

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.11.004
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220223.0910.009.html(2022-02-23)

circ_0062389 通过靶向 miRNA-331-3p 对 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤的影响及其机制研究^{*}

曹俊杰,黄 剑,刘占鳌,霍桂军,汤 尧[△]
[南京医科大学姑苏学院/南京医科大学附属苏州医院/苏州市立医院
(本部)血管外科,江苏苏州 215002]

[摘要] **目的** 探讨 circ_0062389 对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管内皮细胞损伤的影响及其可能机制。**方法** 分别转染 circ_0062389 小干扰 RNA、微 RNA(miRNA)-331-3p 模拟物或共转染 circ_0062389 小干扰 RNA 和 miRNA-331-3p 抑制剂至人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC),然后用 1.0 μg/mL ox-LDL 刺激 24 h,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测 HUVEC 中 circ_0062389 和 miRNA-331-3p 表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HUVEC 中丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,流式细胞术检测细胞凋亡,Western blot 检测 HUVEC 中活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cleaved-caspase)3 和 cleaved-caspase9 蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验验证 circ_0062389 和 miRNA-331-3p 调控关系。**结果** ox-LDL 可促进 HUVEC 中 circ_0062389 表达($P<0.05$),而抑制 miRNA-331-3p 表达($P<0.05$)。敲减 circ_0062389 或过表达 miRNA-331-3p 可降低 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 MDA 水平($P<0.05$)、提高 HUVEC 中 SOD 和 GSH-Px 活性($P<0.05$),并降低细胞凋亡率及 HUVEC 中 cleaved-caspase3 和 cleaved-caspase9 蛋白表达($P<0.05$)。circ_0062389 可靶向结合并负调控 miRNA-331-3p。敲减 miRNA-331-3p 可逆转敲减 circ_0062389 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化应激及凋亡的影响。**结论** circ_0062389 可能通过靶向抑制 miRNA-331-3p 促进 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞氧化应激及凋亡,其可能成为动脉粥样硬化治疗的分子靶点。

[关键词] 动脉粥样硬化;circ_0062389;微 RNA-331-3p;氧化应激;细胞凋亡

[中图法分类号] R543.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)11-1818-06

Effect of circ_0062389 targeting miRNA-331-3p on ox-LDL-induced vascular endothelial cell damage and its mechanism^{*}

CAO Junjie, HUANG Jian, LIU Zhanao, HUO Guijun, TANG Yao[△]
[Department of Vascular Surgery, Gusu School of Nanjing Medical University/
Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University/Suzhou Municipal
Hospital (Headquarters), Suzhou, Jiangsu 215002, China]

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and possible mechanism of circ_0062389 on vascular endothelial cell injury induced by ox-LDL and its possible mechanism. **Methods** After circ_0062389 small interfering RNA or miRNA-331-3p mimic was transfected into human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), or circ_0062389 small interfering RNA and miRNA-331-3p inhibitor were co-transfected into human umbilical vein endothelial cells(HUVEC), 1.0 μg/mL ox-LDL was used to stimulate the cells for 24 h. The real-time quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression of circ_0062389 and miRNA-331-3p in HUVEC. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the level of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in HUVEC. The flow cytometry was used to detect the cell apoptosis. Western blot was used to detect the protein expression of cleaved-caspase3 and cleaved-caspase9. The dual luciferase reporter gene experiment verified the regulatory relationship between circ_0062389 and miRNA-331-3p. **Results** ox-LDL could promote the expression of circ_0062389 in HUVEC ($P<0.05$), while inhibited the expression of miRNA-331-3p ($P<0.05$). Knockdown

^{*} 基金项目:江苏省苏州市科教兴卫青年科技项目(KJXW2020031)。 作者简介:曹俊杰(1993—),住院医师,硕士,主要从事外周血管疾病的基础和临床诊疗研究。 [△] 通信作者, E-mail:ty13862132470@163.com。

of circ_0062389 or overexpression of miRNA-331-3p could reduce the MDA level in HUVEC induced by ox-LDL ($P < 0.05$), but increased the activities of SOD and GSH-Px ($P < 0.05$), and reduced the apoptosis rate and the protein expression of cleaved-caspase3 and cleaved-caspase9 in HUVEC ($P < 0.05$). circ_0062389 could target and negatively regulate the expression of miRNA-331-3p. Knockdown of miRNA-331-3p could reverse the effect of knockdown of circ_0062389 on the oxidative stress and apoptosis of HUVEC induced by ox-LDL. **Conclusion** circ_0062389 may promote ox-LDL-induced oxidative stress and apoptosis of vascular endothelial cells through targeted inhibiting the expression of miRNA-331-3p, which may become a molecular target for atherosclerosis treatment.

