

· 基础研究 ·

## lncRNA HAND2-AS1 对子痫前期患者血管内皮细胞的影响

吴莉莉<sup>1</sup>, 薛路<sup>1</sup>, 章浩<sup>2</sup>, 乌兰<sup>1</sup>, 丁虹娟<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学附属妇产医院产科, 江苏 南京 210004; <sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院心内科, 江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:探究lncRNA HAND反义RNA1(HAND2-AS1)、miRNA hsa-miR-520c-3p和整合素亚基 $\beta$ 8(integrin subunit beta 8, ITGB8)在子痫前期患者胎盘中表达量的改变以及HAND2-AS1对血管内皮功能的影响和机制。方法:收集25例子痫前期患者胎盘样本和20例匹配的健康产妇胎盘样本,通过荧光定量PCR技术检测HAND2-AS1、hsa-miR-520c-3p和ITGB8的表达量。通过细胞活力、划痕、血管形成和荧光定量PCR实验,观察过表达和敲低HAND2-AS1对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)增殖、迁移和血管形成的影响以及对hsa-miR-520c-3p和ITGB8表达量的影响。结果:与对照组胎盘相比,子痫前期患者胎盘中HAND2-AS1和ITGB8的表达量显著升高,而hsa-miR-520c-3p表达量降低。同时,子痫前期患者的胎盘中, HAND2-AS1的表达量与hsa-miR-520c-3p呈负相关,与ITGB8呈正相关。在HUVEC中过表达HAND2-AS1, HUVEC的增殖、迁移和血管形成能力减弱,同时hsa-miR-520c-3p表达量下降, ITGB8表达增高;敲低HAND2-AS1, 结果相反。结论:HAND2-AS1抑制血管内皮增殖、迁移和血管形成能力,其潜在机制可能是通过调控hsa-miR-520c-3p/ITGB8的表达,有望成为子痫前期的治疗靶点。

**[关键词]** 子痫前期;长链非编码RNA;人脐静脉内皮细胞

**[中图分类号]** R714.245

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)12-1761-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20201204

## Effects of lncRNA HAND2-AS1 on vascular endothelial cells in preeclampsia patients

WU Lili<sup>1</sup>, XUE Lu<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>2</sup>, WU Lan<sup>1</sup>, DING Hongjuan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210004; <sup>2</sup>Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to investigate the expression patterns of lncRNA HAND2-AS1, miRNA hsa-miR-520c-3p and integrin subunit beta 8 (ITGB8) in placentas of preeclampsia (PE) patients and the role of HAND2-AS1 played in modulating vascular endothelial cells. **Methods:** Total 25 placentas of PE patients and 20 placentas of healthy controls were collected to detect the expressing abundance of HAND2-AS1, hsa-miR-520c-3p and ITGB8 using qRT-PCR technology. Proliferation, migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) was detected through cell viability assay, wound healing assay and tube formation assay, respectively, when HAND2-AS1 was overexpressed or knock-down. Also, expression of hsa-miR-520c-3p and ITGB8 was detected using QPCR. **Results:** Compared with healthy controls, expression of HAND2-AS1 and ITGB8 increased and expression of hsa-miR-520c-3p decreased significantly in placentas of PE patients. In placentas of PE patients, the expression of HAND2-AS1 was negatively correlated with hsa-miR-520c-3p and positively correlated with ITGB8. The proliferation, migration and angiogenesis of HUVEC were impaired, the expression of hsa-miR-520c-3p decreased and the expression of ITGB8 increased when HAND2-AS1 was overexpressed. The result was the opposite when HAND2-AS1 was knocked-down. **Conclusion:** HAND2-AS1 inhibits proliferation, migration and angiogenesis of vascular endothelial cells, of which potential mechanism may be modulating expression of hsa-miR-520c-3p/ITGB8.

**[Key words]** preeclampsia; long non-coding RNA; human umbilical vein endothelial cell

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(12): 1761-1767, 1773]

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81771604);南京市卫生科技发展专项资金项目(YKK18156)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: njdinghj@163.com

