

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.18.001

• 基础研究 •

miR-448-3p 通过调节 KLF5 的表达抑制颅内动脉瘤进展*

张建忠^{1,2#} 陈丹^{3#} 许政¹ 王君玉¹ 韩凯伟¹ 侯立军^{1Δ}

(1 上海市海军军医大学附属长征医院神经外科 上海 200003;

2 上海市海军军医大学附属海军特医学中心神经外科(解放军第 455 医院神经外科) 上海 200052;

3 上海市海军军医大学附属海军特医学中心骨科(解放军第 455 医院骨科) 上海 200052)

摘要 目的:明确 miR-448-3p 对颅内动脉瘤发展的影响。**方法:**我们通过结扎左侧肾动脉和左侧颈总动脉的方法建立大鼠 IA 模型;qRT-PCR 用于检测 miR-448-3p 表达;qRT-PCR 和 western blot 用于检测 KLF5 mRNA 和蛋白表达;qRT-PCR 和 ELISA 法用于检测炎症因子水平。**结果:**我们发现 IA 诱导大鼠中 miR-448-3p 表达下调,而 KLF5 表达上调。我们发现并鉴定出 KLF5 是平滑肌细胞中 miR-448-3p 的直接靶点。此外,miR-448-3p 处理使得 IA 诱导 4 周后动脉瘤大小和瘤腔截面积变小。miR-448-3p 处理保护了 IA 诱导后的壁厚比,抑制了巨噬细胞浸润。IAs 引起 KLF5 表达显著增加,被 miR-448-3p 处理后表达显著降低。我们还发现 miR-448-3p 在脂多糖诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞中具有抗炎作用。脂多糖促进 KLF5、MMP2、MMP9 的表达水平,但却被 miR-448-3p 所抑制。**结论:**研究结果表明,miR-448-3p 可以抑制 IA 的进展,其机制可能是通过下调 KLF5 的介导的炎症反应。

关键词: 颅内动脉瘤;miR-448-3p;KLF5;巨噬细胞;炎症**中图分类号:** R-33;R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)18-3401-06miR-448-3p Suppressed Intracranial Aneurysm
by Inhibiting KLF5 Expression*ZHANG Jian-zhong^{1,2#}, CHEN Dan^{3#}, XU Zheng¹, WANG Jun-yu¹, HAN Kai-wei¹, HOU Li-jun^{1Δ}

(1 Department of Neurosurgery, Neurosurgery Research Institution of Shanghai, Changzheng Hospital, Naval Military Medical University (The Second Military Medical University), Shanghai, 200003, China;

2 Department of Neurosurgery, Naval Special Medical Center, Naval Military Medical University (The Second Military Medical University), , Shanghai, 200052, China;

3 Department of Orthopedics, Naval Special Medical Center, Naval Military Medical University(The Second Military Medical University), Shanghai, 200052, China)

ABSTRACT Objective: To determine the function of miR-448-3p in intracranial aneurysm (IA) development. **Methods:** We created a rat model of IA by ligating the left renal artery and the left common carotid artery. The expression of miR-448-3p was detected by qRT-PCR assay, and KLF5 mRNA and protein levels were measured by qRT-PCR and western blot. Inflammatory cytokines were measured by qRT-PCR and ELISA assay. **Results:** We found that miR-448-3p was decreased and KLF5 was increased in IA rats. We showed that KLF5 was a direct target of miR-448-3p in SMCs. In addition, aneurysms size and the lumen area of the aneurysms were smaller 4 weeks after IA induction in the miR-448-3p-treated IA rats. miR-448-3p treatment protected the wall thickness ratio and inhibited macrophage infiltration after IA induction. IA caused an increase in KLF5 expression and miR-448-3p alleviated KLF5 expression. Moreover, the anti-inflammatory effect of miR-448-3p was verified in lipopolysaccharide -stimulated RAW 264.7 macrophage cells. The expression levels of KLF5, MMP2, and MMP9 levels were elevated by LPS, and were attenuated by miR-448-3p. **Conclusions:** All data indicate that miR-448-3p have the inhibitory role in IA progression, suggesting that miR-448-3p is crucial for preventing the development of IA through suppressing the macrophage-mediated inflammation.

