

· 实验研究 ·

杨梅苷对高糖环境下视网膜微血管内皮细胞的保护作用及其调控机制

刘茜 刘长庚 李海军 董仰曾 张颖

河南省人民医院眼科 郑州大学人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所, 郑州 450003

通信作者: 刘茜, Email: qianliuyk@163.com

【摘要】 目的 探讨杨梅苷对高糖诱导视网膜微血管内皮细胞(HRMECs)损伤的抑制作用及其调控机制。方法 将HRMECs分为正常对照组、高糖组及12.5 μg/ml、25.0 μg/ml、50.0 μg/ml杨梅苷组,其中杨梅苷组细胞在含杨梅苷的高糖培养基中培养24 h。分别采用pcDNA和pcDNA-circZNF292转染HRMECs后使用含25 mmol/L D-葡萄糖的高糖培养基培养24 h,作为pcDNA组和pcDNA-circZNF292组。分别采用siR-NC和siR-circZNF292转染至HRMECs后加入含50.0 μg/ml杨梅苷和25 mmol/L D-葡萄糖的培养基中培养24 h,作为杨梅苷+siR-NC组和杨梅苷+siR-circZNF292组。采用流式细胞术检测细胞凋亡率;利用酶联免疫吸附测定试剂盒检测细胞中丙二醛(MDA)浓度和超氧化物歧化酶(SOD)活性;采用实时荧光定量PCR法检测circZNF292和miR-23b-3p的基因表达量;采用双荧光素酶报告实验检测circZNF292与miR-23b-3p的靶向关系;采用Western blot法检测B细胞淋巴瘤-2(bcl-2)和bcl-2相关蛋白(bax)蛋白表达量。结果 正常对照组、高糖组及12.5 μg/ml、25.0 μg/ml、50.0 μg/ml杨梅苷组细胞bax和bcl-2蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA浓度、SOD活性值以及circZNF292和miR-23b-3p相对表达量总体比较,差异均有统计学意义($F=105.707, 111.835, 74.515, 109.651, 135.020, 219.919, 116.304$, 均 $P<0.001$)。随着杨梅苷剂量的逐渐增加,细胞中bax蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA浓度和miR-23b-3p相对表达量逐渐下降,bcl-2蛋白相对表达量、SOD活性值和circZNF292相对表达量逐渐升高,不同剂量杨梅苷组间比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。共转染野生型载体WT-circZNF292细胞中,miR-23b-3p组细胞中相对荧光素酶活性值为 0.35 ± 0.03 ,低于miR-NC组的 0.96 ± 0.09 ,差异有统计学意义($t=11.137, P<0.001$)。与pcDNA组比较,pcDNA-circZNF292组细胞中circZNF292相对表达量、bcl-2蛋白相对表达量和MDA浓度明显升高,miR-23b-3p相对表达量、bax蛋白相对表达量、细胞凋亡率和SOD活性值明显下降,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与高糖组和杨梅苷+siR-circZNF292组比较,杨梅苷组和杨梅苷+siR-NC组miR-23b-3p、bax蛋白相对表达量、细胞凋亡率和MDA浓度明显降低,circZNF292、bcl-2蛋白相对表达量和SOD活性值明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 杨梅苷可通过调控circZNF292/miR-23b-3p表达而抑制HRMECs凋亡及氧化应激损伤,从而减轻高糖诱导的HRMECs损伤。

【关键词】 杨梅苷; 细胞凋亡; 氧化应激; 人视网膜微血管内皮细胞; circZNF292; miR-23b-3p**基金项目:** 国家自然科学基金项目(U1404812); 河南省医学科技攻关计划省部共建项目(SBGJ2018083); 河南省立眼科医院基础研究专项(21JCQN005); 23456河南省人民医院人才工程项目

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210809-00451

Protective effect of myricitrin on retinal microvascular endothelial cells induced by high glucose and its regulation mechanism

Liu Qian, Liu Changgeng, Li Haijun, Dong Yangzeng, Zhang Ying

Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Liu Qian, Email: qianliuyk@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of myricitrin on the injury of human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs) induced by high glucose and its regulation mechanism. **Methods** HRMECs were

divided into normal control group, high glucose group and 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ and 50.0 $\mu\text{g/ml}$ myricitrin groups. HRMECs transfected with pcDNA and pcDNA-circZNF292, respectively and then cultured in high-glucose medium containing 25 mmol/L D-glucose for 24 hours were assigned as pcDNA group and pcDNA-circZNF292 group. HRMECs transfected with siR-NC and siR-circZNF292, respectively and then cultured in medium containing 50.0 $\mu\text{g/ml}$ myricitrin and 25 mmol/L D-glucose for 24 hours were assigned as myricitrin + siR-NC group and myricitrin + siR-circZNF292 group. The cell apoptosis rate was detected by flow cytometry. The concentration of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in cells were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The expression levels of circZNF292 and miR-23b-3p were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The targeting relationship between circZNF292 and miR-23b-3p was detected by dual-luciferase reporter assay. The relative expression levels of B-cell lymphoma-2 (bcl-2) and bcl-2-related X protein (bax) were assayed by Western blot. **Results** Significant differences were found in the relative expressions of bax and bcl-2 proteins, cell apoptosis rate, MDA concentration, SOD activity, circZNF292 and miR-23b-3p among normal control group, high glucose group and 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25.0 $\mu\text{g/ml}$, 50.0 $\mu\text{g/ml}$ myricitrin groups ($F = 105.707, 111.835, 74.515, 109.651, 135.020, 219.919, 116.304$; all at $P < 0.001$). With the increase of myricitrin concentration, the relative expression levels of bax protein, cell apoptosis rate, MDA concentration and miR-23b-3p in cells gradually decreased, while the relative expression levels of bcl-2 protein, SOD activity and circZNF292 increased, with statistically significant differences among groups with different concentrations of myricitrin (all at $P < 0.05$). In the co-transfected wild-type (WT)-circZNF292 cells, the relative luciferase activity in miR-23b-3p group was 0.35 ± 0.03 , which was lower than 0.96 ± 0.09 in microRNA-negative control group, and the difference was statistically significant ($t = 11.137, P < 0.001$). Compared with pcDNA group, the relative expression levels of bcl-2 protein, circZNF292 and MDA concentration in cells of pcDNA-circZNF292 group were significantly increased, and the relative expression levels of bax protein, miR-23b-3p, cell apoptosis rate and SOD activity were significantly decreased (all at $P < 0.05$). The relative expression levels of bax protein, miR-23b-3p, cell apoptosis rate and MDA concentration were reduced and relative expression levels of bcl-2 protein, circZNF292 and SOD activity were enhanced in myricitrin group and myricitrin+siR-NC group in comparison with high glucose group and myricitrin+siR-circZNF292 group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Myricitrin can inhibit cell apoptosis and oxidative stress by regulating the expression of circZNF292/miR-23b-3p, thereby reducing the damage of HRMECs induced by high glucose.

