

CircRNA ANKRD36靶向miR-127-5p调控脓毒症血管内皮细胞凋亡和氧化应激的分子机制研究

郭飞波^{1*} 吴斌²

(¹湖北省天门市第一人民医院, 检验科, 天门 431700; ²武汉市中西医结合医院, 检验科, 武汉 430022)

摘要 为了探讨CircRNA ANKRD36对脓毒症血管内皮细胞凋亡和氧化应激的影响及可能机制, 该研究将CircRNA ANKRD36小干扰RNA、miR-127-5p模拟物或CircRNA ANKRD36小干扰RNA和miR-127-5p抑制剂转染至人脐静脉血管内皮细胞中, 然后用1.0 μg/mL LPS干预转染后的细胞24 h, RT-qPCR法检测细胞中CircRNA ANKRD36和miR-127-5p的表达情况, 流式细胞术检测细胞凋亡, 蛋白印迹法检测细胞中Cleaved-Caspase-3蛋白表达水平, DCFH-DA探针法检测ROS水平, 硫代巴比妥酸法检测细胞中MDA含量, 黄嘌呤氧化酶法检测细胞中SOD活性。此外, 用双荧光素酶报告基因实验验证了CircRNA ANKRD36和miR-127-5p的调控关系。结果显示, LPS可促进血管内皮细胞中CircRNA ANKRD36的表达($P < 0.05$), 而抑制miR-127-5p表达($P < 0.05$); 下调CircRNA ANKRD36或上调miR-127-5p可降低LPS诱导的血管内皮细胞凋亡率、细胞中Cleaved-Caspase-3蛋白表达水平、ROS水平及MDA含量($P < 0.05$), 提高细胞中SOD活性($P < 0.05$)。CircRNA ANKRD36可靶向结合并负调控miR-127-5p。下调miR-127-5p可逆转下调CircRNA ANKRD36对LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化应激的影响。这提示, 下调CircRNA ANKRD36可能通过靶向上调miR-127-5p抑制LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化应激反应, CircRNA ANKRD36/miR-127-5p轴可能为脓毒症的治疗提供了新的分子靶点。

关键词 脓毒症; CircRNA ANKRD36; miR-127-5p; 细胞凋亡; 氧化应激

Study on Molecular Mechanism of CircRNA ANKRD36 Regulating Apoptosis and Oxidative Stress of Vascular Endothelial cells in Sepsis by Targeting miR-127-5p

GUO Feibo^{1*}, WU Bin²

(¹Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Tianmen, Tianmen 431700, China;

²Department of Clinical Laboratory, Wuhan Hospital of Integrated Chinese And Western Medicine, Wuhan 430022, China)

Abstract In order to explore the effect and possible mechanism of CircRNA ANKRD36 on the apoptosis and oxidative stress of vascular endothelial cells in sepsis, CircRNA ANKRD36 small interfering RNA, miR-127-5p mimic or CircRNA ANKRD36 small interfering RNA and miR-127-5p inhibitor were transfected into human umbilical vein endothelial cells, and then 1.0 μg/mL LPS was used to intervene the transfected cells for 24 h. RT-qPCR method was used to detect the expression of CircRNA ANKRD36 and miR-127-5p in the cells. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to detect the protein expression of Cleaved-Caspase-3 in cells. DCFH-DA probe method was used to detect the level of ROS. Thiobarbituric acid method was used to detect the content of

收稿日期: 2021-04-20

接受日期: 2021-07-06

*通讯作者。Tel: 13117118657, E-mail: 51325119@qq.com

Received: April 20, 2021

Accepted: July 6, 2021

*Corresponding author. Tel: +86-13117118657, E-mail: 51325119@qq.com

MDA in cells. Xanthine oxidase method was used to detect the activity of SOD in cells. In addition, the dual luciferase reporter gene experiment verified the regulatory relationship between CircRNA ANKRD36 and miR-127-5p. The results showed that LPS promoted the expression of CircRNA ANKRD36 in vascular endothelial cells ($P < 0.05$), but it inhibited the expression of miR-127-5p ($P < 0.05$). Down-regulating CircRNA ANKRD36 or up-regulating miR-127-5p reduced LPS-induced vascular endothelial cells apoptosis, the expression of Cleaved-Caspase-3 protein expression, the level of ROS and the content of MDA in cells ($P < 0.05$), but increased the activity of SOD in cells ($P < 0.05$). CircRNA ANKRD36 could target to regulate the expression of miR-127-5p. Down-regulating miR-127-5p reversed the effect of down-regulating CircRNA ANKRD36 on LPS-induced vascular endothelial cell apoptosis and oxidative stress. This suggested that down-regulating CircRNA ANKRD36 might inhibit LPS-induced vascular endothelial cell apoptosis and oxidative stress by up-regulating the expression of miR-127-5p. CircRNA ANKRD36/miR-127-5p axis may provide new molecular targets for the treatment of sepsis.

Keywords sepsis; CircRNA ANKRD36; miR-127-5p; apoptosis; oxidative stress

脓毒症是由感染、烧伤等引起的全身性炎症反应综合征,严重时可导致急性呼吸窘迫综合征。血管内皮细胞参与维持血管的正常形态和生理功能,也是脓毒症的效应细胞和靶细胞,脓毒症发生时,其可诱导肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 等炎症介质的释放损害内皮细胞,使内皮细胞的结构和完整性遭到破坏,进而引起血管内皮细胞通透性增加,血管内液体、血浆蛋白大量渗出,进一步造成组织、器官水肿及发生相应的功能障碍^[1]。血管内皮细胞损伤是脓毒症发生发展的中心环节^[2],抑制或减轻血管内皮细胞损伤对脓毒症的治疗尤为重要。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要组成部分,其可引起细胞中相关细胞因子和炎症因子表达紊乱,进而引发细胞损伤^[3]。环状RNA(circular RNA, CircRNA)与微小RNA(micro RNA, miRNA)是两类非编码RNA,且CircRNA可发挥miRNA分子海绵作用,间接调控miRNA靶基因的表达,进而影响细胞增殖、凋亡、氧化应激和炎症反应等生理或病理过程,参与人类多种疾病的发生发展^[4-6]。研究显示,CircRNA ANKRD36可通过靶向miR-138激活p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK)/核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)途径,促进LPS诱导的心肌细胞H9c2凋亡和炎症损伤,进而促进心肌炎的发展进程^[7];沉默CircRNA ANKRD36可有效减弱LPS引起的人胚肺成纤维细胞凋亡、氧化应激和炎症反应,其作用机制与靶向调控miR-31/髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)轴有关^[8]。但目前,CircRNA ANKRD36能否影响脓毒

