

环状 RNA hsa-circ-0001360 在同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用

况园军^{1, 2}, 于素美^{2, 3}, 钟颖怡², 章旭红⁴, 马胜超², 杨安宁², 郝银菊², 熊建团², 焦运⁵, 姜怡邓²

<https://doi.org/10.12307/2024.184>

投稿日期: 2023-05-31

采用日期: 2023-07-17

修回日期: 2023-08-18

在线日期: 2023-08-30

中图分类号:

R459.9; R363.2+1; R543.5

文章编号:

2095-4344(2024)25-04060-05

文献标识码: B

文章快速阅读: hsa-circ-0001360 参与同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞的凋亡

分组:

- 人脐静脉内皮细胞: 对照组和同型半胱氨酸组;
- 人脐静脉内皮细胞: 干扰对照组、干扰对照 + 同型半胱氨酸组、干扰 hsa-circ-0001360 组、干扰 hsa-circ-0001360 + 同型半胱氨酸组;
- 人脐静脉内皮细胞: 过表达对照组、过表达对照 + 同型半胱氨酸组、过表达 hsa-circ-0001360 组、过表达 hsa-circ-0001360 + 同型半胱氨酸组。

检测指标:

- Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 凋亡蛋白的表达;
- 人脐静脉内皮细胞凋亡率;
- hsa-circ-0001360 的表达及定位。

结论:

hsa-circ-0001360 能够促进同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞发生凋亡。

文题释义:

人脐静脉内皮细胞: 是来源于新生儿脐带静脉内壁的一种干细胞。因其容易获取、没有伦理学争议, 且能够无限增殖, 常作为内皮细胞功能和病理学的研究模型, 应用于血管生成、愈合、血管建模、组织工程、炎症等研究中。

环状RNA: 一种共价闭合的单链非编码RNA, 其结构稳定性相较于其他RNA更强; 环状RNA具有调控基因转录、调控靶蛋白和充当小分子RNA海绵等诸多功能。

同型半胱氨酸: 是一种含硫氨基酸, 是蛋氨酸代谢的中间产物, 其本身不参与蛋白质的合成。高同型半胱氨酸血症是心脑血管病的新的、独立的危险因素。

摘要

背景: 同型半胱氨酸水平上升会诱导人脐静脉内皮细胞发生凋亡, 但机制尚不清楚。

目的: 探讨hsa-circ-0001360在同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞发生凋亡中的作用。

方法: 体外培养人脐静脉内皮细胞, 将其分为对照组、同型半胱氨酸组、干扰对照组、干扰对照+同型半胱氨酸组、干扰hsa-circ-0001360组、干扰hsa-circ-0001360+同型半胱氨酸组、过表达对照组、过表达对照+同型半胱氨酸组、过表达hsa-circ-0001360组和过表达hsa-circ-0001360+同型半胱氨酸组, 同型半胱氨酸的干预浓度均为100 μmol/L。干预细胞72 h后, 应用Western blot检测凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和Caspase-3的表达; 流式细胞仪检测细胞的凋亡率; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测hsa-circ-0001360的表达水平。

结果与结论: ①与对照组相比, 同型半胱氨酸组人脐静脉内皮细胞中Caspase-3和Bax的表达明显升高($P < 0.01$), Bcl-2的表达明显降低($P < 0.01$), 细胞凋亡率明显增高($P < 0.01$); ②与对照组相比, 同型半胱氨酸组人脐静脉内皮细胞中hsa-circ-0001360的表达明显升高($P < 0.01$); ③hsa-circ-0001360在人脐静脉内皮细胞的细胞质中表达显著高于细胞核($P < 0.01$); ④与干扰对照组或干扰对照+同型半胱氨酸组相比, 干扰hsa-circ-0001360组和干扰hsa-circ-0001360+同型半胱氨酸组人脐静脉内皮细胞中Caspase-3、Bax的表达明显降低($P < 0.01$), Bcl-2的表达明显升高($P < 0.01$), 细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$); ⑤与过表达对照组或过表达对照+同型半胱氨酸组相比, 过表达hsa-circ-0001360组和过表达hsa-circ-0001360+同型半胱氨酸组人脐静脉内皮细胞中Caspase-3、Bax的表达明显升高($P < 0.01$), Bcl-2的表达明显降低($P < 0.01$), 细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$); ⑥以上结果表明, hsa-circ-0001360可以促进同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞发生凋亡。