Key words: Aneurysm; miR-448-3p; KLF5; Macrophage; Inflammation**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R739.41 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2020)18-3401-06

* 基金项目:上海市长宁区科学技术委员会基金项目(CNKW2016Y29);国家自然科学基金青年科学基金项目(81801141)

为共同第一作者

作者简介:张建忠,医学博士,主治医师,主要从事脑血管病的基础研究和临床治疗;

陈丹,医学学士,主管护师,主要从事脊髓神经创伤病人的临床护理

Δ 通讯作者:侯立军,医学博士,主任医师,教授,主要从事脑血管病和颅底微创外科治疗

(收稿日期:2020-02-28 接受日期:2020-03-23)

前言

颅内动脉瘤(Intracranial aneurysm, IA)是指颅内动脉管腔的局限性异常扩张、膨出,常发于颅底动脉分叉处,多见于 Willis 环及其主要分支上,患病率约为 3.6%至 6%^[1-3]。蛛网膜下腔出血引起的 IA 破裂是一个危及生命的事件,死亡率约 65%^[4]。因此,预防 IA 的生长和破裂具有重要的社会意义。

KLF5 属于 Krüppel 样转录因子家族,它们在血管生成、增殖、迁移和炎症等在众多细胞生理病理变化过程中发挥着重要作用^[5-8]。KLF5 是一种对血管重构非常重要的转录因子,靶向阻断 KLF5 可显著降低血管紧张素 II 介导的血管重构^[9]。SRSF1 通过调控 $\Delta 133p53/EGR1/KLF5$ 通路促进血管平滑肌细胞增殖^[10]。值得注意的是,抑制 KLF5 介导的巨噬细胞足细胞形成可改善腹主动脉瘤^[9]。既往有报道 KLF5 在大的未破裂脑动脉瘤中高度表达;然而,其在 IA 发展中的意义还有待阐明。

microRNA(miRNAs)是一类约为 21-25 核苷酸长小的非编码 RNA,通过与靶 mRNA 的 3' 未翻译区域(3'UTR)相互作用抑制基因表达,从而导致靶 mRNA 降解或翻译抑制^[11-13]。IA 研究的一个新方向是 miRNAs 的调制。miR-9 通过抑制细胞增殖和降低细胞的收缩性,促进 IA 的发展^[14]。下调 miR-29b 通过激活 atg14 介导的自噬,诱导 VSMCs 表型调控,并与 IAs 的形成、生长和破裂相关^[15]。研究表明,抑制 miR-448-3p 可导致扩张型心肌病和心律失常^[16]。尤其,miR-448-3p 通过直接靶向 MEF2C mRNA 促进血管 SMC 增殖和迁移^[17]。因此,我们推测 miR-448-3p 可能参与 IA 进展。

我们采用大鼠构建 IA 模型,且发现 IA 引起 miR-448-3p 下调和 KLF5 上调。在本研究中,我们通过调节 KLF5 的表达来确定 miR-448-3p 是否影响巨噬细胞浸润影响 IA 形成。

1 材料与方法

1.1 大鼠 IA 模型制作

所有动物实验均按照动物护理和使用机构委员会批准进行。实验方案经海军军医大学附属上海长征医院审核批准。所有实验均采用 7 周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠,并随机分为 3 组。我们按照以前方法创建 IA 大鼠模型来诱导 IA。简单来说,大鼠腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)诱导麻醉,然后结扎左侧肾动脉和左侧颈总动脉,增加对侧大脑前动脉/嗅动脉分叉处血流动力学冲击。大鼠饲喂含 8%氯化钠和 0.12% 3-氨基丙醇的饲料,诱导后给予自由饲料。

1.2 组织学分析

生理压力下左心室穿刺并采用 4%多聚甲醛灌注后,将大脑前动脉/嗅动脉(ACA/OA)分叉部剥离冷冻进行组织学分析。)获得的样本放到 4%多聚甲醛中固定后,通过梯度酒精脱水、透明、石蜡包埋,切成 4 μ m 厚的切片,然后进行苏木精-伊红染色染色,观察动脉瘤的病理变化(动脉瘤的大小,壁厚比,以及动脉瘤的管腔面积)。

1.3 细胞培养与转染

酶消化法分离大鼠主动脉平滑肌细胞,在 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清,2 mmol/L 左旋谷酰胺中和 100 mg/L 庆大霉素)湿度为 95%空气/5%二氧化碳的温度为 37 度下培养。

RAW 264.7 细胞在 DMEM (10%胎牛血清、l-谷氨酰胺和 1%青霉素、链霉素和两性霉素 B 溶液)中培养。miR-448-3p mimic 模拟物和阴性对照 miRNA (miR-ctrl)均购自中国广东锐博生物有限公司,采用 Lipofectamine 2000 进行转染。转染 48 小时后,收集细胞进行后续实验。

1.4 荧光素酶报告实验

野生型(Wt)或突变(Mt)KLF5 3' UTR 生成和克隆到 psiCHECK-2 荧光素酶报告质粒中。转染的前一天 HEK293 细胞放入六孔板,然后将 KLF5 3' UTR Wt 或 KLF5 3' UTR Mt 质粒和 miR-448-3p mimic 或其对照共转染到细胞中。采用双荧光素酶报告试验系统测定海肾荧光素酶与萤火虫荧光素酶活性。