[Key words] Myricitrin; Apoptosis; Oxidative stress; Human retinal microvascular endothelial cells; CircZNF292; MiR-23b-3p

Fund program: National Natural Science Foundation of China (U1404812); Provincial Joint Project of Medical Science and Technology Research Program of Henan Province (SBGJ2018083); Basic Research Project of Henan Provincial Eye Hospital (21JCQN005); Talent Project of Henan Provincial People's Hospital 23456

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210809-00451

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是主要的致盲眼病之一,视网膜血管病变与视网膜神经进行性病变是其主要病理改变。DR是由于长期血糖升高诱发视网膜及其相邻组织微环境改变引起的眼部并发症,其发生和发展与高糖环境、组织缺氧、氧化应激损伤和慢性炎症过程诱发相关信号通路基因表达和功能异常有关^[1-3]。杨梅苷属于天然多酚羟基黄酮苷类黄酮化合物,其主要存在于杨梅果实和树皮中,具有抗炎和抗氧化作用,可抑制 SN4741 小鼠多巴胺能神经细胞凋亡及氧化应激损伤,从而延缓帕金森病进展^[4-7]。研究表明,杨梅素类衍生物能够减轻过氧化氢诱导的视网膜色素上皮细胞氧化应激损伤^[8]。基

于以上研究推测杨梅苷可对 DR 视网膜组织损伤发挥保护作用,但目前杨梅苷对 DR 患者视网膜的具体作用及其机制尚不清楚。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种以共价闭合环状为特征的非编码 RNA。近年来越来越多的研究发现, circRNA 在 DR 中表达异常,并可能作为 DR 治疗的潜在靶点^[9-11]。上调 circZNF292 表达量可通过与 miR-23b-3p (miR-23b-3p) 竞争调控抑制晶状体上皮细胞凋亡从而减轻细胞损伤^[12-13]。Zhao 等^[14] 研究发现,持续高糖环境刺激人视网膜血管内皮细胞 miR-23b-3p 表达量升高,而降低 miR-23b-3p 表达可减少细胞凋亡。以上研究结果提示 circZNF292/miR-23b-3p 可能参与 DR

的发生和发展过程。本研究拟探讨杨梅苷衍生物对高糖环境下人视网膜微血管内皮细胞 (human retinal microvascular endothelial cells, HRMECs) 的保护作用及其分子机制, 以期为 DR 发病机制研究及临床治疗提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞来源 HRMECs 购自美国 ATCC。

1.1.2 主要试剂及仪器 杨梅苷 (纯度 $\geq 98\%$, 上海康朗生物科技有限公司); DMEM 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (上海碧云天生物技术有限公司); 细胞凋亡检测试剂盒、荧光素酶活性检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); Trizol 试剂、cDNA 合成试剂、qRT-PCR 试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); Lipofectamine™ 3000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司); miR-NC、miR-23b-3p mimics、pcDNA、pcDNA-circZNF292、circZNF292 小干扰 RNA (siR-circZNF292)、siR-NC (上海吉玛制药技术有限公司); 兔抗人 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, bcl-2) 一抗 (sc-7382)、兔抗人 bcl-2 相关 X 蛋白 (bcl-2 associated X protein, bax) 一抗 (sc-7480)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (sc-69786) (美国 Santa Cruz 公司)。流式细胞仪 (BDC6, 北京艾格斯生物科技有限公司); 凝胶扫描系统 (Gel Doc XR+, 美国 Bio-Rad 公司); Nanodrop 2000c 紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher 科技公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (7500, 美国 ABI 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞分组及培养 将 HRMECs 以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 并分为 5 个组: 正常对照组细胞于含 5.5 mmol/L D-葡萄糖和体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h; 高糖组细胞于含 25 mmol/L D-葡萄糖和 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h; 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 杨梅苷组细胞分别在含 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 杨梅苷的高糖培养基培养 24 h。

1.2.2 转染液的制备及细胞转染 (1) 脂质体转染液配制 用不含 FBS 的 DMEM 培养液分别稀释 pcDNA、pcDNA-circZNF292、siR-circZNF292 和 siR-NC 至终浓度为 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 室温孵育 5 min 作为 A 液; 向 200 μl 不含 FBS 的 DMEM 培养液中加入 16 μl Lipofectamine™ 3000 转染试剂并充分混合作为 B 液,

A 液与 B 液充分混匀后室温孵育 20 min。(2) 细胞分组转染 将细胞以 2×10^5 个/ml 密度接种于 6 孔板, 分为高糖+pcDNA 组和高糖+pcDNA-circZNF292 组, 取 16 μl 相应脂质体转染混合液加入 400 μl HRMECs 培养液中培养 6 h 后弃上清液, 加入正常培养液继续培养 48 h, 更换为含 25 mmol/L D-葡萄糖的 DMEM 完全培养基培养 24 h。将细胞分为高糖+杨梅苷+siR-NC 组和高糖+杨梅苷+siR-circZNF292 组, 分别取 20 μl siR-NC、siR-circZNF292 脂质体转染混合液加入 400 μl HRMECs 培养液中培养 6 h 后弃上清液, 加入正常培养液培养 48 h, 更换为含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 杨梅苷和 25 mmol/L D-葡萄糖的 DMEM 完全培养基培养 24 h。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 参照文献 [15] 中的方法, 取各组细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心半径 10 cm, 3 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 预冷磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤, 离心弃上清后加入 500 μl 结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI, 避光振荡 10 min, 应用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.4 酶联免疫吸附测定法检测细胞中 MDA 浓度及 SOD 活性 参照文献 [16] 中的方法, 胰蛋白酶消化收集各组细胞, 采用反复冻融法裂解细胞并形成匀浆液, 取 0.1 ml 匀浆液加入离心管, 分别加入 0.2 ml MDA 或 SOD 工作液, 水浴冷却, 室温条件下 1 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 于 96 孔板中每孔加 200 μl 上清液和 100 μl 工作液, 充分混匀, 同时设置样品孔与空白对照孔, 应用酶标仪分别检测 MDA 浓度及 SOD 活性。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 circZNF292 及 miR-23b-3p 相对表达量 参照文献 [17] 中的方法, 收集各组细胞, 加入 Trizol 试剂 1 ml, 采用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, A_{260}/A_{280} 为 1.6~1.8, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 以 2 μl cDNA 进行扩增 (扩增反应体系 25 μl), 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 次循环。circZNF292 正向引物序列为 5'-GAGACTGGGGTGTGAAAA-3', 反向引物序列为 5'-CGGGCTTTAACATAAC TTTGG-3'; miR-23b-3p 正向引物序列为 5'-GGGATCACATTGCCAGGGAT-3', 反向引物序列为 5'-CACTGCGTGTCTGGAGT-3'。GAPDH 正向引物为 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 反向引物为 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'; U6 正向引物为 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3', 反向引物为 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'。circZNF292 基因扩增以 GAPDH 为内参, miR-23b-3p 基因扩增以 U6 为内参,

