

# CircPTPRA通过miR-145-5p/KLF5轴调节ox-LDL诱导的血管内皮细胞凋亡的机制研究

王征<sup>1</sup> 杨晓丽<sup>2</sup> 焦清海<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>邯郸市第一医院重症医学科, 邯郸 056000; <sup>2</sup>河北工程大学附属医院神内一科, 邯郸 056000)

**摘要** 该文旨在探讨CircPTPRA通过miR-145-5p/KLF5轴调节氧化性低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管内皮细胞凋亡的机制。将血管内皮细胞(EVC-304)分为control组、ox-LDL组、ox-LDL+si-NC组、ox-LDL+si-CircPTPRA组、ox-LDL+miR-NC组、ox-LDL+miR-145-5p mimic组、ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组、ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor组。qRT-PCR检测各组细胞中CircPTPRA、miR-145-5p和KLF5 mRNA的表达情况; MTT法、EdU染色检测细胞增殖情况; ELISA检测TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、MDA、SOD、GSH-Px水平; 流式细胞术检测细胞凋亡率; 蛋白质免疫印记法检测Ki-67、cleaved caspase-3、KLF5蛋白表达量; 荧光素酶实验验证miR-145-5p与CircPTPRA、KLF5的关系。与control组相比, ox-LDL组EVC-304细胞CircPTPRA和KLF5 mRNA表达量, TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、MDA水平, 细胞凋亡率, cleaved caspase-3和KLF5蛋白水平显著升高, miR-145-5p表达量, 细胞 $D_{490}$ 值(24、48 h)、增殖率, GSH-Px、SOD水平, Ki-67蛋白表达量显著降低。敲除CircPTPRA或过表达miR-145-5p都可降低细胞炎症反应程度、氧化应激水平和细胞凋亡水平。与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组相比, 敲低miR-145-5p可促进细胞炎症反应、氧化应激和细胞凋亡。干扰CircPTPRA可调控miR-145-5p/KLF5轴, 进而减少ox-LDL诱导的血管内皮细胞凋亡。

**关键词** CircPTPRA; miR-145-5p/KLF5轴; ox-LDL; 血管内皮细胞

## Mechanism of CircPTPRA Regulating ox-LDL Induced Apoptosis of Vascular Endothelial Cells Through the miR-145-5p/KLF5 Axis

WANG Zheng<sup>1</sup>, YANG Xiaoli<sup>2</sup>, JIAO Qinghai<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Critical Care Medicine, the First Hospital of Handan, Handan 056000, China;

<sup>2</sup>Department of Shennei, Affiliated Hospital of Hebei University of Technology, Handan 056000, China)

**Abstract** This study aims to investigate the mechanism of CircPTPRA regulating ox-LDL induced apoptosis of vascular endothelial cells through the miR-145-5p/KLF5 axis. Vascular endothelial cells (EVC-304) were divided into control group, ox-LDL group, ox-LDL+si-NC group, ox-LDL+si-CircPTPRA group, ox-LDL+miR-NC group, ox-LDL+miR-145-5p mimic group, ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC group, and ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor group. The gene expression levels of CircPTPRA, miR-145-5p, and KLF5 mRNA were detected by qRT-PCR. Cell proliferation were detected by MTT and EdU staining. The levels

收稿日期: 2023-08-07 接受日期: 2023-10-07

河北省卫健委青年科技项目(批准号: 20200585)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 15631002288, E-mail: nutso8097@163.com

Received: August 7, 2023 Accepted: October 7, 2023

This work was supported by the Hebei Provincial Health Commission Youth Science and Technology Project (Grant No.20200585)

\*Corresponding author. Tel: +86-15631002288, E-mail: nutso8097@163.com

of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MDA, SOD and GSH-Px were detected by ELISA. Cell apoptosis rate were detected by flow cytometry. Western blot was used to detect Ki-67, cleaved caspase-3 and KLF5 protein expression levels. Luciferase assay verified the relationship between miR-145-5p and CircPTPRA and KLF5. Compared with the control group, CircPTPRA and *KLF5* mRNA expression levels, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MDA levels, apoptosis rate, cleaved caspase-3 and KLF5 protein levels were significantly increased in EVC-304 cells in ox-LDL group. miR-145-5p expression, cell  $D_{490}$  value (24, 48 h) and proliferation rate, GSH-Px and SOD levels, Ki-67 protein expression were significantly decreased. Both CircPTPRA knockout or miR-145-5p overexpression reduced cellular inflammatory response, oxidative stress and apoptosis. Compared with ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC group, knockdown of miR-145-5p promoted cellular inflammatory response, oxidative stress and apoptosis. Interference with CircPTPRA can regulate the miR-145-5p/KLF5 axis, thereby reducing ox-LDL induced apoptosis of vascular endothelial cells.

**Keywords** CircPTPRA; miR-145-5p/KLF5 axis; ox-LDL; vascular endothelial cell

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性血管疾病,而血管内皮细胞损伤与AS的发生密切相关,血管内皮细胞处于血管内膜层,在维持血管功能方面发挥重要作用,在血液循环过程中血管内皮细胞会直接接触有害物质,这会对其造成损伤,进一步引发血管功能障碍<sup>[1]</sup>。氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)是一种氧化脂质,会刺激血管内皮细胞产生炎症反应和氧化应激,诱发细胞凋亡,进一步引发血管功能障碍<sup>[2]</sup>。环状RNA是一种经反式剪接而形成的非编码RNA,在疾病发生过程中发挥重要的调控作用<sup>[3]</sup>。ZHANG等<sup>[4]</sup>研究表明,下调Circ\_0004104可减轻ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞损伤。LUO等<sup>[5]</sup>研究表明,敲低CircPTPRA可防止ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞损伤。miR-145-5p是一种小RNA, ZHANG等<sup>[6]</sup>研究表明, miR-145-5p在AS患者血液和动脉组织中表达下调, miR-145-5p通过调控CaMKII $\delta$ 激活血管平滑肌细胞自噬,进而影响AS进展。KLF5是Krüppel转录因子家族成员,在心血管损伤反应中具有重要的调控作用<sup>[7]</sup>。WANG等<sup>[8]</sup>研究表明, KLF5在AS患者血清中过表达,下调KLF5表达可抑制ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞炎症和功能损伤。生物信息学分析发现, CircPTPRA与miR-145-5p, miR-145-5p与KLF5存在靶向结合位点。CircPTPRA是否可以通过miR-145-5p/KLF5轴调节ox-LDL诱导的血管内皮细胞凋亡尚不清楚,因此本研究对CircPTPRA通过miR-145-5p/KLF5轴调节ox-LDL诱导的血管内皮细胞凋亡的机制进行探究,以期作为AS治疗提供有效靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