子痫前期(preeclampsia, PE)以高血压和蛋白尿为临床表现,是一种妊娠期特有的疾病<sup>[1-2]</sup>。PE可以并发宫内生长受限和早产,并有进展为子痫和系统性炎症的可能<sup>[3]</sup>,严重威胁了产妇和胎儿的生命健康。血管内皮损伤和功能障碍被认为是参与PE发生发展的重要因素<sup>[4-5]</sup>,然而其内在机制仍不明确。因而,寻找血管内皮损伤和功能障碍的发生机制将有助于预防和治疗PE。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一种长度约22个核苷酸的单链非编码RNA,miRNA可以通过与其靶mRNA的3'-UTR区域结合,从而促进该mRNA的降解或者抑制其翻译<sup>[6]</sup>。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一种长度大于200个核苷酸、不编译蛋白的RNA,lncRNA可以“分子海绵”的形式募集其靶miRNA,从而解除该miRNA对下游mRNA的调控<sup>[7]</sup>。这种lncRNA-miRNA-mRNA的调控形式被称作竞争内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA),并在多种疾病的发生发展中发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。本研究利用公共数据库中的全转录组芯片数据,构建了PE胎盘组织中差异表达的ceRNA网络,并对其中一组ceRNA“HAND2-AS1/hsa-miR-520c-3p/ITGB8”进行了初步研究,阐明了PE中内皮功能障碍的潜在机制,为干预PE提供了新的靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM培养基、胎牛血清、EDTA-胰酶溶液、PBS缓冲液(Gibco公司,美国);基质胶、TRIzol试剂(Sigma公司,美国);CCK8试剂(同仁化学研究所,日本);Lipofectamine™ 3000试剂盒(Invitrogen公司,美国);si-HAND2-AS1和si-NC干扰序列、oe-HAND2-AS1和oe-NC过表达质粒(上海吉玛生物公司);抗β-actin一抗、抗ITGB8一抗、抗兔二抗(Abcam公司,美国)。

PE患者全转录组芯片数据下载自GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),数据识别号为GSE96985,包含3例PE患者胎盘样本和4例对照胎盘样本。胎盘组织收集于南京医科大学附属妇产医院2018年2月—2019年2月住院产妇(PE组25例,健康对照组20例),PE诊断标准为:血压>140/90 mmHg,尿蛋白≥300 mg/d。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 差异表达基因分析和ceRNA网络构建

使用R软件中的Limma程序包分别分析2张芯片中的差异表达的探针,差异倍数>2、平均表达值>5且P值<0.05为鉴定差异探针的标准,并使用Pheatmap程序包绘制差异探针的热图。随后,将差异表达探针注释为相应的lncRNA、miRNA和mRNA。使用miRWalk2.0数据库(<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>)预测能与差异miRNA结合的mRNA和lncRNA,将结果与差异表达的mRNA和lncRNA取交集,并用Cytoscape软件绘制ceRNA网络图。

#### 1.2.2 RNA提取和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

使用TRIzol和相应试剂盒提取组织或者细胞总RNA。对于lncRNA和mRNA,将总RNA按照说明书使用PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒逆转录为cDNA,将cDNA使用TB Green Advantage qPCR premixes试剂盒和ABI ViiA7系统进行qRT-PCR反应。以GAPDH的表达量为内参,采取 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因表达量。对于miRNA,逆转录使用专用的miRNA 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒和逆转录引物,qRT-PCR反应使用miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒和U6内参。实验独立重复3次,每次技术重复6次,计算均值。qRT-PCR引物(由广州锐博生物科技有限公司设计合成)见表1。

#### 1.2.3 细胞转染

取对数生长期HUVEC,用EDTA-胰酶溶液消化后以 $2.0 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板,待细胞贴壁生长至50%~70%密度用不含血清的DMEM培养基换液并使用Lipofectamine™ 3000试剂进行瞬时转染。转染后6 h用含10%胎牛血清的DMEM培养基换液并继续培养48 h。用qRT-PCR验证敲低和过表达后用作后续实验。

#### 1.2.4 细胞增殖实验

将转染48 h后的细胞消化重悬制成密度为 $4 \times 10^4$ 个/mL的细胞悬液,以100 μL/孔的体积接种在96孔板中,在37℃孵箱培养48 h后,每孔加入CCK8试剂10 μL并于37℃孵箱避光孵育1 h,然后将96孔板放入酶标仪中测得每孔在450 nm波长处吸收光强度,该吸收光强度即可反映每孔中活细胞数目。实验独立重复3次,计算均值。

#### 1.2.5 细胞划痕实验

待转染后细胞生长至100%密度,用1 mL微量

表1 qRT-PCR引物序列  
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

| 基因              | 引物序列(5'→3')   |
|-----------------|---|
| HAND2-AS1       | F:TGTAGTGTGGCTGGTATCGG<br>R:GAGTCACAGGCAGTCGTAGA  |
| ITGB8           | F:ACCAGGAGAAGTGTCTATCCAG<br>R:CCAAGACGAAAAGTCACGGGA   |
| GAPDH           | F:GGATATTGTTGCCATCAATGACC<br>R:AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA  |
| hsa-miR-520c-3p | F:GGGAAAGTGCTTCCTTTTA<br>R:CAGTGCGGTGTCGTGGAGT  |
| U6              | RT:GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACCCTC<br>F:CGCTTCGGCAGCACATATACTA<br>R:CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA |

移液枪头垂直于6孔板在细胞中划痕,弃去培养基并用PBS润洗3遍,后用不含血清的DMEM培养基培养。在倒置显微镜下拍摄划痕处细胞在0 h和24 h时照片,根据划痕宽度计算细胞迁移率。细胞迁移率(%)=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。实验独立重复3次,每次技术重复6次,计算均值。