症的发生发展还未知。Circular RNA Interactome靶基因在线预测软件显示,CircRNA ANKRD36可能与miR-127-5p存在相互作用。有报道称,miR-127-5p可通过靶向肿瘤坏死因子受体相关因子1来减少LPS诱导的炎症细胞因子的产生,抑制肺炎发展^[9],但miR-127-5p对血管内皮细胞损伤的影响也还未知。因此,本研究建立LPS诱导的人脐静脉血管内皮细胞损伤模型,主要探究CircRNA ANKRD36和miR-127-5p对血管内皮细胞凋亡及氧化应激损伤的影响及CircRNA ANKRD36能否靶向miR-127-5p发挥作用。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

永生化人脐静脉血管内皮细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自浙江天杭生物科技有限公司;LPS购自美国Sigma公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、DMEM培养液、膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡试剂盒、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均购自北京索莱宝科技有限公司;Lipofectamine™ 2000试剂盒购自美国Invitrogen公司;CircRNA ANKRD36小干扰RNA(si-CircRNA ANKRD36)、小干扰RNA阴性对照(si-NC)、miR-127-5p抑制剂(anti-miR-127-5p)及阴性序列(anti-miR-NC)、miR-127-5p模拟物(mimcs)及模拟对照序列(miR-NC)和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试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司; 活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 兔单克隆抗体半胱氨酸天冬氨酸酶前体(Pro-Caspase)-3和活化的半胱天冬酶-3(Cleaved-Caspase-3)及兔多克隆抗体Pro-Caspase-9和Cleaved-Caspase-9均购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 从液氮罐中取出装有血管内皮细胞的冻存管, 在超净工作台内复苏细胞。加含10% FBS的DMEM培养液, 将血管内皮细胞转移至25 cm²培养瓶中, 置于37 °C、CO₂体积分数5%、湿度97%的培养箱中培养。当细胞生长密度至80%时, 传代培养。

1.2.2 CCK-8法检测细胞增殖活性 取对数期血管内皮细胞, 将其以2.5×10⁴个/孔的密度接种至96孔板中, 培养12 h后, 弃培养基。分别换用含0.1、1.0、10.0 μg/mL LPS的培养液培养细胞24 h, 然后每孔加10 μL CCK-8试剂。孵育2 h后, 用酶标仪(450 nm)检测各孔细胞吸光度(D)值。同时设置对照组(control组): 细胞用不含LPS的培养液培养24 h。D值越大, 说明细胞增殖活性越强, 选择血管内皮细胞增殖活性接近50%的LPS浓度进行后续实验。

1.2.3 细胞分组 取对数期血管内皮细胞, 将其以5.0×10⁵个/孔的密度接种至6孔板中, 培养12 h后, 弃培养基, 用含1.0 μg/mL LPS的培养液培养24 h, 记为LPS组。同时设置control组, 细胞用不含LPS的培养液培养24 h。用Lipofectamine™ 2000脂质体法, 分别转染si-NC、si-CircRNA ANKRD36、miR-NC、miR-127-5p mimics、共转染si-CircRNA ANKRD36与anti-miR-NC、si-CircRNA ANKRD36与anti-miR-127-5p至血管内皮细胞。转染12 h后, 换为含1.0 μg/mL LPS的培养液培养24 h, 并分别记为si-NC+LPS组、si-CircRNA ANKRD36+LPS组、miR-NC+LPS组、miR-127-5p+LPS组、si-CircRNA ANKRD36+anti-miR-NC+LPS组、si-CircRNA ANKRD36+anti-miR-127-5p+LPS组。培养结束后, 收集细胞, 用磷酸盐缓冲液清洗2次, 检测以下各指标。

1.2.4 RT-qPCR检测CircRNA ANKRD36和miR-127-5p表达 用RNA抽提试剂盒提取各组细胞中总RNA, 利用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA, 行

PCR扩增。扩增程序: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共35个循环。引物序列: CircRNA ANKRD36上游5'-GTC GAG TCG AGG AGC TAG GC-3', 下游5'-CGC GTG AGC CGT AGG CAA GCT GA-3'; miR-127-5p上游5'-CTC TTC AAG CTC CAA ACC AAA C-3', 下游5'-GTA TCC ACC AGA ACC ACC AGG-3'; GAPDH上游5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G-3', 下游5'-TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT-3'; U6上游5'-ATT GGA ACG ATA CAG AGA AGA TT-3', 下游5'-GGA ACG CTT CAC GAA TTT G-3'。2^{-ΔΔCt}法计算CircRNA ANKRD36相对GAPDH、miR-127-5p相对U6的表达量。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 向各组细胞中加500 μL结合缓冲液, 重悬细胞。然后严格参照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书, 用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

1.2.6 蛋白印迹法检测蛋白表达 向各组细胞中加RIPA试剂, 充分裂解细胞, 提取细胞中总蛋白, 并用BCA法对蛋白溶液进行定量。以每泳道20 μg蛋白行10% SDS-PAGE电泳, 然后将分离蛋白转至PVDF膜, 并在5%脱脂奶粉溶液中室温封闭1 h。分别用Pro-Caspase-3(1:500)、Cleaved-Caspase-3(1:500)、Pro-Caspase-9(1:500)、Cleaved-Caspase-9(1:500)、β-actin(1:1 000)一抗孵育液, 在4 °C冰箱中孵育过夜。洗膜后, 再用山羊抗兔二抗(1:2 000)孵育液在37 °C摇床中孵育1 h。洗膜后, 加化学发光试剂避光显影, 凝胶成像系统曝光拍照, ImageJ软件分析目的蛋白相对β-actin的表达量。

1.2.7 相应试剂盒检测细胞中ROS水平、MDA含量及SOD活性 分别参照ROS、MDA及SOD试剂盒, 检测其在细胞中的表达水平, 其中ROS检测采用DCFH-DA探针法, MDA含量检测采用硫代巴比妥酸法, SOD活性检测采用黄嘌呤氧化酶法。