血管内皮细胞(EVC-304)购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要试剂

ox-LDL购自上海高创化学科技有限公司; Trizol试剂购自武汉纯度生物科技有限公司; 总RNA提取试剂盒购自北京擎科生物科技股份有限公司; MTT试剂盒购自上海抚生实业有限公司; Ki-67、cleaved caspase-3、KLF5一抗和二抗均购自英国Abcam公司。

### 1.3 细胞转染与分组培养

将对数生长期的EVC-304细胞分为control组、ox-LDL组(100 mg/mL的ox-LDL<sup>[2]</sup>处理)、ox-LDL+si-NC组(100 mg/mL的ox-LDL+转染si-NC共同处理)、ox-LDL+si-CircPTPRA组(100 mg/mL的ox-LDL+转染si-CircPTPRA共同处理)、ox-LDL+miR-NC组(100 mg/mL的ox-LDL+转染miR-NC共同处理)、ox-LDL+miR-145-5p mimic组(100 mg/mL的ox-LDL+转染miR-145-5p mimic共同处理)、ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组(100 mg/mL的ox-LDL+转染si-CircPTPRA和inhibitor NC共同处理)、ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor组(100 mg/mL的ox-LDL+转染si-CircPTPRA和miR-145-5p inhibitor共同处理)。对EVC-304细胞进行上述转染和处理48 h, 然后进行后续实验。

### 1.4 qRT-PCR检测各组细胞中CircPTPRA、miR-145-5p和KLF5 mRNA的表达情况

Trizol试剂提取各组细胞总RNA, 将RNA逆转录为cDNA后, qRT-PCR法扩增cDNA。CircPTPRA

和 *KLF5* mRNA 以 *GAPDH* 为内参, miR-145-5p 以 *U6* 为内参, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算 CircPTPRA、miR-145-5p 和 *KLF5* mRNA 的相对表达量。CircPTPRA 正向引物 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CAC AC-3', 反向引物 5'-CTG CTC ACA AGA CCT ACC CA-3'; *KLF5* 正向引物 5'-AGC TCA CCT GAG GAC TCA TA-3', 反向引物 5'-GTG CGC AGT GCT CAG TTC T-3'; miR-145-5p 正向引物 5'-CGG TCC AGT TTT CCC AGG AA-3', 反向引物 5'-AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT-3'; *GAPDH* 正向引物 5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3', 反向引物 5'-AAT GGT CGT TGA GGG CAA TG-3'; *U6* 正向引物 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 反向引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

### 1.5 MTT法、EdU染色检测细胞增殖情况

将各组细胞接种于 96 孔板 ( $1 \times 10^4$  个/孔) 中培养, 在培养 24 h、48 h 时, 每孔分别加入 10  $\mu$ L MTT 溶液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h。再加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷, 溶解完全后, 用酶标仪检测各孔吸光度 (*D*) 值 (波长为 490 nm)。

将各组转染细胞接种到 96 孔板中 ( $5 \times 10^4$  个/孔), 培养 36 h, 然后按照 EdU-555 细胞增殖检测试剂盒说明书的操作步骤进行 EdU 及 DAPI 染色, 显色后用荧光显微镜采集各组细胞的图像, ImageJ 软件定量分析各组 EdU 阳性细胞数和总细胞数。细胞增殖率公式: 增殖率 = (EdU 阳性细胞数/总细胞数)  $\times$  100%。

### 1.6 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$ 水平检测

将培养的细胞于离心机中 4  $^{\circ}$ C、1 000  $\times$ g 离心 20 min, 得上清液, 将上清液加入酶标板中, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 洗涤之后加入相应酶标试剂, 37  $^{\circ}$ C 孵育 20 min 之后洗涤, 加入相应显色剂, 避光反应 15 min, 加入相应终止液。测定各指标 *D* 值, 根据标准曲线计算 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平。

### 1.7 GSH-Px、SOD、MDA 含量检测

收集细胞培养液, 4  $^{\circ}$ C、3 000  $\times$ g 离心 10 min, 弃去上清液之后加入提取液, 超声波破碎细胞。4  $^{\circ}$ C、8 000  $\times$ g 离心 10 min, 之后按照试剂盒说明书加入相应反应试剂检测各组细胞中的 GSH-Px、SOD、MDA 水平。

### 1.8 流式细胞术检测细胞凋亡情况

将各组细胞接种在 96 孔板中, 使每孔细胞数量达到  $1 \times 10^5$  个, 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养过

夜, 胰蛋白酶消化细胞后用 PBS 缓冲液洗涤, 4  $^{\circ}$ C、200  $\times$ g 离心 5 min, 收集细胞, 根据凋亡试剂盒说明书的步骤进行操作, 加入 Annexin V-FITC 与 PI 试剂, 室温避光反应 15 min, 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

### 1.9 Western blot 检测蛋白表达情况

提取各组细胞总蛋白, 检测细胞蛋白表达量, SDS-PAGE 电泳分离蛋白然后转膜。封闭液中常温封闭 2 h 后加入 Ki-67、cleaved caspase-3、KLF5 一抗 (稀释比例为 1:1 500), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后加入二抗 (稀释比例为 1:5 000), 常温下孵育 2 h。使用 ECL 发光液显影, 用 Image-Pro Plus 软件对蛋白质进行定量分析。

### 1.10 双荧光素酶报告基因检测

构建 CircPTPRA 野生型载体 (CircPTPRA-WT) 和突变型载体 (CircPTPRA-MUT), 将 CircPTPRA-WT 和 CircPTPRA-MUT 分别与 miR-NC 和 miR-145-5p mimic 共转染于 EVC-304 细胞中, 48 h 后, 检测荧光素酶活性。