1.2.6 血管形成实验

在预冷的96孔板中加入30 μL液态的基质胶,放入37℃孵箱中2 h使基质胶凝固。将转染过后的HUVEC细胞以2×10<sup>3</sup>个/孔的密度接种至预先铺有基质胶的96孔板中,放入37℃孵箱培养6 h。在倒置显微镜下观察血管形成的情况并拍照。

1.2.7 Western blot实验

将转染后的细胞用胰酶消化后离心收取蛋白,BCA法测定上清蛋白浓度,取30 μg蛋白与SDS-PAGE蛋白上样缓冲液混合并煮沸5 min,冰上冷却后在10%SDS-PAGE凝胶中电泳。将电泳分离后的蛋白转移至PVDF膜,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h后,在4℃分别孵育抗ITGB8一抗和抗β-actin一抗12 h。然后洗膜,室温孵育抗兔二抗1 h,再次洗膜后用ECL发光法显影。使用Image J对条带进行灰度分析和半定量。实验独立重复3次,计算均值。

1.3 统计学方法

实验结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有数据均应用Graphpad Prism 8统计软件处理,基因表达量相关分析采用Pearson相关,两组间均数比较采用t检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA)和Turkey检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

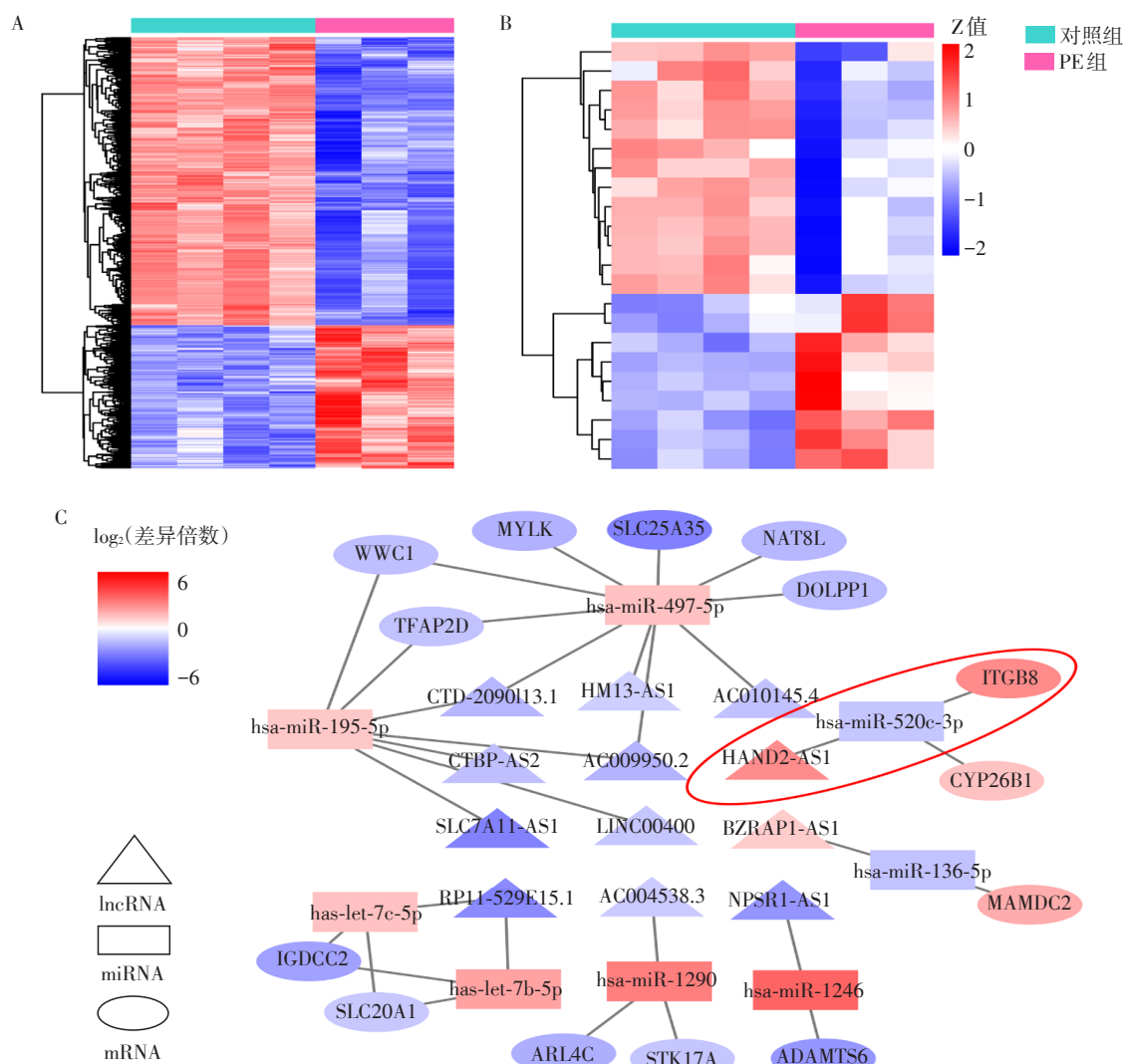
2 结果

2.1 PE相关的差异基因鉴定和ceRNA网络构建

使用R软件Limma程序包对PE患者全转录组芯片数据GSE96985进行分析,在芯片Agilent-078298 human ceRNA array V1.0 4X180K中发现差异表达的探针6 807个(图1A),经过注释后找到差异表达的lncRNA 805个,mRNA 878个;在芯片Agilent-070156 Human miRNA中识别出差异表达的miRNA 22个(图1B)。使用miRWalk 2.0数据库预测可以与差异miRNA结合的mRNA和lncRNA,与差异mRNA和差异lncRNA分别取交集后构建ceRNA网络(图1C)。ceRNA网络表明:lncRNA HAND2-AS1和ITGB8在PE胎盘中表达升高,miRNA hsa-miR-520c-3p表达下降,且三者可能存在相互作用。