[Key words] atherosclerosis; circ_0062389; microRNA-331-3p; oxidative stress; apoptosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心脑血管疾病的病理基础,极大威胁人类生命健康。血管内皮细胞是维持血管壁结构和功能的重要屏障,其损伤是AS发生的始动环节^[1]。因此,抑制或减轻血管内皮细胞损伤是预防和治疗AS的重要途径。环状RNA(circRNA)是一类非编码RNA,可作为微RNA(miRNA, miRNA)分子海绵发挥作用,调控miRNA靶基因的表达,进而影响细胞生理或病理过程,参与人类多种疾病的发展进程^[2-4]。研究显示, circ_0062389在心力衰竭大鼠心肌组织中高表达,沉默其表达可明显降低大鼠心肌细胞凋亡,改善大鼠心肌功能,其作用机制与调控转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)/SMAD家族成员3 (Smad3)信号通路有关,有可能成为治疗心力衰竭的分子靶点^[5]。但目前, circ_0062389对AS发生、发展的影响和机制还不清楚。Circular RNA Interactome靶基因在线软件预测显示, circ_0062389可能竞争性结合miRNA-331-3p。ZHANG等^[6]研究显示,脊髓损伤大鼠脊髓中miRNA-331-3p表达下调, miRNA-331-3p过表达可改善脊髓损伤大鼠运动能力,减轻脊髓组织损伤、神经元凋亡和炎症反应,可用作治疗脊髓损伤的分子靶点。而目前miRNA-331-3p对AS发生、发展的影响还不清楚,因此,本研究通过建立氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的血管内皮细胞损伤模型,观察 circ_0062389和miRNA-331-3p对血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响及 circ_0062389可否通过调控miRNA-331-3p发挥作用,以期作为AS的治疗提供分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞:人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),购自上海弘顺生物科技有限公司。试剂:改良杜氏伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)和膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡试剂盒,购自北京索莱宝公司; Lipofectamine™ 2000试剂盒,购自美国Invitrogen公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS),购自浙江天

杭州生物科技股份有限公司; circ_0062389 小干扰RNA(si-circ_0062389)、小干扰RNA阴性序列(si-NC)、miRNA-331-3p抑制剂(anti-miRNA-331-3p)、抑制剂阴性序列(anti-miRNA-NC)、miRNA-331-3p模拟物(mimics)、模拟对照序列(miRNA-NC)和聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物,均购自上海生工生物工程有限公司; RNA抽提试剂盒、逆转录试剂盒和PCR试剂盒,购自大连宝生物工程有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;兔抗人活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cleaved-caspase)3和cleaved-caspase9单克隆抗体,购自美国Santa Cruz公司;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒和双荧光素酶活性检测试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

复苏HUVEC,用含10% FBS的DMEM培养液培养。取对数期HUVEC,将其接种至6孔板中(1.0×10^5 个/孔),培养12 h后弃培养液。采用Lipofectamine™ 2000脂质体法,分别转染si-NC、si-circ_0062389、miRNA-NC、miRNA-331-3p mimics、共转染si-circ_0062389与anti-miRNA-NC、si-circ_0062389与anti-miRNA-331-3p,转染12 h后更换新鲜培养液,再培养24 h后,实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)法检测细胞中 circ_0062389或miRNA-331-3p表达验证转染效果,并收集细胞备用。

1.2.2 细胞分组处理

将未转染、转染后的HUVEC均接种至6孔板中(1.0×10^5 个/孔),培养12 h后弃培养液。未转染的HUVEC分为对照组(Con组)和ox-LDL组,Con组细胞用常规培养液培养24 h, ox-LDL组细胞用含ox-LDL终浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ ^[7]的培养液培养24 h。转染si-NC、si-circ_0062389、miRNA-NC、miRNA-331-3p mimics、共转染si-circ_0062389与anti-miRNA-NC、si-circ_0062389与anti-miRNA-331-3p的细胞均

用含 ox-LDL 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培养液培养 24 h,并依次记为 ox-LDL+si-NC 组(A 组)、ox-LDL+si-circ_0062389 组(B 组)、ox-LDL+miRNA-NC 组(C 组)、ox-LDL+miRNA-331-3p 组(D 组)、ox-LDL+si-circ_0062389+anti-miRNA-NC 组(E 组)、ox-LDL+si-circ_0062389+anti-miRNA-331-3p 组(F 组)。培养结束后,收集各组细胞并用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)清洗 2 次,然后检测以下指标。