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因相对表达量。

1.2.6 双荧光素酶报告实验检测 HRMECs 中 circZNF292 与 miR-23b-3p 的靶向关系 采用 Starbase 预测 circZNF292 与 miR-23b-3p 的结合位点,用分子克隆的方法分别将结合位点克隆至 pGL3 质粒中构建野生型(wild type, WT)载体 WT-circZNF292,采用点突变试剂盒结合突变位点后构建含有突变位点的突变型(mutant type, MUT)载体 MUT-circZNF292,将 WT-circZNF292、MUT-circZNF292 分别与 miR-NC 或 miR-23b-3p mimics 共转染至 HRMECs,培养 48 h 后用双荧光素酶活性检测试剂盒检测细胞的荧光素酶活性。

1.2.7 Western blot 法检测 HRMECs 中 bax、bcl-2 蛋白相对表达量 参照文献[18]中的方法,收集各组细胞,PBS 洗涤,加入 500 μ l RIPA 裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白定量检测试剂盒检测蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,将分离的蛋白凝胶转印至 PVDF 膜,置于质量分数 5%脱脂牛奶封闭液中室温封闭 2 h;加入 bax (1 : 800)、bcl-2 (1 : 800)一抗及 GAPDH 抗体(1 : 1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBST 漂洗后加入相应二抗(1 : 3 000)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBST 漂洗后 ECL 发光显影。采用 Quantity One 软件对蛋白条带进行灰度值分析,以目的蛋白与内参 GAPDH 蛋白灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件(美国 IBM SPSS 公司)进行统计分析。本研究中计量资料经 S-W 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个组间双荧光素酶报告检测结果差异比较采用独立样本 *t* 检验,多组间细胞凋亡率、相关蛋白表达量、MDA 浓度及 SOD 活性总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量杨梅苷处理组细胞凋亡率和凋亡相关蛋白表达量比较

正常对照组细胞中 bax 蛋白条带灰度最弱,bcl-2 蛋白条带灰度最强;与正常对照组比较,高糖组细胞中 bax 条带灰度明显增强,bcl-2 条带灰度明显减弱;随着杨梅苷剂量增加,细胞中 bax 蛋

白条带灰度逐渐减弱,bcl-2 蛋白条带灰度逐渐增强(图 1)。各组细胞中 bax 蛋白和 bcl-2 蛋白相对表达量及细胞凋亡率总体比较,差异均有统计学意义($F = 105.707、111.835、74.515$,均 $P < 0.01$);其中与正常对照组相比,高糖组细胞 bax 蛋白相对表达量和细胞凋亡率明显升高,bcl-2 蛋白相对表达量明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);随着杨梅苷剂量逐渐增加,细胞中 bax 蛋白相对表达量和细胞凋亡率逐渐下降,bcl-2 蛋白相对表达量逐渐升高,不同剂量杨梅苷组间比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2,表 1)。

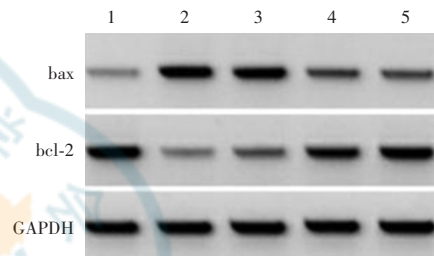


图 1 不同剂量杨梅苷组细胞中 bax 和 bcl-2 蛋白表达电泳图 1:正常对照组;2:高糖组;3:12.5 μ g/ml 杨梅苷组;4:25.0 μ g/ml 杨梅苷组;5:50.0 μ g/ml 杨梅苷组 bax:bcl-2 相关 X 蛋白;bcl-2:B 细胞淋巴瘤-2
Figure 1 Electrophoretogram of bax and bcl-2 proteins expression in HRMECs of different groups 1: normal control group; 2: high glucose group; 3: 12.5 μ g/ml myricitrin group; 4: 25.0 μ g/ml myricitrin group; 5: 50.0 μ g/ml myricitrin group bax:bcl-2 associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma-2

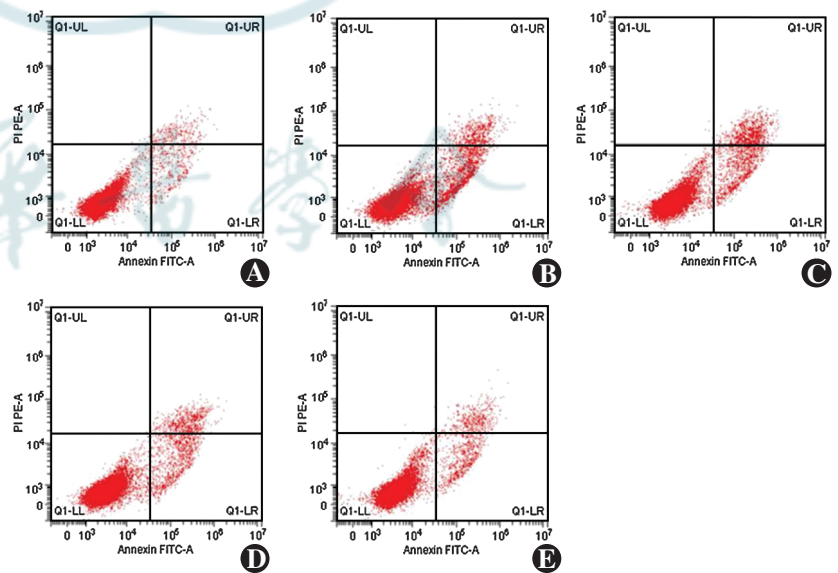


图 2 不同剂量杨梅苷组细胞凋亡流式细胞图 高糖组凋亡细胞明显增多,随着杨梅苷剂量的增加,凋亡细胞有所减少 A:正常对照组 B:高糖组 C:12.5 μ g/ml 杨梅苷组 D:25.0 μ g/ml 杨梅苷组 E:50.0 μ g/ml 杨梅苷组
Figure 2 Flow cytometry of cell apoptosis in different groups Apoptotic cells increased significantly in high glucose group, and the number of apoptotic cells decreased with the increase of myricitrin concentration A: normal control group B: high glucose group C: 12.5 μ g/ml myricitrin group D: 25.0 μ g/ml myricitrin group E: 50.0 μ g/ml myricitrin group

