



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250071

http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.250071

China Journal of General Surgery, 2025, 34(6):1196-1208.

· 基础研究 ·

巨噬细胞富集 lncRNA CCL3-AS1 在颈动脉斑块不稳定中的表达及作用机制

王思婷, 谢和健, 杨淑均, 谢伟

(中南大学湘雅医院 心血管内科/湘雅冠脉循环研究中心/国家老年疾病临床医学研究中心, 湖南 长沙 410008)

摘要

背景与目的: 颈动脉斑块不稳定性是缺血性脑卒中的重要病理基础, 寻找关键分子标志物以评估斑块稳定性具有重要临床意义。近年来的研究强调了长链非编码 RNA (lncRNA) 在斑块稳定性中的重要调控作用和预警价值。笔者前期对人颈动脉稳定和 unstable 斑块组织进行全转录组测序, 发现 lncRNA 趋化因子 3 反义 RNA 1 (CCL3-AS1) 在 unstable 斑块中高表达, 可能与斑块稳定性密切相关。因此, 本研究进一步扩大斑块组织样本量验证, 并探讨 CCL3-AS1 对颈动脉斑块稳定性的影响及分子机制。

方法: 收集颈动脉内膜剥脱术患者的斑块组织, HE 和天狼星红等病理染色方法将其分为稳定斑块组和 unstable 斑块组 ($n=15/\text{组}$), 采用 qRT-PCR 对候选的差异 lncRNA CCL3-AS1 的表达进行验证。用 RNA 原位杂交联合免疫荧光技术确定其在斑块组织中的定位及与巨噬细胞的共表达关系。体外实验中, 通过慢病毒或反义寡核苷酸 (ASO) 分别上调或敲低 THP1 来源巨噬细胞中 CCL3-AS1 表达, 检测炎症因子及基质金属蛋白酶 (MMP) 的变化。体内通过载脂蛋白 E 敲除 ($\text{ApoE}^{-/-}$) 小鼠右颈动脉串联结扎构建 unstable 斑块模型, 并局部过表达 CCL3-AS1, 评估其对斑块形态、炎症巨噬细胞浸润及 MMP-9 表达的影响。进一步基于 catRAPID omics v2.1 平台进行生物信息学预测, 筛选 CCL3-AS1 潜在结合蛋白, 并结合 RNA 稳定性实验与 RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP) 实验, 验证其调控 MMP-9 表达的机制。

结果: 结果显示, CCL3-AS1 在 unstable 颈动脉斑块中呈明显高表达, 并主要定位于斑块中巨噬细胞的胞浆。体外实验显示, CCL3-AS1 过表达可明显上调巨噬细胞中 MCP-1、TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 及 MMP-9 的表达, 敲低则相反。在 $\text{ApoE}^{-/-}$ 小鼠的颈动脉 unstable 斑块模型中, CCL3-AS1 过表达诱导斑块纤维帽破裂、炎症巨噬细胞聚集及 MMP-9 分泌增强, 促进斑块不稳定。共表达分析提示 CCL3-AS1 与 MMP-9 表达高度相关 ($r=0.89$, $P=0.001$), RNA 稳定性实验显示其可延缓 MMP-9 mRNA 降解。生物信息学预测发现 CCL3-AS1 可能与 hnRNP-K 蛋白结合, RIP 实验和组织 FISH 共定位进一步证实该相互作用, 提示 CCL3-AS1 通过与 hnRNP-K 结合增强 MMP-9 mRNA 稳定性, 进而促进其表达。

结论: lncRNA CCL3-AS1 作为巨噬细胞中富集的炎症调控因子, 可能通过 hnRNP-K 介导的 MMP-9 表达促进颈动脉斑块不稳定, 为缺血性脑卒中的早期干预和分子分型提供潜在靶点。

关键词

斑块, 动脉粥样硬化; 颈动脉; RNA, 长链非编码; 巨噬细胞

中图分类号: R654.3

基金项目: 湖南省自然科学基金青年基金资助项目 (2023JJ41010)。

收稿日期: 2025-02-13; **修订日期:** 2025-06-10。

作者简介: 王思婷, 中南大学湘雅医院硕士研究生, 主要从事血管衰老相关疾病的机制与干预方面的研究 (谢和健为共同第一作者)。

通信作者: 杨淑均, Email: yangshujun0421@csu.edu.cn; 谢伟, Email: XIEWEI5874@outlook.com

Expression and mechanistic role of macrophage-enriched lncRNA CCL3-AS1 in carotid plaque instability

WANG Siting, XIE Hejian, YANG Shujun, XIE Wei

(Department of Cardiovascular Medicine Xiangya Hospital, Central South University/Center of Coronary Circulation/National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Changsha 410008, China)

Abstract

Background and Aims: Carotid plaque instability is a critical pathological basis for ischemic stroke. Identifying key molecular markers to evaluate plaque stability has important clinical implications. Recent studies have emphasized the regulatory roles and predictive value of long non-coding RNAs (lncRNAs) in plaque stability. In our previous transcriptome sequencing analysis of human stable and unstable carotid plaques, we identified lncRNA C-C motif chemokine ligand 3 antisense RNA 1 (CCL3-AS1) as significantly upregulated in unstable plaques, suggesting a potential association with plaque instability. Therefore, this study aimed to validate CCL3-AS1 expression in an expanded plaque sample cohort and to explore its role and underlying molecular mechanism in carotid plaque destabilization.

Methods: Carotid plaque specimens were obtained from patients undergoing carotid endarterectomy and classified into stable and unstable groups ($n=15$ per group) based on HE and Sirius red staining. qRT-PCR was used to validate the expression of candidate lncRNA CCL3-AS1. The localization and co-expression of CCL3-AS1 with macrophages in plaques were determined by RNA fluorescence in situ hybridization (FISH) combined with immunofluorescence staining. In vitro, THP1-derived macrophages were transduced with lentivirus or treated with antisense oligonucleotides (ASO) to overexpress or knock down CCL3-AS1, respectively, and the expression levels of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases (MMPs) were assessed. In vivo, an unstable carotid plaque model was established by tandem ligation of the right carotid artery in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice, followed by local overexpression of CCL3-AS1. The effects on plaque morphology, macrophage infiltration, and MMP-9 expression were evaluated. Additionally, bioinformatic prediction using the catRAPID v2.1 omics platform was performed to identify potential RNA-binding proteins interacting with CCL3-AS1. RNA stability assays and RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) were conducted to verify the regulatory mechanism of MMP-9 expression.

Results: CCL3-AS1 was significantly upregulated in unstable carotid plaques and was predominantly localized to the cytoplasm of plaque-infiltrating macrophages. In vitro, overexpression of CCL3-AS1 markedly increased the expression of MCP-1, TNF- α , IL-1 β , iNOS, and MMP-9 in macrophages, whereas knockdown had the opposite effect. In the ApoE^{-/-} mouse model of unstable carotid plaques, CCL3-AS1 overexpression led to fibrous cap rupture, increased infiltration of pro-inflammatory macrophages, enhanced MMP-9 secretion, and promoted plaque instability. Co-expression analysis revealed a strong correlation between CCL3-AS1 and MMP-9 expression ($r=0.89$, $P=0.001$). RNA stability assays demonstrated that CCL3-AS1 delayed the degradation of MMP-9 mRNA. Bioinformatic prediction identified heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) as a potential binding partner of CCL3-AS1. RIP and FISH co-localization confirmed the interaction, suggesting that CCL3-AS1 enhances MMP-9 mRNA stability through binding to hnRNP-K, thereby promoting its expression.

Conclusion: As a macrophage-enriched inflammatory lncRNA, CCL3-AS1 may promote carotid plaque instability by enhancing MMP-9 expression via hnRNP-K-mediated mRNA stabilization. This lncRNA represents a potential molecular target for early intervention and stratification of ischemic stroke.