1.2.3 RT-qPCR 检测 circ_0062389 和 miRNA-331-3p 表达

用 RNA 抽提试剂盒提取各组 HUVEC 中总 RNA,经逆转录生成 cDNA 后,行 PCR 扩增。扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环。引物序列:circ_0062389 上游 5'-GTA CGA GAT GAG TCG ACG CGC-3',下游 5'-CGA TAG GCG CGA GCG AGC-3'; miRNA-331-3p 上游 5'-TCG GCA GGG CCC CTG GGC CTA-3',下游 5'-GCC CCU GGG CCU AUC CUA GAA-3'; GAPDH 上游 5'-GTT GGA GGT CGG AGT CAA CGG-3',下游 5'-GAG GGA TCT CGC TCC TGG AGG A-3'; U6 上游 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3',下游 5'-CGC TTC AGA ATT TGC GTG TCA T-3'。2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算 circ_0062389 相对于 GAPDH、miRNA-331-3p 相对于 U6 的表达水平。

1.2.4 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测 HUVEC 中 MDA 水平及 SOD 和 GSH-Px 活性

向 HUVEC 中加入细胞裂解液,充分裂解细胞,3 500 r/min 离心 5 min,取上清液,分别参照 MDA、SOD 和 GSH-Px 试剂盒,检测上清液中其表达水平。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

向各组 HUVEC 中加 500 μL 结合缓冲液,将细胞重悬。然后利用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒,依次加 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,室温避光孵育 15 min 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.6 Western blot 检测 cleaved-caspase3 和 cleaved-caspase9 蛋白表达

将各组 HUVEC 中加放射免疫沉淀试验(radio-immunoprecipitation assay,RIPA)试剂,充分裂解细胞,提取细胞中总蛋白。将蛋白溶液经 BCA 法定量、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)、转膜及封闭后,分别置于 cleaved-caspase3 (1:1 000)、cleaved-caspase9 (1:1 000)、GAPDH (1:1 000)一抗孵育液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜。洗膜后置于山羊抗兔二抗(1:2 000)孵育液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中孵育 1 h。洗膜后加显影液避光显影,凝胶成

像系统曝光拍照,Image J 软件分析 cleaved-caspase3 和 cleaved-caspase9 相对于 GAPDH 表达水平。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验

根据 Circular RNA Interactome 靶基因在线软件预测 circ_0062389 与 miRNA-331-3p 核苷酸序列的结合位点,分别构建 circ_0062389 野生型荧光素酶载体(WT-circ_0062389)及突变型荧光素酶载体(MUT-circ_0062389),该过程由上海生工生物工程有限公司设计并完成。将 HUVEC 接种至 6 孔板中(1.0×10^5 个/孔),用 LipofectamineTM 2000 脂质体法,分别将 WT-circ_0062389 和 miRNA-NC、WT-circ_0062389 和 miRNA-331-3p mimic、MUT-circ_0062389 和 miRNA-NC、MUT-circ_0062389 和 miRNA-331-3p mimic 共转染至 HUVEC 中。转染 12 h 后,更换新鲜培养液,再培养 24 h 收集细胞,加细胞裂解液裂解,3 500 r/min 离心 5 min,取上清液,参照荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光素酶活性,结果以萤火虫与海肾荧光强度的比值表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS22.0 统计软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较用独立样本 t 检验;多组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ox-LDL 组与 Con 组 HUVEC 中 circ_0062389 和 miRNA-331-3p 表达水平比较

ox-LDL 组 HUVEC 中 circ_0062389 表达水平高于 Con 组(3.01 ± 0.29 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=20.79$, $P<0.01$),而 miRNA-331-3p 表达水平低于 Con 组(0.33 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=67.00$, $P<0.01$)。

2.2 各组 HUVEC 中 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性比较

B 组 HUVEC 中 circ_0062389 表达低于 A 组(0.23 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=77.00$, $P<0.01$)。与 Con 组比较,ox-LDL 组 HUVEC 中 MDA 水平升高($P<0.05$),SOD 和 GSH-Px 活性降低($P<0.05$)。与 A 组比较,B 组 HUVEC 中 MDA 水平降低($P<0.05$),SOD 和 GSH-Px 活性升高($P<0.05$)。ox-LDL 组与 A 组各检测指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 各组 HUVEC 中凋亡相关蛋白表达水平比较

ox-LDL 组 HUVEC 中细胞凋亡率高于 Con 组[(30.38 ± 3.45)% vs. (5.14 ± 0.43)%, $P<0.05$],凋亡相关蛋白 cleaved-caspase3 和 cleaved-caspase9 表达水平高于 Con 组($P<0.05$)。A、B 组 HUVEC 中细胞凋亡率分别为(32.57 ± 3.17)%、(10.14 ± 0.84)%,与 A 组比较,B 组 HUVEC 中细胞凋亡率明显降低($P<0.05$);且凋亡相关蛋白 cleaved-caspase3