关键词: 同型半胱氨酸; hsa-circ-0001360; 人脐静脉内皮细胞; 细胞凋亡; 环状RNA

Effect of cyclic RNA hsa-circ-0001360 on homocysteine-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells

Kuang Yuanjun^{1, 2}, Yu Sumei^{2, 3}, Zhong Yingyi², Zhang Xuhong⁴, Ma Shengchao², Yang Anning², Hao Yinju², Xiong Jiantuan², Jiao Yun⁵, Jiang Yideng²

¹School of Inspection, ²Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, ³School of Clinical Medicine, ⁴Basical Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; ⁵General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

宁夏医科大学, ¹检验学院, ²国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室, ³临床医学院, ⁴基础医学院, 宁夏回族自治区银川市 750004; ⁵宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750004

第一作者: 况园军, 男, 1996年生, 江西省宜春市人, 汉族, 宁夏医科大学在读硕士, 主要从事心血管疾病形成的机制研究。

通讯作者: 姜怡邓, 博士, 教授, 宁夏医科大学国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏回族自治区银川市 750004

<https://orcid.org/0009-0000-9937-6056> (况园军)

基金资助: 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2019PT330002), 项目负责人: 姜怡邓; 国家自然科学基金(82270492),

项目负责人: 马胜超; 国家自然科学基金(82060090), 项目负责人: 郝银菊; 宁夏回族自治区重点研发计划(2022BFH02013),

项目负责人: 郝银菊; 宁夏回族自治区重点研发计划(2020BFH02003), 项目负责人: 杨安宁; 宁夏回族自治区重点研发计划

(2021BEG02033), 项目负责人: 熊建团; 宁夏回族自治区重点研发计划(2020BEG03005), 项目负责人: 焦运

引用本文: 况园军, 于素美, 钟颖怡, 章旭红, 马胜超, 杨安宁, 郝银菊, 熊建团, 焦运, 姜怡邓. 环状 RNA hsa-circ-0001360

在同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(25):4060-4064.



Kuang Yuanjun, Master candidate, School of Inspection, and Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China
Corresponding author: Jiang Yideng, MD, Professor, Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research of National Health Commission, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Increased homocysteine level induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells, but the mechanism remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate the role of hsa-circ-0001360 in human umbilical vein endothelial cell apoptosis induced by homocysteine.

METHODS: *In vitro* cultured human umbilical vein endothelial cells were divided into control group, homocysteine group, interference control group, interference control + homocysteine group, hsa-circ-0001360 interference group, hsa-circ-0001360 + homocysteine interference group, overexpression control group, overexpression control + homocysteine group, hsa-circ-0001360 overexpression group and hsa-circ-0001360 + homocysteine overexpression group. All groups were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine. After 72 hours of intervention, the expressions of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2, and Caspase-3 were detected by western blot assay. The apoptotic rate was detected by flow cytometry. Quantitative real-time PCR was used to detect the expression of hsa-circ-0001360.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the control group, the expression of Caspase-3 and Bax was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P < 0.01$), and the apoptotic rate was significantly increased ($P < 0.01$) in the homocysteine group. (2) Compared with control group, the expression of hsa-circ-0001360 was significantly increased in the homocysteine group ($P < 0.01$). (3) The expression of hsa-circ-0001360 was significantly higher in the cytoplasm than that in the nucleus ($P < 0.01$). (4) Compared with the interference control C group and interference control + homocysteine group, the expressions of Caspase-3 and Bax were significantly decreased ($P < 0.01$), while the expression of Bcl-2 was significantly increased ($P < 0.01$); the apoptotic rate was significantly decreased ($P < 0.01$) in sh-hsa-circ-0001360 interference group and sh-hsa-circ-0001360 + homocysteine interference group. (5) Compared with overexpression control group and overexpression control + homocysteine group, the expressions of Caspase-3 and Bax were significantly increased ($P < 0.01$), while the expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P < 0.01$); the apoptotic rate was significantly increased ($P < 0.01$) in the hsa-circ-0001360 overexpression group and the hsa-circ-0001360 + homocysteine overexpression group. (6) In conclusion, hsa-circ-0001360 can promote the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by homocysteine.