表 1 不同剂量杨梅苷组细胞中 bax 和 bcl-2 蛋白相对表达量及细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of relative expression levels of bax and bcl-2 proteins and cell apoptosis rate among groups with different concentrations of myricitrin ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	bax 蛋白表达量	bcl-2 蛋白表达量	细胞凋亡率 (%)
正常对照组	3	0.18±0.03	0.80±0.06	7.85±0.71
高糖组	3	0.71±0.05 ^a	0.18±0.02 ^a	20.40±1.15 ^a
12.5 μg/ml 杨梅苷组	3	0.55±0.04 ^b	0.28±0.04 ^b	18.33±1.12 ^b
25.0 μg/ml 杨梅苷组	3	0.36±0.04 ^{bc}	0.51±0.04 ^{bc}	15.30±1.03 ^{bc}
50.0 μg/ml 杨梅苷组	3	0.23±0.02 ^{bed}	0.72±0.05 ^{bed}	10.31±1.22 ^{bed}
F 值		105.707	111.835	74.515
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组相比,^a*P*<0.05;与高糖组相比,^b*P*<0.05;与 12.5 μg/ml 杨梅苷组相比,^c*P*<0.05;与 25.0 μg/ml 杨梅苷组相比,^d*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) bax:bcl-2 相关 X 蛋白;bcl-2:B 细胞淋巴瘤-2

Note:Compared with normal control group,^a*P*<0.05;compared with high glucose group,^b*P*<0.05;compared with 12.5 μg/ml myricitrin group,^c*P*<0.05;compared with 25.0 μg/ml myricitrin group,^d*P*<0.05(One-way ANOVA,LSD-*t* test) bax:bcl-2 associated X protein;bcl-2:B-cell lymphoma-2

2.2 不同剂量杨梅苷组细胞中 MDA 浓度和 SOD 活性比较

正常对照组、高糖组及不同剂量杨梅苷组细胞中 MDA 浓度及 SOD 活性值总体比较差异均有统计学意义 (*F* = 109.651、135.020, 均 *P* < 0.001); 与正常对照组比较,高糖组细胞中 MDA 浓度明显升高,SOD 活性值明显降低,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05); 与高糖组比较,各不同剂量杨梅苷组细胞中 MDA 浓度均明显降低,SOD 活性值均明显升高,且呈剂量依赖性,各不同剂量杨梅苷组间比较,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05)(表 2)。

2.3 不同剂量杨梅苷组细胞中 circZNF292 和 miR-23b-3 相对表达量比较

正常对照组、高糖组及不同剂量杨梅苷组细胞中 circZNF292 和 miR-23b-3p 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (*F* = 219.919、116.304, 均 *P* < 0.001); 与正常对照组相比,高糖组细胞中 circZNF292 相对表达量明显降低,miR-23b-3p 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05); 与高糖组相比,各不同剂量杨梅苷组 circZNF292 相对表达量均明显升高,miR-23b-3p 相对表达量均明显降低,且均呈现剂量依赖性,不同剂量杨梅苷组间比较,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05)(表 3)。

表 2 不同剂量杨梅苷组细胞中 MDA 浓度和 SOD 活性值比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of MDA concentration and SOD activity among groups with different concentrations of myricitrin ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	MDA 浓度 (mmol/L)	SOD 活性值 [μmol/(min·L)]
正常对照组	3	124.39±12.02	207.36±12.03
高糖组	3	350.00±22.39 ^a	47.89± 4.50 ^a
12.5 μg/ml 杨梅苷组	3	306.07±16.20 ^b	80.26± 6.55 ^b
25.0 μg/ml 杨梅苷组	3	247.74±12.45 ^{bc}	141.62± 9.51 ^{bc}
50.0 μg/ml 杨梅苷组	3	166.51±11.98 ^{bed}	173.47±13.42 ^{bed}
F 值		109.651	135.020
P 值		<0.001	<0.001

注:与正常对照组相比,^a*P*<0.05;与高糖组相比,^b*P*<0.05;与 12.5 μg/ml 杨梅苷组相比,^c*P*<0.05;与 25.0 μg/ml 杨梅苷组相比,^d*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) MDA:丙二醛;SOD:超氧化物歧化酶

Note:Compared with normal control group,^a*P*<0.05;compared with high glucose group,^b*P*<0.05;compared with 12.5 μg/ml myricitrin group,^c*P*<0.05;compared with 25.0 μg/ml myricitrin group,^d*P*<0.05(One-way ANOVA,LSD-*t* test) MDA:malondialdehyde;SOD:superoxide dismutase

表 3 不同剂量杨梅苷组细胞中 circZNF292 和 miR-23b-3p 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of relative expression levels of circZNF292 and miR-23b-3p among groups with different concentrations of myricitrin ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	circZNF292	miR-23b-3p
正常对照组	3	1.00±0.01	1.00±0.06
高糖组	3	0.25±0.02 ^a	2.34±0.10 ^a
12.5 μg/ml 杨梅苷组	3	0.39±0.04 ^b	1.89±0.08 ^b
25.0 μg/ml 杨梅苷组	3	0.57±0.04 ^{bc}	1.60±0.06 ^{bc}
50.0 μg/ml 杨梅苷组	3	0.79±0.05 ^{bed}	1.36±0.10 ^{bed}
F 值		219.919	116.304
P 值		<0.001	<0.001

注:与正常对照组相比,^a*P*<0.05;与高糖组相比,^b*P*<0.05;与 12.5 μg/ml 杨梅苷组相比,^c*P*<0.05;与 25.0 μg/ml 杨梅苷组相比,^d*P*<0.05(单因素方差分析,LSD-*t* 检验) miR:微小 RNA

Note:Compared with normal control group,^a*P*<0.05;compared with high glucose group,^b*P*<0.05;compared with 12.5 μg/ml myricitrin group,^c*P*<0.05;compared with 25.0 μg/ml myricitrin group,^d*P*<0.05(One-way ANOVA,LSD-*t* test) miR:microRNA

