

高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞中环状 RNA 差异表达分析

贾杨雪¹ 王志玲² 魏莹莹² 朱恺² 顾永昊²

¹皖南医学院第二附属医院眼科, 芜湖 241000; ²安徽医科大学附属省立医院眼科, 合肥 230001

通信作者: 顾永昊, Email: aerolplane@hotmail.com

【摘要】 目的 研究高糖培养条件下人视网膜血管内皮细胞(HRVECs)的环状 RNA(circRNA)表达变化。方法 将 HRVECs 分为正常对照组、高渗对照组和高糖组,分别在 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基、19.5 mmol/L 甘露醇+5.5 mmol/L 葡萄糖培养基和 25 mmol/L 葡萄糖培养基中培养 24 h。使用 circRNA 芯片对高糖组和正常对照组 HRVECs 进行 circRNA 表达谱检测,筛选出差异表达 circRNA 分子;采用实时荧光定量 PCR 验证差异表达 circRNA 分子在正常对照组、高渗对照组和高糖组细胞中的表达变化,并采用 Circular RNA Interactome 数据库预测差异表达 circRNA 可能作用的微小 RNA(miRNA)靶点。结果 在高糖培养的 HRVECs 中共筛选出 448 个差异表达 circRNA(差异倍数 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 且 $P < 0.05$),其中 182 个 circRNA 上调,266 个 circRNA 下调。表达上调排序前 3 的差异 circRNA 分别为 hsa_circ_0002938、hsa_circ_0008036 和 hsa_circ_0001946,表达下调排序前 3 的差异 circRNA 分别为 hsa_circ_0035277、hsa_circ_0008344 和 hsa_circ_0001874。实时荧光定量 PCR 结果显示,与正常对照组和高渗对照组相比,高糖组中 hsa_circ_0002938、hsa_circ_0008036 和 hsa_circ_0001946 相对表达量显著升高,hsa_circ_0035277、hsa_circ_0008344 和 hsa_circ_0001874 相对表达量显著下调,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);正常对照组与高渗对照组各差异 circRNA 表达比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。结论 在高糖条件下培养的 HRVECs 中 circRNA 呈差异表达,差异表达 circRNA 可能参与糖尿病视网膜病变发病机制。

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 环状 RNA; 基因芯片; 靶基因

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1908085MH254)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200602-00390

Differential expression analysis of circular RNA in human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose

Jia Yangxue¹, Wang Zhiling², Wei Yingying², Zhu Kai², Gu Yonghao²

¹Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China; ²Department of Ophthalmology, Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, China
Corresponding author: Gu Yonghao, Email: aerolplane@hotmail.com

[Abstract] **Objective** To investigate the differential expression profile of circular RNA (circRNA) in high glucose-cultured human retinal vascular endothelial cells (HRVECs). **Methods** HRVECs were divided into high glucose group, normal control group and hypertonic control group, and were cultured in 25 mmol/L glucose medium, 5.5 mmol/L glucose medium and 19.5 mmol/L mannitol+5.5 mmol/L glucose medium for 24 hours accordingly. The differentially expressed circRNA molecules between high glucose group and normal control group were screened by circRNA microarray analysis. The expression of the most significant differentially expressed circRNAs in different groups was verified by real-time quantitative PCR. The possible microRNA (miRNA) targets were analyzed through the Circular RNA Interactome database. **Results** It was found that 448 circRNAs were differentially expressed ($FC \geq 1.5$ or $FC \leq 0.67$, $P < 0.05$) in high glucose-cultured HRVECs, among which 182 were up-regulated and 266 were down-regulated. The top 3 significantly up-regulated circRNAs were hsa_circ_0002938, hsa_circ_0008036, and hsa_circ_0001946, and the top 3 significantly down-regulated circRNAs were hsa_circ_0035277, hsa_circ_0008344, and hsa_circ_0001874. Compared with normal control group and hypertonic control group, the relative expressions of top 3 up-regulated circRNAs were significantly enhanced and the relative expressions of top 3 down-regulated circRNAs were significantly reduced in high glucose group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). No significant difference was found in the differentially expressed circRNAs between normal control group and hypertonic control group (all at $P > 0.05$). **Conclusions** CircRNAs are differentially expressed in high glucose-cultured HRVECs, and the differentially expressed circRNAs may be involved in the regulatory mechanism of diabetic retinopathy.