Key words: homocysteine; hsa-circ-0001360; human umbilical vein endothelial cell; apoptosis; cyclic RNA

Funding: Fundamental Research Funds for Central Level Public Welfare Research Institutes of the Chinese Academy of Medical Sciences, No. 2019PT330002 (to JYD); National Natural Science Foundation of China, No. 82270492 (to MSC); National Natural Science Foundation of China, No. 82060090 (to HYJ); Key Research and Development Plan of Ningxia Hui Autonomous Region, No. 2022BFH02013 (to HYJ); Key Research and Development Plan of Ningxia Hui Autonomous Region, No. 2020BFH02003 (to YAN); Key Research and Development Plan of Ningxia Hui Autonomous Region, No. 2021BEG02033 (to XJT); Key Research and Development Plan of Ningxia Hui Autonomous Region, No. 2020BEG03005 (to JY)

How to cite this article: KUANG YJ, YU SM, ZHONG YY, ZHANG XH, MA SC, YANG AN, HAO YJ, XIONG JT, JIAO Y, JIANG YD. Effect of cyclic RNA hsa-circ-0001360 on homocysteine-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(25):4060-4064.

0 引言 Introduction

心血管疾病,包括冠心病、高血压和脑卒中,共同构成了全球第一大死亡原因^[1]。动脉粥样硬化是指脂质和/或纤维物质积聚在动脉血管内壁,是一种影响大中动脉的慢性全身性疾病,被认为是导致心血管疾病的主要原因^[2-3]。高同型半胱氨酸血症被认为是动脉粥样硬化性心血管疾病的独立危险因素^[4-5]。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是必需氨基酸蛋氨酸分解代谢过程中产生的含硫氨基酸^[6-7]。环状RNA(circular RNAs, circRNAs)是一种较为广泛的共价闭合单链RNA,在心血管系统中高丰度分布,并在多种衰老相关疾病中通过多种机制参与疾病的发生发展^[8-10]。hsa-circ-0001360是众多 circRNA 中的一种,CHEN 等^[11]研究指出其表达与皮肤鳞状细胞癌变存在潜在关系,目前尚未见 hsa-circ-0001360 在心血管系统退行性疾病发生发展中发挥作用的相关报道。该研究探讨 hsa-circ-0001360 在 Hcy 诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)凋亡中的作用,为进一步研究 Hcy 诱导动脉粥样硬化发生的分子机制及未来临床疾病的新药物靶点的筛选提供实验依据和理论基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验,两样本间均数比较采用 *t* 检验,多样本间均数比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 10 月至 2023 年 4 月在宁夏医科大学国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室完成。

1.3 材料 HUVECs 由宁夏医科大学国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室惠赠。DMEM 高糖培养基、胎牛血清(Gibco,美国);胰蛋白酶、青链霉素(Solarbio,中国);Hcy(Sigma,美国);蛋白提取试剂盒(凯基,南京);凋亡检测试剂盒(BD,北京);总 RNA 提取试剂盒(天根,北京);反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(Takara,中国);Bcl-2 抗体、Bax 抗体、Caspase-3 抗体(Abcam,美国);核质分离试剂盒(Thermo Fisher,美国);RNA 引物(生工,上海);慢病毒转染试剂(舍为斯,天津);超净工作台(安泰,苏州);荧光定量 PCR 仪(耶拿,德国);流式细胞仪(安捷伦,美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养、转染及分组 使用含有体积分数 1% 青链霉素和体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 HUVECs(T25 培养瓶),每 24 h 换液 1 次,待细胞密度达 90% 左右时,用胰蛋白酶对其进行消化、传代,继续培养。

细胞分组: 对照组、Hcy 组、干扰对照组、干扰对照 + Hcy 组、干扰 hsa-circ-0001360 组、干扰 hsa-circ-0001360 + Hcy 组、过表达对照组、过表达对照 + Hcy 组、过表达 hsa-circ-0001360 组和过表达 hsa-circ-0001360 + Hcy 组。第 4 代 HUVECs 接种于 6 孔板中,每孔细胞数约 2×10^5 ,细胞密度约 50% 时,选取其中 4 孔分别加入 20 μL sh-NC、sh-hsa-circ-0001360、pLV-NC 和 pLV-sh-hsa-circ-0001360 慢病毒转染试剂,继续培养 72 h(中途可使用完全培养基对细胞进行换液以保持细胞活性),荧光显微镜下观察细胞感染效率,将细胞转移至 T25 培养瓶中继续培养、传代,待细胞稳定