构建 KLF5 野生型载体 (KLF5-WT) 和突变型载体 (KLF5-MUT), 将 KLF5-WT 和 KLF5-MUT 分别与 miR-NC 和 miR-145-5p mimic 共转染于 EVC-304 细胞中, 48 h 后, 检测荧光素酶活性。

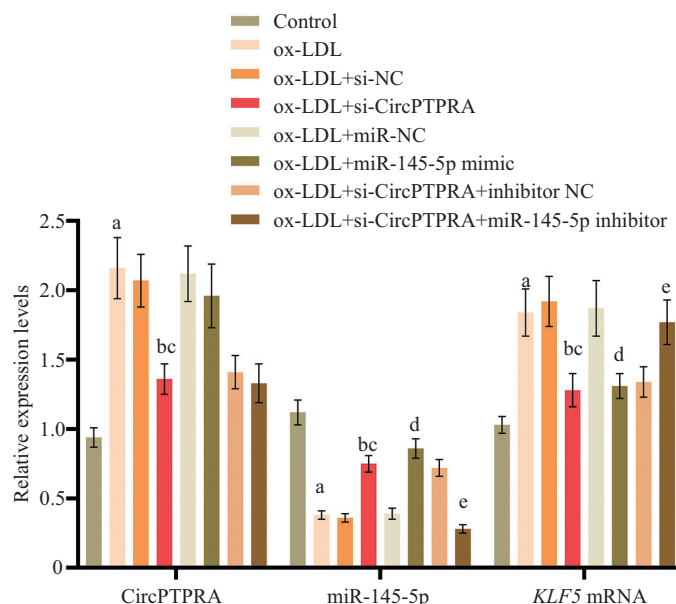
### 1.11 统计分析

实验数据分析用 SPSS 25.0 软件, 统计数据表示为平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), 多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较用 SNK-*q* 检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CircPTPRA、miR-145-5p 和 KLF5 mRNA 在各组细胞中的表达情况

与 control 组相比, ox-LDL 组细胞中 CircPTPRA 和 *KLF5* mRNA 表达量显著升高, miR-145-5p 表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 ox-LDL 组和 ox-LDL+si-NC 组比较, ox-LDL+si-CircPTPRA 组细胞中 CircPTPRA 和 *KLF5* mRNA 表达量显著降低, miR-145-5p 表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 ox-LDL+miR-NC 组相比, ox-LDL+miR-145-5p mimic 组 *KLF5* mRNA 表达量显著降低, miR-145-5p 表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), CircPTPRA 表达量无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC 组相比, ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor 组 *KLF5* mRNA



<sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与control组比较; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , 与ox-LDL组比较; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , 与ox-LDL+si-NC组比较; <sup>d</sup> $P < 0.05$ , 与ox-LDL+miR-NC组比较; <sup>e</sup> $P < 0.05$ , 与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组比较。

<sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with control group; <sup>b</sup> $P < 0.05$  compared with ox-LDL group; <sup>c</sup> $P < 0.05$  compared with ox-LDL+si-NC group; <sup>d</sup> $P < 0.05$  compared with ox-LDL+miR-NC group; <sup>e</sup> $P < 0.05$  compared with ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC group.

图1 各组细胞中CircPTPRA、miR-145-5p和KLF5 mRNA表达水平比较

Fig.1 Comparison of expression levels of CircPTPRA, miR-145-5p and KLF5 mRNA in cells of each group

表达量显著升高, miR-145-5p表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), CircPTPRA表达量无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图1)。

## 2.2 CircPTPRA和miR-145-5p对各组EVC-304细胞增殖能力的影响

与control组相比, ox-LDL组细胞 $D_{490}$ 值(24、48 h)和细胞增殖率显著性降低 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL组和ox-LDL+si-NC组相比, ox-LDL+si-CircPTPRA组细胞 $D_{490}$ 值(24、48 h)和细胞增殖率显著性升高 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL+miR-NC组相比, ox-LDL+miR-145-5p mimic组 $D_{490}$ 值(24、48 h)和细胞增殖率显著性升高 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组相比, ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor组 $D_{490}$ 值(24、48 h)和细胞增殖率显著性降低 ( $P < 0.05$ , 图2和图3)。这表明干扰CircPTPRA表达和过表达miR-145-5p都可影响ox-LDL诱导的EVC-304细胞增殖。

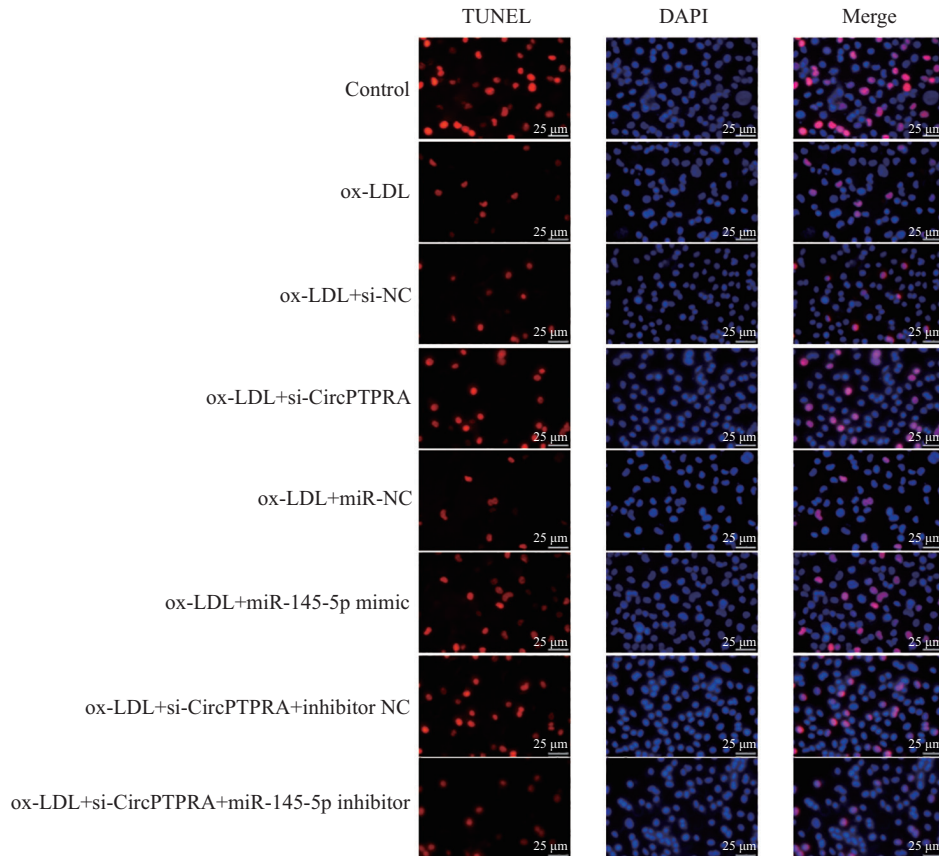
## 2.3 CircPTPRA和miR-145-5p对各组EVC-304细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平的影响