1.2.8 双荧光素酶报告基因实验 由上海生工生物工程有限公司根据Circular RNA Interactome靶基因在线预测软件显示的CircRNA ANKRD36与miR-127-5p核苷酸序列的结合位点分别构建CircRNA ANKRD36野生型荧光素酶载体(WT-CircRNA ANKRD36)及突变型荧光素酶载体(MUT-CircRNA ANKRD36)。将血管内皮细胞以5.0×10⁵个/孔接种于6孔板中, 用Lipofectamine™ 2000脂质体法, 分别共转染WT-CircRNA ANKRD36与miR-NC、WT-CircRNA

ANKRD36与 miR-127-5p mimic、MUT-CircRNA ANKRD36与 miR-NC、MUT-CircRNA ANKRD36与 miR-127-5p mimic。转染 12 h 后, 更换新鲜培养液, 继续培养 24 h。然后收集细胞, 并加细胞裂解液裂解, 离心(3 500 r/min、5 min), 取上清, 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

SPSS 22.0 软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 LPS 对血管内皮细胞增殖活性的影响

与 control 组比较, 血管内皮细胞经不同浓度(0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$) LPS 干预 24 h 后, 细胞 *D* 值明显降低, 且差异显著($P<0.05$), 说明 LPS 可抑制血管内皮细胞的增殖活性, 且其浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时对血管内皮细胞的抑制率为 47.49%, 接近 50.00%。因此, 选择 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS 进行后续实验(图 1)。

2.2 LPS 对血管内皮细胞中 CircRNA ANKRD36 与 miR-127-5p 表达的影响

图 2 结果显示, 与 control 组比较, LPS 组血管内皮

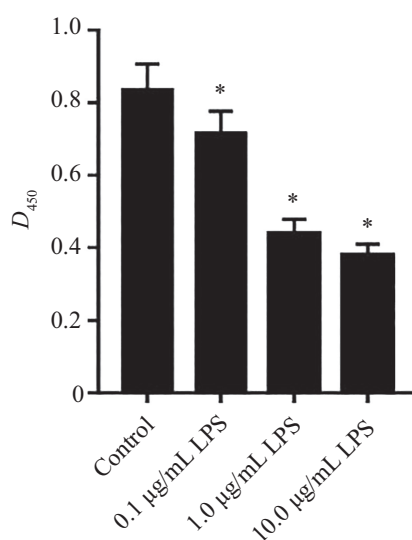
细胞中 CircRNA ANKRD36 表达量增加, 而 miR-127-5p 表达量减少, 且差异显著($P<0.05$), 说明 LPS 促进血管内皮细胞中 CircRNA ANKRD36 的表达, 而抑制 miR-127-5p 表达。

2.3 下调 CircRNA ANKRD36 可抑制 LPS 诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化应激

与 control 组比较, LPS 组血管内皮细胞凋亡率及细胞中凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase-3 表达升高, Pro-Caspase-3 和 Pro-Caspase-9 蛋白表达降低, 细胞中 ROS 水平和 MDA 含量增加, SOD 活性降低, 且差异均显著($P<0.05$), 说明 LPS 可引起血管内皮细胞凋亡及氧化应激反应; 与 si-NC+LPS 组比较, si-CircRNA ANKRD36+LPS 组血管内皮细胞凋亡率及细胞中 Cleaved-Caspase-3 和 Cleaved-Caspase-9 蛋白表达降低, Pro-Caspase-3 和 Pro-Caspase-9 蛋白表达升高, 细胞中 ROS 水平和 MDA 含量减少, SOD 活性升高, 且差异均显著($P<0.05$)。LPS 组与 si-NC+LPS 组各检测指标比较无显著差异($P>0.05$)。这说明下调 CircRNA ANKRD36 减少 LPS 诱导的血管内皮细胞凋亡, 并抑制细胞氧化应激反应(图 3)。

2.4 上调 miR-127-5p 可抑制 LPS 诱导的血管内皮细胞凋亡和氧化应激

与 miR-NC+LPS 组比较, miR-127-5p+LPS 组血管内皮细胞凋亡率及细胞中 Cleaved-Caspase-3 和 Cleaved-Caspase-9 蛋白表达降低, Pro-Caspase-3

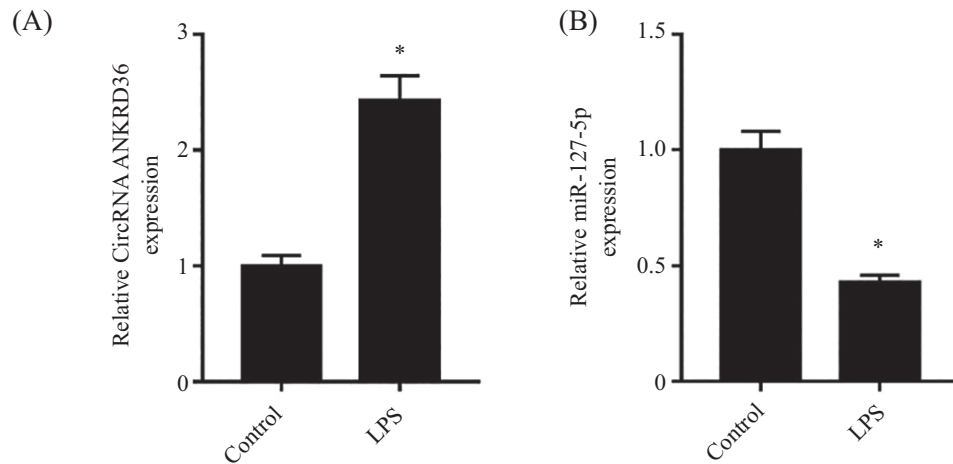


* $P<0.05$, 与 control 组比较。

* $P<0.05$ compared with control group.

图 1 不同浓度 LPS 对血管内皮细胞增殖活性的影响

Fig.1 The effect of different concentrations of LPS on the proliferation activity of vascular endothelial cells



* $P < 0.05$, 与control组比较。

* $P < 0.05$ compared with control group.