1.5 qRT-PCR 分析

采用 TRIzol 试剂提取组织或培养细胞的总 RNA,用 RealScript RT 试剂盒把 1 μ g 总 RNA 合成 cDNA。qRT-PCR 用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行检测。U6 作为 miRNA 的内参,GAPDH 作为 mRNA 的内参。各样品的目的基因和管家基因分别进行 qRT-PCR 反应,每个基因设置 3 个重复孔,按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算个基因表达的相对值。

1.6 蛋白质免疫印迹

细胞在 RIPA 缓冲液中裂解,用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。在 10%凝胶上用 SDS-PAGE 分析总蛋白,并将其转移到聚偏氟乙烯膜上。置于 5% BSA 溶液中室温孵育 1 小时,然后用封闭液封闭。封闭过的 PVDF 膜加入一抗(抗 KLF5 抗体),然后加入加入 HRP 标记的二抗孵育。 β -actin 作为目标蛋白内参,增强化学发光法检测条带。

1.7 炎症细胞因子的定量测定

用 10 ng/mL 脂多糖(LPS)刺激细胞 24 小时,采用酶联免疫试剂盒检测细胞上清液中炎症因子(TNF- α 、MCP-1 和 IL-6)含量。

1.8 慢病毒注射

将 miR-448-3p pre-miRNA 和 miR-ctrl 分别克隆到慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 中,单独表达 GFP 的慢病毒载体作为对照。将包装质粒 psPAX2 和 pMD 与 pCDH-miR-448-3p 或 pCDH-control 载体用 Lipofectamine 2000 共转染 HEK293T 细胞,48 小时后收集病毒颗粒。将表达 miR-448-3p 的慢病毒腹膜内注射,每只大鼠在 IA 诱导后 1 天内注射,并每周重复注射 4 周。

1.9 统计分析

本实验所有数据都有均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SD)表示。数据采用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析。在只比较两组的情况下,采用 *t* 检验分析两组之间的差异,多组间差别分析采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为该差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 KLF5 在 IA 大鼠模型中表达显著上调,而 miR-448-3p 表达下调

我们通过结扎左肾动脉和左颈总动脉建立大鼠 IA 模型。与对照大鼠相比,动脉瘤大鼠模型诱导 4 周后大脑前动脉/嗅动脉分叉部分的 HE 染色显示动脉瘤壁较薄及其破坏性严重(图 1A)。为了探究 miR-448-3p 和 KLF5 在 IA 中的作用,我们

首先检测了 miR-448-3p 和 KLF5 在 IA 大鼠和假手术对照组大鼠动脉壁组织中的表达。qRT-PCR 结果显示 IA 模型大鼠动脉壁中 miR-448-3p 表达较在假手术对照组中显著降低,而 KLF5 mRNA 表达明显上调(图 1B 和 1C)。Western blot 证实

IA 大鼠动脉中 KLF5 蛋白表达较假手术大鼠中的表达显著增加(图 1D)。这些结果表明,miR-448-3p 和 KLF5 的异常表达可能与 IA 进展有关。