2.2 PE患者胎盘中HAND2-AS1、hsa-miR-520c-3p和ITGB8的表达

收集25例PE患者胎盘和20例健康产妇胎盘作为对照,用qRT-PC检测胎盘中HAND2-AS1、hsa-miR-520c-3p和ITGB8的相对表达量。与对照组相比,PE患者胎盘中HAND2-AS1和ITGB8的表达量升高,而hsa-miR-520c-3p表达量下降( $P < 0.01$ ,图2A)。Pearson相关分析表明:在PE患者的胎盘中,HAND2-AS1的表达与hsa-miR-520c-3p呈负相关( $P < 0.01$ ,图2B),与ITGB8呈正相关( $P < 0.05$ ,图2C)。以上结果提示:HAND2-AS1、hsa-miR-520c-3p和ITGB8在PE的发生发展中可能发挥重要功能,且HAND2-AS1、hsa-miR-520c-3p和ITGB8之间可能存在ceRNA调控作用。



A: 芯片 Agilent-078298 human ceRNA array V1.0 4X180K 中差异表达探针的热图; B: 芯片 Agilent-070156 Human miRNA 中差异表达探针的热图; C: 差异表达基因的 ceRNA 网络。

图1 识别PE胎盘中的差异基因和构建ceRNA网络

Figure 1 Identification of differentially expressed genes in PE placenta and construction of ceRNA network

### 2.3 过表达和敲低HAND2-AS1对HUVEC增殖、迁移和血管形成的影响

炎症介质介导的血管内皮损伤和功能障碍在PE的发生发展中起重要作用。通过搜索GEO数据库,发现在肿瘤坏死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )作用下,HUVEC中HAND2-AS1的表达明显升高。使用TNF- $\alpha$ 模拟PE患者胎盘中的炎症状态,并通过qRT-PCR检测TNF- $\alpha$ 处理后HUVEC中HAND2-AS1表达量的改变,结果发现:TNF- $\alpha$ 处理8 h后,HUVEC中HAND2-AS1明显升高( $P < 0.01$ ),并呈现浓度依赖性(图3B)。

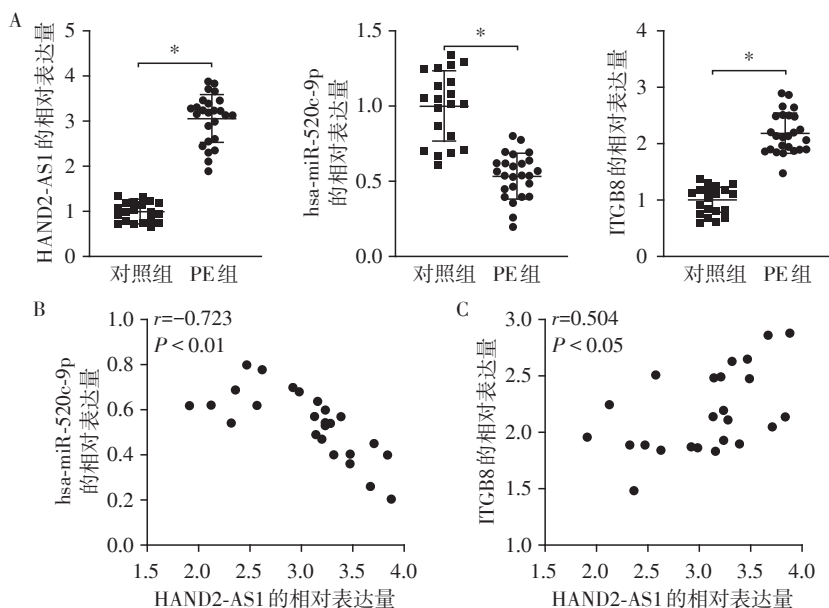
继续探究HAND2-AS1对血管内皮功能的影响。通过转染干扰序列和质粒对HUVEC中HAND2-AS1的表达量进行敲低和过表达( $P < 0.01$ ,图3C)。