与control组相比, ox-LDL组细胞TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平显著性升高 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL组和ox-LDL+si-NC组比较, ox-LDL+si-CircPTPRA组细

胞TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平显著性降低 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL+miR-NC组相比, ox-LDL+miR-145-5p mimic组细胞TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平显著性降低 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组相比, ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor组细胞TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平显著性升高 ( $P < 0.05$ , 图4)。这表明干扰CircPTPRA表达和过表达miR-145-5p都可影响ox-LDL诱导的EVC-304细胞炎症因子表达。

## 2.4 CircPTPRA和miR-145-5p对各组EVC-304细胞中GSH-Px、SOD、MDA水平的影响

与control组相比, ox-LDL组细胞MDA水平显著升高, GSH-Px、SOD水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL组和ox-LDL+si-NC组比较, ox-LDL+si-CircPTPRA组细胞中MDA水平显著降低, GSH-Px、SOD水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL+miR-NC组相比, ox-LDL+miR-145-5p mimic组细胞MDA水平显著降低, GSH-Px、SOD水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组相比, ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor组细胞MDA水平显著升高, GSH-Px、SOD水平显著降低 ( $P < 0.05$ , 图5)。这表明干扰CircPTPRA表达和过表达miR-145-5p都

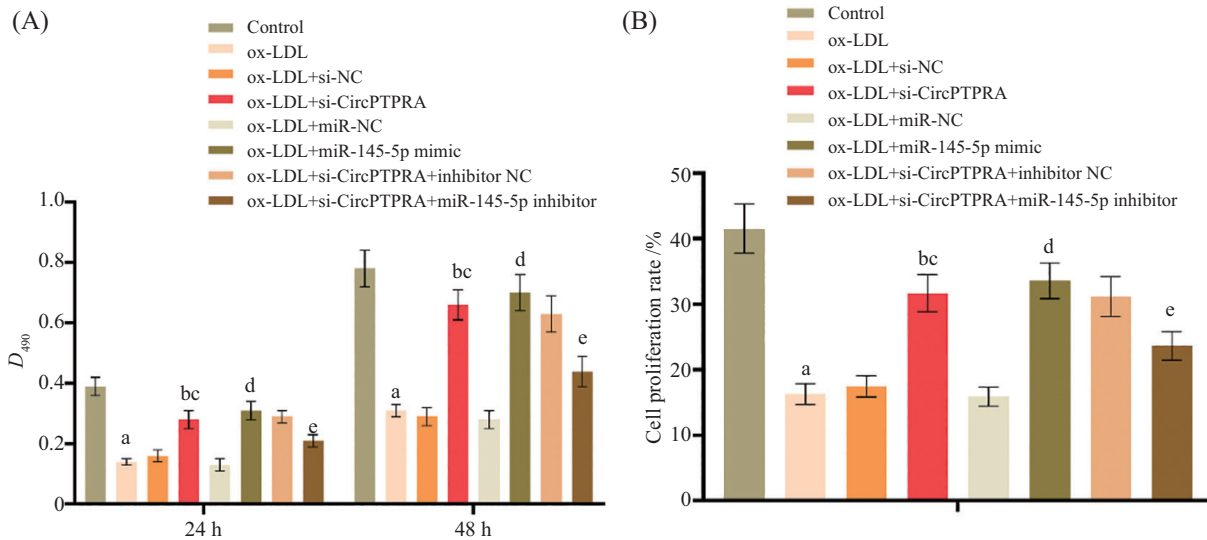


EdU阳性细胞呈红色, DAPI阳性细胞呈蓝色。

EdU positive cell was red, DAPI positive cell was blue.

图2 EdU染色检测各组EVC-304细胞增殖情况

Fig.2 EdU staining to detect the proliferation of EVC-304 cells in each group



A: 各组细胞的D值; B: 各组细胞的增殖率。<sup>a</sup>*P*<0.05, 与control组比较; <sup>b</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL组比较; <sup>c</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+si-NC组比较; <sup>d</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+miR-NC组比较; <sup>e</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组比较。

A: the *D* value of cells in each group; B: cell proliferation rate of each group. <sup>a</sup>*P*<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL group; <sup>c</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+si-NC group; <sup>d</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+miR-NC group; <sup>e</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC group.