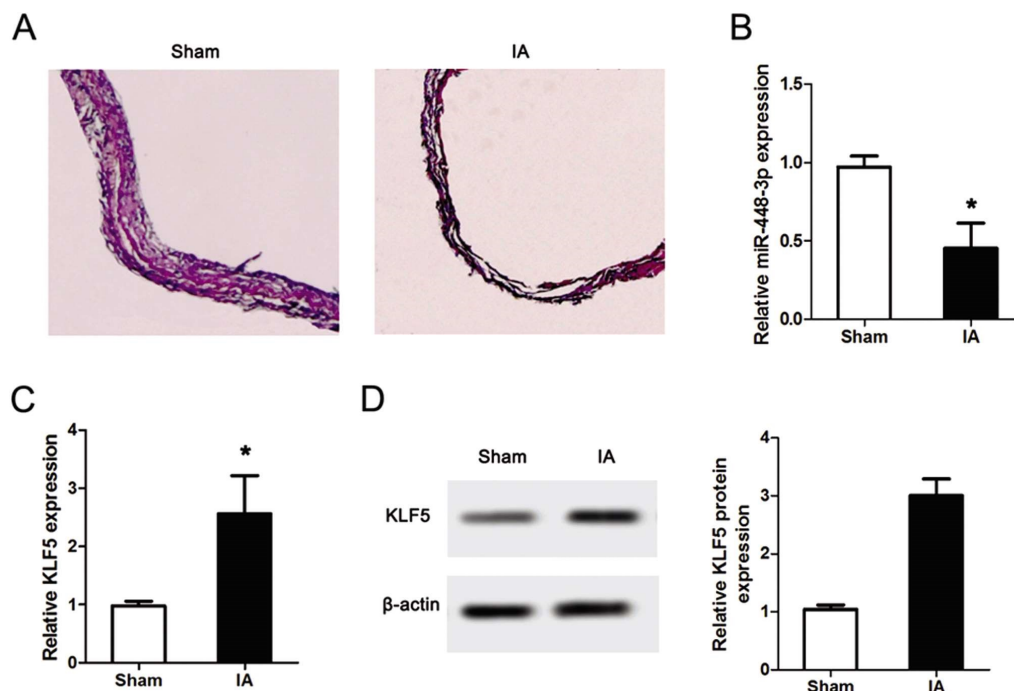


图 1 在 IA 大鼠模型中,KLF5 表达上调,而 miR-448-3p 表达下调。(A)IA 诱导 4 周后,IA 诱导模型组和假手术组大鼠 ACA/OA 分叉的 HE 染色。(B,C)通过 qRT-PCR 分析,miR-448-3p 和 KLF5 在 IA 大鼠和假手术组大鼠动脉壁中的表达。

(D)Western blot 法检测 KLF5 蛋白表达。* $P<0.05$ 。

Fig.1 KLF5 was upregulated and miR-448-3p was downregulated in the rat model of IA. (A) HE staining of the ACA/OA bifurcation in a rat 4 weeks after aneurysm induction and in a sham-operated control rat; $n=6$ in the sham group; $n=12$ in the IA group.

(B, C) The expression of miR-448-3p and KLF5 was evaluated in arterial walls from IA rats and sham-operated control rats by qRT-PCR analysis.

(D) Representative photographs of immunohistochemical staining for KLF5 in cerebral arteries from IA and sham groups. * $P<0.05$.

2.2 KLF5 是 miR-448-3p 的靶点

生物信息学软件显示,KLF5 的 3'UTR 含有 miR-448-3p 的结合位点。把 miR-448-3p 过表达载体和 Wt-KLF5 3'UTR-psiCHECK-2 质粒或 Mt1-KLF5 3'UTR-psiCHECK-2 质粒或 Mt2-KLF5 3'UTR-psiCHECK-2 质粒或 Mt1+Mt2-KLF5 3'UTR-psiCHECK-2 质粒共转染 HKT293 细胞 48h 后进行检测。检测结果显示:Wt-KLF5 3'UTR-psiCHECK-2 质粒同 miR-448-3p 共转染后,荧光素强度显著下降,而 Mt1+Mt2-KLF5 3'UTR-psiCHECK-2 质粒同 miR-448-3p mimics 共转染细胞后,荧光强度无明显改变(图 2B)。后续实验表明,miR-448-3p 过表达显著降低了 KLF5 的 mRNA 和蛋白表达(图 2C-E)。这结果提示 miR-448-3p 可能通过与 KLF5 的 3'UTR 上的结合位点结合来抑制 KLF5 的表达,KLF5 可能是 miR-448-3p 直接作用的下游靶基因。

2.3 miR-448-3p 过表达抑制大鼠 IA 的发生

另外,我们发现注射 miR-448-3p 过表达慢病毒的 IA 大鼠中 miR-448-3p 表达较 IA 大鼠中的表达升高,而注射过表达 miR-448-3p 组 KLF5 表达明显降低(图 3A 和 B)。在手术 IA 诱导后 4 周后,miR-448-3p 治疗组与 mir-ctrl 组相比动脉瘤体积明显减小,壁厚比明显升高和动脉瘤的管腔面积较小(图

3C-E)。此外,我们还证实了 miR-448-3p 可以明显抑制 IA 中病灶巨噬细胞浸润(图 3F)。这些结果表明,miR-448-3p 可能是通过抑制 KLF5 的表达对 IA 有较强的预防作用。

2.4 miR-448-3p 过表达抑制 IA 中巨噬细胞浸润和活化

巨噬细胞浸润和活化在长期炎症中发挥重要作用,并与 IA 的形成有关,因此我们研究了 miR-448-3p 在 IA 大鼠巨噬细胞浸润中的作用。如图 4A 所示,miR-448-3p 处理的 IA 大鼠动脉中巨噬细胞标记物 CD68 的 mRNA 表达显著增加。miR-448-3p 处理显著抑制了 IA 大鼠动脉壁中 MCP-1、IL-6 和 TNF- α 促炎因子的表达(图 4B-D)。另外,MCP-1、TNF- α 和 IL-6 在脂多糖诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞中表达明显上调,而过表达 miR-448-3p 明显减轻脂多糖引起的 MCP-1、TNF- α 和 IL-6 表达(图 4E)。与上述结果相似,脂多糖也能引起 KLF5、MMP2 和 MMP9 水平升高,而 miR-448-3p 能减弱这一变化(图 4F)。所有这些数据表明,miR-448-3p 抑制巨噬细胞的炎症活化,减少 IA 的形成。