Key words

Plaque, Atherosclerotic; Carotid Arteries; RNA, Long Noncoding; Macrophages

CLC number: R654.3

我国已进入“深度老龄化”阶段，衰老相关心脑血管疾病的发病率和病死率仍居首位，其中动脉粥样硬化性疾病（如脑卒中、冠心病等）以其高致死和高致残性造成了沉重的经济和社会负担。越来越多的证据^[1-2]表明，颅外颈动脉斑块不稳定与脑卒中发生风险增加相关，而非狭窄程度。颈动脉内膜剥脱术是治疗颈动脉狭窄、预防缺血性卒中的主要手段，其核心是通过切除增厚的动脉内膜和粥样硬化斑块，恢复血管通畅性^[3-4]。部分患者由于高龄化或弥漫性血管病变无法耐受手术^[5]。因此，深入解析颈动脉斑块不稳定的分子机制、寻找无创预警的分子标志物有助于对颈动脉粥样硬化患者进行风险分层、精准实施颈动脉内膜剥脱手术，降低脑卒中发病风险。

动脉粥样硬化斑块是否破裂取决于其内在组织成分和外在表面应力，大脂质核心、薄纤维帽、活动性炎症、点状钙化和凝血机制增强等是不稳定斑块的突出特点。与稳定斑块相比，破裂斑块纤维帽处存在大量巨噬细胞浸润，炎症反应更加活跃，并伴随基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMP）分泌^[6]。MMP，尤其是MMP-9过表达会降解纤维帽胶原，促进斑块破裂^[7]。因此，巨噬细胞激活和活动性炎症是导致斑块不稳定乃至破裂的重要因素，但机制还未完全阐明。

目前，对于斑块易损性的客观诊断标准尚未统一，病理诊断仍然是最可靠的评估手段，亟须开发更多无创诊断技术^[8]。近年来研究^[9-10]表明，长链非编码RNA（long non-coding RNA, lncRNA）在动脉粥样硬化发生发展过程中发挥重要的调控作用，可能作为鉴别和预测斑块稳定性的关键分子标志物。笔者团队前期根据病理学特征，将收集的颈动脉内膜剥脱术患者的斑块组织分为稳定斑块组和不稳定斑块组进行全转录组测序，筛选与斑块稳定性相关的差异lncRNA，发现趋化因子3反义RNA 1（C-C motif chemokine ligand 3 antisense RNA 1, CCL3-AS1）可能与斑块稳定性密切相关。本研究进一步扩大斑块组织样本量验证，并利用团队前期构建的小鼠颈动脉斑块不稳定模型^[11-12]，深入解析目标lncRNA的生物学功能，以期预测

和治疗颈动脉斑块不稳定性提供新的分子标志。

1 材料与方法

1.1 实验材料

载脂蛋白E敲除（apolipoprotein E-deficient, ApoE^{-/-}）小鼠（维通利华，中国），高脂饮食（Research Diets, #D12492，美国），慢病毒（吉凯基因，中国），反义寡核苷酸（antisense oligonucleotides, ASO）（锐博生物，中国），核内不均一核糖核蛋白K（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNP-K）抗体（#ab39975）、CD68抗体（#ab213363）、F4/80抗体（#ab6640）、MMP-9抗体（#ab283575）和诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase 2, iNOS）抗体（#ab178945）均来自Abcam公司，cleaved casepase3抗体（CST, #9661，美国），Magna RIP™ RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit试剂盒（Millipore, #17-700，美国），Fluorescent In Situ Hybridization Kit（FISH试剂盒）（锐博生物，#C10910，中国），Masson染色试剂盒、天狼星红染色试剂盒和佛波酯（Sigma-Aldrich，美国）。

1.2 实验方法

1.2.1 人颈动脉斑块组织学染色 收集人颈动脉内膜剥脱术患者的斑块组织，通过HE染色和天狼星红染色鉴定斑块结构和稳定性情况。将大脂质核心、薄纤维帽、III型胶原比例减少等特征判断斑块处于不稳定状态。CD68免疫荧光染色鉴定斑块巨噬细胞浸润情况，RNA FISH检测CCL3-AS1的分布情况及与CD68巨噬细胞、hnRNP-K蛋白的共定位情况。

1.2.2 小鼠颈动脉不稳定斑块模型构建和组织学染色 笔者前期建立了ApoE^{-/-}小鼠的颈动脉不稳定斑块模型^[12]，其颈动脉斑块表现出不稳定的动脉粥样硬化病变，类似于人易损、易破裂的颈动脉斑块。简单来说，选取6周龄雄性ApoE^{-/-}小鼠30只，高脂饮食喂养6周，注射氯胺酮（100 mg/kg）和甲苯噻嗪（10 mg/kg）进行麻醉，进行右颈动脉串联结扎手术。右颈动脉分叉处引入直径为160 μm的

针, 在位于分叉处远端 1 mm 处以及远端狭窄的近端点 3 mm 处使用 6-0 的黑色聚酯纤维缝合线结扎, 随后将针移除。采用局部浸润慢病毒的方式过表达 CCL3-AS1, 10 min 后缝合伤口, 继续高脂喂养 4 周后取材。取小鼠右颈动脉近端颈动脉Ⅱ段, 做冷冻切片, 分析 CCL3-AS1 对斑块稳定性的影响。Masson 染色检测斑块纤维帽胶原含量, 分析血栓形成类型(斑块内血栓、血管腔内血栓)、纤维帽完整性和有无破裂。免疫荧光染色鉴定巨噬细胞浸润情况: F4/80 抗体染色鉴定斑块内巨噬细胞总量, iNOS 抗体染色鉴定炎性巨噬细胞, cleaved caspase-3 抗体染色鉴定凋亡巨噬细胞, MMP-9 抗体染色检测巨噬细胞的 MMP-9 分泌情况。

1.2.3 细胞培养 人 THP1 单核/巨噬细胞系培养: 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基进行培养。THP1 细胞在 100 ng/mL 佛波酯刺激 48 h 后分化成 M0 巨噬细胞。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 和人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cell, HAEC) 使用内皮细胞专用培养基, 人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cell, HASMC) 使用平滑肌细胞专用培养基。慢病毒感染 THP1 细胞(MOI=50), 获得稳定过表达 CCL3-AS1 细胞系。给予巨噬细胞 ASO (50 nmol/L) 以降低 CCL3-AS1 表达水平。通过观察巨噬细胞炎症因子及 MMP 表达、亚型分化、脂质吞噬和凋亡情况, 明确 CCL3-AS1 在巨噬细胞炎症活动中的调控作用。

1.2.4 qRT-PCR 采用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司, 美国) 提取细胞或组织的总 RNA, 使用 PrimeScript 逆转录酶试剂盒(Takara 公司, 美国) 合成 cDNA, 使用 SYBR Green qPCR Mix (YEASEN 公司, 中国) 对 CCL3-AS1、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白介素 1 β (interleukin 1 beta, IL-1 β)、iNOS 和 CCL3 基因进行 PCR 扩增, 使用 ABI QuantStudio Dx 仪器(Life Technologies 公司, 美国) 进行基因实时荧光定量检测。熔解曲线分析中的单峰表明扩增产物具有特异性。以 β -actin 作为内参基因来校正其他基因 mRNA 水平, 并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行比较。qRT-PCR 的基因特异性引物序列见表 1。

1.2.5 RNA 稳定性实验 将稳定过表达 CCL3-AS1 的 THP1 细胞系(Lv-CCL3-AS1) 及对照细胞系(Lv-NC)

接种于 12 孔板, 佛波酯刺激 48 h 诱导单核细胞分化为巨噬细胞, 加入 10 μ g/mL 放线菌素 D, 分别在 0、4、8、12、24 h 收集细胞, 使用 qRT-PCR 法检测 MMP-9 mRNA 表达水平。