和 cleaved-caspase9 表达水平均低于 A 组 ($P < 0.05$)。ox-LDL 组与 A 组各检测指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1、2。

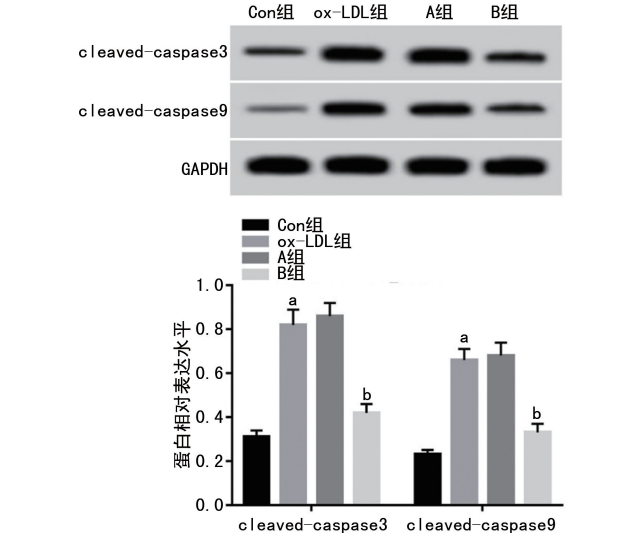
表 1 各组 HUVEC 中 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性比较($\bar{x} \pm s, n=9$)			
组别	MDA (nmol/L)	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)
Con 组	0.42±0.04	63.18±5.11	49.11±4.85
ox-LDL 组	9.24±0.81 ^a	19.79±1.07 ^a	13.89±1.18 ^a
A 组	9.31±0.85	20.36±2.05	12.82±1.35
B 组	0.61±0.05 ^b	54.37±5.08 ^b	38.65±3.16 ^b
F	666.16	322.01	322.54
P	<0.01	<0.01	<0.01

^a: $P < 0.05$, 与 Con 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 A 组比较。

2.4 Circular RNA Interactome 靶基因在线软件预测 circ_0062389 与 miR-331-3p 核苷酸序列的结合位点

Circular RNA Interactome 靶基因在线软件预测显示, circ_0062389 与 miRNA-331-3p 的核苷酸序列存在结合位点, 见图 3。双荧光素酶报告基因结果显示, 共转染 miRNA-331-3p mimics 和 WT-circ_0062389 的 HUVEC 荧光素酶活性较共转染 miRNA-NC 和 WT-circ_0062389 的细胞明显降低 ($0.52 \pm$

0.04 vs. $0.96 \pm 0.07, t = 16.37, P < 0.01$), 但共转染 miRNA-331-3p mimics 和 MUT-circ_0062389 的 HUVEC 荧光素酶活性与共转染 miRNA-NC 和 MUT-circ_0062389 的细胞比较差异无统计学意义 (0.99 ± 0.07 vs. $0.98 \pm 0.08, t = 0.28, P = 0.78$)。同时, 转染 si-circ_0062389 的 HUVEC 中 miRNA-331-3p 表达明显高于转染 si-NC 的细胞 (3.01 ± 0.28 vs. $1.03 \pm 0.06, t = 20.74, P < 0.01$)。



^a: $P < 0.05$, 与 Con 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 A 组比较。