且传至 3 代以后, 用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素对细胞进行消杀以保证感染效率(消杀后即可获取可稳定传代的转染株)。根据实验分组将细胞密度达 90% 左右稳定干扰和过表达 hsa-circ-0001360 的 HUVECs(经嘌呤霉素消杀后获得的稳转株)或正常 HUVECs 进行 1 瓶传 4 瓶传代, 待细胞贴壁后使用浓度为 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Hcy 干预细胞 72 h, 最后收取细胞用于后续实验^[12]。

1.4.2 Western blot 检测 HUVECs 中 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平 提取各组细胞总蛋白, 加入蛋白上样缓冲液后 99 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 5 min; 取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后电转至 PVDF 膜, 再用 50 g/L 脱脂牛奶封闭 2 h, PBST 清洗 3 次, 每次 10 min, PVDF 膜用抗 Bax 抗体 (1 : 1 000 稀释), 抗 Bcl-2 抗体 (1 : 1 000 稀释) 和抗 Caspase-3 抗体 (1 : 500 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST 清洗 3 次 (同上), PVDF 膜用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 孵育 2 h, PBST 清洗 3 次 (同上), 最后应用凝胶图像分析成像系统 (Image Lab) 对 PVDF 膜进行成像并统计分析。

1.4.3 流式细胞术检测 HUVECs 的凋亡水平 实验全程将细胞置于冰上操作。从培养箱中取出各组 HUVECs, 用胰蛋白酶 (不含酚红和 EDTA) 对细胞进行消化处理并转移至 1.5 mL 离心管中, 避光配制结合液 (buffer : 水 = 1 : 9), 单染组每个离心管只加 100 μL 结合液和 5 μL 其对应染料, 实验组每管加 100 μL 结合液、5 μL PE 染料和 5 μL 7-aad 染料, 静置 15 min 再向每管加入 400 μL 结合液, 轻轻混匀并过滤细胞至新离心管中, 最后上机检测并统计分析数据。

1.4.4 qRT-PCR 检测 HUVECs 中 hsa-circ-0001360 的表达 按照总 RNA 提取试剂盒使用说明书提取各组 HUVECs 总 RNA, 再将其反转录为 cDNA。使用荧光定量 PCR 仪对 cDNA 进行扩增 (扩增条件为: 两步法, 20 μL 体系, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 53.9 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, 共 40 个循环), 以 GAPDH 为内参基因, 运用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对获得的数据进行统计分析。hsa-circ-0001360 引物序列: 上游为 5'-GCT GAT TTT CAC ACC CGC TA-3', 下游为 5'-GTT GGG TAA TAC TGC CGC TG-3'; GAPDH 引物序列: 上游为 5'-GAA CGG GAA GCT CAC TGG-3', 下游为 5'-GCC TGC TTC ACC ACC TTC T-3'。

1.4.5 qRT-PCR 检测 HUVECs 细胞质和细胞核中 hsa-circ-0001360 的表达 按照核质分离试剂盒分别提取 HUVECs 细胞质和细胞核, 以 GAPDH 作为细胞质的内参基因, 以 U6 作为细胞核的内参基因, 进行 qRT-PCR 检测 (方法同 1.4.4)。U6 引物序列: 上游为 5'-GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG-3', 下游为 5'-CTC GCT GGA AGA TGG TG-3'。

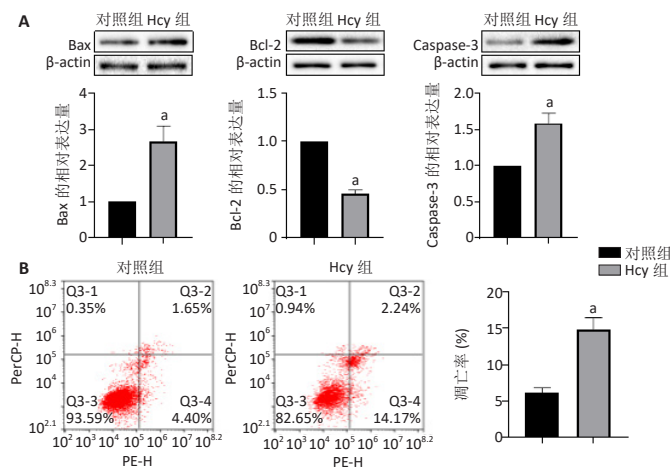
1.5 主要观察指标 ① HUVECs 中 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达; ② HUVECs 的凋亡率; ③ HUVECs 中 hsa-circ-0001360 的表达。