表 1 引物序列表
Table 1 Primer information

基因	序列(5'→3')
CCL3-AS1	正向:AAG CAG TCA AGA ACG CAT A
	反向:GAC CTG GAA GCA ACA AGA
MCP-1	正向:AAG ACC ATT GTG GCC AAG GA
	反向:TTC GGA GTT TGG GTT TGC T
TNF- α	正向:CTT CTC CTT CCT GAT CGT
	反向:GCT ACA GGC TTG TCA CTC
IL-1 β	正向:CGC CAG TGA AAT GAT GGC TTA T
	反向:CTG GAA GGA GCA CTT CAT CTG T
iNOS	正向:TGC AGA CAC GTG CGT TAC TCC
	反向:GGT AGC CAG CAT AGC GGA TG
CCL3	正向:CAG TGT CAT CTT CCT AAC CA
	反向:GGC AAT AAC CAG TCC ATA GA
MMP-1	正向:GAG TAA TGT CAC ACC TCT GA
	反向:ATG CCA TCA ATG TCA TCC T
MMP-3	正向:CTG TTG ATT CTG CTG TTG AG
	反向:AGG TCT GTG AGT GAG TGA T
MMP-9	正向:AAC CAA TCT CAC CGA CAG
	反向:GGC AAG TCT TCC GAG TAG
β -actin	正向:CAC CAT TGG CAA TGA GCG GTT C
	反向:AGG TCT TTG CGG ATG TCC ACG T

1.2.6 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA-protein immunoprecipitation, RIP) 收集 Lv-CCL3-AS1 和 Lv-NC 组巨噬细胞, 使用 Magna RIP™ RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit 试剂盒进行 RNA 蛋白复合物免疫沉淀。简单来说, 在细胞裂解物中加入 5 μ g hnRNP-K 抗体孵育过夜, 加入 protein A/G 磁珠孵育 8 h, 使用磁力架收集与 hnRNP-K 结合的 RNA 复合物, qRT-PCR 法检测 CCL3-AS1 和 MMP 水平, 以验证三者是否存在相互作用。

1.3 统计学处理

实验数据统计分析均使用 GraphPad Prism v10.4.2 完成。数据均进行 Shapiro-Wilk 正态性检验, 两组符合正态分布的数据采用非配对双尾 t 检验; 非正态分布的数据, 采用 Mann-Whitney U 检验; 两组多个时间点连续数据的显著性检验采用两因素方差分析进行组间差异比较; 采用 Spearman 分析非正态分布数据间的相关性。计量资料均采用

均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA CCL3-AS1 在人颈动脉不稳定斑块的巨噬细胞中高表达

前期对人颈动脉稳定和 unstable 斑块组织进行全转录组测序, 发现 lncRNA CCL3-AS1 在 unstable 斑块中高表达, 上调达 5.1 倍 ($P=0.013$) (图 1A); 本次研究进一步扩大样本验证表明, CCL3-AS1 在颈动脉 unstable 斑块中上调 3.3 倍 ($P=0.016$) (图 1B)。CCL3-AS1 (NCBI Gene ID: 102724850) 与编码基因 CCL3 转录方向相反, 位于 17 号染色体, 全长 646 bp, 目前该 lncRNA 尚无功能注释 (图 1C)。组织学染色显示人不稳定颈动脉斑块具有较大的脂质核心、较薄的纤维帽、III 型胶原减少和炎症细胞浸润增加等易损斑块特征 (图 2A)。RNA FISH 染色结果显示 CCL3-AS1 主要富集在 unstable 斑块的巨噬细胞中 (图 2B-C)。在体外培养的血管细胞中 (包括 HUVEC、HAEC、HASMC、THP1 和 THP1-M0 细胞), CCL3-AS1 在 THP1 单核细胞以及单核来源的巨噬细胞 (THP1-M0) 中高度表达 (图 2D)。亚细

胞定位显示, CCL3-AS1 主要表达于炎症反应活跃的巨噬细胞胞浆中 (图 2E)。以上结果提示 CCL3-AS1 富集在斑块的巨噬细胞中, 可能通过调控巨噬细胞炎症影响颈动脉斑块稳定性。

2.2 CCL3-AS1 促进巨噬细胞炎症活动和 MMP-9 表达, 加速斑块不稳定

体外研究表明慢病毒介导 CCL3-AS1 过表达, 显著上调巨噬细胞炎症基因 (MCP-1、TNF- α 、IL-1 β 和 iNOS) 表达水平; ASO 敲低 CCL3-AS1 后显著下调 MCP-1 和 iNOS 基因表达水平。由于巨噬细胞可分泌多种 MMP 影响斑块胶原含量和稳定性, 本研究分别检测了 CCL3-AS1 对 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9 表达水平的影响。结果表明 CCL3-AS1 对 MMP-1 和 MMP-3 的 mRNA 水平无明显影响, 过表达 CCL3-AS1 升高 MMP-9 mRNA 表达约 1.8 倍 ($P=0.002$), 反之, 敲低 CCL3-AS1 降低 34% 的 MMP-9 表达 ($P=0.001$) (图 3A)。在蛋白水平上, 过表达 CCL3-AS1 增加 MMP-9 蛋白表达水平 2.2 倍左右 ($P=0.004$), 敲低 CCL3-AS1 降低 60% 的 MMP-9 蛋白水平 ($P < 0.001$) (图 3B)。以上结果提示, CCL3-AS1 可能通过促进巨噬细胞炎症活动和 MMP-9 表达介导斑块不稳定。

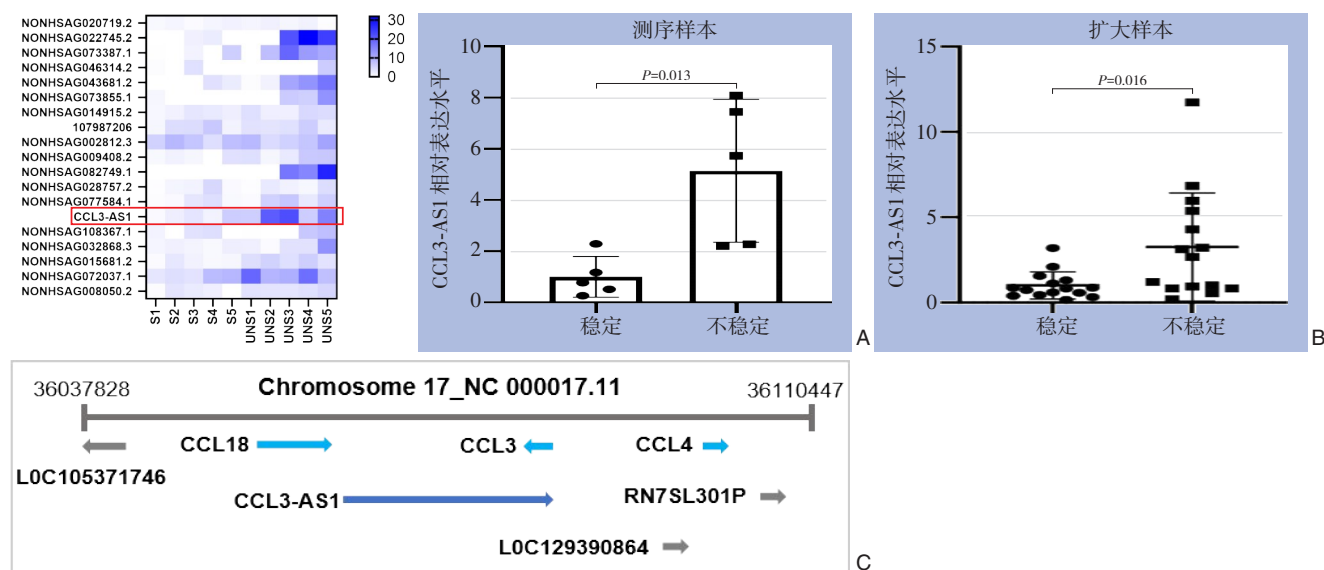


图1 CCL3-AS1 在人颈动脉不稳定斑块中高表达 A: 人颈动脉稳定斑块 ($n=5$) 和不稳定斑块组织 ($n=5$) 全转录组测序中差异 lncRNA 热图 ($FC > 1$, $FPKM > 1$), 及在测序样本中使用 qRT-PCR 验证 CCL3-AS1 表达水平; B: 扩大样本 ($n=15$ /组) 后使用 qRT-PCR 验证 CCL3-AS1 表达水平; C: CCL3-AS1 基因组结构