3 讨论

动脉瘤的发生和发展涉及复杂的病理机制,但 IA 的分子发病机制尚不清楚。在本研究中,我们建立了 IA 大鼠模型,发

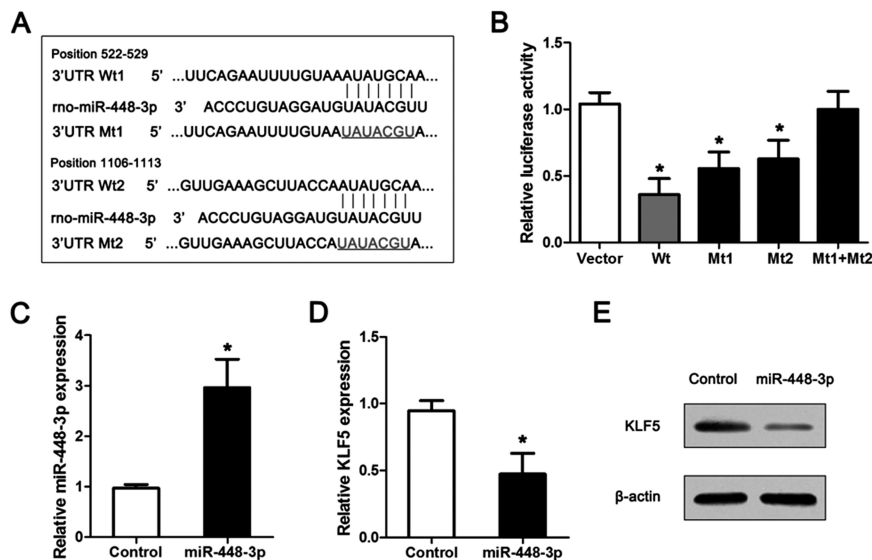


图2 KLF5 是 miR-448-3p 的直接靶点。(A) miR-448-3p KLF5 3' UTR 野生型(Wt)或突变体(Mt)目标序列。

(B) 萤光素酶实验。(C) miR-448-3p 在转染 miR-448-3p mimic 模拟物或阴性对照的 SMCs 中表达。

(D,E) KLF5 在转染 miR-448-3p mimic 模拟物或阴性对照的 SMCs 中 mRNA 和蛋白表达。* $P < 0.05$ 。

Fig.2 KLF5 is the direct target of miR-448-3p. (A) Wild-type (Wt) or mutant (Mt) miR-448-3p target sequences in the KLF5 3' UTR. (B) Relative luciferase activity of SMCs after cotransfection with the Wt or Mt KLF5 3' UTR reporter genes along with MIR-448-3p mimics or control.

(C) Expression of miR-448-3p was determined in SMCs transfected with miR-448-3p mimics or negative control. (D and E) The mRNA and protein level of KLF5 were measured in SMCs transfected with miR-448-3p mimics or negative control. * $P < 0.05$.