图 1 各组 HUVEC 中凋亡相关蛋白表达水平

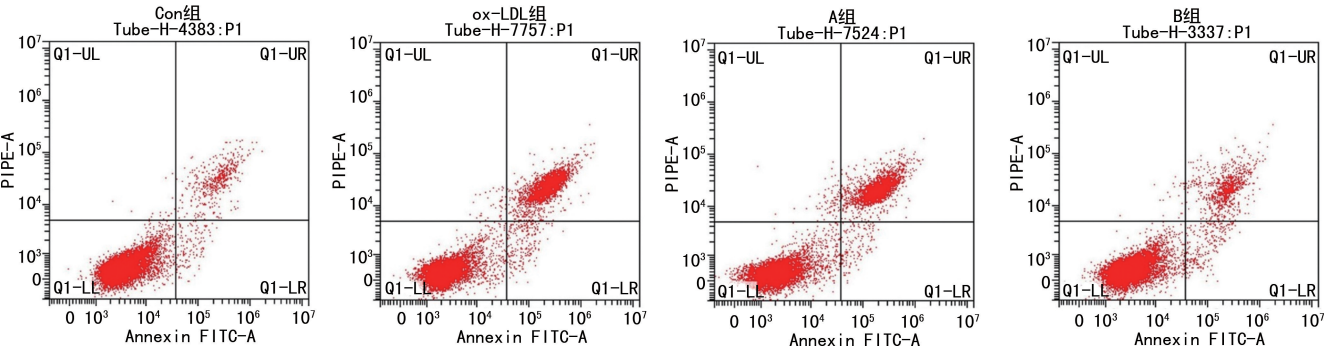


图 2 各组 HUVEC 细胞凋亡流式图

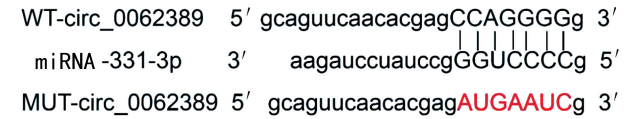


图 3 circ_0062389 的序列中含有与 miRNA-331-3p 互补的核苷酸序列

2.5 C、D 组 HUVEC 细胞损伤相关指标比较

D 组 HUVEC 中 miRNA-331-3p 表达高于 C 组细胞 (3.79 ± 0.31 vs. $1.00 \pm 0.00, t = 27.00, P < 0.01$)。与 C 组比较, D 组 HUVEC 中 MDA 水平降低 ($P < 0.05$), SOD 和 GSH-Px 活性升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率及凋亡相关蛋白 cleaved-caspase3 和 cleaved-caspase9 表达水平均降低 ($P < 0.05$), 见表 2、图 4。

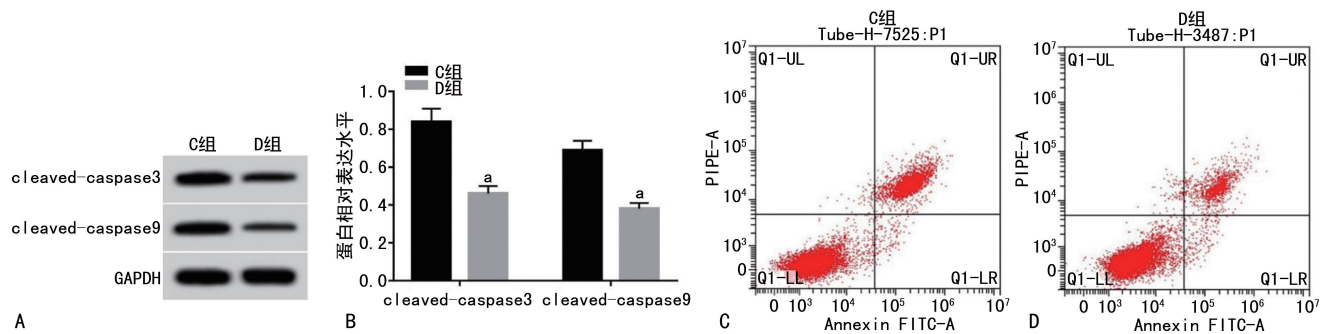
表 2 C、D 组 HUVEC 细胞损伤相关指标比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)				
组别	MDA (nmol/L)	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)	凋亡率 (%)
C 组	9.65±0.75	22.23±2.15	14.53±1.21	33.41±3.47
D 组	0.87±0.07	45.65±4.06	31.35±2.83	13.87±1.26
t	34.97	15.29	16.40	15.88
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.6 E、F 组 HUVEC 细胞损伤相关指标比较

F 组 HUVEC 中 miRNA-331-3p 表达低于 E 组细胞 (0.26 ± 0.02 vs. $1.00 \pm 0.00, t = 111.00, P < 0.01$)。与 E 组比较, F 组 HUVEC 中 miRNA-331-

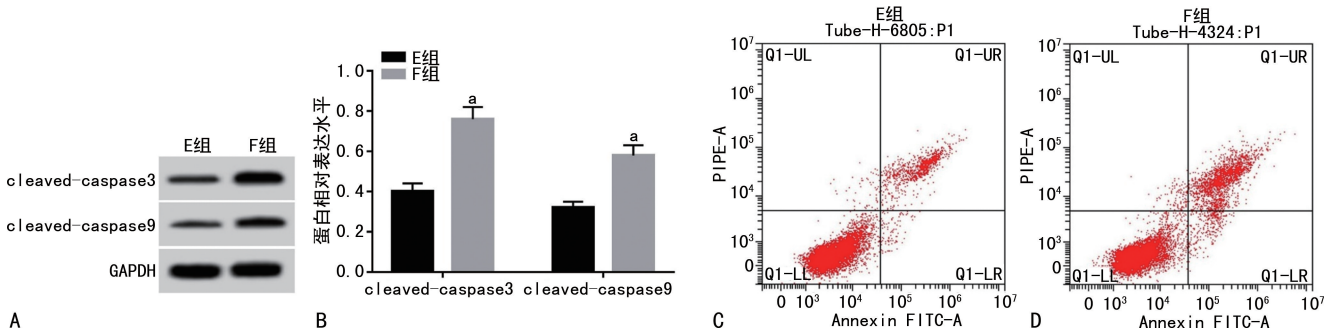
3p 表达水平降低($P<0.05$),MDA 水平升高($P<0.05$),SOD 和 GSH-Px 活性降低($P<0.05$),细胞凋