图3 各组EVC-304细胞的增殖情况

Fig.3 Proliferation of EVC-304 cells in each group

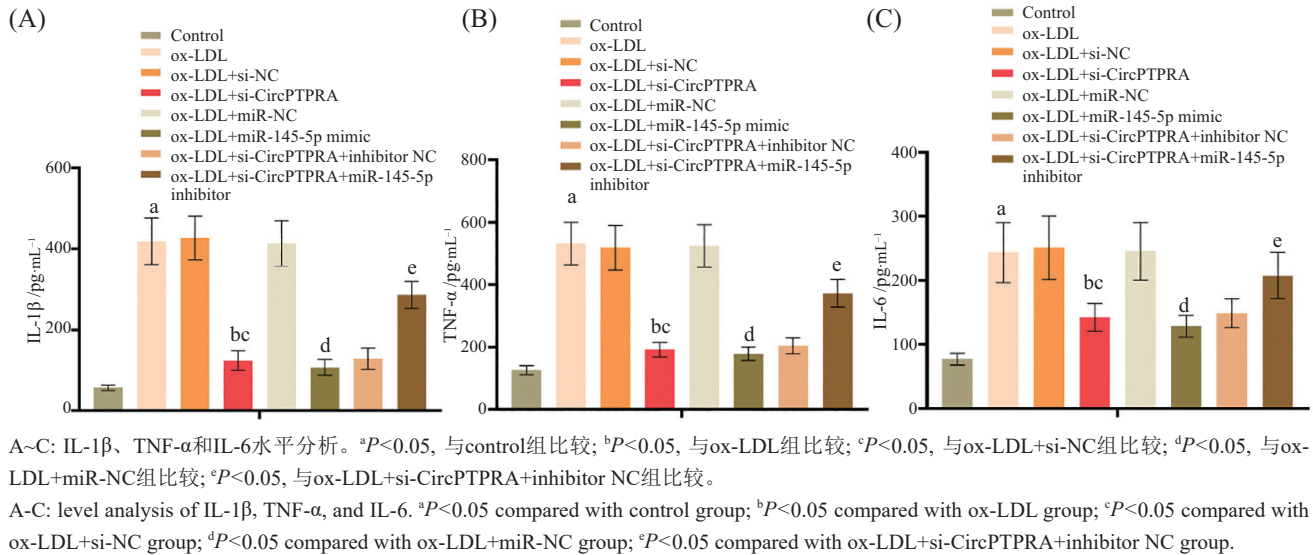


图4 各组EVC-304细胞中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6的水平  
 Fig.4 Levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in EVC-304 cells in each group

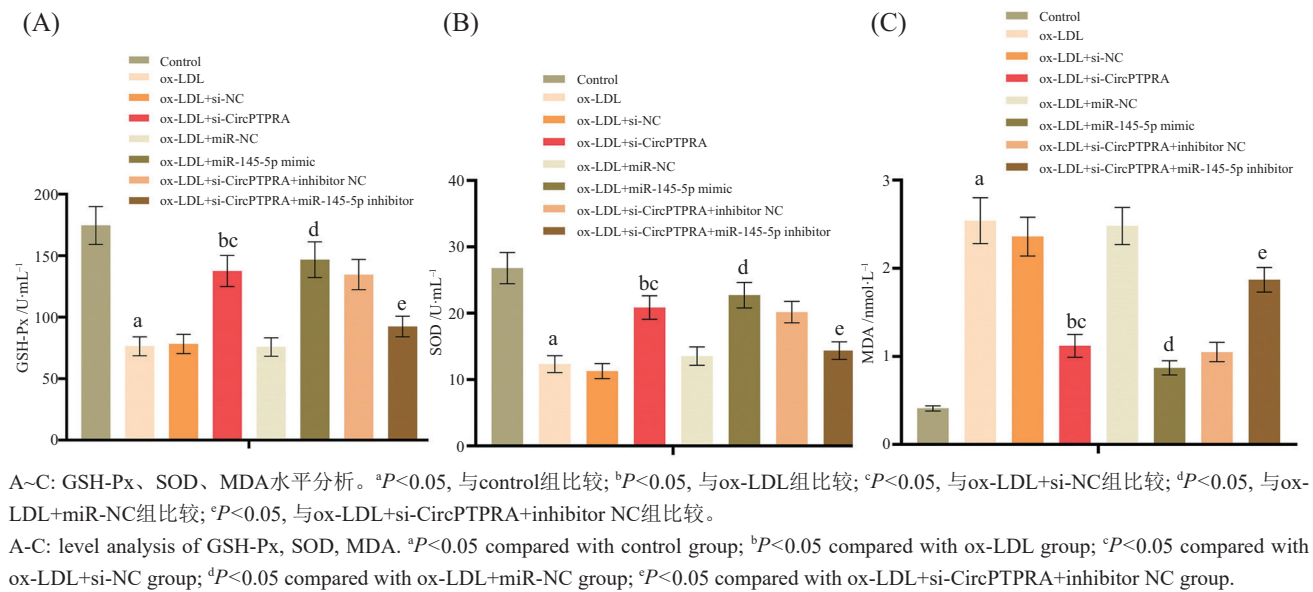


图5 各组EVC-304细胞中GSH-Px、SOD、MDA的水平  
 Fig.5 Levels of GSH-Px, SOD, and MDA in EVC-304 cells of each group