Figure 1 High expression of CCL3-AS1 in human unstable carotid plaques A: Heatmap of differentially expressed lncRNAs ($FC > 1$, $FPKM > 1$) from whole transcriptome sequencing of human stable ($n=5$) and unstable carotid plaques ($n=5$), along with qRT-PCR validation of CCL3-AS1 expression in the sequencing samples; B: qRT-PCR validation of CCL3-AS1 expression in an expanded cohort ($n=15$ per group); C: Genomic structure of CCL3-AS1

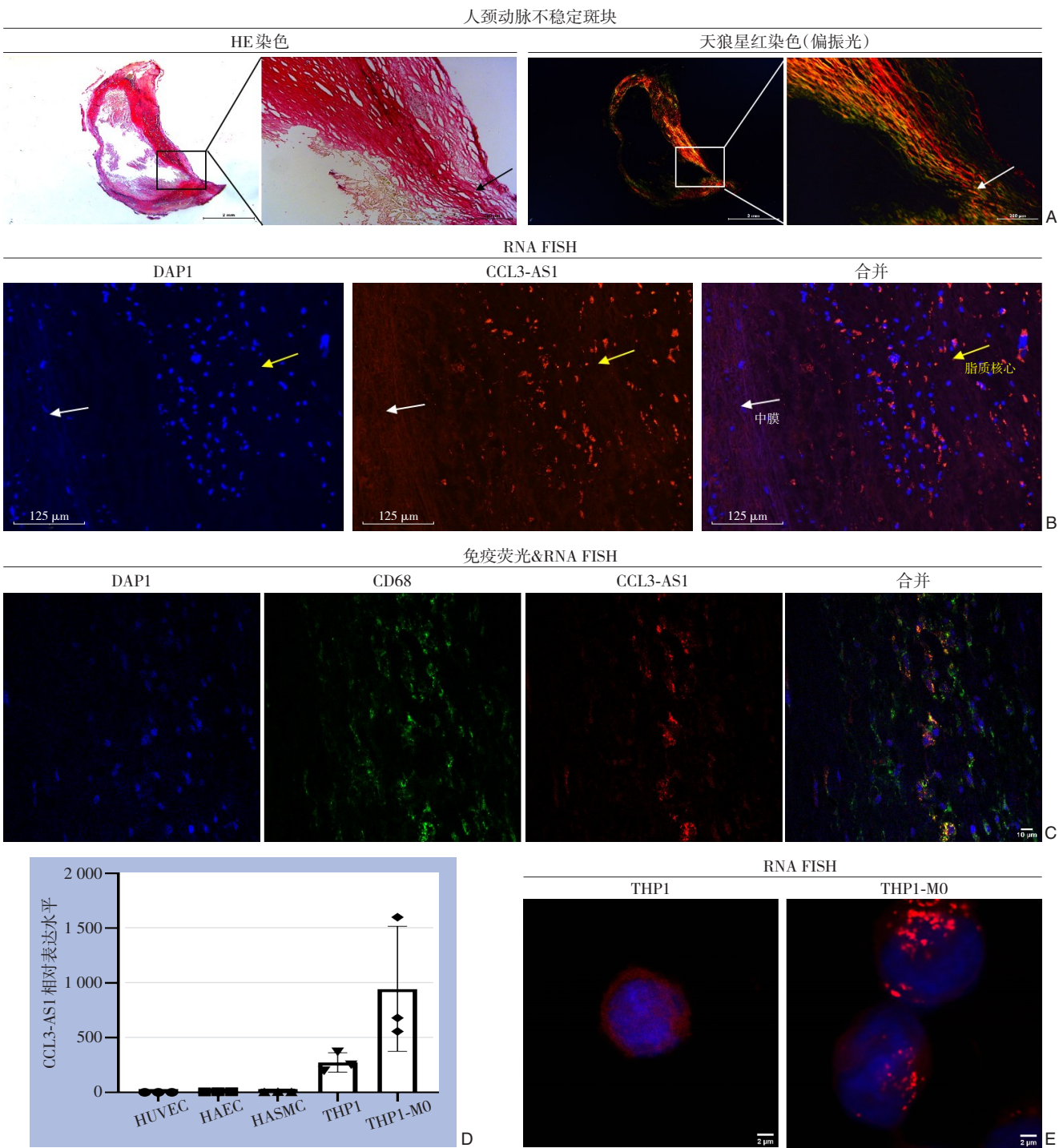


图2 CCL3-AS1 高度富集于人颈动脉不稳定斑块的巨噬细胞中 A: 人颈动脉不稳定斑块的HE 和天狼星红染色; B: RNA FISH 显示 CCL3-AS1 在人颈动脉斑块中的原位表达情况; C: CCL3-AS1 富集在斑块巨噬细胞中; D: 不同血管细胞中 CCL3-AS1 的表达水平; E: RNA FISH 显示 CCL3-AS1 在单核细胞和巨噬细胞中的原位表达情况

Figure 2 CCL3-AS1 is highly enriched in macrophages within human unstable carotid plaques A: HE and Sirius red staining of human unstable carotid plaques; B: RNA FISH showing the in situ expression of CCL3-AS1 in carotid plaque tissue; C: CCL3-AS1 is enriched in macrophages within the plaques; D: Expression levels of CCL3-AS1 in different vascular cell types; E: RNA FISH showing the in situ expression of CCL3-AS1 in monocytes and macrophages