亡率及凋亡相关蛋白 cleaved-caspase3 和 cleaved-caspase9 表达水平均升高($P<0.05$),见图 5、表 3。



A: Western blot 检测;B:蛋白相对表达水平柱状图;C、D:细胞凋亡流式图;^a: $P<0.05$,与 C 组比较。

图 4 C、D 组 HUVEC 细胞凋亡相关蛋白表达及细胞凋亡流式图



A: Western blot 检测;B:蛋白相对表达水平柱状图;C、D:细胞凋亡流式图;^a: $P<0.05$,与 E 组比较。

图 5 E、F 组 HUVEC 细胞凋亡相关蛋白表达及细胞凋亡流式图

表 3 E、F 组 HUVEC 细胞损伤相关指标比较				
($\bar{x}\pm s, n=9$)				
组别	MDA (nmol/L)	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)	凋亡率 (%)
E 组	0.58±0.05	53.75±4.69	37.64±3.45	11.82±1.26
F 组	8.11±0.69	30.94±4.05	24.22±2.22	22.86±2.09
t	32.65	11.04	9.81	13.57
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨 论

ox-LDL 是重要的致病因子,其可诱导血管内皮细胞产生过度氧化应激反应及细胞凋亡,促进 AS 的发生、发展过程^[8]。本研究显示,HUVEC 经 100 μg/mL ox-LDL 干预 24 h 后,细胞中氧化应激指标 MDA 表达明显增加,SOD 和 GSH-Px 活性明显降低,且细胞凋亡率升高,与相关报道结果一致^[9],说明 ox-LDL 诱导 HUVEC 产生了氧化应激反应,且加剧了 HUVEC 凋亡,ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤模型建立成功。

circRNA 呈闭合环状结构,可通过竞争性结合 miRNA,影响 miRNA 靶基因的表达,进而发挥生物学功能。研究显示,circRNA 参与调控血管内皮细胞功能障碍,可作为减轻血管内皮细胞损伤的分子靶点。如 PENG 等^[10] 研究显示,circ-USP36 可通过靶

向 miRNA-98-5p/VCAM1 轴促进 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞凋亡及炎症反应,减轻血管内皮细胞损伤,其有望成为治疗 AS 的分子靶点;QIN 等^[11] 研究显示,circ_0003645 的沉默可减轻 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞凋亡及炎症损伤,对揭示 AS 的发病机制及治疗靶点的选择提供了新途径。探究影响 AS 血管内皮细胞损伤的分子机制可为其治疗提供新靶点。

circ_0062389 是 circRNA 家族成员之一,可靶向 miRNA-103a-3p/CCNE1 轴促进非小细胞肺癌的发展进程,为非小细胞肺癌的治疗提供了新策略^[12]。本研究结果显示,circ_0062389 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中表达升高,敲减其表达可明显减少 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞凋亡,提示 circ_0062389 可能成为降低 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的分子靶点。细胞凋亡受多种基因分子调控,其中 caspase 级联反应对细胞凋亡发挥重要调控作用^[13]。caspase9 是 caspase 级联反应的起始分子,再接受到上游凋亡信号后被活化,向下游传递凋亡信号。caspase3 处于 caspase 级联反应的核心位置,其被活化后,执行细胞凋亡。本研究结果提示,circ_0062389 可能通过间接抑制 caspase 级联反应来减少 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡。

ox-LDL 引起的血管内皮细胞氧化应激是血管内皮细胞损伤的主要通路,抑制 ox-LDL 诱导的氧化应激可保护血管内皮细胞免受氧化损伤^[14]。MDA 是

脂质过氧化产物之一,细胞中其水平越高,说明氧化应激反应越剧烈。SOD 是机体内重要的抗氧化酶,其可清除氧自由基,减轻机体组织损伤。GSH-Px 也是抗氧化酶,与 SOD 具有协同作用,对机体组织发挥保护作用。本研究显示,敲减 circ_0062389 通过降低 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 MDA 表达及提高 SOD 和 GSH-Px 活性减轻细胞氧化损伤。