1.6 统计学分析 实验数据均使用 Graphpad Prism 8.0 进行处理分析, 统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本间比较采用 t 检验, 多样本间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有

显著性意义。统计学方法已通过宁夏医科大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 Hcy 对 HUVECs 凋亡的影响 Western blot 检测结果表明, 与对照组相比, Hcy 组 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达水平明显增高 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 流式细胞仪结果显示, Hcy 组 HUVECs 凋亡率明显高于对照组 ($P < 0.01$)。以上结果共同表明, Hcy 处理后 HUVECs 发生明显凋亡, 见图 1。

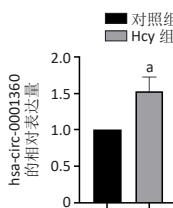


图注: 图 A 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 的表达; B 为流式细胞仪检测细胞凋亡率。与对照组相比, $^a P < 0.01$ 。

图 1 | 同型半胱氨酸 (Hcy) 对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

Figure 1 | Effect of homocysteine on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells

2.2 Hcy 对 HUVECs 中 hsa-circ-0001360 表达的影响 qRT-PCR 结果表明, Hcy 组 HUVECs 中 hsa-circ-0001360 的表达显著高于对照组 ($P < 0.01$), 见图 2。



图注: qRT-PCR 检测 hsa-circ-0001360 的相对表达量。与对照组相比, $^a P < 0.01$ 。

图 2 | 同型半胱氨酸 (Hcy) 对人脐静脉内皮细胞中 hsa-circ-0001360 表达的影响

Figure 2 | Effect of homocysteine on hsa-circ-0001360 expression in human umbilical vein endothelial cells

2.3 hsa-circ-0001360 在 HUVECs 细胞核和细胞质中的表达 qRT-PCR 结果表明, hsa-circ-0001360 在细胞质中的表达明显高于细胞核 ($P < 0.01$), 见图 3。

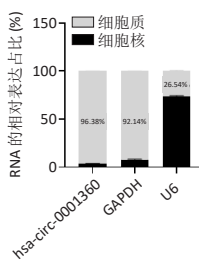


图 3 | hsa-circ-0001360 在人脐静脉内皮细胞的细胞核和细胞质中的表达

Figure 3 | Expression of hsa-circ-0001360 in the nucleus and cytoplasm of human umbilical vein endothelial cells

2.4 慢病毒转染干扰和过表达 hsa-circ-0001360 效果验证 使用慢病毒转染 HUVECs 以实现 hsa-circ-0001360 的干扰和过表达, qRT-PCR 结果表明, 与干扰对照组相比, 干扰 hsa-circ-0001360 组 hsa-circ-0001360 表达明显下降 ($P < 0.01$); 与过表达对照组相比, 过表达 hsa-circ-0001360 组 hsa-circ-0001360 表达明显升高 ($P < 0.01$), 见图 4。

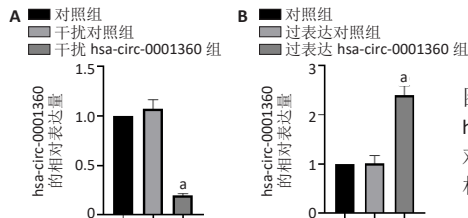
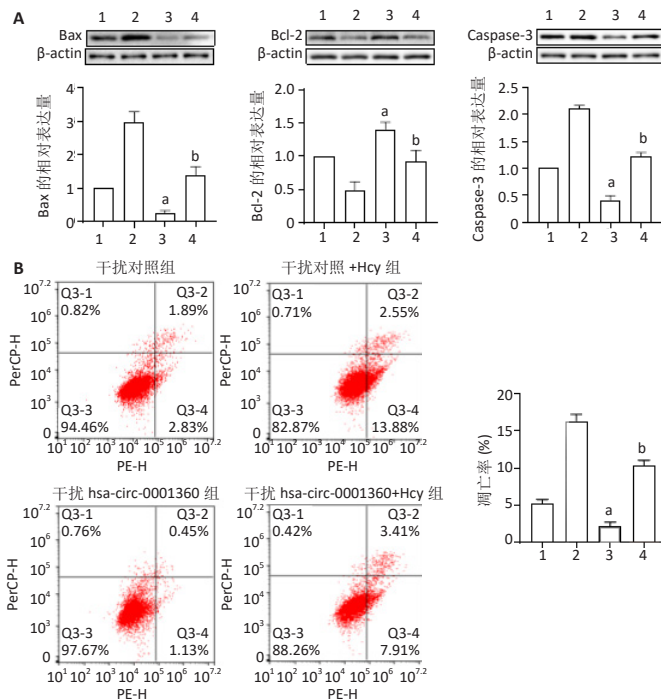