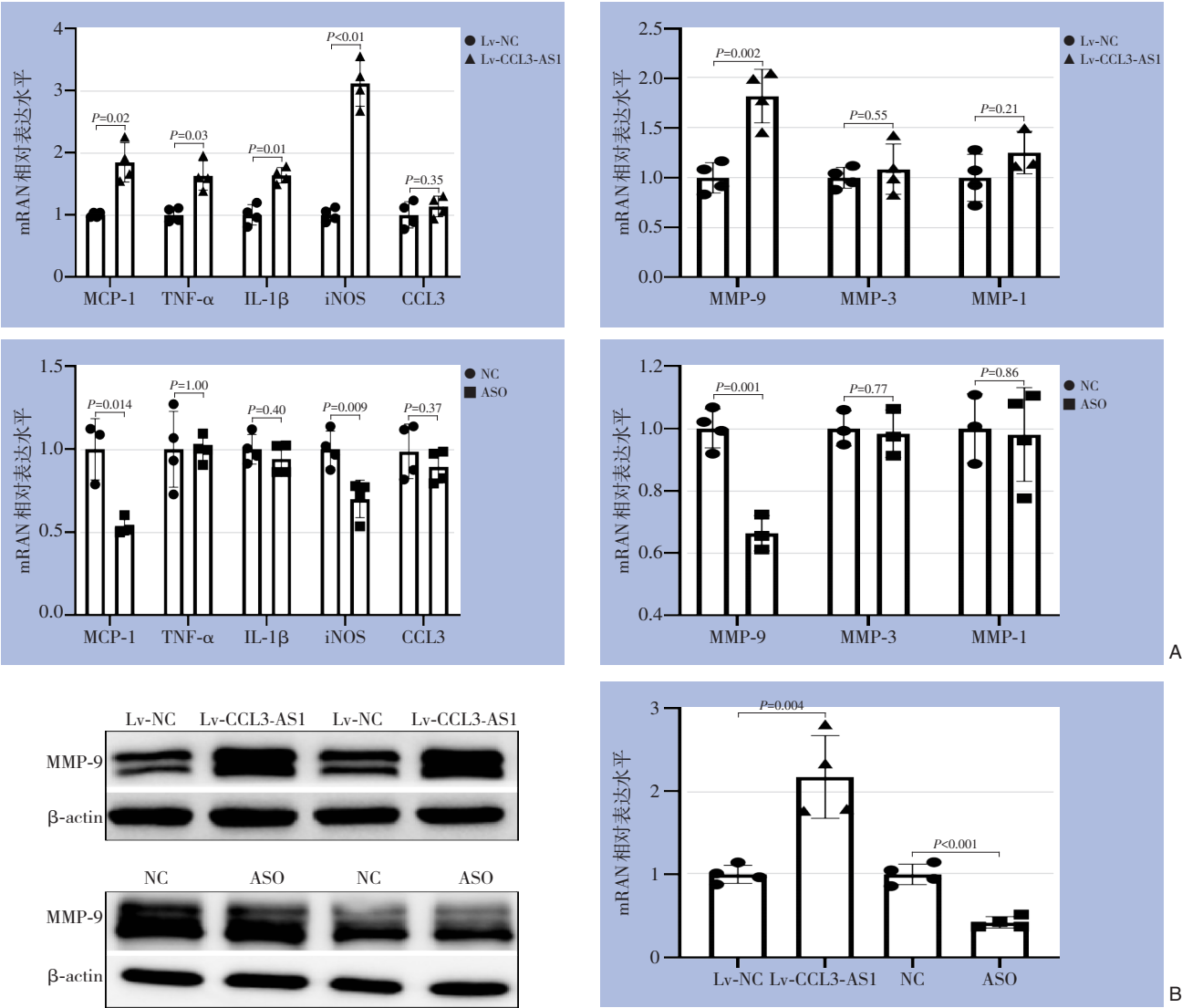


图3 CCL3-AS1 促进巨噬细胞炎症反应和 MMP-9 表达 A: 在过表达或敲低 CCL3-AS1 的 THP1 来源巨噬细胞中, qRT-PCR 检测炎症因子和 MMP 基因的表达水平; B: Western blot 检测 MMP-9 蛋白水平

Figure 3 CCL3-AS1 promotes inflammatory responses and MMP-9 expression in macrophages A: Expression levels of inflammatory cytokines and MMP genes detected by qRT-PCR in THP1-derived macrophages with CCL3-AS1 overexpression or knockdown; B: MMP-9 protein levels detected by Western blot

2.3 CCL3-AS1 促进颈动脉斑块不稳定

为了进一步明确体内 CCL3-AS1 是否促进颈动脉斑块不稳定,建立了小鼠颈动脉不稳定斑块模型,首先对 ApoE^{-/-}小鼠进行右颈动脉串联结扎手术,慢病毒局部浸润过表达 CCL3-AS1,该模型可产生类似于人不稳定的、易破裂的颈动脉斑块(图 4A)。Masson 染色结果显示,对照组(Lv-NC)颈动脉在串联结扎后主要发生中膜增厚的血管重塑特征,而过表达 CCL3-AS1 则可促进小鼠颈动脉斑块纤维帽破裂,形成管腔闭塞性血栓(图 4B)。免疫荧光染色结果显示,过表达 CCL3-AS1 明显促进了巨噬细胞(F4/80 标记)浸润,炎性巨噬细胞(iNOS 标记)和凋亡巨噬细胞(cleaved caspase-3 标记)比例明显增加,巨噬细胞 MMP-9 表达增加(图 4C)。以上结果表明,CCL3-AS1 促进小鼠斑块巨噬细胞浸润和炎性活动,加速斑块不稳定和破裂。

2.4 CCL3-AS1 可能通过与 hnRNP-K 蛋白结合增强 MMP-9 mRNA 稳定性

以上研究结果显示 CCL3-AS1 富集在不稳定斑块巨噬细胞中,过表达 CCL3-AS1 可以显著影响巨噬细胞炎症因子和 MMP-9 表达水平,促进颈动脉斑块破裂。为了进一步探索 CCL3-AS1 的作用靶点,

基于颈动脉斑块全转录组测序数据,对 CCL3-AS1 与巨噬细胞炎症因子和 MMPs 基因进行了共表达分析,结果显示 CCL3-AS1 与 MMP-9 mRNA 水平相关性最高($r=0.89$, $P=0.001$)(图 5A)。进一步通过 RNA 稳定性实验发现 CCL3-AS1 可以延缓 MMP-9 mRNA 降解,促进其 mRNA 稳定性($P=0.032$)(图 5B)。既往研究表明巨噬细胞中 MMP-9 过度表达会导致斑块纤维帽胶原降解,加速斑块破裂^[13]。由此推测,巨噬细胞中 CCL3-AS1 可能通过维持 MMP-9 mRNA 稳定性促进其表达及分泌,从而影响颈动脉斑块稳定性。为了明确巨噬细胞中 CCL3-AS1 调控 MMP-9 表达的分子机制,使用 catRAPID omics v2.1 网站(http://s.tartagialab.com/page/catrapid_omics2_group)预测与 CCL3-AS1 相互作用的蛋白。生物信息学预测结果显示,CCL3-AS1 可能与 hnRNP-K 结合,具体表现为 hnRNP-K 蛋白 389-453 位氨基酸(KH3 结构域)与 CCL3-AS1 的 26-77 位碱基片段存在高亲和力(图 5C-D)。RIP 实验证实 CCL3-AS1、hnRNP-K 蛋白和 MMP-9 mRNA 存在相互作用(图 5E)。人颈动脉斑块免疫荧光染色和 RNA FISH 结果表明,CCL3-AS1 与 hnRNP-K 存在共定位(图 5F)。以上结果提示,CCL3-AS1 可能通过与 hnRNP-K 蛋白结合增强 MMP-9 mRNA 稳定性。