为了进一步探究敲减 circ_0062389 抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化应激和凋亡的分子机制,本研究证实了 circ_0062389 可靶向结合并负调控 miRNA-331-3p,这与本文 ox-LDL 促进 HUVEC 中 circ_0062389 的表达而抑制 miRNA-331-3p 表达的结果一致。有研究显示,miRNA-331-3p 在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者血清中表达降低,且与 AD 患者简易智能精神状态量表(mini-mental state examination, MMSE)评分和血清促炎细胞因子的表达密切相关,是诊断 AD 的潜在生物标志物;过表达 miRNA-331-3p 可提高 β -淀粉样蛋白(amyloid beta, A β)1-40 诱导的神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞活性,并抑制细胞炎性损伤,miRNA-331-3p 具有潜在的神经保护作用^[15]。本研究结果显示,miRNA-331-3p 过表达明显减轻了 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化应激水平,并减少了细胞凋亡,提示 miRNA-331-3p 可作为 AS 治疗的分子靶点。此外,本研究实验结果还显示,敲减 miRNA-331-3p 逆转敲减 circ_0062389 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化应激及凋亡的抑制作用,进一步提示 circ_0062389 可能通过靶向负调控 miRNA-331-3p 来影响 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化应激和凋亡,但其具体调控的 miRNA-331-3p 靶基因还有待进一步探究。

综上所述,ox-LDL 促进 HUVEC 中 circ_0062389 的表达,而抑制 miRNA-331-3p 表达;circ_0062389 可能通过靶向抑制 miRNA-331-3p 来促进 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化应激及凋亡,其可能成为 AS 治疗的分子靶点。

参考文献

- [1] HU Y, XU R, HE Y, et al. Downregulation of microRNA-106a-5p alleviates ox-LDL-mediated endothelial cell injury by targeting STAT3[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2):783-791.
- [2] SHI Y, SUN C F, GE W H, et al. Circular RNA VMA21 ameliorates sepsis-associated acute kidney injury by regulating miR-9-3p/SMG1/inflammation axis and oxidative stress[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(19):11397-11408.
- [3] CHENG Q, CAO X, XUE L, et al. CircPRKCI-

miR-545/589-E2F7 axis dysregulation mediates Hydrogen peroxide-induced neuronal cell injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 514(2):428-435.

- [4] WANG Y, WO Y, LU T, et al. Circ-AASDH functions as the progression of early stage lung adenocarcinoma by targeting miR-140-3p to activate E2F7 expression[J]. Transl Lung Cancer Res, 2021, 10(1):57-70.
- [5] ZHANG Y, CHEN B. Silencing circ_0062389 alleviates cardiomyocyte apoptosis in heart failure rats via modulating TGF- β 1/Smad3 signaling pathway[J]. Gene, 2021, 766:145154-145160.
- [6] ZHANG X, GUO H, XIE A, et al. microRNA-331-3p attenuates neuropathic pain following spinal cord injury via targeting RAP1A[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2020, 34(1):25-37.
- [7] 康桂兰, 景增秀. 山奈酚通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路缓解 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(4):525-530.
- [8] XU Y, MIAO C, CUI J, et al. miR-92a-3p promotes ox-LDL induced-apoptosis in HUVECs via targeting SIRT6 and activating MAPK signaling pathway[J]. Braz J Med Biol Res, 2021, 54(3):e9386-9393.
- [9] 王俊岩, 曲宁宁, 贾连群, 等. 二陈汤合桃红四物汤含药血清对 ox-LDL 诱导内皮细胞损伤的保护作用及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(10):987-992.
- [10] PENG K, JIANG P, DU Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein accelerates the injury of endothelial cells via circ-USP36/miR-98-5p/VCAM1 axis[J]. IUBMB Life, 2021, 73(1):177-187.
- [11] QIN M, WANG W, ZHOU H, et al. Circular RNA circ_0003645 silencing alleviates inflammation and apoptosis via the NF- κ B pathway in endothelial cells induced by oxLDL[J]. Gene, 2020, 755:144900-144907.
- [12] SHE Y, HAN Y, ZHOU G, et al. hsa_circ_0062389 promotes the progression of non-small cell lung cancer by sponging miR-103a-3p to mediate CCNE1 expression[J]. Cancer Genet, 2020, 241(5):12-19.
- [13] YANG Y, YOU B, DONG S, et al. FRA-1 suppresses apoptosis of Helicobacter pylori infected MGC-803 cells[J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(1):611-621.