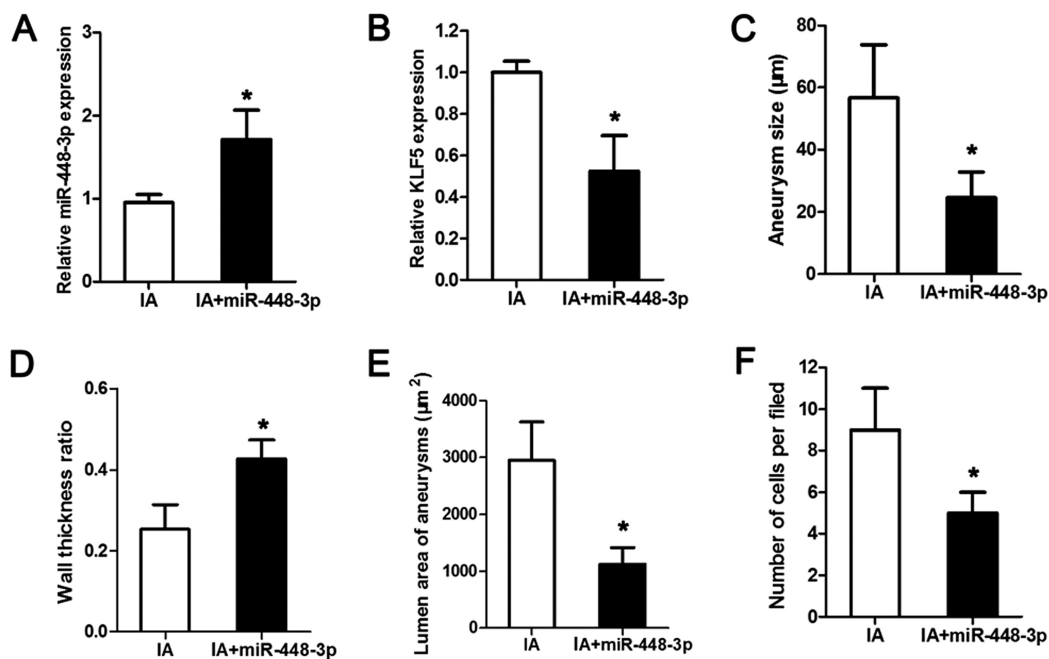


图3 miR-448-3p 治疗对 IA 诱导有较强的预防作用。(A,B) 检测 miR-448-3p 和 KLF5 在 IA 组和 IA+miR-448-3p 组中的表达。在 IA 诱导后 4 周制备 ACA/OA 分叉处诱导的 IA 标本,并测量(C)动脉瘤大小,(D)壁厚比,(E)动脉瘤管腔面积和(F)巨噬细胞浸润病灶的数目。* $P < 0.05$ 。

Fig.3 MiR-448-3p treatment had a potent preventive effect against IA induction. Examples of IAs in groups IA and IA+miR-448-3p. The aneurysm at 4 weeks after the operation in the IA group (left) and in the miR-448-3p-treated IA group. Specimens of IA induced at the ACA/OA bifurcation were prepared 4 weeks after the IA induction. (A and B) miR-448-3p and KLF5 expression were determined in the two groups. The aneurysm size (C), wall thickness ratio (D), the luminal area of aneurysms (E), and the number of macrophages infiltrating the lesion (F) were examined. * $P < 0.05$.

现 IA 大鼠动脉壁中 miR-448-3p 表达较对照组减少,而 KLF5 表达增加。我们发现 miR-448-3p 通过其对巨噬细胞的抗炎作用防止了 IA 的生长。KLF5 被发现是 miR-448-3p 调节 IA 中主要靶标,这促使我们对 IA 的新治疗靶点的探索。

研究表明 KLF5 参与低氧肺动脉高压、心肌肥厚和动脉粥

样硬化发展^[18-20]。一项研究表明,在腹主动脉瘤的发展过程中,足细胞的形成和巨噬细胞的迁移需要依赖于 KLF5 对 Myo9b/RhoA 的调节^[21]。然而,KLF5 参与 IA 形成的可能作用和机制尚不清楚。在此,我们确定 KLF5 在 IA 大鼠模型的动脉壁中显著上调。血管平滑肌衰竭或发育不全不是脑动脉瘤的常见