可影响ox-LDL诱导的EVC-304细胞氧化应激。

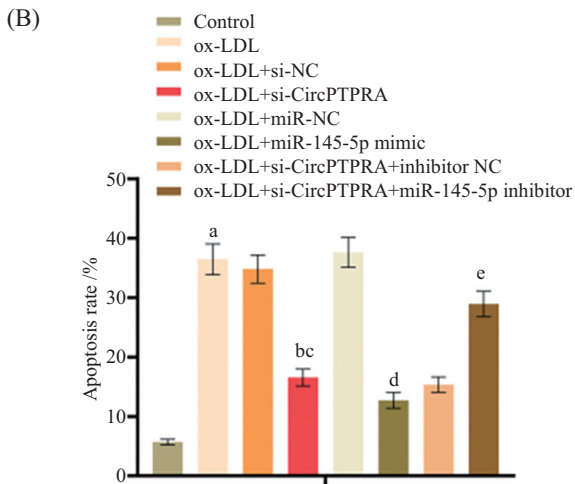
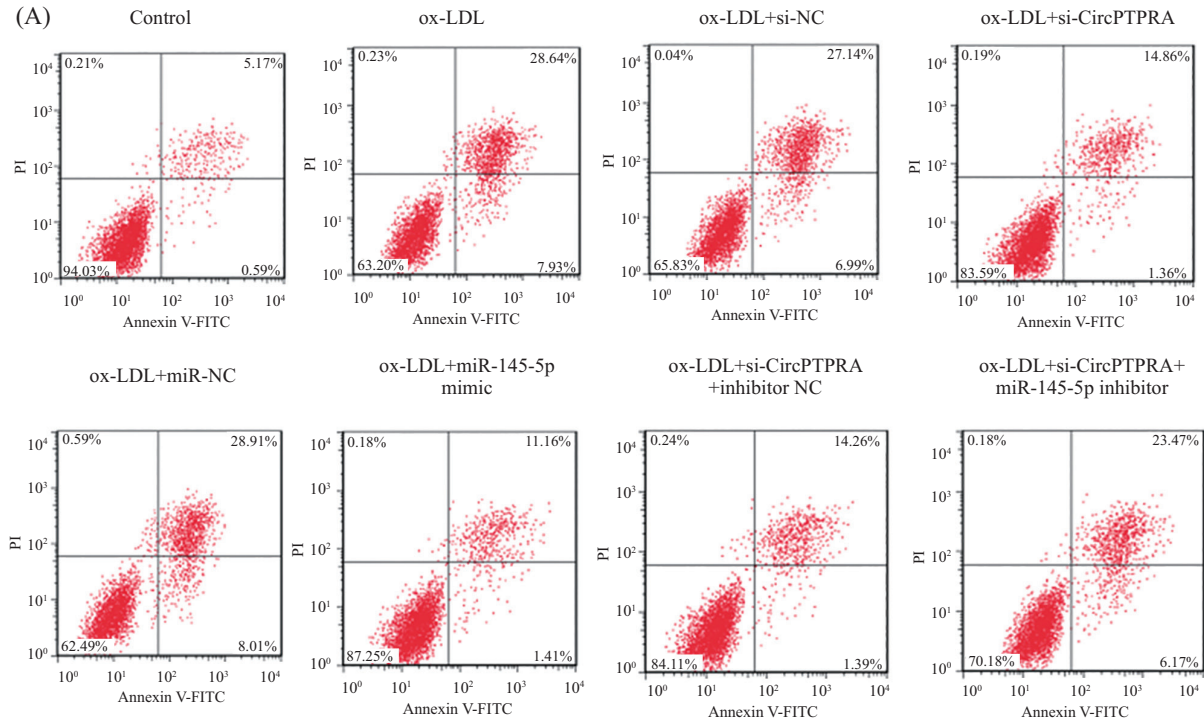
### 2.5 CircPTPRA和miR-145-5p对各组EVC-304细胞凋亡率的影响

与control组相比, ox-LDL组细胞凋亡率显著性升高(*P*<0.05); 与ox-LDL组和ox-LDL+si-NC组相比, ox-LDL+si-CircPTPRA组细胞凋亡率显著性降低(*P*<0.05); 与ox-LDL+miR-NC组相比, ox-LDL+miR-145-5p mimic组细胞凋亡率显著性降低(*P*<0.05); 与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组相比, ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor组细胞凋

亡率显著性升高(*P*<0.05, 图6)。这表明干扰CircPTPRA表达和过表达miR-145-5p都可影响ox-LDL诱导的EVC-304细胞凋亡。

### 2.6 CircPTPRA和miR-145-5p对各组EVC-304细胞Ki-67、cleaved caspase-3、KLF5蛋白表达的影响

与control组相比, ox-LDL组细胞cleaved caspase-3、KLF5水平显著升高, Ki-67水平显著降低(*P*<0.05); 与ox-LDL组和ox-LDL+si-NC组比较, ox-LDL+si-CircPTPRA组细胞cleaved caspase-3、



A: 细胞凋亡结果图; B: 各组细胞凋亡率比较。<sup>a</sup>*P*<0.05, 与control组比较; <sup>b</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL组比较; <sup>c</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+si-NC组比较; <sup>d</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+miR-NC组比较; <sup>e</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组比较。

A: the results of cell apoptosis; B: comparison of apoptosis rate in each group. <sup>a</sup>*P*<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL group; <sup>c</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+si-NC group; <sup>d</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+miR-NC group; <sup>e</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC group.

图6 各组细胞凋亡率比较

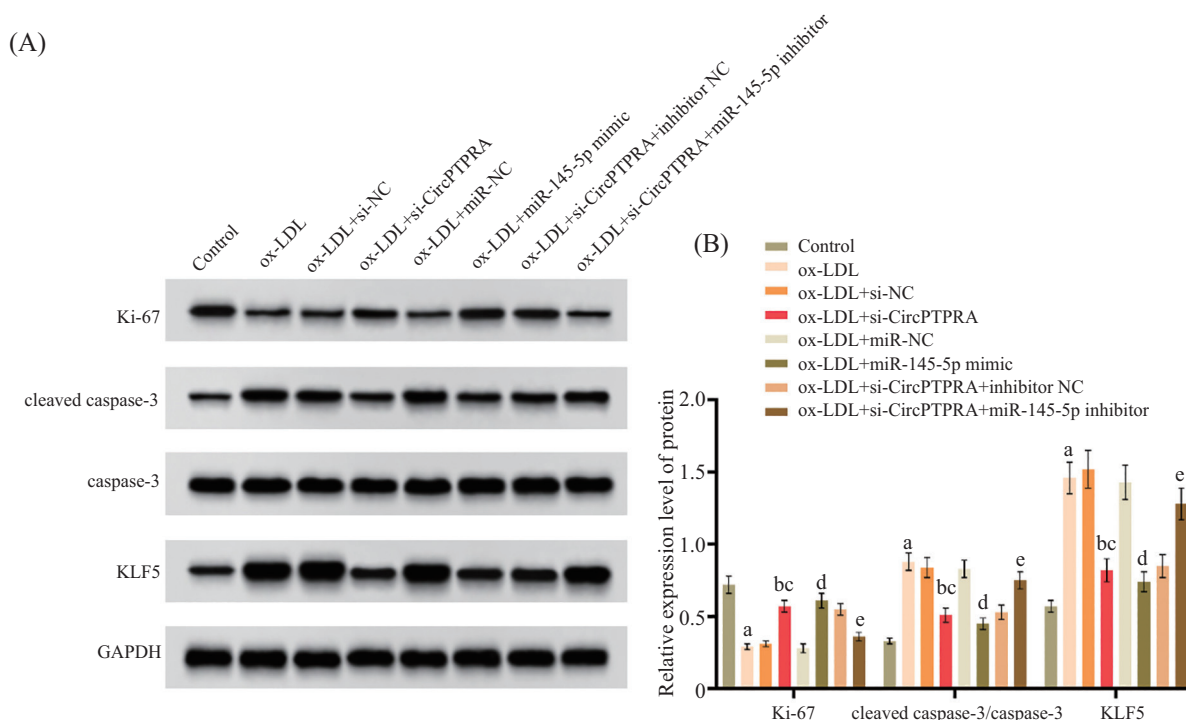
Fig.6 Comparison of apoptosis rates in each group

