. Propranolol suppresses infantile hemangioma cell proliferation and promotes apoptosis by upregulating miR-125b expression[J]. Anti-Cancer Drugs, 2019, 30(5): 501-507.
- [20] LIU Yiping, QIU Zhongzhi, LI Xuhui, et al. Propofol induces ferroptosis and inhibits malignant phenotypes of gastric cancer cells by regulating miR-125b-5p/STAT3 axis[J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2021, 13(12): 2114-2128.
- [21] HU Tingting, ZHANG Qian, GAO Lingxue. LncRNA CAR10 upregulates PDPK1 to promote cervical cancer development by sponging miR-125b-5p[J]. Biomed research international, 2020, 2020: 4351671.
- [22] CHEN Qianbo, XI Xiaoting, MA Jia, et al. The mechanism by which crocetin regulates the lncRNA NEAT1/miR-125b-5p/SOX7 molecular axis to inhibit high glucose-induced diabetic retinopathy[J]. Experimental Eye Research, 2022, 222: 109157.
- [23] SUN Bin, HUANG Zhi, YANG Hua, et al. MicroRNA-195-5p inhibits the progression of hemangioma via targeting SKI[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2022, 23(2): 165.
- [24] 张聪, 曹立宇. 基于肿瘤数据库分析 IGFBP5 基因在结直肠癌中的表达及意义 [J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(3): 375-380.
- ZHANG Cong, CAO Liyu. Expression of IGFBP5 gene in colorectal cancer: a study based on tumor database[J]. The Practical Journal of Cancer, 2021, 36(3): 375-380.
- [25] 饶大彪, 虞海峰, 王帅彬, 等. miRNA-149 靶向 IGFBP5 抑制膀胱癌细胞侵袭的分子机制研究 [J]. 中国现代医生, 2018, 56(35): 1-4, 14, 169.
- RAO Dapang, YU Haifeng, WANG Shuaibin, et al. Molecular mechanism of miRNA-149 targeting IGFBP5 to inhibit invasion of bladder cancer cells[J]. China Modern Doctor, 2018, 56(35): 1-4, 14, 169.

收稿日期: 2022-10-14 修回日期: 2023-02-09

(上接第52页)

- [13] 王晓蕊, 朱松鑫, 温晓鸣, 等. 多巴胺代谢异常在帕金森病相关病理变化中的作用 [J]. 生理学报, 2021, 73(1): 89-102.
- WANG Xiaorui, ZHU Songxin, WEN Xiaoming, et al. The role of abnormal dopamine metabolism in Parkinson's disease-related pathological changes[J]. Acta Physiologica Sinica, 2021, 73(1): 89-102.
- [14] 吕海燕, 侯广玉, 朱梅. MPTP 致帕金森病动物模型的研究进展 [J]. 实验动物科学, 2022, 39(4): 64-68.
- LÜ Haiyan, HOU Guangyu, ZHU Mei. Research progress of MPTP to Parkinson's disease animal models[J]. Laboratory Animal Science, 2022, 39(4): 64-68.
- [15] SHISHIDO T, NAGANO Y, ARAKI M, et al. Synphilin-1 has neuroprotective effects on MPP⁺-induced Parkinson's disease model cells by inhibiting ROS production and apoptosis[J]. Neuroscience Letters, 2019, 690: 145-150.
- [16] GANJAM G K, BOLTE K, MATSCHKE L A, et al. Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(11): 865.
- [17] 龙借帆, 李翠, 高元标, 等. 联合检测血清 SIRT1 和 CTRP5 水平对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者预后的预测价值研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(3): 162-166, 176.
- LONG Jiefan, LI Cui, GAO Yuanbiao, et al. Prognostic value of combined detection of serum SIRT1 and CTRP5 levels in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(3): 162-166, 176.
- [18] SUN Jiangtao, LI Guifang, LIU Yiwen, et al. Targeting histone deacetylase SIRT1 selectively eradicates EGFR TKI-resistant cancer stem cells via regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in lung adenocarcinoma[J]. Neoplasia, 2020, 22(1): 33-46.
- [19] CAMPOREZ D, BELCAVELLO L, ALMEIDA J F F, et al. Positive association of a Sirt1 variant and parameters of oxidative stress on Alzheimer's disease[J]. Neurological Sciences, 2021, 42(5): 1843-1851.
- [20] LI Xuan, FENG Ya, WANG Xixi, et al. The critical role of SIRT1 in Parkinson's disease: mechanism and therapeutic considerations[J]. Aging and disease, 2020, 11(6): 1608-1622.
- [21] CADENAS S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection[J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2018, 1859(9): 940-950.
- [22] SIES H, BELOUSOV V V, CHANDEL N S, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23(7): 499-515.
- [23] TAUFFENBERGER A, MAGISTRETTI P J. Reactive oxygen species: beyond their reactive behavior[J]. Neurochemical Research, 2021, 46(1): 77-87.

收稿日期: 2022-10-13 修回日期: 2023-01-18