图2 CircRNA ANKRD36与miR-127-5p在LPS处理的血管内皮细胞中的表达

Fig.2 The expression of CircRNA ANKRD36 and miR-127-5p in vascular endothelial cells treated with LPS

和Pro-Caspase-9蛋白表达升高,细胞中ROS水平和MDA含量减少,SOD活性升高,且差异均显著($P < 0.05$),说明上调miR-127-5p可减少LPS诱导的血管内皮细胞凋亡,并抑制细胞氧化应激反应(图4)。

2.5 CircRNA ANKRD36靶向负调控miR-127-5p

Circular RNA Interactome靶基因在线预测软件显示的CircRNA ANKRD36与miR-127-5p的结合位点见图5A。共转染miR-127-5p与WT-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞荧光素酶活性明显低于共转染miR-NC与WT-CircRNA ANKRD36的细胞($P < 0.05$),而共转染miR-127-5p与MUT-CircRNA ANKRD36的细胞荧光素酶活性与共转染miR-NC与MUT-CircRNA ANKRD36的细胞比较无明显变化($P > 0.05$),说明CircRNA ANKRD36可与miR-127-5p靶向结合(图5B)。同时,转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中CircRNA ANKRD36表达量明显低于转染si-NC的细胞($P < 0.05$),而miR-127-5p表达量明显高于转染si-NC的细胞($P < 0.05$),进一步说明CircRNA ANKRD36靶向结合并负调控miR-127-5p(图5C)。

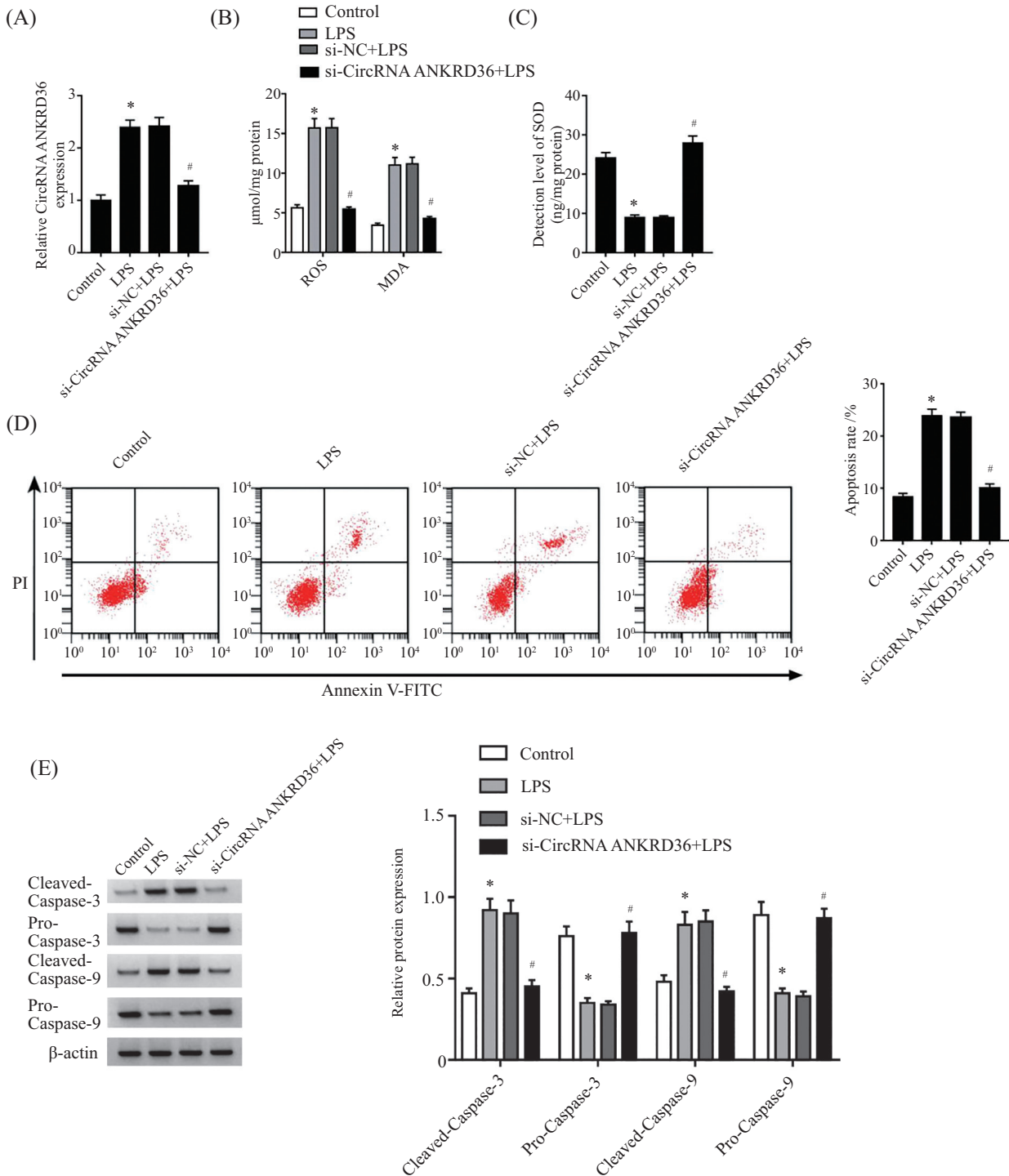
2.6 下调miR-127-5p逆转下调CircRNA ANKRD36对LPS诱导的血管内皮细胞凋亡和氧化应激的影响

与anti-miR-NC+si-CircRNA ANKRD36+LPS组比较,anti-miR-127-5p+si-CircRNA ANKRD36+LPS组血管内皮细胞中miR-127-5p表达量降低,细胞凋

亡率及Cleaved-Caspase-3和Cleaved-Caspase-9蛋白表达量升高,Pro-Caspase-3和Pro-Caspase-9蛋白表达量降低,细胞中ROS水平和MDA含量增加,SOD活性降低,且差异均显著($P < 0.05$),说明下调miR-127-5p可逆转下调CircRNA ANKRD36对LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化应激反应的影响(图6)。

3 讨论

脓毒症常见于大型手术、严重创伤及休克后,也是临床ICU危重病患者死亡的主要原因。目前,脓毒症发生发展的分子机制尚未可知,且缺乏有效的治疗方法。研究表明,血管内皮细胞受损是脓毒症发生发展的重要原因,保护血管内皮细胞免受损伤是脓毒症治疗的关键^[10]。CircRNA是真核生物中广泛存在的一类环状非编码RNA,其可竞争性结合miRNA,进而调控miRNA靶基因的表达,从而发挥生物学调控作用。研究表明,CircRNA参与调控脓毒症血管损伤,为减轻脓毒症血管内皮细胞损伤提供了分子靶点^[11]。作为一种CircRNA,CircRNA ANKRD36在多种疾病中异常表达,参与调控疾病的发展进程。研究显示,CircRNA ANKRD36在2型糖尿病患者外周血白细胞中表达上调,且与2型糖尿病患者慢性炎症密切相关,可用作筛选2型糖尿病患者慢性炎症的潜在生物标志物^[12]。但目前,CircRNA ANKRD36对血管内皮细胞损伤的影响和机制还未