KLF5水平显著降低, Ki-67水平显著升高(*P*<0.05); 与 ox-LDL+miR-NC组相比, ox-LDL+miR-145-5p mimic组细胞 cleaved caspase-3、KLF5水平显著降低, Ki-67水平显著升高(*P*<0.05); 与 ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组相比, ox-LDL+si-CircPTPRA+miR-145-5p inhibitor组细胞 cleaved caspase-3、KLF5水平显著升高, Ki-67水平显著降低

(*P*<0.05, 图7)。这表明干扰 CircPTPRA表达和过表达miR-145-5p都可影响ox-LDL诱导的EVC-304细胞相关蛋白表达。

### 2.7 双荧光素酶报告基因检测

利用Starbase网站预测miR-145-5p与CircPTPRA、KLF5的结合位点(图8)。与 miR-NC和 CircPTPRA-WT共转染组(1.04±0.08)比较, miR-145-5p mimic和



A: 各组细胞蛋白表达图; B: 各组细胞蛋白表达比较。<sup>a</sup>*P*<0.05, 与control组比较; <sup>b</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL组比较; <sup>c</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+si-NC组比较; <sup>d</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+miR-NC组比较; <sup>e</sup>*P*<0.05, 与ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC组比较。

A: protein expression in each group; B: comparison of protein expression in each group. <sup>a</sup>*P*<0.05 compared with control group; <sup>b</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL group; <sup>c</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+si-NC group; <sup>d</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+miR-NC group; <sup>e</sup>*P*<0.05 compared with ox-LDL+si-CircPTPRA+inhibitor NC group.

图7 EVC-304细胞Ki-67、cleaved caspase-3、KLF5蛋白表达情况  
Fig.7 Expression of Ki-67, cleaved caspase-3 and KLF5 protein in EVC-304 cells

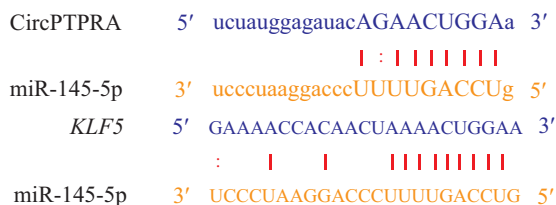


图8 miR-145-5p与CircPTPRA、KLF5的结合位点  
Fig.8 Binding sites of miR-145-5p with CircPTPRA and KLF5

CircPTPRA-WT共转染组(0.41±0.03)荧光素酶活性显著降低(*P*<0.05); 与miR-NC和KLF5-WT共转染组(1.01±0.09)比较, miR-145-5p mimic和KLF5-WT共转染组(0.44±0.04)荧光素酶活性显著降低(*P*<0.05)。

### 3 讨论

AS的病症特征主要是动脉血管壁脂质代谢异常<sup>[9]</sup>, 导致血管内皮损伤、巨噬细胞活化、血栓形成和炎症反应等。有研究显示其发病机理可能与高热量、高脂肪等不健康饮食以及运动少等因素有关<sup>[10]</sup>, 但其具体发病机制目前尚不完全清楚, 因此

深入探讨AS的发病机制可能会为预防和治疗AS带来重大突破<sup>[11]</sup>。CircRNA是一种环状RNA, 参与调控细胞增殖和转移, 并且与一些疾病的发生有关<sup>[12]</sup>。WANG等<sup>[13]</sup>研究表明, Circ-0124644可促进ox-LDL诱导的血管内皮损伤。ZHANG<sup>[14]</sup>研究表明, CircPTPRA可促进AS的发展。因此, 推测环状RNA或许可以调控AS的发展。

TNF-α、IL-6、IL-1β为炎症因子, 参与炎症的发生, 其过量分泌可诱导细胞损伤。MDA为氧化产物, 具有细胞毒性, 可反映细胞损伤程度, GSH-Px和SOD为抗氧化酶, 可降低细胞氧化损伤。本研究结



果表明, ox-LDL可诱导EVC-304细胞发生炎症反应和氧化应激, 并上调CircPTPRA表达。干扰CircPTPRA表达, 可显著降低细胞氧化应激和炎症水平。cleaved caspase-3为细胞凋亡蛋白, 其过表达可促进细胞凋亡。Ki-67蛋白为细胞增殖蛋白, 其过表达可促进细胞增殖。本研究结果显示, ox-LDL可诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖。干扰CircPTPRA表达可显著抑制细胞凋亡, 促进细胞增殖。干扰CircPTPRA表达后, 细胞增殖活性显著升高, 细胞凋亡、炎症反应和氧化应激水平显著降低, 这与推测结果一致。

miRNA是一种非编码小RNA分子, 在转录过程中可以调控基因表达, 参与细胞增殖、迁移、凋亡等过程<sup>[15]</sup>。WANG等<sup>[16]</sup>研究表明, 过表达miR-145-5p可减轻脂质代谢紊乱和炎症反应, 减缓AS进展。LIU等<sup>[15]</sup>研究表明, 下调miR-145-5p表达可促进AS发展。本研究结果表明, ox-LDL可诱导降低EVC-304细胞中的miR-145-5p表达水平, 上调miR-145-5p表达可显著降低细胞氧化应激、炎症水平并减少细胞凋亡, 提高细胞增殖活性和抗氧化水平。进一步研究发现干扰CircPTPRA表达后, miR-145-5p表达水平显著升高, ox-LDL诱导的细胞损伤显著减轻。通过生物信息学发现, miR-145-5p与CircPTPRA存在结合位点, 荧光素酶活性实验也证实两者存在靶向调控关系。进一步实验发现, 在下调CircPTPRA的基础上下调miR-145-5p表达可部分逆转下调CircPTPRA表达对ox-LDL诱导的细胞的保护作用。这提示干扰CircPTPRA表达可通过调控miR-145-5p表达来减少ox-LDL诱导的细胞凋亡。