图 4 | 慢病毒转染干扰 (A) 和过表达 (B) hsa-circ-0001360 效果验证
Figure 4 | Validation of lentivirus transfection interference (A) and overexpression (B) of hsa-circ-0001360

2.5 干扰 hsa-circ-0001360 对 Hcy 诱导 HUVECs 凋亡的影响 Western blot 检测结果与流式细胞仪结果分别表明: 干扰 hsa-circ-0001360 组相较于干扰对照组, 干扰 hsa-circ-0001360+Hcy 组相较于干扰对照 +Hcy 组, Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白的表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.01$), 见图 5。

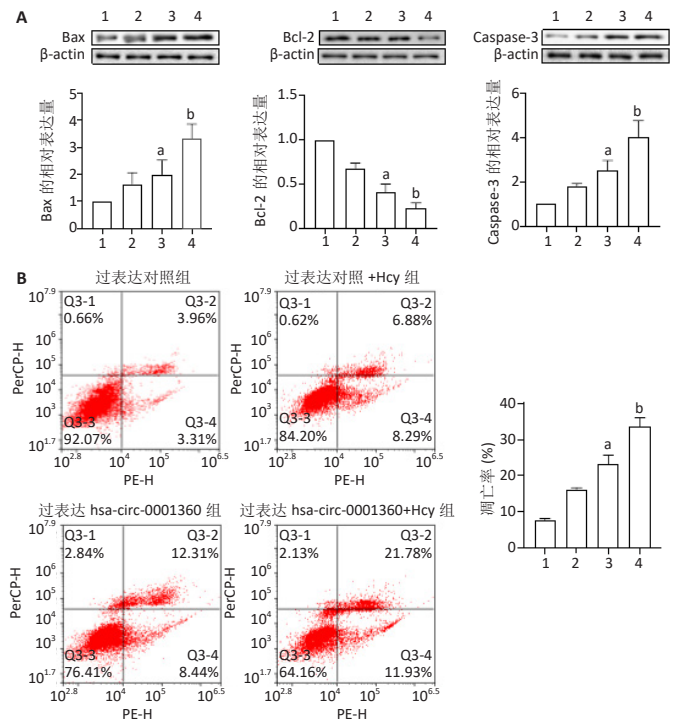


图注: 图 A 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 的表达; B 为流式细胞仪检测细胞凋亡率。1, 2, 3 和 4 分别为干扰对照组、干扰对照 +Hcy 组、干扰 hsa-circ-0001360 组和干扰 hsa-circ-0001360 + Hcy 组; 与干扰对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与干扰对照 +Hcy 组相比, ^b $P < 0.01$ 。

图 5 | 干扰 hsa-circ-0001360 对同型半胱氨酸 (Hcy) 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

Figure 5 | Effect of interfering hsa-circ-0001360 on homocysteine induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells

2.6 过表达 hsa-circ-0001360 对 Hcy 诱导 HUVECs 凋亡的影响 Western blot 结果与流式细胞仪结果分别表明: 过表达 hsa-circ-0001360 组相较于过表达对照组, 过表达 hsa-circ-0001360+Hcy 组相较于过表达对照 + Hcy 组, Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达水平明显增高 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.01$), 见图 6。



图注: 图 A 为 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 的表达; B 为流式细胞仪检测细胞凋亡率。1, 2, 3 和 4 分别为过表达对照组、过表达对照 +Hcy 组、过表达 hsa-circ-0001360 组和过表达 hsa-circ-0001360+Hcy 组; 与过表达对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与过表达对照 +Hcy 组相比, ^b $P < 0.01$ 。

图 6 | 过表达 hsa-circ-0001360 对同型半胱氨酸 (Hcy) 诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