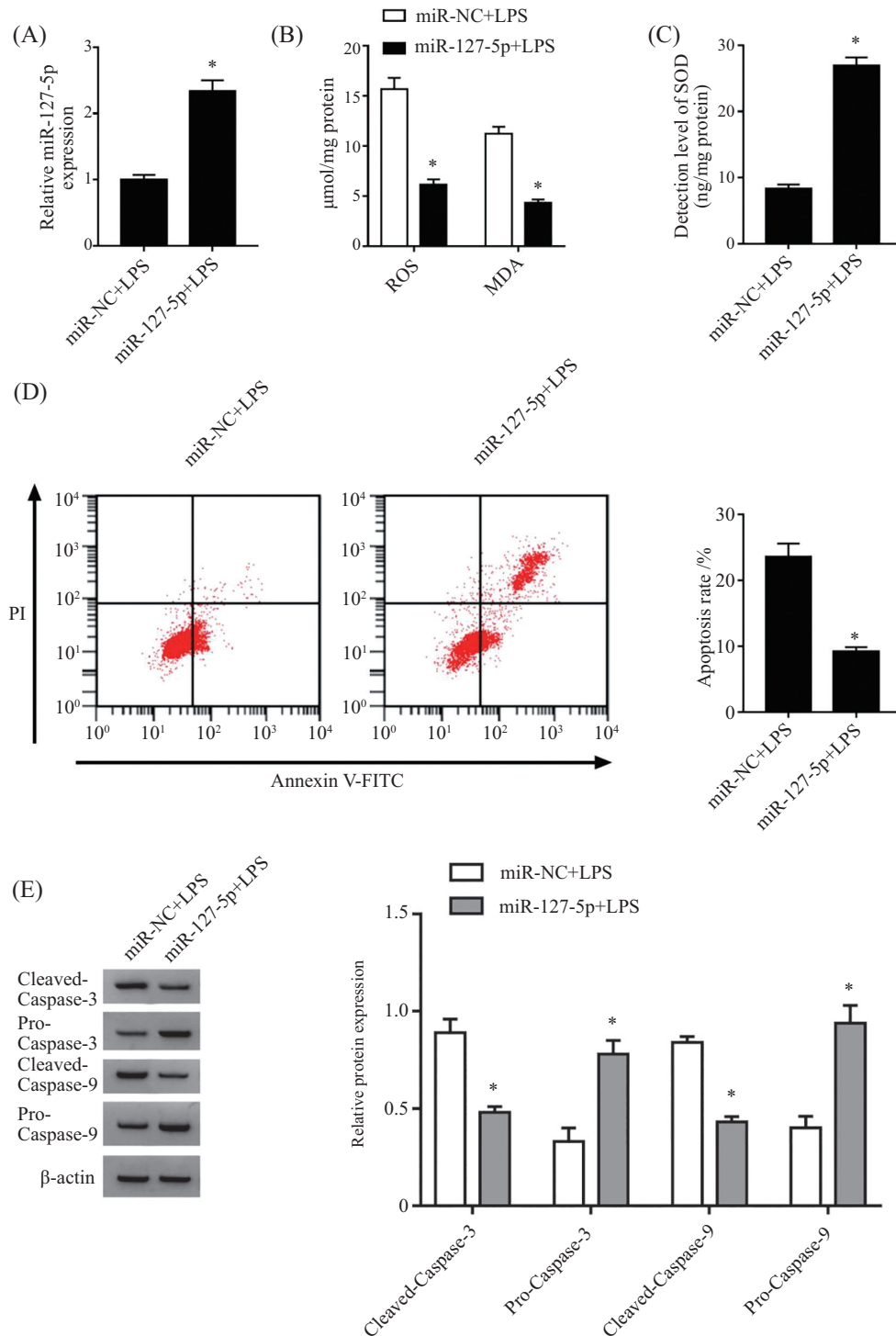


A: LPS诱导的转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中CircRNA ANKRD36的表达; B: LPS诱导的转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中ROS活性和MDA含量; C: LPS诱导的转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中SOD活性; D: LPS诱导的转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞凋亡率; E: LPS诱导的转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中Cleaved-Caspase-3、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9和Pro-Caspase-9蛋白表达。^{*} $P < 0.05$, 与control组比较; [#] $P < 0.05$, 与si-NC+LPS组比较。

A: the expression of CircRNA ANKRD36 in LPS-induced vascular endothelial cells transfected with si-CircRNA ANKRD36; B: the activity of ROS and the content of MDA LPS-induced vascular endothelial cells transfected with si-CircRNA ANKRD36; C: the activity of SOD activity in LPS-induced vascular endothelial cells transfected with si-CircRNA ANKRD36; D: LPS-induced apoptosis rate of vascular endothelial cells transfected with si-CircRNA ANKRD36; E: the protein expression of Cleaved-Caspase-3, Pro-Caspase-3, Cleaved-Caspase-9 and Pro-Caspase-9 in LPS-induced vascular endothelial cells transfected with si-CircRNA ANKRD36. ^{*} $P < 0.05$ compared with the control group; [#] $P < 0.05$ compared with the si-NC+LPS group.

图3 下调CircRNA ANKRD36对LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化应激的影响

Fig.3 The effects of down-regulation of CircRNA ANKRD36 on LPS-induced vascular endothelial cell apoptosis and oxidative stress