(下转第 1829 页)

- [3] 郑国庆,王小同,李勇.慢性阻塞性肺疾病认知功能障碍[J].中国行为医学科学,2006,15(3):284-285.
- [4] 林盈盈,陈轲扬,霍鑫龙,等.慢性低氧高二氧化碳大鼠记忆障碍与脑内胆碱能失调的关系[J].中华神经科杂志,2013,46(1):47-50.
- [5] 刘银花,杨汉文,王小同,等.硫化氢对慢性低氧高二氧化碳模型大鼠学习记忆的影响[J].中国临床神经科学,2011,19(2):141-145.
- [6] 孟晓菲,谭进,苗雨阳,等.间歇低氧诱导海马神经细胞凋亡和自噬增多[J].中华老年医学杂志,2017,36(3):311-315.
- [7] GOREN B,CAKIR A,OCALAN B,et al. Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Brain Res,2017,1659:81-87.
- [8] PENTIMALLI F. Autophagy in disease:hunger for translation[J]. Cell Death Dis,2019,10(3):247.
- [9] MENZIES F M,FLEMING A,CARICASOLE A A,et al. Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Neuron,2017,93(5):1015-1034.
- [10] SHEFA U,JEONG N Y,SONG I O,et al. Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases[J]. Neural Regen Res,2019,14(5):749-756.
- [11] WEI Z Z,CHEN D,LEE M,et al. DL-3-n-butylphthalide increases collaterogenesis and functional recovery after focal ischemic stroke in mice[J]. Aging Dis,2021,12(7):1835-1849.
- [12] FENG Y,GUO M,ZHAO H,et al. DL-3-n-Butylphthalide alleviates demyelination and improves cognitive function by promoting mitochondrial dynamics in white matter lesions[J]. Front Aging Neurosci,2021,13:632374.
- [13] ZQ X,ZHOU Y,SHAO B Z,et al. A systematic review of neuroprotective efficacy and safety of DL-3-N-Butylphthalide in ischemic stroke[J]. Am J Chin Med,2019,47(3):507-525.
- [14] 高立伟,张强,李萌,等.丁苯酞对血管性痴呆小鼠认知功能的影响及 Nrf2/SIRT3 信号通路的调节作用[J].中华行为医学与脑科学杂志,2020,29(3):200-201.
- [15] 李勇,柯将琼,邵胜敏,等.慢性低氧高二氧化碳对大鼠海马 NF- κ B 的影响[J].浙江实用医学,2009,14(2):100-101,177.
- [16] WANG Q,ZHANG L,YUAN X,et al. The relationship between the Bcl-2/Bax proteins and the mitochondria-mediated apoptosis pathway in the differentiation of adipose-derived stromal cells into neurons[J]. PLoS One,2016,11(10):e0163327.
- [17] SUN C,ZHANG X,YU F,et al. Atractylenolide I alleviates ischemia/reperfusion injury by preserving mitochondrial function and inhibiting caspase-3 activity[J]. J Int Med Res,2021,49(2):300060521993315.
- [18] 史婷婷,白建平,梁月琴,等.芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2, Bax,caspase-3 表达的影响[J].中国药理学通报,2011,27(5):666-671.
- [19] 毛西京,朱博驰,于挺敏,等.丁苯酞对血管性痴呆大鼠记忆能力及海马 CA1 区 caspase-3 表达的影响[J].中国医药导报,2017,14(28):9-12.
- [20] KIM D,SONG J,JIN E J. BNIP3-dependent mitophagy via PGC1 α promotes cartilage degradation[J]. Cells,2021,10(7):1839.
- [21] ZHANG Y,LIU D,HU H,et al. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Biomed Pharmacother,2019,120:109464.
- [22] SHI R Y,ZHU S H,LI V,et al. BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke[J]. CNS Neurosci Ther,2014,20(12):1045-1055.

(收稿日期:2021-08-07 修回日期:2022-02-15)

(上接第 1823 页)

- [14] ZHANG Y,LU X,YANG M,et al. GAS5 knock-down suppresses inflammation and oxidative stress induced by oxidized low-density lipoprotein in macrophages by sponging miR-135a[J]. Mol Cell Biochem,2021,476(2):949-957.
- [15] LIU Q,LEI C. Neuroprotective effects of miRNA-

331-3p through improved cell viability and inflammatory marker expression: correlation of serum miRNA-331-3p levels with diagnosis and severity of Alzheimer's disease[J]. Exp Gerontol,2021,144(1):111187.

(收稿日期:2021-08-05 修回日期:2022-02-20)