2.4 HRMECs 中 circZNF292 与 miR-23b-3p 靶向关系验证

Starbase 预测显示 circZNF292 与 miR-23b-3p 之间的互补序列中存在相互结合位点(图 3)。共转染 WT-circZNF292 细胞中,miR-23b-3p 组相对荧光素酶活性值为 0.35 ± 0.03 ,明显低于 miR-NC 组的 0.96 ± 0.09 ,差异有统计学意义($t = 11.137, P < 0.05$);而共转染 MUT-circZNF292 细胞中,miR-23b-3p 组和 miR-NC 组相对荧光素酶活性值分别为 0.98 ± 0.08 和 1.00 ± 0.11 ,差异无统计学意义($t = 0.441, P > 0.05$)。

2.5 不同 circZNF292 转染组 circZNF292 和 miR-23b-3p 相对表达量以及细胞凋亡情况比较

与 pcDNA 组比较,pcDNA-circZNF292 组细胞中 circZNF292 相对表达量明显升高,miR-23b-3p 相对表达量明显下降,差异均有统计学意义($t = 13.874, 13.668$,均 $P < 0.001$)。与 pcDNA 组比较,pcDNA-circZNF292 组 bax 蛋白相对表达量和细胞凋亡率明显下降,bcl-2 蛋白相对表达量明显升高,差异均有统计学意义($t = 8.133, 9.046, 13.070$,均 $P \leq 0.001$)(图 4, 5,表 4)。

2.6 不同 circZNF292 转染组细胞中 MDA 浓度和 SOD 活性比较

与 pcDNA 组比较,pcDNA-circZNF292 组细胞中 MDA 浓度明显升高,SOD 活性值明显下降,差异均有统计学意义($t = 11.281, 15.585$,均 $P < 0.001$)(表 5)。

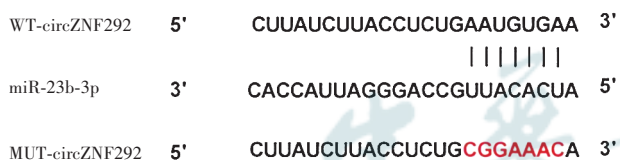


图 3 circZNF292 与 miR-23b-3p 序列互补关系 Starbase 预测显示 circZNF292 与 miR-23b-3p 存在结合位点 WT:野生型;miR:微小 RNA;MUT:突变型

Figure 3 Complementary sequences of circZNF292 and miR-23b-3p Starbase prediction showed that there were binding sites between circZNF292 and miR-23b-3p WT: wild type; miR: microRNA;MUT: mutant type

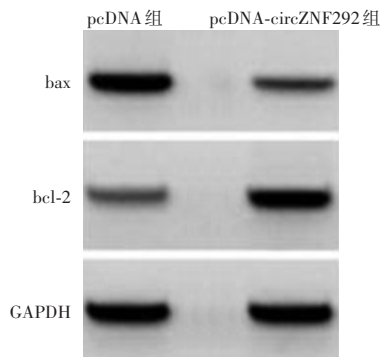


图 4 不同 circZNF292 转染组细胞凋亡相关蛋白表达电泳图 bax: bcl-2 相关 X 蛋白;bcl-2:B 细胞淋巴瘤-2

Figure 4 Electrophoretogram of apoptosis-related protein expression in different circZNF292 transfection groups bax: bcl-2 associated X protein;bcl-2:B-cell lymphoma-2

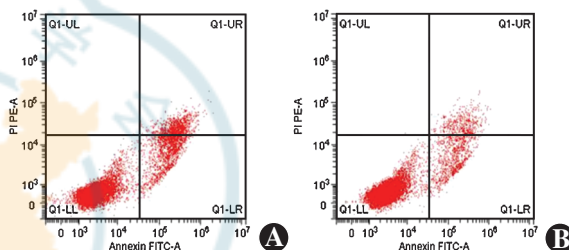


图 5 不同 circZNF292 转染组细胞凋亡流式细胞图 pcDNA-circZNF292 组凋亡细胞数少于 pcDNA 组 A:pcDNA 组 B:pcDNA-circZNF292 组

Figure 5 Flow cytometry of apoptosis in different circZNF292 transfection groups The number of apoptotic cells was smaller in pcDNA-circZNF292 group than pcDNA group A: pcDNA group B: pcDNA-circZNF292 group

2.7 不同 siRNA 转染组细胞凋亡情况比较

高糖组细胞中 bax 蛋白条带灰度最强,bcl-2 蛋白条带灰度最弱;杨梅苷组和杨梅苷+siR-NC 组细胞中 bax 蛋白条带灰度明显减弱,bcl-2 蛋白条带灰度明显增强;与杨梅苷组和杨梅苷+siR-NC 组比较,杨梅苷+siR-circZNF292 组细胞中 bax 蛋白条带灰度增强,bcl-2 蛋白条带灰度减弱(图 6)。高糖组、杨梅苷组、杨梅苷+siR-NC 组和杨梅苷+siR-circZNF292 组细胞中 circZNF292、miR-23b-3p、bax 蛋白和 bcl-2 蛋白相对表达量及细胞凋亡率总体比较,差异均有统计学意义

表 4 不同 circZNF292 转染组 circZNF292 和 miR-23b-3p 相对表达量、细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of relative expression levels of circZNF292 and miR-23b-3p, cell apoptosis rate and apoptosis-related protein expression between different circZNF292 transfection groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	circZNF292	miR-23b-3p	凋亡率(%)	bax	bcl-2
pcDNA 组	3	1.00±0.02	1.00±0.01	22.63±1.43	0.70±0.08	0.19±0.03
pcDNA-circZNF292 组	3	2.61±0.20 ^a	0.52±0.06 ^a	13.24±1.09 ^a	0.28±0.04 ^a	0.63±0.05 ^a
t 值		13.874	13.668	9.046	8.133	13.070
P 值		<0.001	<0.001	0.001	0.001	<0.001

注:(独立样本 t 检验) miR:微小 RNA;bax;bcl-2 相关 X 蛋白;bcl-2:B 细胞淋巴瘤-2

Note:(Independent samples t test) miR:microRNA;bax;bcl-2 associated X protein;bcl-2:B-cell lymphoma-2

表 5 不同 circZNF292 转染组细胞 MDA 浓度和 SOD 活性值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of MDA concentration and SOD activity between different circZNF292 transfection groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	MDA 浓度 (mmol/L)	SOD 活性 [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$]
pcDNA 组	3	354.47±21.52	47.82± 5.65
pcDNA-circZNF292 组	3	194.21±11.93 ^a	161.20±11.02 ^a
<i>t</i> 值		11.281	15.585
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: (独立样本 *t* 检验) MDA: 丙二醛; SOD: 超氧化物歧化酶
 Note: (Independent samples *t* test) MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase

($F = 163.188, 107.321, 85.623, 59.310, 96.786$, 均 $P < 0.001$); 其中与高糖组和杨梅苷+siR-circZNF292 组比较, 杨梅苷组和杨梅苷+siR-NC 组细胞中 miR-23b-3p、bax 蛋白相对表达量和细胞凋亡率明显降低, circZNF292 和 bcl-2 蛋白相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 6, 7, 表 6)。

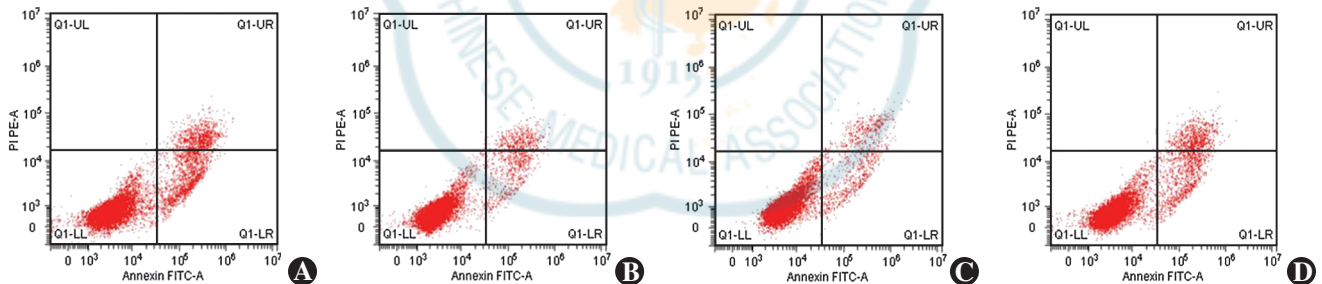


图 7 不同 siRNA 转染组细胞凋亡流式细胞图 杨梅苷组凋亡细胞数少于高糖组和杨梅苷+siR-circZNF292 组 A: 高糖组 B: 杨梅苷组 C: 杨梅苷+siR-NC 组 D: 杨梅苷+siR-circZNF292

Figure 7 Flow cytometry of cell apoptosis in different siRNA transfection groups The number of apoptotic cells was smaller in myricitrin group than myricitrin+siR-cirZNF292 group A: high glucose group B: myricitrin group C: myricitrin+siR-NC group D: myricitrin+siR-circZNF292

表 6 不同 siRNA 转染组 circZNF292 和 miR-23b-3p 相对表达量、细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
 Table 6 Comparison of relative expression levels of circZNF292 and miR-23b-3p, cell apoptosis rate and apoptosis-related protein expression among different siRNA transfection groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	circZNF292	miR-23b-3p	凋亡率 (%)	bax	bcl-2
高糖组	3	1.00±0.03	1.00±0.01	22.71±1.29	0.69±0.06	0.18±0.03
杨梅苷组	3	2.97±0.15 ^a	0.46±0.05 ^a	9.98±1.07 ^a	0.24±0.02 ^a	0.71±0.05 ^a
杨梅苷+siR-NC 组	3	3.01±0.20	0.47±0.04	10.02±1.15	0.23±0.02	0.72±0.08
杨梅苷+siR-circZNF292 组	3	1.64±0.10 ^b	0.80±0.06 ^b	17.29±0.78 ^b	0.50±0.05 ^b	0.35±0.03 ^b
<i>F</i> 值		163.188	107.321	96.786	85.623	59.310
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与高糖组相比, ^a $P < 0.05$; 与杨梅苷+siR-NC 组相比, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) siRNA: 小干扰 RNA; miR: 微小 RNA; bax; bcl-2 相关 X 蛋白; bcl-2: B 细胞淋巴瘤-2; siR-NC: 小干扰 RNA-阴性对照

Note: Compared with high glucose group, ^a $P < 0.05$; compared with myricitrin + siR-NC group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) siRNA: small interfering RNA; miR: microRNA; bax; bcl-2 associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma-2; siR-NC: small interfering RNA-negative control

2.8 不同 siRNA 转染组细胞中 MDA 浓度及 SOD 活性比较

高糖组、杨梅苷组、杨梅苷+siR-NC 组和杨梅苷+siR-circZNF292 组细胞中 MDA 浓度和 SOD 活性值总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 49.375, 149.745$, 均 $P < 0.001$)。与杨梅苷+siR-NC 组比较, 杨梅苷+siR-circZNF292 组 MDA 浓度明显升高, SOD 活性值明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 7)。

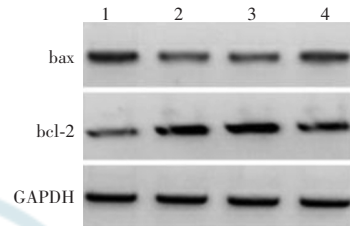


图 6 不同 siRNA 转染组细胞凋亡相关蛋白表达电泳图 1: 高糖组; 2: 杨梅苷组; 3: 杨梅苷+siR-NC 组; 4: 杨梅苷+siR-circZNF292 bax; bcl-2 相关 X 蛋白; bcl-2: B 细胞淋巴瘤-2

Figure 6 Electrophoretogram of apoptosis-related protein expression in different siRNA transfection groups 1: high glucose group; 2: myricitrin group; 3: myricitrin+siR-NC group; 4: myricitrin+siR-circZNF292 bax; bcl-2 associated X protein; bcl-2: B-cell lymphoma-2

表 7 不同 siRNA 转染组细胞中 MDA 浓度和 SOD 活性值比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 7 Comparison of MDA concentration and SOD activity among different siRNA transfection groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	MDA 浓度 (mmol/L)	SOD 活性值 [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$]
高糖组	3	347.23 \pm 25.43	48.55 \pm 5.99
杨梅苷组	3	159.82 \pm 17.15 ^a	181.07 \pm 10.06 ^a
杨梅苷+siR-NC 组	3	155.41 \pm 19.84	186.12 \pm 9.96
杨梅苷+siR-circZNF292 组	3	254.10 \pm 25.99 ^b	133.69 \pm 9.45 ^b
F 值		49.375	149.745
P 值		<0.001	<0.001

注:与高糖组相比,^a $P < 0.05$;与杨梅苷+siR-NC 组相比,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) siRNA:小干扰 RNA;MDA:丙二醛;SOD:超氧化物歧化酶;siR-NC:小干扰 RNA-阴性对照

Note: Compared with high glucose group, ^a $P < 0.05$; compared with myricitrin + siR-NC group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) siRNA: small interfering RNA; MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase; siR-NC: small interfering RNA-negative control