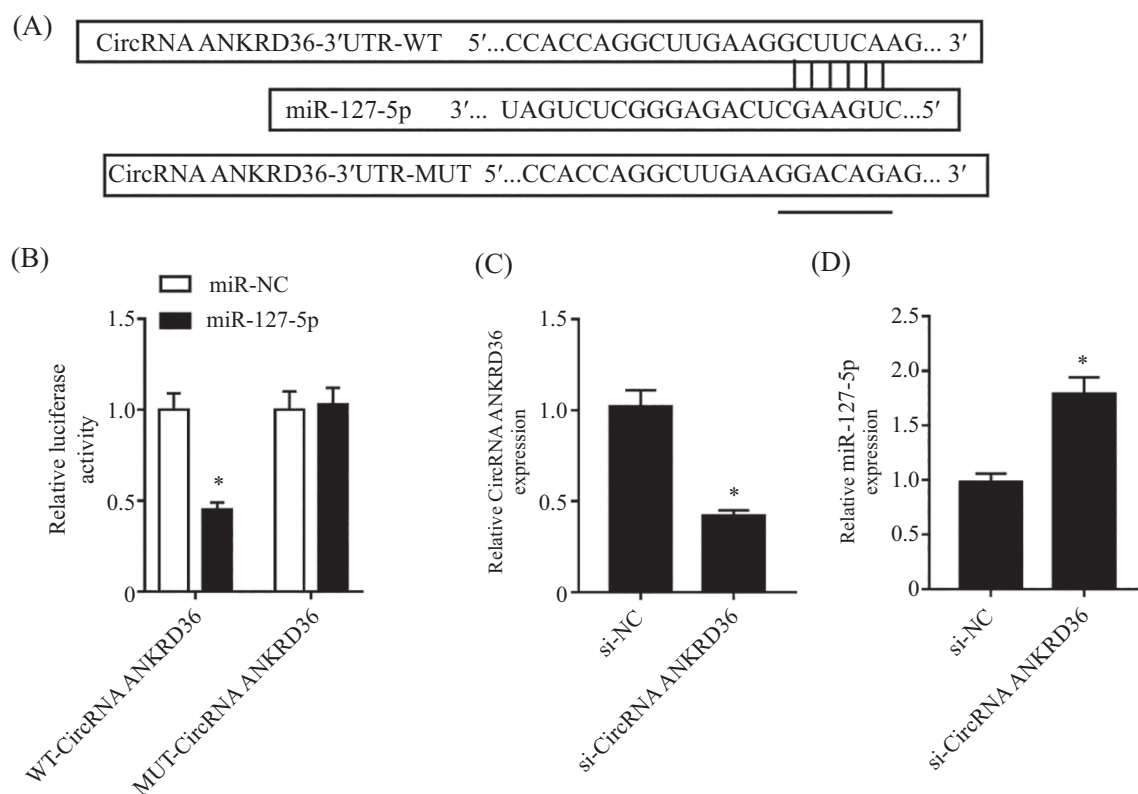


A: LPS诱导的转染miR-127-5p mimics的血管内皮细胞中miR-127-5p的表达; B: LPS诱导的转染miR-127-5p mimics的血管内皮细胞中ROS活性和MDA含量; C: LPS诱导的转染miR-127-5p mimics的血管内皮细胞中SOD活性; D: LPS诱导的转染miR-127-5p mimics的血管内皮细胞凋亡率; E: LPS诱导的转染miR-127-5p mimics的血管内皮细胞中Cleaved-Caspase-3、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9和Pro-Caspase-9蛋白表达。
* $P < 0.05$, 与miR-NC+LPS组比较。

A: the expression of miR-127-5p in LPS-induced vascular endothelial cells transfected with miR-127-5p mimics; B: the activity of ROS and the content of MDA LPS-induced vascular endothelial cells transfected with miR-127-5p mimics; C: the activity of SOD activity in LPS-induced vascular endothelial cells transfected with miR-127-5p mimics; D: LPS-induced apoptosis rate of vascular endothelial cells transfected with miR-127-5p mimics; E: the protein expression of Cleaved-Caspase-3, Pro-Caspase-3, Cleaved-Caspase-9 and Pro-Caspase-9 in LPS-induced vascular endothelial cells transfected with miR-127-5p mimics. * $P < 0.05$ compared with the miR-NC+LPS group.

图4 上调miR-127-5p对LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化应激的影响

Fig.4 The effects of up-regulation of miR-127-5p on vascular endothelial cell apoptosis and oxidative stress induced by LPS



A: Circular RNA Interactome靶基因在线预测软件显示的CircRNA ANKRD36和miR-127-5p的结合位点; B: 荧光素酶活性检测结果; C: 转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中CircRNA ANKRD36的表达; D: 转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中miR-127-5p的表达。* $P < 0.05$, 与si-NC组比较。

A: the binding sites between CircRNA ANKRD36 and miR-127-5p displayed by the Circular RNA Interactome target gene online prediction software; B: luciferase activity detection result; C: the expression of CircRNA ANKRD36 in vascular endothelial cells transfected with si-CircRNA ANKRD36; D: the expression of miR-127-5p in vascular endothelial cells transfected with si-CircRNA ANKRD36. * $P < 0.05$ compared with si-NC group.

图5 CircRNA ANKRD36靶向调控miR-127-5p

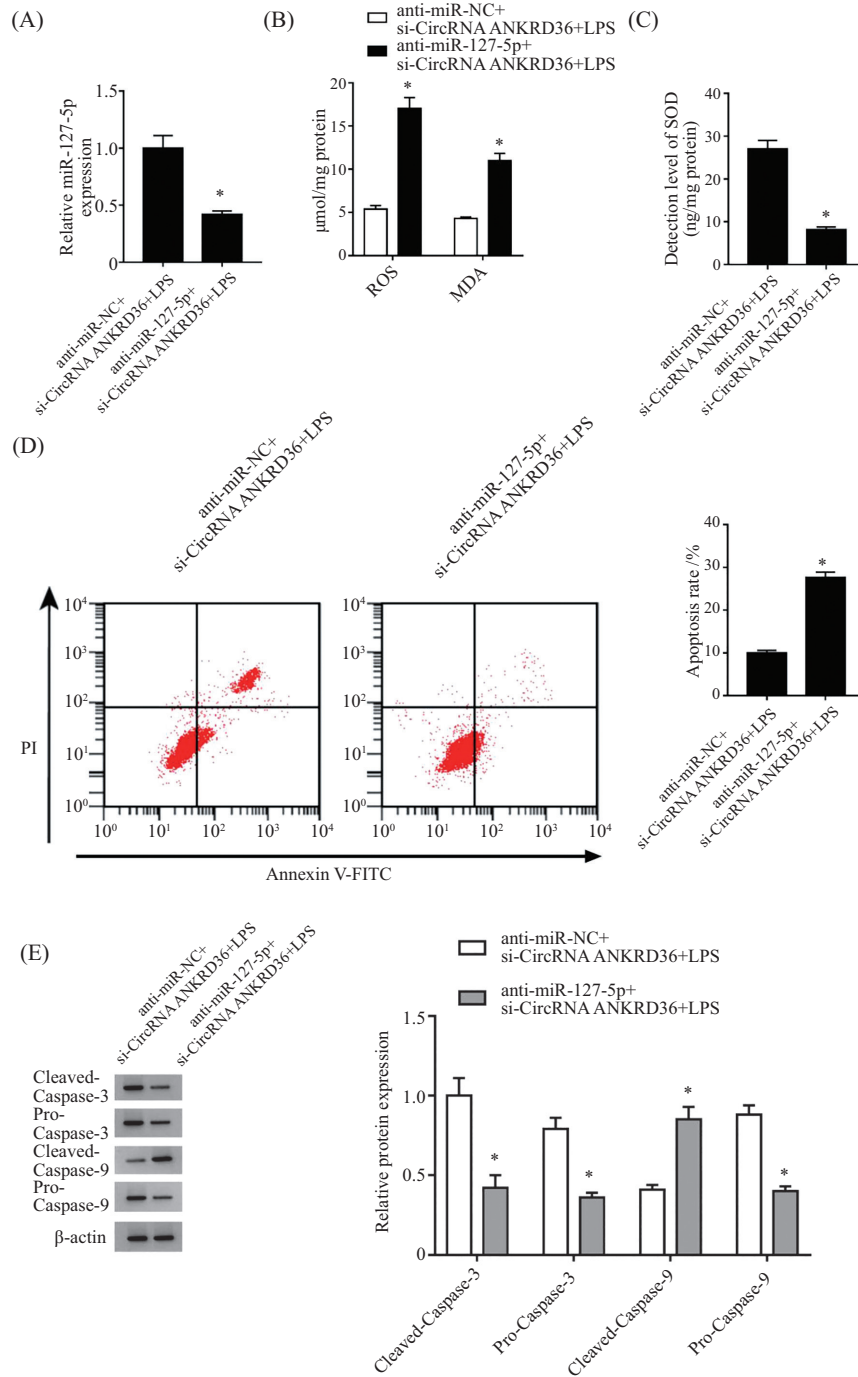
Fig.5 CircRNA ANKRD36 targets to regulate the expression of miR-127-5p