相比较NC组,si-HAND2-AS1组HUVEC增殖加快( $P < 0.05$ ),oe-HAND2-AS1组HUVEC增殖减慢( $P < 0.01$ ),而si-NC组和oe-NC组无明显差异(图3D)。同时,与NC组相比,si-HAND2-AS1组HUVEC迁移速度增快( $P < 0.01$ ),oe-HAND2-AS1组HUVEC迁移速度减慢( $P < 0.05$ ),而si-NC组和oe-NC组无明显差异(图3E)。此外,相比其他组,oe-HAND2-AS1的血管形成能力明显受损(图3F)。因而,过表达HAND2-AS1对HUVEC的增殖、迁移和血管形成具有抑制作用,敲低HAND2-AS1则相反。

### 2.4 过表达和敲低HAND2-AS1对HUVEC中hsa-miR-520c-3p和ITGB8表达的影响

为了研究HAND2-AS1与hsa-miR-520c3p、ITGB8之间可能存在的ceRNA调控作用,通过序列比对,





A:胎盘组织中HAND2-AS1、hsa-miR-520c-3p和ITGB8表达量,两组比较,\* $P < 0.01$ ;B:PE胎盘中HAND2-AS1表达量与hsa-miR-520c-3p表达量的散点图;C:PE胎盘中HAND2-AS1表达量与ITGB8表达量的散点图。 $r$ :Pearson相关系数。

图2 qRT-PCR检验胎盘中HAND2-AS1、hsa-miR-520c-3p和ITGB8的表达量

Figure 2 Detecting the expression of HAND2-AS1, hsa-miR-520c-3p and ITGB8 in placentas by qRT-PCR

发现HAND2-AS1的8mer区和ITGB8的3'-UTR区均存在与hsa-miR-520c-3p反义互补的片段,这提示hsa-miR-520c-3p有结合HAND2-AS1和ITGB8的能力(图4A)。通过qRT-PCR和Western blot技术,进一步探究在HUVEC中过表达和敲低HAND2-AS1对hsa-miR-520c-3p和ITGB8表达量的影响。结果发现:与NC组相比,si-HAND2-AS1组hsa-miR-520c-3p表达上升( $P < 0.01$ ),oe-HAND2-AS1组hsa-miR-520c-3p表达下降( $P < 0.01$ ),而si-NC组和oe-NC组无明显差异(图4B)。相比NC组,si-HAND2-AS1组ITGB8 mRNA和蛋白表达水平均下降( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),oe-HAND2-AS1组ITGB8 mRNA和蛋白表达水平均上升( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),而si-NC组和oe-NC组无明显差异(图4C~E)。以上结果初步表明,HAND2-AS1可能通过与hsa-miR-520c-3p结合,解除hsa-miR-520c-3p对ITGB8表达的抑制。

### 3 讨论

通过生物信息学方法和对临床样本的检测,本研究发现HAND2-AS1和ITGB8在PE胎盘中表达升高,而hsa-miR-520c-3p表达下降,且三者之间可能存在ceRNA调控关系。此外,在HUVEC中敲低HAND2-AS1促进了HUVEC的增殖、迁移和血管形成的能力,而过表达HAND2-AS1则相反。既往研究表明,HAND2-AS1在子宫内膜癌组织中表达下

调,而过表达HAND2-AS1可以通过下调NMU抑制子宫内膜癌的迁移和侵袭<sup>[10]</sup>;类似地,HAND2-AS1在结直肠癌中表达明显下调,过表达HAND-AS1可以通过ceRNA作用靶向miR-1275/KLF14,从而抑制结直肠癌细胞的增殖和侵袭<sup>[11]</sup>;此外,HAND2-AS1还对非小细胞肺癌、食管鳞癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭具有抑制作用<sup>[12-14]</sup>。以上结果与我们在HUVEC中观察到的相一致,这表明HAND2-AS1具有广泛的抗细胞增殖、迁移和侵袭的作用。因而,在PE患者胎盘中高表达的HAND2-AS1对血管内皮细胞的增殖、迁移和血管形成能力造成损害,可能是造成PE中血管内皮损伤的因素。