3 讨论

DR 是糖尿病常见的严重眼部微血管并发症之一。高血糖状态下视网膜代谢异常,促发氧化应激和炎症反应,引发 HRMECs 功能障碍和细胞凋亡等病理改变,最终破坏血-视网膜屏障结构和功能的稳定性。因此,及早干预或合理治疗对防治 DR 的发生和发展具有重要意义^[19-20]。

杨梅苷可促进缺氧/复氧诱导的心肌细胞增生,抑制细胞凋亡和 caspase-3 活性,抑制氧化应激反应,减轻心肌细胞损伤^[21]。杨梅苷通过调控 bcl-2/bax 信号通路,抑制大鼠脊髓外伤诱导的氧化应激损伤及炎症反应^[22]。本研究结果也显示,高糖可诱导 HRMECs 凋亡率和 bax 表达升高,抗凋亡蛋白 bcl-2 水平降低;随着杨梅苷剂量增加,高糖诱导的 HRMECs 凋亡率和 bax 蛋白表达降低,bcl-2 蛋白表达升高,并存在剂量依赖性,提示杨梅苷可抑制高糖诱导的 HRMECs 凋亡。同时本研究发现,高糖诱导的 HRMECs 中 MDA 浓度升高,SOD 活性降低,而杨梅苷可降低细胞 MDA 浓度,增强 SOD 活性,且呈剂量依赖性,提示杨梅苷可抑制高糖诱导的 HRMECs 过氧化损伤。然而,杨梅苷对高糖诱导 HRMECs 过氧化损伤和凋亡途径的分子机制尚不清楚。

circRNA 具有稳定性、保守性和特异性,部分 circRNA 序列上富含多个 miRNA 应答元件,可结合并吸附 miRNA 从而调控靶基因表达。近年来越来越多的研究发现,circRNA 在 DR 中表达异常,并可能作为 DR 治疗的潜在靶点。circZNF292 是研究较为广泛的

circRNA,其在氧化应激状态下对细胞凋亡发挥着重要的调节作用。circZNF292 在氧糖剥夺诱导的心肌 H9c2 细胞中表达异常,并通过 Wnt3a/ β -catenin 调控细胞增生及凋亡^[23]。circZNF292 在年龄相关性白内障中表达显著下调,circZNF292 表达上调可通过与 miR-23b-3p 竞争调控抗氧化基因表达抑制晶状体上皮细胞凋亡^[13]。本研究结果显示,高糖诱导的 HRMECs 中 circZNF292 表达量显著降低,miR-23b-3p 表达量显著升高,杨梅苷能够以浓度依赖性方式升高 circZNF292 表达量,降低 miR-23b-3p 表达量,提示杨梅苷可能参与调控 circZNF292/miR-23b-3p 表达。本研究结果还显示,通过转染上调 circZNF292 表达可抑制 miR-23b-3p 表达,增强高糖诱导的 HRMECs 抗氧化能力,抑制 HRMECs 凋亡;同时,转染 siRNA 抑制 circZNF292 表达可升高 miR-23b-3p 表达,逆转杨梅苷对高糖诱导 HRMECs 的凋亡及抗氧化能力。双荧光素酶报告实验结果显示,HRMECs 中 circZNF292 与 miR-23b-3p 存在靶向关系。以上结果提示,杨梅苷可通过上调高糖诱导的 HRMECs 中 circZNF292 表达而抑制 miR-23b-3p 表达,增强细胞抗氧化能力并抑制细胞凋亡。但杨梅苷是否参与调控 DR 的其他基因或信号通路尚需进一步研究探索。

综上所述,本研究结果显示 circZNF292 可靶向调控 miR-23b-3p 表达,circZNF292/miR-23b-3p 分子轴在高糖诱导的 HRMECs 氧化应激损伤和细胞凋亡中发挥重要调控作用。杨梅苷可抑制高糖诱导的 HRMECs 凋亡并增强细胞抗氧化能力,其作用机制与促进 circZNF292 表达及抑制 miR-23b-3p 表达有关。本研究为杨梅苷治疗 DR 提供了一定的实验基础,后续可在 DR 动物模型内进一步验证其安全性和有效性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘茜:参与研究选题、研究设计、研究实施、数据收集整理和分析、论文撰写修改及定稿;刘长庚:参与研究实施、数据收集整理和分析、论文修改;李海军:参与研究选题、数据分析和论文修改;董仰曾:参与研究设计、论文定稿;张颖:参与数据收集整理和分析

参考文献

- [1] 徐辉勇,陈金鹏,章剑.柚皮素对糖尿病视网膜病变大鼠氧化损伤、细胞凋亡及 Nrf2-ARE 的影响[J].临床和实验医学杂志,2020,19(2):128-132. DOI:10.3969/j.issn.1671-4695.2020.02.005. Xu HY, Cheng JP, Zhang J. The effects of naringenin on oxidative damage, apoptosis and Nrf2-ARE in rats with diabetic retinopathy[J]. J Clin Exp Med, 2020, 19(2): 128-132. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2020.02.005.
- [2] 崔锡铭,王霜,许顺江,等.白藜芦醇对高糖环境下人视网膜血管内皮细胞增殖的影响及分子机制[J].山东大学学报:医学版,2019,57(3):19-24. DOI:10.6040/j.issn.1671-7554.0.2018.799.