[Key words] Diabetic retinopathy; Circular RNA; Microarray; Target gene

Fund program: Anhui Natural Science Foundation (1908085MH254)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200602-00390

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的主要微血管并发症之一,严重影响患者视力。我国糖尿病患者中 DR 的总患病率约为 23%^[1]。有研究显示,15 年以上病程的 1 型和 2 型糖尿病患者中 DR 患病率分别达 98% 和 78%^[2]。目前仍然缺乏良好的 DR 防治方法,探索其发病机制及可能的治疗方向显得非常重要。血管内皮细胞功能障碍和视网膜微环境的代谢变化是 DR 的主要发病机制之一,预防血管内皮细胞功能障碍可降低糖尿病性血管并发症的风险^[3-5]。环状 RNA(circular RNA, circRNA)是一种广泛存在于真核生物体内的非编码 RNA,具有高度稳定性、保守性、一定的时序及组织特异性,其主要功能包括:与微小 RNA(miRNA, miRNA)竞争性结合;通过 RNA 结合蛋白与蛋白质相互作用^[6];调控 RNA 聚合酶的转录进而调控亲本基因的表达^[7];通过选择性剪接或碱基互补配对等方式介导假基因形成^[8];少部分的 circRNA 可作为 mRNA 编码蛋白^[9]。越来越多的研究表明, circRNA 参与肺癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、肝癌等疾病的病理过程,成为肿瘤早期诊断标志物及潜在的治疗靶点^[10]。另外,也有研究表明 circRNA 可通过调控下游靶基因表达影响胰岛 β 细胞的分泌功能,从而在糖尿病及其并发症的发展中发挥作用^[11]。本课题组前期应用 circRNA 芯片对 5 例增生性 DR 患者、5 例无明显眼底病变的 2 型糖尿病患者和 5 名年龄匹配的正常人血浆进行对比研究发现,增生性 DR 患者血浆的 circRNA 谱发生明显变化,证实 circRNA 在 DR 的发病中可能发挥潜在作用^[12]。采用血浆标本进行 circRNA 芯片研究时,血浆内的各种成分易受身体整体情况的影响,而直接进行细胞实验可以更准确地发现高糖刺激对视网膜血管内皮细胞中 circRNA 表达的影响。本研究拟通过 circRNA 芯片筛选正常与高糖培养的人视网膜血管内皮细胞(human retinal vascular endothelial cells, HRVECs)中差异表达的 circRNA,采用实时荧光定量 PCR 进行验证,分析其可能的靶 miRNA 分子,为 DR 的诊断和治疗提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HRVECs 购于深圳市豪地华拓生

物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 低糖(5.5 mmol/L)培养基(美国 HyClone 公司);胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青-链霉素混合液(美国 Gibco 公司);甘露醇试剂(上海展云化工有限公司);Trizol 试剂(美国 Ambion 公司);逆转录试剂盒(美国 ABclonal 公司);circRNA 基因芯片(美国 Arraystar 公司);SuperRed GelRed 核酸染料(美国 Biosearch Technologies 公司);荧光定量 PCR 试剂 Genious 2X SYBR Green Fast qPCR(美国 ABclonal 公司)。低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);CO₂ 细胞培养箱、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司);DYY-6C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Nanodrop 微光分光光度计(美国 Thermo 公司);紫外分光光度计(上海司乐仪器有限公司);凝胶成像仪(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 HRVECs 的培养及分组处理 HRVECs 用含体积分数 10% FBS 和青-链霉素混合液 100 U/ml(商品单位)的 DMEM 低糖培养基,在 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 的恒温 CO₂ 培养箱中培养并传代,每 2~3 d 换液 1 次。待细胞生长至 80% 融合度,将细胞进行传代并分组培养:正常对照组细胞于 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基中培养,高渗对照组细胞于 19.5 mmol/L 甘露醇以及 5.5 mmol/L 葡萄糖培养基中培养,高糖组细胞于 25 mmol/L 葡萄糖培养基中培养。各组细胞均在 37 °C 细胞恒温培养箱中培养 24 h。实验独立重复 3 次。