见报道。

本研究结果显示, LPS能够促进血管内皮细胞中CircRNA ANKRD36的表达, 下调CircRNA ANKRD36可减少LPS诱导的血管内皮细胞凋亡。细胞凋亡是一种受多种基因分子调控的程序性死亡过程, 其中Caspase级联反应在细胞凋亡中发挥重要调控作用。Caspase-9是Caspase级联反应的起始分子, 其活化生成Cleaved-Caspase-9, 进一步激活Caspase-3。Caspase-3是Caspase级联反应的关键调控分子, 受到上游凋亡信号刺激被活化, 生成Cleaved-Caspase-3, 进而剪切各种细胞底物, 执行细胞凋亡^[13]。本研究结果显示, 下调CircRNA ANKRD36促进了LPS诱导的血管内皮细胞中Cleaved-Caspase-3和Cleaved-Caspase-9蛋白表达, 提示CircRNA ANKRD36可能通过间接调控Caspase级联反应来影响LPS诱导的血管内皮细胞凋亡。

脓毒症发生时, 病原体及其毒素激活的炎症反应和宿主本身不断释放的炎症介质可破坏细胞线粒体功能, 影响线粒体内氧化呼吸链的偶联过程, 导致ROS生成增多, 进而启动氧化应激反应, 损伤血管内皮细胞功能, 最终引起脓毒症患者各器官功能障碍^[14]。MDA是脂质过氧化产物之一, 其在细胞中表达量的高低可间接反映细胞氧化应激水平^[15]。SOD是机体内抗氧化酶, 可清除过量氧自由基, 减轻自由基对机体组织造成的损伤^[16]。本研究结果显示, 下调CircRNA ANKRD36降低了LPS诱导的血管内皮细胞中ROS水平及MDA含量, 而提高SOD活性, 说明下调CircRNA ANKRD36可抑制LPS诱导的血管内皮细胞氧化应激反应, 减轻细胞氧化应激损伤。

circRNA可靶向miRNA调控miRNA靶基因的表达, 进而发挥生物学调控作用。miRNA在脓毒症的发生发展中也起重要作用。LI等^[19]研究显示, 脓毒



A: LPS诱导的共转染anti-miR-127-5p和si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中miR-127-5p的表达; B: LPS诱导的共转染anti-miR-127-5p和si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中ROS活性和MDA含量; C: LPS诱导的共转染anti-miR-127-5p和si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中SOD活性; D: LPS诱导的转染si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞凋亡率; E: LPS诱导的共转染anti-miR-127-5p和si-CircRNA ANKRD36的血管内皮细胞中Cleaved-Caspase-3、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-9和Pro-Caspase-9蛋白表达。* $P < 0.05$, 与anti-miR-NC+si-CircRNA ANKRD36+LPS组比较。

A: the expression of miR-127-5p in LPS-induced vascular endothelial cells co-transfected with anti-miR-127-5p and si-CircRNA ANKRD36; B: the activity of ROS and the content of MDA LPS-induced vascular endothelial cells co-transfected with anti-miR-127-5p and si-CircRNA ANKRD36; C: the activity of SOD activity in LPS-induced vascular endothelial cells co-transfected with anti-miR-127-5p and si-CircRNA ANKRD36; D: LPS-induced apoptosis rate of vascular endothelial cells co-transfected with anti-miR-127-5p and si-CircRNA ANKRD36; E: the protein expression of Cleaved-Caspase-3, Pro-Caspase-3, Cleaved-Caspase-9 and Pro-Caspase-9 in LPS-induced vascular endothelial cells co-transfected with anti-miR-127-5p and si-CircRNA ANKRD36. * $P < 0.05$ compared with the anti-miR-NC+si-CircRNA ANKRD36+LPS group.