- Cui XM, Wang S, Xu SJ, et al. Effect of resveratrol on the proliferation of human retinal capillary endothelial cells induced by high glucose and its possible mechanism [J]. J Shandong Univ (Health Sci), 2019, 57(3): 19-24. DOI:10.6040/j.issn.1671-7554.0.2018.799.
- [3] Cui J, Gong R, Hu S, et al. Gambogic acid ameliorates diabetes-induced proliferative retinopathy through inhibition of the HIF-1 α /VEGF expression via targeting PI3K/AKT pathway [J]. Life Sci, 2018, 192: 293-303. DOI:10.1016/j.lfs.2017.11.007.
- [4] 蔡志标, 陶凯, 王宝, 等. 杨梅苷通过抑制线粒体功能障碍减轻 MPP⁺诱导的 SN4741 细胞凋亡 [J]. 神经解剖学杂志, 2015, 31(5): 579-583. DOI:10.16557/1000-7547.201505008.
- Cai ZB, Tao K, Wang B, et al. Myricitrin attenuated MPP⁺-induced apoptosis in SN4741 cells by inhibiting mitochondrial dysfunction [J]. Chin J Neuroanat, 2015, 31(5): 579-583. DOI:10.16557/1000-7547.201505008.
- [5] 张秀娟, 侯喆, 白雪莹, 等. 杨梅素作用于人肝癌 HepG-2 细胞凋亡信号转导途径的研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(1): 71-76. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2014.01.016.
- Zhang XJ, Hou Z, Bai XY, et al. Studies on myricetin inducing human hepatoma HepG-2 cells apoptosis through signal transduction pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(1): 71-76. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2014.01.016.
- [6] Kim DY, Kim SR, Jung UJ. Myricitrin ameliorates hyperglycemia, glucose intolerance, hepatic steatosis, and inflammation in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic mice [J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1870 [2021-06-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32182914>. DOI:10.3390/ijms21051870.
- [7] Ahangarpour A, Oroojan AA, Khorsandi L, et al. Antioxidant effect of myricitrin on hyperglycemia-induced oxidative stress in C2C12 cell [J]. Cell Stress Chaperones, 2018, 23(4): 773-781. DOI:10.1007/s12192-018-0888-z.
- [8] Arumugam B, Palanisamy UD, Chua KH, et al. Protective effect of myricetin derivatives from Syzygium malaccense against hydrogen peroxide-induced stress in ARPE-19 cells [J]. Mol Vis, 2019, 25: 47-59.
- [9] Qiao Y, Fan CL, Tang MK. Astragaloside IV protects rat retinal capillary endothelial cells against high glucose-induced oxidative injury [J]. Drug Des Devel Ther, 2017, 11: 3567-3577. DOI:10.2147/DDDT.S152489.
- [10] Zhu K, Hu X, Chen H, et al. Downregulation of circRNA DMNT3B contributes to diabetic retinal vascular dysfunction through targeting miR-20b-5p and BAMBI [J]. EBioMedicine, 2019, 49: 341-353. DOI:10.1016/j.ebiom.2019.10.004.
- [11] Liu G, Zhou S, Li X, et al. Inhibition of hsa_circ_0002570 suppresses high-glucose-induced angiogenesis and inflammation in retinal microvascular endothelial cells through miR-1243/angiogenin axis [J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(5): 767-777. DOI:10.1007/s12192-020-01111-2.
- [12] Xu X, Gao R, Li S, et al. Circular RNA circZNF292 regulates H₂O₂-induced injury in human lens epithelial HLE-B3 cells depending on the regulation of the miR-222-3p/E2F3 axis [J]. Cell Biol Int, 2021, 45(8): 1757-1767. DOI:10.1002/cbin.11615.
- [13] Liang S, Dou S, Li W, et al. Profiling of circular RNAs in age-related cataract reveals circZNF292 as an antioxidant by sponging miR-23b-3p [J/OL]. Aging (Albany NY), 2020, 12(17): 17271-17287 [2021-06-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32913142>. DOI:10.18632/aging.103683.
- [14] Zhao S, Li T, Li J, et al. miR-23b-3p induces the cellular metabolic memory of high glucose in diabetic retinopathy through a SIRT1-dependent signalling pathway [J]. Diabetologia, 2016, 59(3): 644-654. DOI:10.1007/s00125-015-3832-0.
- [15] 曹峰, 吕欣, 董凯峰, 等. AMG-102 通过调控 c-Met/PI3K/Akt 通路抑制喉鳞癌细胞增殖和诱导凋亡 [J]. 中华肿瘤杂志, 2020, 42(2): 99-104. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2020.02.003.
- Cao F, Lyu X, Dong KF, et al. AMG-102 inhibits proliferation and induces apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma cells by regulating c-Met/PI3K/Akt pathway [J]. Chin J Oncol, 2020, 42(2): 99-104. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2020.02.003.
- [16] 周玉娣, 蒋为, 周萍. 黄芩素通过上调 miR-7-5p 影响脂多糖诱导的肾小球上皮细胞氧化应激及凋亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(10): 1860-1866. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2020.10.018.
- Zhou YD, Jiang W, Zhou P. Scutellarin affects LPS-induced oxidative stress and apoptosis of glomerular epithelial cells by up-regulating miR-7-5p [J]. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(10): 1860-1866. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2020.10.018.
- [17] 许国彩, 刘芝兰, 逯艳艳. lncRNA FLVCR1-AS1 靶向 miR-381-3p 对结肠直肠癌细胞增殖、凋亡的影响及其分子机制 [J]. 山东医药, 2020, 60(29): 5-9. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2020.29.002.
- Xu GC, Liu ZL, Lu YY. Effects of lncRNA FLVCR1-AS1 targeting miR-381-3p on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells and molecular mechanism [J]. Shandong Med J, 2020, 60(29): 5-9. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2020.29.002.
- [18] 高飞, 王志鹏, 阮一华. miR-146a 对高糖诱导人视网膜微血管内皮细胞凋亡的抑制作用及其机制 [J]. 中华实验眼科杂志, 2021, 39(5): 398-403. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190703-00286.
- Gao F, Wu ZP, Ruan YH. Inhibitory effect of miR-146a on high glucose-induced apoptosis of retinal microvascular endothelial cells and its mechanism [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39(5): 398-403. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190703-00286.
- [19] Ren Q, Li H, Wang X. The circular RNA ZNF292 alleviates OGD-induced injury in H9c2 cells via targeting BNIP3 [J]. Cell Cycle, 2019, 18(23): 3365-3377. DOI:10.1080/15384101.2019.1676585.
- [20] 方梦园, 李秋明, 杨鑫, 等. 积雪草酸对糖尿病大鼠血-视网膜屏障的保护作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2021, 39(7): 593-601. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201024-00713.
- Fang MY, Li QM, Yang X, et al. Protective effect of asiatic acid on blood-retinal barrier in diabetic rats [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39(7): 593-601. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201024-00713.
- [21] Wang M, Sun GB, Du YY, et al. Myricitrin protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury: involvement of heat shock protein 90 [J/OL]. Front Pharmacol, 2017, 8: 353 [2021-07-18]. DOI:10.3389/fphar.2017.00353.
- [22] Lei Y. Myricitrin decreases traumatic injury of the spinal cord and exhibits antioxidant and anti-inflammatory activities in a rat model via inhibition of COX-2, TGF- β 1, p53 and elevation of Bcl-2/Bax signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 7699-7705. DOI:10.3892/mmr.2017.7567.
- [23] 顾顺, 詹鹏飞, 王文娟, 等. miR-146a 对糖尿病视网膜病炎症反应的抑制作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(9): 733-739. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190213-00051.
- Gu S, Zhan PF, Wang WJ, et al. Inhibitory effects of miR-146a on retinal inflammation induced by high glucose in human retinal endothelial cells [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(9): 733-739. DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190213-00051.

(收稿日期:2021-11-15 修回日期:2022-06-13)

(本文编辑:张宇 骆世平)