既往研究显示hsa-miR-520c-3p在PE胎盘中表达下降,同时过表达hsa-miR-520c-3p可以下调NLRP3的表达,并抑制PE中NLRP3炎症小体的激活和炎症反应<sup>[15]</sup>。ITGB8全称整合素亚基 $\beta 8$ ,所翻译的蛋白通过与 $\alpha$ 亚基非共价结合构成整合素复合体。ITGB8在脑血管生成中发挥重要作用,敲除ITGB8会导致血管发育异常和出血<sup>[16-17]</sup>。然而,ITGB8在PE中的作用尚不明确。本研究发现PE患者胎盘中HAND2-AS1的表达量与hsa-miR-520c-3p的表达量呈负相关,与ITGB8的表达量呈正相关。同时,在HUVEC中过表达HAND2-AS1,hsa-miR-520c-3p表达升高,ITGB8表达下降;敲低HAND2-AS1,结果相反。此外,hsa-miR-520c-3p与HAND2-AS1的8mer

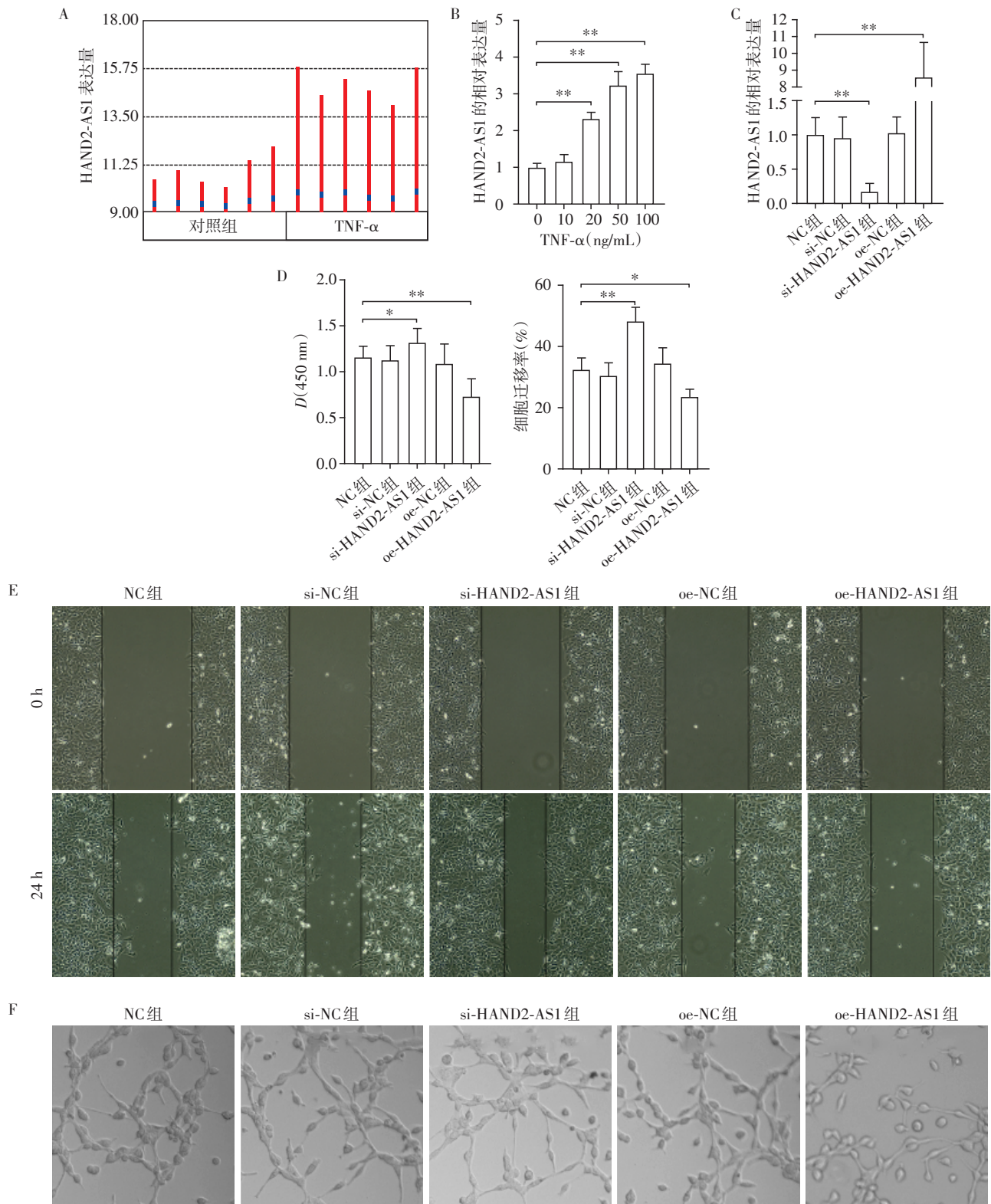
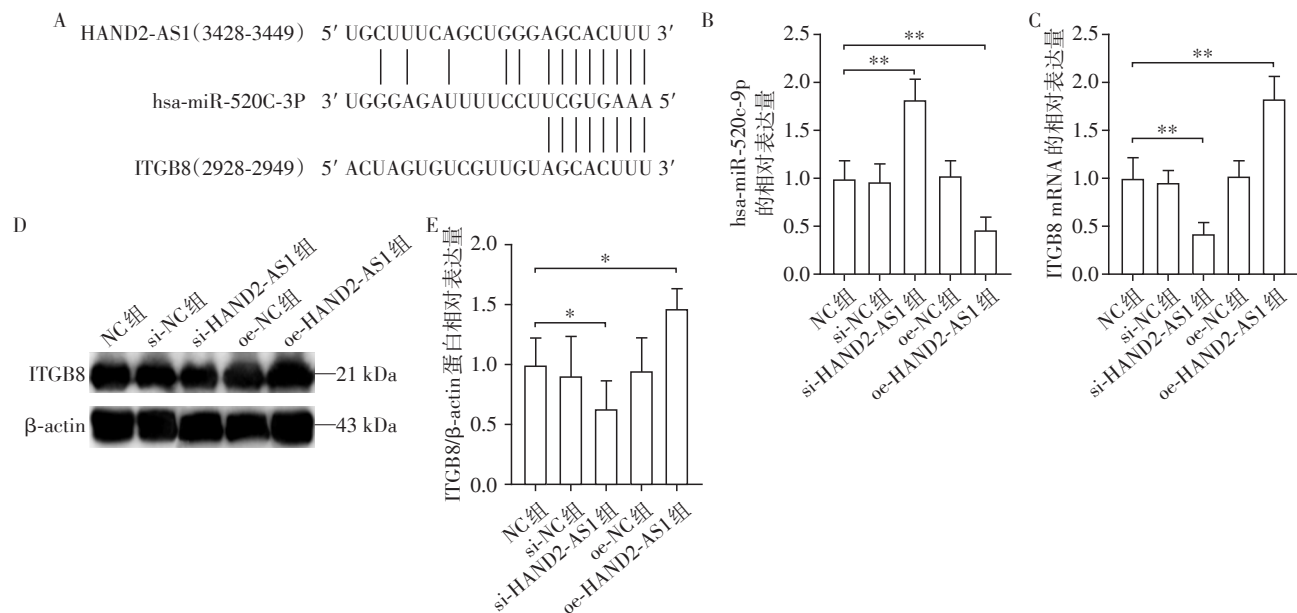