图6 下调miR-127-5p逆转下调CircRNA ANKRD36对LPS诱导的血管内皮细胞凋亡和氧化应激的影响

Fig.6 Down-regulation of miR-127-5p reverses the effects of down-regulation of CircRNA ANKRD36 on LPS-induced vascular endothelial cell apoptosis and oxidative stress

症患者血清中miR-142-3p表达升高,且与乳酸、IL-6和前降钙素原呈正相关,miR-142-3p可能是影响脓毒症发生发展的促进因素。为了进一步探究下调CircRNA ANKRD36抑制LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化损伤的分子机制,本研究证实了CircRNA ANKRD36可靶向结合并负调控miR-127-5p,这与LPS促进血管内皮细胞中CircRNA ANKRD36表达而抑制miR-127-5p表达的结果一致。miR-127-5p属于miRNA家族成员,参与肿瘤^[18]、骨关节炎^[19]等多种疾病的发展进程。例如,李政等^[20]研究显示,miR-127-5p可通过靶向下调adipoR1及脂联素的表达,促进骨关节炎软骨细胞增殖,并抑制细胞炎症反应,这可能为骨关节炎的治疗提供了新途径。本研究显示,上调miR-127-5p可降低LPS引起的血管内皮细胞凋亡率及细胞中Cleaved-Caspase-3和Cleaved-Caspase-9的水平,同时降低细胞中ROS和MDA表达,而提高SOD活性,提示miR-127-5p也可抑制LPS引起的血管内皮细胞凋亡和氧化应激,其可作为减轻血管内皮细胞损伤的分子靶点。本研究还显示,下调miR-127-5p可逆转下调CircRNA ANKRD36对LPS诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化应激的影响,提示CircRNA ANKRD36可能通过靶向负调控miR-127-5p来减轻LPS诱导的血管内皮细胞损伤。

综上,LPS可促进血管内皮细胞中CircRNA ANKRD36的表达,从而抑制miR-127-5p的表达;下调CircRNA ANKRD36可减少LPS诱导的血管内皮细胞凋亡,并降低细胞氧化损伤,其作用机制可能与靶向负调控miR-127-5p有关,CircRNA ANKRD36/miR-127-5p轴可能为脓毒症的治疗提供了新的分子靶点。但本研究尚存在不足之处,仅在体外细胞层面进行了探究,尚需在体内进一步观察CircRNA ANKRD36/miR-127-5p轴对脓毒症发生发展的影响。

参考文献 (References)

- [1] KONG L C, WU P, LI J Z. miR-331 inhibits CLDN2 expression and may alleviate the vascular endothelial injury induced by sepsis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 1343-52.
- [2] 张望, 郭明杰, 胡晓彤, 等. 不同剂型的辛伐他汀通过iNOS/eNOS的平衡调节对脓毒症血管内皮细胞的保护效应[J]. *中华急诊医学杂志*(ZHANG W, WU M J, HU X T, et al. The protective effect of different dosage forms of simvastatin on vascular endothelial cells in sepsis through the balance adjustment of iNOS/eNOS [J]. *Chin J Emerg Med*), 2020, 29(1): 71-5.
- [3] ZYRIANOVA T, LOPEZ B, LIAO A, et al. BK channels regulate LPS-induced CCL-2 release from human pulmonary endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 64(2): 224-34.
- [4] WANG X J, BAI M. CircTM7SF3 contributes to oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis, inflammation and oxidative stress through targeting miR-206/ASPH axis in atherosclerosis cell model *in vitro* [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1): 51-64.
- [5] 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): 11397-408.
- [6] YANG Y T, SHEN P Y, YAO T, et al. Novel role of circRSU1 in the progression of osteoarthritis by adjusting oxidative stress [J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1877-900.
- [7] SHI S W, ZHANG S H, ZHANG H L, et al. Silencing circANKRD36 protects H9c2 cells against lipopolysaccharide-induced injury via up-regulating miR-138 [J]. *Exp Mol Pathol*, 2019, 111(5): 104300-30.
- [8] GUO R, ZHANG L J, MENG J J. Circular RNA ANKRD36 attends to lipopolysaccharide-aroused MRC-5 cell injury via regulating microRNA-31-3p [J]. *Biofactors*, 2020, 46(3): 391-401.
- [9] CHEN C R, LIN S, ZHOU L L, et al. MicroRNA-127-5p attenuates severe pneumonia via tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3): 2856-62.
- [10] CAI G L, YANG Z X, GUO D Y, et al. Macrophages enhance lipopolysaccharide induced apoptosis via Ang1 and NF- κ B pathways in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 2918-30.
- [11] NIE M W, HAN Y C, SHEN Z J, et al. Identification of circRNA and mRNA expression profiles and functional networks of vascular tissue in lipopolysaccharide-induced sepsis [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(14): 7915-27.
- [12] FANG Y, WANG X X, LI W Q, et al. Screening of circular RNAs and validation of circANKRD36 associated with inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1865-74.
- [13] YANG P, HAN J H, LI S G, et al. miR-128-3p inhibits apoptosis and inflammation in LPS-induced sepsis by targeting TGFBR2 [J]. *Open Med*, 2021, 16(1): 274-83.
- [14] 张晓菲, 刘英, 王丽纯, 等. 血必净注射液抑制eNOS脱耦联减轻脓毒症血管内皮细胞氧化应激[J]. *广州医科大学学报*(ZHANG X F, LIU Y, WANG L C, et al. Xuebijing injection reduces oxidative stress of sepsis vascular endothelial cells by inhibiting eNOS decoupling [J]. *Academic J Guangzhou Med College*), 2020, 48(6): 29-32.
- [15] HU P, ZHAO F Z, WANG J, et al. Lactoferrin attenuates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses and barrier impairment through the modulation of NF- κ B/MAPK/Nrf2 pathways in IPEC-J2 cells [J]. *Food Funct*, 2020, 11(10): 8516-26.
- [16] HU Q, WANG Q, HAN C G, et al. Sufentanil attenuates inflammation and oxidative stress in sepsis-induced acute lung injury by downregulating KNG1 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(5): 4298-306.
- [17] 李洁, 孙敏, 乐健伟, 等. 微小RNA-142-3p在脓症患者血清中的表达及其临床意义[J]. *中华危重症医学杂志(电子版)*(LI J, SUN M, LE J W, et al. Expression of microRNA-142-3p in se-

- rum of septic patients and its clinical significance [J]. *Chin J Crit Care Med, Electronic Edition*, 2018, 11(5): 310-5.
- [18] ZHANG W, ZHU L, YANG G W, et al. Hsa_circ_0026134 expression promoted TRIM25- and IGF2BP3-mediated hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion via sponging miR-127-5p [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(7): 1-10.
- [19] LI Z, YUAN B, PEI Z, et al. Circ_0136474 and MMP-13 suppressed cell proliferation by competitive binding to miR-127-5p in osteoarthritis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(10): 6554-64.
- [20] 李政, 胡洪波, 李玉民, 等. MiR-127-5p通过靶向调节 adipoR1 促进骨关节炎软骨细胞的增殖 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*(LI Z, HU H B, LI Y M, et al. MiR-127-5p promotes proliferation of osteoarthritis chondrocytes by targeting AdipoR1 [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2016, 32(5): 544-51.