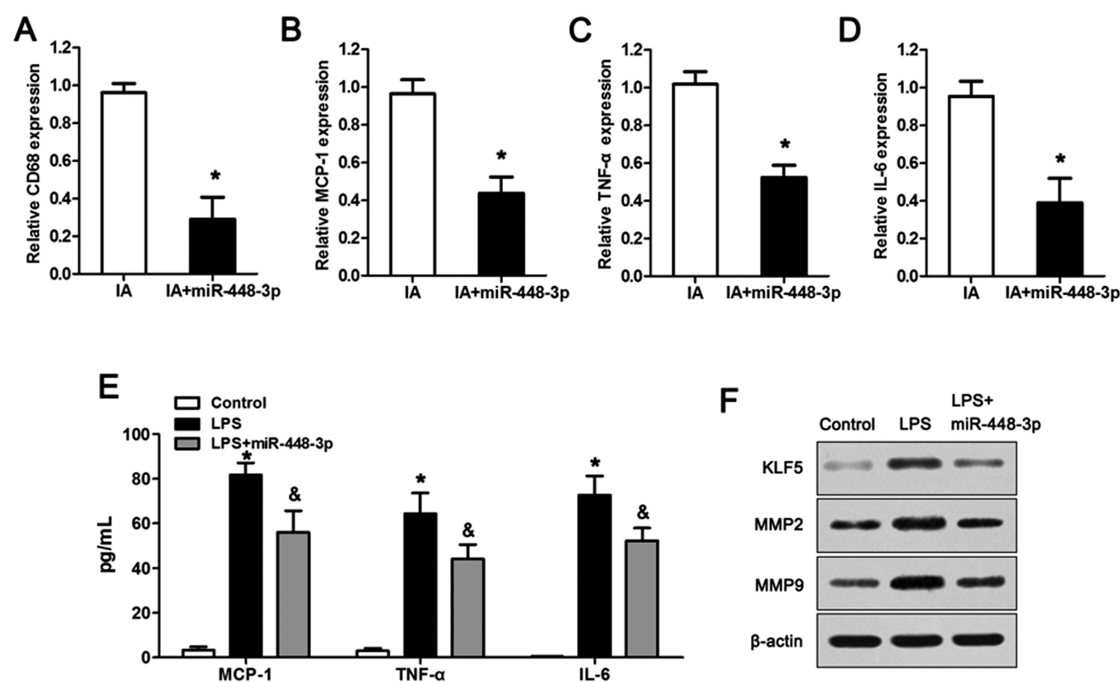


图4 miR-488-3p 过表达抑制 IA 中巨噬细胞浸润和活化。(A-D)qRT-PCR 法检测 CD68、MCP-1、TNF- α 和 IL-6 在 IA 大鼠和 miR-488-3p 处理 IA 大鼠组动脉壁中的表达。(E)ELISA 法检测炎症细胞因子 MCP-1、TNF- α 和 IL-6 水平。(F)Western blot 检测 KLF5、MMP2、MMP9 蛋白在对照组、LPS 组和 LPS+miR-488-3p 组中的表达情况。* $P < 0.05$ 。

Fig.4 KLF5 expression was determined by immunofluorescent staining in the rat model of IA. (A-D) The mRNA expression of Cd68, MCP-1, TNF- α , and IL-6 in cerebral arteries was evaluated by qRT-PCR. (E) The levels of inflammatory cytokines were measured by ELISAs. (F) The protein expression of KLF5, MMP2, and MMP9 was assessed by western blotting in groups control, LPS, and LPS+miR-488-3p.

表现;并且在 IA 形成过程中,血管平滑肌细胞可以将其表型从收缩的表型转变为促炎和基质重塑表型^[22-25]。研究表明,miR-488-3p 通过直接靶向 MEF2C mRNA 促进血管 SMC 的增殖和迁移^[17]。在本研究中,我们观察到 IA 大鼠模型中 miR-488-3p 表达下调,提示 miR-488-3p 可能参与 IA 的发病机制。另外,我们鉴定出 KLF5 是 miR-488-3p 靶基因。miR-488-3p 过表达导致 SMCs 中 KLF5 水平显著下降。此外,IA 导致 KLF5 表达显著增加,miR-488-3p 过表达逆转了这一效应。与对照组大鼠相比,IA 大鼠动脉瘤壁较薄,但 miR-488-3p 注入 IA 组动脉瘤壁变薄明显减轻。

IA 作为一个潜在的致命性的临床问题,炎症是其发病机制中的重要环节^[26,27]。巨噬细胞浸润和活化在慢性炎症中起关键作用,并与 IA 的进展有关^[28]。炎症涉及巨噬细胞的存在,然后产生促炎因子和基质金属蛋白酶,诱导动脉壁细胞成分降解,导致动脉壁变薄^[29]。浸润进血管壁的巨噬细胞在血管中膜和外膜分泌大量炎症细胞因子,如:TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 和 IL-6,进一步加剧炎症反应。在本研究中,我们研究了 miR-488-3p 在 IA 大鼠巨噬细胞浸润中的作用。miR-488-3p 处理显著抑制了 IA 大鼠动脉壁中 MCP-1、IL-6 和 TNF- α 促炎因子的表达。另外,MCP-1、TNF- α 和 IL-6 在脂多糖诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞中表达明显上调,而过表达 miR-488-3p 明显减轻脂多糖引起的 MCP-1、TNF- α 和 IL-6 表达。与上述结果相似,脂多糖也能引起 KLF5、MMP2 和 MMP9 水平升高,而 miR-488-3p 能减弱这一变化。所有这些数据表明,miR-488-3p 抑制巨噬细胞的炎症活化,减少 IA 的形成。在这里,我们展示

了 miR-488-3p 对巨噬细胞的抗炎作用,其部分依赖于抑制 KLF5 的表达。

总之,本研究结果提示,miR-488-3p/KLF5 表达参与了 IA 发生与进展,miR-488-3p 的过表达可能是抑制 IA 进展的一种新的治疗方法。

参考文献(References)

- [1] Alfano JM, Kolega J, Natarajan SK, et al. Intracranial aneurysms occur more frequently at bifurcation sites that typically experience higher hemodynamic stresses[J]. *Neurosurgery*, 2013, 73(3): 497-505
- [2] Slatore N, Talibi SS, Mundil N, et al. Paediatric intracranial aneurysms: a British institutional review [J]. *Childs Nerv Syst*, 2019, 35(7): 1197-1205
- [3] Wei L, Yang C, Li KQ, et al. 3-Aminobenzamide protects against cerebral artery injury and inflammation in rats with intracranial aneurysms[J]. *Pharmazie*, 2019, 74(3): 142-146
- [4] Rinkel GJ. Natural history, epidemiology and screening of unruptured intracranial aneurysms[J]. *J Neuroradiol*, 2008, 35(2): 99-103
- [5] Azami T, Matsumoto K, Jeon H, et al. KLF5 suppresses ERK signaling in mouse pluripotent stem cells[J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0207321
- [6] Cai W, Xu Y, Yin J, et al. miR590-5p suppresses osteosarcoma cell proliferation and invasion via targeting KLF5 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 2328-2334
- [7] Liang H, Sun H, Yang J, et al. miR1455p reduces proliferation and migration of hepatocellular carcinoma by targeting KLF5 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 8332-8338
- [8] Li Y, Li J, Hou Z, et al. KLF5 overexpression attenuates cardiomyocyte inflammation induced by oxygen-glucose deprivation