KLF5是一种锌指结构转录因子, 通过加速血管平滑肌细胞从收缩表型到不利增殖表型的转化, 促进动脉粥样硬化斑块的形成, 在心血管重塑中起着至关重要的作用<sup>[17]</sup>。ZHAO等<sup>[7]</sup>研究表明, KLF5在AS患者和ox-LDL诱导的人脐静脉平滑肌细胞中上调, 下调KLF5可改善ox-LDL诱导的人脐静脉平滑肌细胞损伤。ZHAO等<sup>[18]</sup>研究表明, 过表达miR-135a-5p可下调KLF5进而降低ox-LDL诱导的细胞毒性。本研究结果显示, ox-LDL可提高EVC-304细胞中的KLF5表达量。干扰CircPTPRA表达后, miR-145-5p表达上调, KLF5表达下调, 减少ox-LDL可诱导EVC-304细胞凋亡。而单独过表达miR-145-5p也可降低KLF5表达量, 减少ox-LDL可诱导EVC-304细胞凋亡。生物信息学结果显示, miR-145-5p和KLF5

存在靶向结合位点, 荧光素酶活性实验也证实两者具有靶向调节关系。综合以上结果可得出, 敲低CircPTPRA表达可上调miR-145-5p表达, 下调KLF5表达, 进而减少ox-LDL诱导的EVC-304细胞凋亡。

综上所述, 干扰CircPTPRA可上调miR-145-5p表达, 降低KLF5表达量, 进而减少ox-LDL诱导的血管内皮细胞凋亡。然而, 本实验仅研究了一条信号通路, 后续还需对其他信号通路进行探究。

## 参考文献 (References)

- [1] 王梦楠, 秦合伟, 郭宁, 等. 下一代益生菌防治动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中国比较医学杂志(WANG M N, QIN H W, GUO N, et al. Research progress of next-generation probiotics in the prevention and treatment of atherosclerosis [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine), 2022, 32(12): 95-102.
- [2] 李骞, 李秀研, 林丽丽, 等. LncRNA DANCR靶向miR-423-5p调控ox-LDL诱导的血管内皮细胞凋亡、炎症反应[J]. 中国免疫学杂志(LI Q, LI X Y, LIN L L, et al. LncRNA DANCR targets miR-423-5p to regulate ox-LDL-induced apoptosis and inflammation of vascular endothelial cells [J]. Chinese Journal of Immunology), 2021, 37(18): 2187-93.
- [3] 张旭, 关勇宇, 刘芳, 等. 环状RNA对自噬和癌症进展的影响[J]. 中国细胞生物学学报(ZHANG X, GUAN Y Y, LIU F, et al. Effects of circular RNA on autophagy and cancer progression [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2023, 45(6): 936-42.
- [4] ZHANG Y, WANG S, GUO S, et al. Circ\_0004104 participates in the regulation of ox-LDL-induced endothelial cells injury via miR-942-5p/ROCK2 axis [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2022, 22(1): 517-28.
- [5] LUO X, ZHOU X. CircRNA-PTPRA knockdown inhibits atherosclerosis progression by repressing ox-LDL-induced endothelial cell injury via sponging of miR-671-5p [J]. Biochem Genet, 2023, 61(1): 187-201.
- [6] ZHANG X, ZAI L, TAO Z, et al. miR-145-5p affects autophagy by targeting CaMKII $\delta$  in atherosclerosis [J]. Int J Cardiol, 2022, 360: 68-75.
- [7] ZHAO Q, LU Y H, WANG X, et al. Circ\_USP36/miR-182-5p/KLF5 axis regulates the ox-LDL-induced injury in human umbilical vein smooth muscle cells [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(12): 7855-69.
- [8] WANG F, GE J, HUANG S, et al. KLF5/LINC00346/miR-148a-3p axis regulates inflammation and endothelial cell injury in atherosclerosis [J]. Int J Mol Med, 2021, 48(2): 152-9.
- [9] DORAN A C. Inflammation resolution: implications for atherosclerosis [J]. Circ Res, 2022, 130(1): 130-48.
- [10] LIANG Y, WANG M, WANG C, et al. The mechanisms of the development of atherosclerosis in prediabetes [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 4108.
- [11] LIANG Y, WANG M, WANG C, et al. The mechanisms of the development of atherosclerosis in prediabetes [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 4108.
- [12] LIN X, ZHANG L, ZHANG W, et al. Circular RNA circ\_0001006 aggravates cardiac hypertrophy via miR-214-3p/PAK6 axis [J]. Aging, 2022, 14(5): 2210-20.
- [13] WANG G, LI Y, LIU Z, et al. Circular RNA circ\_0124644 exac-

- erbates the ox-LDL-induced endothelial injury in human vascular endothelial cells through regulating PAPP-A by acting as a sponge of miR-149-5p [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 471(1/2): 51-61.
- [14] ZHANG L L. CircRNA-PTPRA promoted the progression of atherosclerosis through sponging with miR-636 and upregulating the transcription factor SP1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(23): 12437-49.
- [15] LIU C, QIN Q, XU J, et al. Phthalate promotes atherosclerosis through interacting with long-non coding RNA and induces macrophage foam cell formation and vascular smooth muscle damage [J]. *Chemosphere*, 2022, 308(Pt 2): 136383.
- [16] WANG Y, LIU L, LI J. LncRNA KCNQ1OT1 depletion inhibits the malignant development of atherosclerosis by miR-145-5p [J]. *Microvasc Res*, 2022, 139: 104236.
- [17] NAN S, WANG Y, XU C, et al. Interfering microRNA-410 attenuates atherosclerosis via the HDAC1/KLF5/IKBA/NF- $\kappa$ B axis [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 24: 646-57.
- [18] ZHAO M, YANG Y, LI J, et al. Silencing of OIP5-AS1 protects endothelial cells from ox-LDL-triggered injury by regulating KLF5 expression via sponging miR-135a-5p [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8(2): 596506.