图3 HAND2-AS1对HUVEC增殖、迁移和血管生成的影响

Figure 3 The effects of HAND2-AS1 on proliferation, migration and angiogenesis of HUVEC

区及ITGB8的3'-UTR区存在反义互补片段,表明hsa-miR-520c-3p与后两者有结合的可能性。因而,

合理推测HAND2-AS1可能通过“分子海绵”作用吸附hsa-miR-520c-3p,从而解除后者对ITGB8表达的



A: hsa-miR-520c-3p与HAND2-AS1、ITGB8的反义互补序列;B: qRT-PCR检测 hsa-miR-520c-3p 的表达量;C: qRT-PCR检测 ITGB8 的表达量;D、E: Western blot检测 ITGB8 蛋白表达量。两组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图4 过表达和敲低HAND2-AS1对 hsa-miR-520c-3p 和 ITGB8 表达量的影响

Figure 4 The effects of HAND2-AS1 alteration on expression of hsa-miR-520c-3p and ITGB8

抑制。为了阐明上述假说以及 hsa-miR-520c-3p 和 ITGB8 在 PE 中的作用,仍需进一步研究。

综上,本研究发现 HAND2-AS1 在 PE 胎盘组织中表达升高,并抑制了血管内皮细胞的增殖、迁移和血管形成的能力。该作用可能是通过靶向 hsa-520c-3p/ITGB8 而实现。本研究为 PE 中血管内皮损伤和功能障碍的机制提供了新理论,为 PE 的防治提供了新靶点。

#### 参考文献

- [1] 马小玲,刘锦辉,程文俊. GATAD1 在子痫前期中的表达及其意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017,37(12):1622-1624
- [2] RANA S, LEMOINE E, GRANGER J, et al. Preeclampsia [J]. Circ Res, 2019, 124(7):1094-1112
- [3] GROTEGUT C A. Prevention of preeclampsia [J]. J Clin Invest, 2016, 126(12):4396-4398
- [4] WEISSGERBER T L, GARCIA-VALENCIA O, MILIC N M, et al. Early onset preeclampsia is associated with glycocalyx degradation and reduced microvascular perfusion [J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(4):e010647
- [5] GAO Q, ZHU X, CHEN J, et al. Upregulation of P53 promoted G1 arrest and apoptosis in human umbilical cord vein endothelial cells from preeclampsia [J]. J Hypertens, 2016, 34(7):1380-1388
- [6] HEMMATZADEH M, SHOMALI N, YOUSEFZADEH Y,