- /reperfusion through the PPARgamma/PGC-1alpha/TNF-alpha signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 940-946
- [9] Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, et al. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling [J]. *Nat Med*, 2002, 8(8): 856-863
- [10] Xie N, Chen M, Dai R, et al. SRSF1 promotes vascular smooth muscle cell proliferation through a Delta133p53/EGR1/KLF5 pathway[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16016
- [11] Farazi TA, Spitzer JL, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer[J]. *J Pathol*, 2011, 223(2): 102-115
- [12] Fu X, Ou B. miR-152/LIN28B axis modulates high-glucose- induced angiogenesis in human retinal endothelial cells via VEGF signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2019[Epub ahead of print]
- [13] Xiaochuan B, Qianfeng J, Min X, et al. RASSF1 promotes cardiomyocyte apoptosis after acute myocardial infarction and is regulated by miR-125b [J]. *J Cell Biochem*, 2019[Epub ahead of print]
- [14] Luo J, Jin H, Jiang Y, et al. Aberrant Expression of microRNA-9 Contributes to Development of Intracranial Aneurysm by Suppressing Proliferation and Reducing Contractility of Smooth Muscle Cells [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 4247-4253
- [15] Sun L, Zhao M, Zhang J, et al. MiR-29b Downregulation Induces Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells: Implication for Intracranial Aneurysm Formation and Progression to Rupture[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(2): 510-518
- [16] Kyrychenko S, Kyrychenko V, Badr MA, et al. Pivotal role of miR-448 in the development of ROS-induced cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 108(3): 324-334
- [17] Zhang R, Sui L, Hong X, et al. MiR-448 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration in through directly targeting MEF2C[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(28): 22294-22300
- [18] Li X, He Y, Xu Y, et al. KLF5 mediates vascular remodeling via HIF-1alpha in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(4): L299-310
- [19] Drosatos K, Pollak NM, Pol CJ, et al. Cardiac Myocyte KLF5 Regulates Ppara Expression and Cardiac Function [J]. *Circ Res*, 2016, 118(2): 241-253
- [20] Zheng B, Zheng CY, Zhang Y, et al. Regulatory crosstalk between KLF5, miR-29a and Fbw7/CDC4 cooperatively promotes atherosclerotic development [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(2): 374-386
- [21] Ma D, Zheng B, Suzuki T, et al. Inhibition of KLF5-Myo9b-RhoA Pathway-Mediated Podosome Formation in Macrophages Ameliorates Abdominal Aortic Aneurysm[J]. *Circ Res*, 2017, 120(5): 799-815
- [22] Starke RM, Chalouhi N, Ding D, et al. Vascular smooth muscle cells in cerebral aneurysm pathogenesis [J]. *Transl Stroke Res*, 2014, 5(3): 338-346
- [23] Gao G, Zhang Y, Chao Y, et al. miR-4735-3p regulates phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells by targeting HIF-1-mediated autophagy in intracranial aneurysm [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(12): 19432-19441
- [24] Man H, Bi W. Expression of a Novel Long Noncoding RNA (lncRNA), GASL1, is Downregulated in Patients with Intracranial Aneurysms and Regulates the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells In Vitro[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1133-1139
- [25] Xu J, Yan S, Tan H, et al. The miR-143/145 cluster reverses the regulation effect of KLF5 in smooth muscle cells with proliferation and contractility in intracranial aneurysm [J]. *Gene*, 2018, 679: 266-273
- [26] Frosen J, Cebal J, Robertson AM, et al. Flow-induced, inflammation-mediated arterial wall remodeling in the formation and progression of intracranial aneurysms[J]. *Neurosurg Focus*, 2019, 47(1): E21
- [27] Fisher CL, Demel SL. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Potential Pharmacological Treatment for Intracranial Aneurysm [J]. *Cerebrovasc Dis Extra*, 2019, 9(1): 31-45
- [28] Shimizu K, Kushamae M, Mizutani T, et al. Intracranial Aneurysm as a Macrophage-mediated Inflammatory Disease [J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2019, 59(4): 126-132
- [29] Quan K, Li S, Wang D, et al. Berberine Attenuates Macrophages Infiltration in Intracranial Aneurysms Potentially Through FAK/Grp78/UPR Axis[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 565