Figure 6 | Effect of overexpressing hsa-circ-0001360 on homocysteine induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells

3 讨论 Discussion

该研究结果显示, Hcy 干预组 HUVECs 中 hsa-circ-0001360 的表达显著高于对照组, 干扰 hsa-circ-0001360 能够降低 Hcy 诱导 HUVECs 的凋亡, 而过表达 hsa-circ-0001360 则进一步增强 Hcy 诱导 HUVECs 的凋亡。

内皮细胞功能障碍是动脉粥样硬化发展的第一步, 血管的形成离不开内皮细胞, 血管内皮细胞是覆盖在血管内膜表面纵向排列的单层扁平细胞, 其直接接触血液系统, 是血液系统和组织间的屏障, 具有多种生理功能。建立血管内皮细胞培养模型, 是体外研究血管内皮细胞功能的实验手段, 而 HUVECs 以其来源方便、增殖能力强且没有伦理争议等诸多优点, 成为了众多研究者首选的模型构建细胞^[13-14]。由于高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化性心血管疾病的独立危险因素^[4-5], 因此, 该研究以 Hcy 干预 HUVECs 来构建体外动脉

粥样硬化模型。

不同于细胞坏死,细胞凋亡是由基因控制的,是细胞为更好适应周围生存环境而发生的一种主动的程序性死亡过程。细胞凋亡的途径有2种:内源性的线粒体途径(Bcl-2途径)和外源性的死亡受体途径^[15]。Bcl-2家族有抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白两大类,抗凋亡蛋白主要包括Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1和Bcl-W等,促凋亡蛋白主要包括Bax、Bak、Bcl-XS和Bad等。该研究从内源性的线粒体途径以Bcl-2、Bax和Caspase-3为主要蛋白指标对HUVECs的凋亡进行了探究。Hcy作为人体代谢的一种中间产物,其能够诱导心肌细胞、足细胞、内皮细胞等多种细胞发生凋亡的研究早有报道^[16-18]。该研究中,Hcy处理后HUVECs凋亡率同样显著高于对照组。

circRNAs作为一种非编码RNA,在生命体中发挥着诸多功能,包括:①调控基因转录;②调控剪接;③充当微小RNA(miRNA)海绵;④充当蛋白质海绵;⑤形成circRNA-蛋白质复合物;⑥翻译蛋白等^[19-20]。某些circRNAs曾被报道在细胞凋亡中发挥作用,HUANG等^[21-23]研究指出circRNA-0092516可调控软骨细胞的凋亡,circRNA-0000285和circRNA-UBAP2等多种circRNA调控细胞凋亡也已被证实,这为研究hsa-circ-0001360调控HUVECs凋亡提供了思路。Hcy处理后HUVECs中hsa-circ-0001360的表达显著高于对照组,当干扰hsa-circ-0001360后,HUVECs的凋亡率明显下降,而过表达hsa-circ-0001360后,HUVECs的凋亡率却显著上升。

核质分离结果显示,hsa-circ-0001360主要在HUVECs的细胞质中表达,而在细胞中表达的circRNA的主要生物学功能可能是充当miRNA海绵和调控下游靶蛋白^[24],但该研究未能展开探讨hsa-circ-0001360调控HUVECs凋亡的具体机制,这将是后续实验的研究重点。

综上所述,该研究表明hsa-circ-0001360可以促进Hcy诱导HUVECs发生凋亡,这为进一步探究高同型半胱氨酸血症诱发动脉粥样硬化的分子机制提供了新的实验依据和理论基础。