- et al. MicroRNAs: small molecules with a large impact on pre-eclampsia [J]. J Cell Physiol, 2019, 235(4):3235-3248
- [7] YANG X, MENG T. Long noncoding RNA in preeclampsia: transcriptional noise or innovative indicators? [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019:5437621
- [8] LIU S, XIE X, LEI H, et al. Identification of key circRNAs/lncRNAs/miRNAs/mRNAs and pathways in preeclampsia using bioinformatics analysis [J]. Med Sci Monit, 2019, 25:1679-1693
- [9] KARRETH F A, PANDOLFI P P. ceRNA cross-talk in cancer: when ce-bling rivalries go awry [J]. Cancer Discov, 2013, 3(10):1113-1121
- [10] YANG X, WANG C C, LEE W Y W, et al. Long non-coding RNA HAND2-AS1 inhibits invasion and metastasis in endometrioid endometrial carcinoma through inactivating neuromedin U [J]. Cancer Lett, 2017, 413:23-34
- [11] ZHOU J, LIN J, ZHANG H, et al. LncRNA HAND2-AS1 sponging miR-1275 suppresses colorectal cancer progression by upregulating KLF14 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(3):1848-1853
- [12] MIAO F, CHEN J, SHI M, et al. LncRNA HAND2-AS1 inhibits non-small cell lung cancer migration, invasion and maintain cell stemness through the interactions with TGF- $\beta$ 1 [J]. Biosci Rep, 2019, 39(1):BSR20181525
- [13] YAN Y, LI S, WANG S, et al. Long noncoding RNA

(下转第 1773 页)

- 变妇女高危型HPV的自然变化[J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(11): 740-744
- [12] SHI N, LU Q, ZHANG J, et al. Analysis of risk factors for persistent infection of asymptomatic women with high-risk human papillomavirus[J]. Hum Vaccin Immunother, 2017, 13(6): 1-7
- [13] PETRY K U, SCHMIDT D, SCHERBRING S, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology[J]. Gynecol Oncol, 2011, 121(3): 505-509
- [14] MARGOT H, NICOLE J, BIRGIT I, et al. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data[J]. Int J Cancer, 2015, 136(10): 2361-2368
- [15] LOUVANTO K, RINTALA M A, SYRJANEN K J, et al. Genotype-specific persistence of genital human papillomavirus (HPV) infections in women followed for 6 years in the Finnish Family HPV Study[J]. J Infect Dis, 2010, 202(3): 436-444
- [16] ZHANG G, LANG J, SHEN K, et al. High-risk human papillomavirus infection clearance following conization among patients with cervical intraepithelial neoplasm grade 3 aged at least 45 years[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2017, 136(1): 47-52
- [17] KATKI H A, SCHIFFMAN M, CASTLE P E, et al. Five-year risks of CIN3+ and cervical cancer among women who test Pap-negative but are HPV positive[J]. J Low Genit Tract Dis, 2013, 17(5): S56-S63
- [18] GUO M, KHANNA A, DAWLETT M, et al. Efficacy of reflex HPV16/18 genotyping in predicting CIN3/VAIN3 in women with HPV+/Pap- results[J]. J Am Soc Cytopathol, 2016, 5(1): 31-36
- [19] KIM K, KIM J J, KIM S M, et al. Prevalence and determinants of high-risk human papillomavirus infection in women with high socioeconomic status in Seoul, Republic of Korea[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(1): 269-273
- [收稿日期] 2020-03-19

(上接第1767页)

- HAND2-AS1 inhibits cancer cell proliferation, migration, and invasion in esophagus squamous cell carcinoma by regulating microRNA-21[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 9564-9571
- [14] CHEN J, LIN Y, JIA Y, et al. LncRNA HAND2-AS1 exerts anti-oncogenic effects on ovarian cancer via restoration of BCL2L1 as a sponge of microRNA-340-5p[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 23421-2343
- [15] LIU Z, ZHAO X, SHAN H, et al. microRNA-520c-3p suppresses NLRP3 inflammasome activation and inflammatory cascade in preeclampsia by downregulating NLRP3[J]. Inflamm Res, 2019, 68(8): 643-654
- [16] MA L, SHEN F, JUN K, et al. Integrin  $\beta$ 8 deletion enhances vascular dysplasia and hemorrhage in the brain of adult Alk1 heterozygous mice[J]. Transl Stroke Res, 2016, 7(6): 488-496
- [17] HIROTA S, CLEMENTS T P, TANG L K, et al. Neuropilin 1 balances  $\beta$ 8 integrin-activated TGF $\beta$  signaling to control sprouting angiogenesis in the brain[J]. Development, 2015, 142(24): 4363-4373
- [收稿日期] 2020-05-30