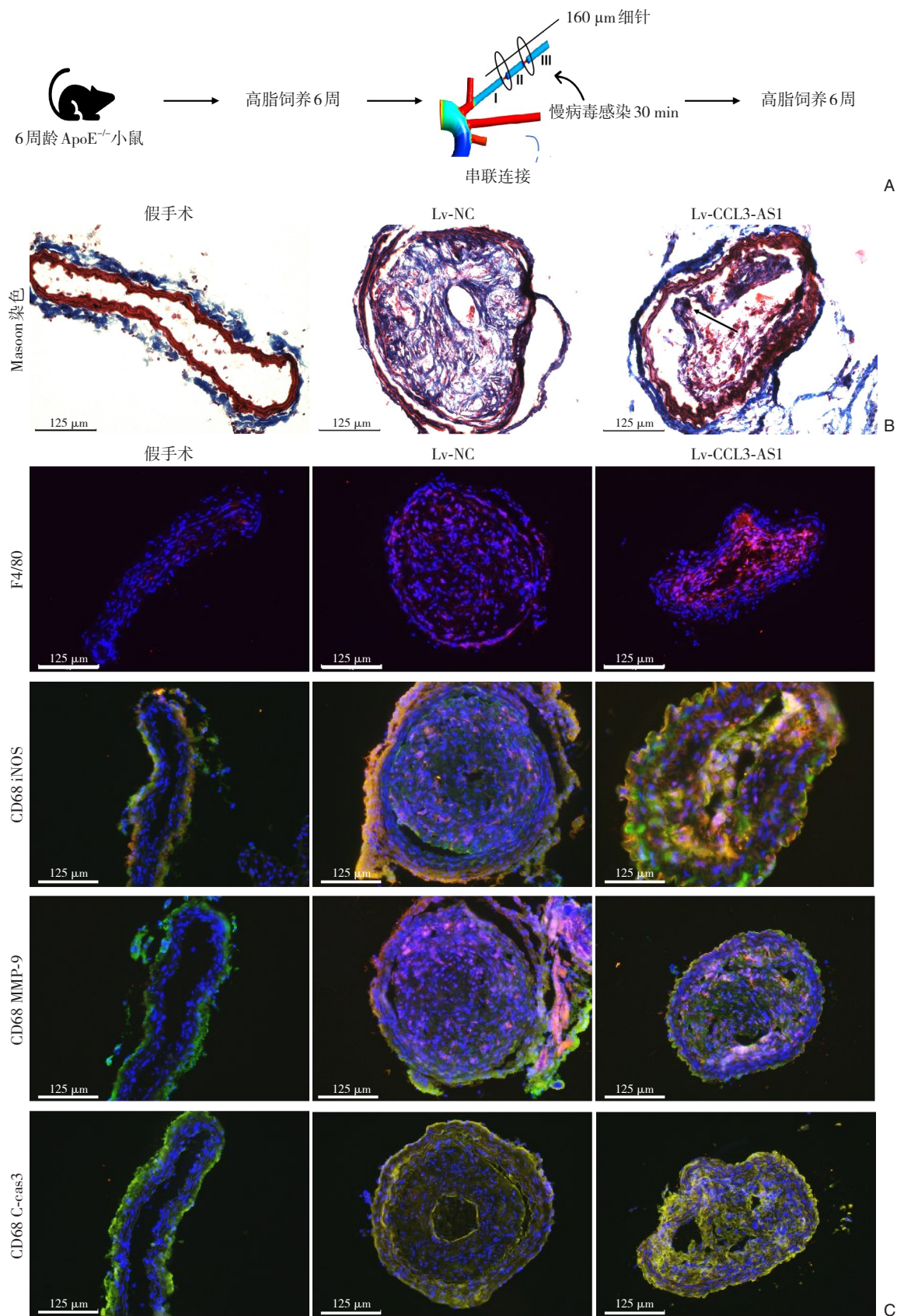


图 4 CCL3-AS1 促进小鼠颈动脉斑块不稳定 A: 小鼠颈动脉斑块不稳定模型构建流程图; B: 小鼠颈动脉 II 段 Masson 染色; C: 小鼠颈动脉免疫荧光染色 (F4/80 代表巨噬细胞, iNOS 代表炎症性巨噬细胞)

Figure 4 CCL3-AS1 promotes carotid plaque instability in mice A: Schematic diagram of the mouse unstable carotid plaque model construction; B: Masson staining of the second segment of the mouse carotid artery; C: Immunofluorescence staining of the mouse carotid artery (F4/80 indicates macrophages, and iNOS indicates pro-inflammatory macrophages)

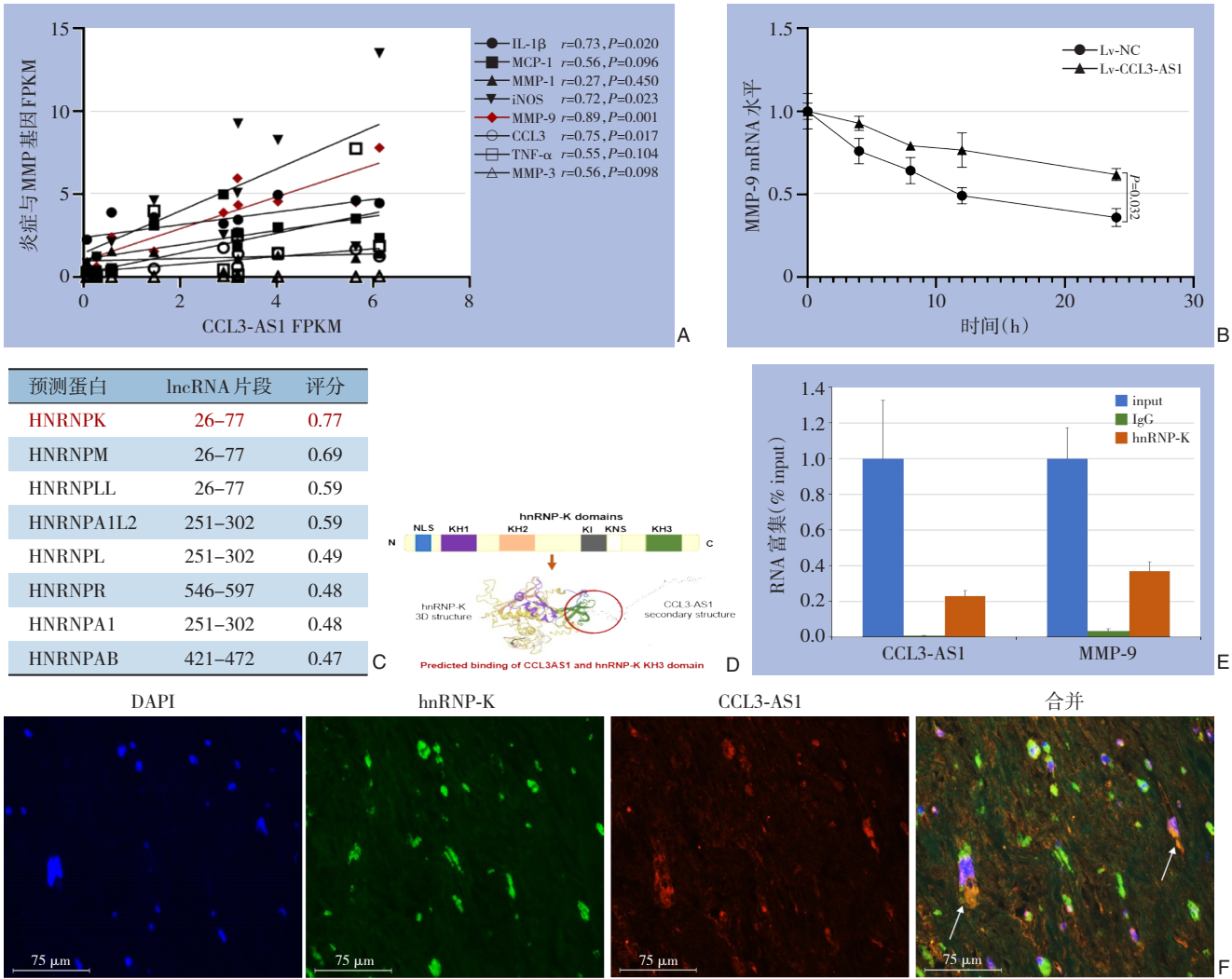


图5 CCL3-AS1可能通过与hnRNP-K蛋白结合增强MMP-9 mRNA稳定性 A: 基于颈动脉转录组测序数据($n=10$), 进行CCL3-AS1与炎症及MMP基因的共表达分析; B: CCL3-AS1对MMP-9 mRNA稳定性的影响; C: 使用catRAPID omics v2.1预测CCL3-AS1相互作用蛋白; D: hnRNP-K蛋白结构以及其与CCL3-AS1结合示意图; E: RIP实验证实CCL3-AS1与hnRNP-K和MMP-9 mRNA存在相互作用; F: 人颈动脉斑块hnRNP-K免疫荧光染色和CCL3-AS1 RNA FISH

Figure 5 CCL3-AS1 may enhance MMP-9 mRNA stability by binding to hnRNP-K protein A: Co-expression analysis of CCL3-AS1 with inflammation-related and MMP genes based on carotid artery transcriptome sequencing data ($n=10$); B: Effect of CCL3-AS1 on MMP-9 mRNA stability; C: Prediction of CCL3-AS1 interacting proteins using catRAPID omics v2.1; D: Structure of hnRNP-K protein and schematic diagram of its binding with CCL3-AS1; E: RIP assay confirming interactions among CCL3-AS1, hnRNP-K, and MMP-9 mRNA; F: Immunofluorescence staining of hnRNP-K and RNA FISH of CCL3-AS1 in human carotid artery plaques