致谢:感谢赣州市妇幼保健院曾慧医生对此研究做出的重要贡献。

作者贡献:况国军负责实验实施、论文撰写,马胜超、杨安宁负责实验数据分析处理,于素美、钟颖怡、章旭红负责细胞培养、指标检测,郝银菊、熊建团、焦运负责数据和文章的校对,姜怡邓、况国军负责实验设计。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》;文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重;文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] BENJAMIN EJ, BLAHA MJ, CHIUVE SE, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(10):e146-e603.
- [2] LI X, QI H, CUI W, et al. Recent advances in targeted delivery of non-coding RNA-based therapeutics for atherosclerosis. *Mol Ther*. 2022;30(10):3118-3132.
- [3] LIBBY P, BURING JE, BADIMON L, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56.
- [4] EIKELBOOM JW, LONN E, GENEST J JR, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med*. 1999;131(5):363-375.
- [5] DUAN H, ZHANG Q, LIU J, et al. Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis. *Pharmacol Res*. 2021;168:105599.
- [6] 张晴,高春兰,于飞飞,等.同型半胱氨酸致胰岛β细胞凋亡中肝配蛋白A型受体2 DNA甲基化升高[J].中国组织工程研究,2023,27(5):714-719.
- [7] 刘昆,谢琳,曹军,等.同型半胱氨酸致足细胞凋亡中FoxO1 DNA甲基化水平增高[J].中国组织工程研究,2021,25(2):269-273.
- [8] QIN M, WANG W, ZHOU H, et al. Circular RNA circ_0003645 silencing alleviates inflammation and apoptosis via the NF-κB pathway in endothelial cells induced by oxLDL. *Gene*. 2020;755:144900.
- [9] ZHUANG JB, LI T, HU XM, et al. Circ_CHFR expedites cell growth, migration and inflammation in ox-LDL-treated human vascular smooth muscle cells via the miR-214-3p/Wnt3/β-catenin pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(6):3282-3292.
- [10] RONG ZH, CHANG NB, YAO QP, et al. Suppression of circDcbl1 Alleviates Intimal Hyperplasia in Rat Carotid Artery by Targeting miR-145-3p/Neuropilin-1. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;18:999-1008.
- [11] CHEN P, LI C, HUANG H, et al. Circular RNA profiles and the potential involvement of down-expression of hsa_circ_0001360 in cutaneous squamous cell carcinogenesis. *FEBS Open Bio*. 2021;11(4):1209-1222.
- [12] 马鹏俊,张鸣号,郭伟,等.叶酸和维生素B₁₂在同型半胱氨酸诱导人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用[J].中国病理生理杂志,2019,35(11):1951-1956.
- [13] DUAN MX, ZHOU H, WU QQ, et al. Andrographolide Protects against HG-Induced Inflammation, Apoptosis, Migration, and Impairment of Angiogenesis via PI3K/AKT-eNOS Signalling in HUVECs. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:6168340.
- [14] ZHAO F, YANG X, XU G, et al. Propranolol suppresses HUVEC viability, migration, VEGF expression, and promotes apoptosis by downregulation of miR-4295. *J Cell Biochem*. 2019;120(4):6614-6623.
- [15] MOUJALLED D, STRASSER A, LIDDELL JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death Differ*. 2021;28(7):2029-2044.
- [16] SIPKENS JA, KRIJNEN PA, HAHN NE, et al. Homocysteine-induced cardiomyocyte apoptosis and plasma membrane flip-flop are independent of S-adenosylhomocysteine: a crucial role for nuclear p47(phox). *Mol Cell Biochem*. 2011;358(1-2):229-239.
- [17] 曹军,刘昆,谢琳,等.脂肪酸结合蛋白4对高同型半胱氨酸血症小鼠足细胞凋亡的影响[J].医学研究生学报,2020,33(1):25-31.
- [18] 杨绍兵,梁思敏,曾祥飞,等.激活TRPV1在高同型半胱氨酸促内皮细胞凋亡中的作用[J].临床心血管病杂志,2017,33(6):587-591.
- [19] CHEN LL. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(8):475-490.
- [20] MISIR S, WU N, YANG BB. Specific expression and functions of circular RNAs. *Cell Death Differ*. 2022;29(3):481-491.
- [21] HUANG Z, MA W, XIAO J, et al. CircRNA_0092516 regulates chondrocyte proliferation and apoptosis in osteoarthritis through the miR-337-3p/PTEN axis. *J Biochem*. 2021;169(4):467-475.
- [22] ZHANG S, XU Y, ZHENG Q. circRNA_0000285 knockdown suppresses viability and promotes apoptosis of cervical cancer cells by sponging microRNA-654-3p. *Bioengineered*. 2022;13(3):5251-5261.
- [23] XU Q, DENG B, LI M, et al. circRNA-UBAP2 promotes the proliferation and inhibits apoptosis of ovarian cancer through miR-382-5p/PRPF8 axis. *J Ovarian Res*. 2020;13(1):81.
- [24] KRISTENSEN LS, ANDERSEN MS, STAGSTED LVW, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):675-691.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)