3 讨论

巨噬细胞参与动脉粥样硬化发生发展的各个阶段,通过介导炎症反应和胞外基质重塑影响斑块进展和稳定性^[14-15],靶向巨噬细胞治疗可以显著减轻斑块负荷以及减少斑块破裂风险^[16-17]。与其他动脉(尤其是股动脉)相比,人类颈动脉的动脉粥样硬化病变具有更高的炎症负荷,巨噬细胞浸润数量显著增加^[18-19]。斑块成分分析显示,栓塞性

缺血患者斑块中的巨噬细胞数量以及MMP-9的表达均高于血流动力学性缺血患者,这表明巨噬细胞炎症活动和MMP-9分泌驱动颈动脉斑块不稳定^[20]。

近年来研究发现富集在巨噬细胞中的lncRNA通过影响巨噬细胞炎症活动和分泌表型影响斑块稳定性^[9,21-22]。Zhang等^[23]发现lnc_000048通过KDM1A/MAP2K2/ERK轴促进巨噬细胞炎症反应和泡沫化,诱导胶原纤维降解从而加速小鼠颈动脉

斑块破裂。Hung等^[24]发现LINC01272在冠脉易损斑块部位的巨噬细胞中特异性高表达,可通过上调CD36表达促进巨噬细胞脂质摄取以及活性氧产生,进而导致斑块不稳定。巨噬细胞中NEAT1通过抑制miR-128促进氧化低密度脂蛋白诱导的炎症和氧化应激,加速斑块进展^[25]。循环中ANRIL水平与急性心肌梗死发生风险相关,最新的机制研究发现ANRIL可能通过影响胶原合成导致斑块易损性增加^[26]。新近研究发现lncRNA AK023617通过调节巨噬细胞中与免疫相关的GTP酶家族M蛋白的昼夜节律,影响动脉粥样硬化斑块稳定性^[27];lncRNA SCARNA8抑制巨噬细胞胞葬作用促进斑块不稳定^[22]。此外,循环MIAT、MALAT1和LIPCAR与急性心肌梗死发生风险相关^[10, 28-29];以上研究提示lncRNA与斑块稳定性相关,可能作为预测斑块破裂相关疾病的生物标志物。

本研究发现,在不稳定颈动脉斑块中,CCL3-AS1富集在巨噬细胞胞浆中。在小鼠颈动脉不稳定模型中,过表达CCL3-AS1诱导巨噬细胞炎性活动和MMP-9分泌,促进斑块破裂与血栓形成。体外研究发现,巨噬细胞CCL3-AS1通过与hnRNP-K结合提高MMP-9 mRNA稳定性从而增加MMP-9表达分泌、降解纤维帽胶原和破坏其完整性。本研究发现了一个新的与颈动脉斑块稳定性相关的lncRNA分子CCL3-AS1,并阐明了其影响斑块稳定性的分子机制,为临床预警斑块不稳定相关疾病如脑卒中和冠心病等提供新的理论依据。

巨噬细胞炎症反应和分泌功能是影响斑块稳定性的重要病理特征,本研究使用人颈动脉晚期不稳定斑块样本,揭示了巨噬细胞分泌的MMP-9通过降解胶原破坏纤维帽结构,加速斑块破裂。此外,本研究通过对ApoE^{-/-}小鼠右颈动脉串联结扎以构建颈动脉不稳定斑块模型,同样发现iNOS标记的炎性巨噬细胞在不稳定斑块的纤维帽处聚集并伴随MMP-9分泌。体外过表达CCL3-AS1特异性促进巨噬细胞MMP-9而非其他MMP分泌,反之,敲低CCL3-AS1抑制巨噬细胞MMP-9分泌和炎性活动。本研究强调了巨噬细胞是决定斑块稳定性的关键细胞,CCL3-AS1是介导巨噬细胞炎性活动和分泌功能从而影响斑块稳定性的关键分子。

lncRNA是一类长度超过200个核苷酸的单链RNA,可形成复杂的二级结构,作为诱饵或分子支架,在转录后水平调控多种基因表达。本研究

通过生物信息学预测和RIP实验发现CCL3-AS1与hnRNP-K蛋白存在相互作用。hnRNP-K属于hnRNP核蛋白超家族,是一种DNA/RNA结合蛋白,同时存在于多种亚细胞结构中,通过影响mRNA转录、前体mRNA加工、剪接、转运和翻译等途径参与调控细胞周期、细胞凋亡、信号传导等多种生物学过程^[30]。目前hnRNP-K的研究主要集中在肿瘤领域,其在动脉粥样硬化中的作用机制尚不明确^[31]。hnRNP-K主要包括3个K同源结构域(K homology domains, KHs):KH1、KH2和KH3,其中KH3可作为一个独立结构域与DNA/RNA结合,发挥重要调控作用。研究^[31-32]表明, hnRNP-K可通过结合lncRNA介导其对靶基因的调控功能,如Xist RNA可在hnRNP-K帮助下通过染色体沉默调控基因表达; circ-0075804通过hnRNP-K结合并维持转录因子E2F3 mRNA稳定性; lncRNA-p21通过hnRNP-K与p53结合抑制其效应基因表达。本研究发现在巨噬细胞中CCL3-AS1可能作为分子支架与hnRNP-K结合后提高MMP-9 mRNA稳定性和表达水平。

综上,本研究发现了影响颈动脉斑块稳定性的新lncRNA CCL3-AS1,该分子通过hnRNP-K/MMP-9通路促进巨噬细胞活动性炎症,加速颈动脉斑块不稳定。

作者贡献声明:王思婷完成本文相关分子和细胞生物学实验;谢和健完成本文相关动物实验;杨淑均负责实验设计、研究指导、论文审阅、经费支持;谢伟参与实验设计、研究指导、论文审阅。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Pakizer D, Kozel J, Taffé P, et al. Diagnostic accuracy of carotid plaque instability by noninvasive imaging: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2024, 25(10): 1325-1335. doi:10.1093/ehjci/jeae144.
- [2] 王迁, 刘思博, 龙安妮, 等. 非手术指征颈动脉斑块患者缺血性脑卒中的危险因素分析[J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(1):84-91. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.01.012.
- Wang Q, Liu SB, Long AN, et al. Analysis of risk factors for ischemic stroke in patients with carotid plaque of no surgical indication[J]. China Journal of General Surgery, 2019, 28(1): 84-91. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.01.012.

- [3] 马博,叶志东,刘鹏. 欧洲血管外科学会2023版《动脉粥样硬化性颈动脉和椎动脉疾病管理的临床实践指南》解读[J]. 中国普通外科杂志, 2023, 32(12): 1829–1841. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2023.12.002](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.12.002).
- Ma B, Ye ZD, Liu P. Interpretation of the European Society for Vascular Surgery(ESVS)2023 Clinical Practice Guidelines on the Management of Atherosclerotic Carotid and Vertebral Artery Disease[J]. China Journal of General Surgery, 2023, 32(12): 1829–1841. doi:[10.7659/j.issn.1005-6947.2023.12.002](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2023.12.002).
- [4] 刘鹏,樊雪强,叶志东. 颈动脉内膜切除术和支架植入术的合理选择[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(6): 715–718. doi:[10.7659/j.issn.1005-6947.2014.06.001](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2014.06.001).
- Liu P, Fan XQ, Ye ZD. Rational choice of carotid endarterectomy and carotid artery stenting[J]. China Journal of General Surgery, 2014, 23(6): 715–718. doi:[10.7659/j.issn.1005-6947.2014.06.001](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2014.06.001).
- [5] Chang X, Zhu H, Guo Z, et al. Expert consensus on the diagnosis and management of carotid atherosclerotic plaque: pathophysiology, clinical management, and preventive approaches[J]. Int J Med Sci, 2025, 22(11): 2738–2756. doi: [10.7150/ijms.107479](https://doi.org/10.7150/ijms.107479).
- [6] Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, et al. Mechanisms of plaque formation and rupture[J]. Circ Res, 2014, 114(12): 1852–1866. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.114.302721](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721).
- [7] Williams JW, Zaitsev K, Kim KW, et al. Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression[J]. Nat Immunol, 2020, 21(10): 1194–1204. doi:[10.1038/s41590-020-0768-4](https://doi.org/10.1038/s41590-020-0768-4).
- [8] 陈忠,杨耀国. 颈动脉易损斑块诊断方法的选择[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(12): 1511–1515. doi: [10.3978/j.issn.1005-6947.2017.12.001](https://doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.12.001).
- Chen Z, Yang YG. Selection of diagnostic method for carotid artery vulnerable plaque[J]. China Journal of General Surgery, 2017, 26(12): 1511–1515. doi:[10.3978/j.issn.1005-6947.2017.12.001](https://doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.12.001).
- [9] Rizzacasa B, Amati F, Romeo F, et al. Epigenetic modification in coronary atherosclerosis: JACC review topic of the week[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74(10): 1352–1365. doi: [10.1016/j.jacc.2019.07.043](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.07.043).
- [10] Petkovic A, Erceg S, Munjas J, et al. LncRNAs as regulators of atherosclerotic plaque stability[J]. Cells, 2023, 12(14): 1832. doi: [10.3390/cells12141832](https://doi.org/10.3390/cells12141832).
- [11] Chen YC, Bui AV, Diesch J, et al. A novel mouse model of atherosclerotic plaque instability for drug testing and mechanistic/therapeutic discoveries using gene and microRNA expression profiling[J]. Circ Res, 2013, 113(3): 252–265. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.113.301562](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301562).
- [12] Yang S, Li J, Chen Y, et al. microRNA-216a promotes M1 macrophages polarization and atherosclerosis progression by activating telomerase via the Smad3/NF- κ B pathway[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(7): 1772–1781. doi: [10.1016/j.bbadis.2018.06.016](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.06.016).
- [13] Sharifi MA, Wierer M, Dang TA, et al. ADAMTS-7 modulates atherosclerotic plaque formation by degradation of TIMP-1[J]. Circ Res, 2023, 133(8): 674–686. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.123.322737](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.322737).
- [14] Liu X, Li X, Wang X, et al. Single-cell RNA-seq analysis of mouse carotid artery under disturbed flow and human carotid plaques identifies key cell populations in atherosclerosis development[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 20747. doi:[10.1038/s41598-025-07395-7](https://doi.org/10.1038/s41598-025-07395-7).
- [15] Li X, Chen Y, Cao X, et al. Inflammatory macrophage-targeted atherosclerosis treatment by miRNA-delivered, MRI-visible, and anti-inflammatory nanomedicine[J]. ACS Nano, 2025, 19(22): 20472–20490. doi:[10.1021/acsnano.4c16585](https://doi.org/10.1021/acsnano.4c16585).
- [16] Bai Q, Lao X, Pang SY, et al. Plaque-targeted delivery of fluoride-free MXene nanozyme for alleviating atherosclerosis via sonocatalytic therapy[J]. Adv Mater, 2025: e2420189. doi: [10.1002/adma.202420189](https://doi.org/10.1002/adma.202420189).
- [17] Qi L, Luo DZ, Li H, et al. Macrophage-driven exosomes regulate the progression of cardiovascular disease[J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1563800. doi:[10.3389/fphar.2025.1563800](https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1563800).
- [18] Poredoš P, Cevc M, Blinc A. Characteristics of atherosclerosis in femoropopliteal artery and its clinical relevance[J]. Atherosclerosis, 2021, 335: 31–40. doi:[10.1016/j.atherosclerosis.2021.09.012](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.09.012).
- [19] Slys J, Sinha A, DeBerge M, et al. Single-cell profiling reveals inflammatory polarization of human carotid versus femoral plaque leukocytes[J]. JCI Insight, 2023, 8(17): e171359. doi: [10.1172/jci.insight.171359](https://doi.org/10.1172/jci.insight.171359).
- [20] Kunte H, Kunte G, Busch MA, et al. Differences in carotid plaque content of macrophages, T cells and MMP-9 between patients with embolic and hemodynamic cerebral ischemia due to symptomatic carotid stenosis[J]. Atherosclerosis, 2010, 211(2): 456–460. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2010.03.005](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.03.005).
- [21] 马骧,欧阳尧明,景在平,等. lncRNA在血管疾病中的作用机制研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(12): 1792–1795. doi: [10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.020](https://doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.020).
- Ma X, Ouyang YM, Jing ZP, et al. Research progress in action mechanisms of lncRNAs in vascular diseases[J]. China Journal of General Surgery, 2016, 25(12): 1792–1795. doi: [10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.020](https://doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.020).
- [22] Yin X, Chen X, Wang T, et al. LncRNA SCARNA8 promotes atherosclerotic plaque instability by inhibiting macrophage efferocytosis[J]. Epigenetics, 2025, 20(1): 2487317. doi: [10.1080/15592294.2025.2487317](https://doi.org/10.1080/15592294.2025.2487317).

- [23] Zhang S, Sun Y, Xiao Q, et al. Lnc_000048 promotes histone H3K4 methylation of MAP2K2 to reduce plaque stability by recruiting KDM1A in carotid atherosclerosis[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(5): 2572–2586. doi:10.1007/s12035-023-03214-0.
- [24] Hung J, Scanlon JP, Mahmoud AD, et al. Novel plaque enriched long noncoding RNA in atherosclerotic macrophage regulation (PELATON)[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(3): 697–713. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313430.
- [25] Chen DD, Hui LL, Zhang XC, et al. NEAT1 contributes to ox-LDL-induced inflammation and oxidative stress in macrophages through inhibiting miR-128[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(2): 2493–2501. doi:10.1002/jcb.27541.
- [26] Shi W, Song J, Weiner JM 3rd, et al. lncRNA CDKN2B-AS1 regulates collagen expression[J]. *Hum Genet*, 2024, 143(7): 907–919. doi:10.1007/s00439-024-02674-1.
- [27] Lu R, Cai H, Liu Y, et al. Long non-coding RNA AK023617 orchestrates atherosclerosis by regulating the circadian rhythm of immunity-related GTPase family M protein in macrophages[J]. *Noncoding RNA Res*, 2024, 11: 262–272. doi: 10.1016/j.ncrna.2024.12.008.
- [28] Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2014, 115(7): 668–677. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303836.
- [29] Kumarswamy R, Bauters C, Volkmann I, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure[J]. *Circ Res*, 2014, 114(10): 1569–1575. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303915.
- [30] Das U, Nguyen H, Xie J. Transcriptome protection by the expanded family of hnRNPs[J]. *RNA Biol*, 2019, 16(2): 155–159. doi: 10.1080/15476286.2018.1564617.
- [31] Wang Z, Wang Z, Qiu H, et al. The emerging roles of hnRNPK[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(3):1995–2008. doi:10.1002/jcp.29186.
- [32] Zhao W, Wang S, Qin T, et al. Circular RNA (circ-0075804) promotes the proliferation of retinoblastoma via combining heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK) to improve the stability of E2F transcription factor 3 E2F3[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(7):3516–3525. doi:10.1002/jcb.29631.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:王思婷, 谢和健, 杨淑均, 等. 巨噬细胞富集 lncRNA CCL3-AS1 在颈动脉斑块不稳定中的表达及作用机制[J]. 中国普通外科杂志, 2025, 34(6): 1196–1208. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.250071

Cite this article as: Wang ST, Xie HJ, Yang SJ, et al. Expression and mechanistic role of macrophage-enriched lncRNA CCL3-AS1 in carotid plaque instability[J]. *Chin J Gen Surg*, 2025, 34(6):1196–1208. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250071