1.2.2 circRNA 芯片检测细胞中 circRNA 表达及差异基因筛选 将正常对照组和高糖组细胞用预冷磷酸盐缓冲液洗涤 3 次后,加入 Trizol 裂解细胞,提取样品中的总 RNA,用紫外分光光度计测定核酸的纯度及浓度,要求 A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0, RNA 总量达到 500 μ g。用甲醛电泳试剂进行变性琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 纯度及完整性。由上海康成生物工程有限公司采用 circRNA 芯片 V2.0 进行检测,将正常对照组和高糖组抽提的总 RNA 用 RNase R 处理,使用 Arraystar Super RNA Labeling 试剂盒,逆转录合成 cDNA 并进行荧光标记。采用 Nanodrop 检测荧光标记效率,在标准条件下将标记好的探针和高密度基因组芯片进行杂交,采用 GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描

芯片的荧光强度,采用 GenePix Pro6 软件将实验结果转换成数字型数据保存。采用 R 软件 limma 包对原始数据进行归一化处理,根据差异倍数 (fold change, FC) ≥ 1.5 或 $FC \leq 0.67$ 且 $P < 0.05$ 筛选出 2 个组样本中差异表达的 circRNA。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 验证差异表达 circRNA
 分别从上调和下调的差异表达 circRNA 中筛选出 FC 排序前 3 的 circRNA,首先在 circRNA 数据库 (<http://www.circbase.org/>) 找到 circRNA 的全长序列,按照发散引物设计原理,跨 circRNA 的 junction site 上下游进行引物设计,确保扩增产物包含 junction site。各目的 circRNA 的具体引物序列见表 1,引物由合肥通用生物系统有限公司合成,以 GAPDH 为内参。收集正常对照组、高渗对照组和高糖组细胞,用 Trizol 处理后抽提总 RNA,再进行定量逆转录得到 cDNA,实时荧光定量 PCR 进行引物扩增。其中目的基因正向和反向引物各 $1 \mu\text{l}$, cDNA $2 \mu\text{l}$, RNase-free water $21 \mu\text{l}$, qRT-PCR 酶 $25 \mu\text{l}$, 共 $50 \mu\text{l}$ 反应体系,将混合物混匀后各取 $15 \mu\text{l}$ 至 96 孔板的 3 个复孔中,离心后置于 qPCR 仪中运行程序。实时荧光定量 PCR 反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火及延伸 34 s , 共 40 个循环。采用溶解曲线 ($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s , $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 s) 分析扩增产物特性。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因相对表达量。

1.2.4 miRNA 结合位点预测 通过数据库 Circinteractome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/index.html>), 依据结合紧密程度, 预测 6 个差异表达最显著的 circRNA 分子下游可能作用 miRNA 靶点。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 个组间 circRNA 相对表达量的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 差异表达 circRNA 的筛选

共筛选出 448 个差异表达的 circRNA, 其中 182 个 circRNA 上调, 266 个 circRNA 表达下调 (图 1)。10 个上调最显著的 circRNA 分别为 hsa_circ_0002938、hsa_circ_0008036、hsa_circ_0001946、hsa_circ_00087862、hsa_circ_00071935、hsa_circ_0000665、hsa_circ_00073748、hsa_circ_0000740、hsa_circ_0008697

表 1 PCR 扩增引物序列
Table 1 PCR primer sequences

目的基因	引物序列 (5'~3')
hsa_circ_0002938	正向: AGCTGTTTCTCTGAGTCCTG 反向: CAGGTGGATCAACTGTGATG
hsa_circ_0008036	正向: AAGGACGGCTCTATCAGCAT 反向: GCAGATCGTCCAAGAATCTC
hsa_circ_0001946	正向: TTGGAAGACCTTGACACAGG 反向: CAGTGTGCTGATCTTCTGAC
hsa_circ_0035277	正向: CATCTGGACTCCAATGAC 反向: ACTGTGGCACTGCCAATCTA
hsa_circ_0008344	正向: TCAGCTCCAGGAACCATCAT 反向: CTGTACTGCACTGGTCATTG
hsa_circ_0001874	正向: TTGGCTCTCCTGCTGTGC 反向: GGTCATCCACAATCAGCCCA
GAPDH	正向: CTCATTGACCTCAACTACATGG 反向: CTCGCTCCTGGAAGATGGTGAT

注: PCR: 聚合酶链式反应; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

Note: PCR: polymerase chain reaction; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

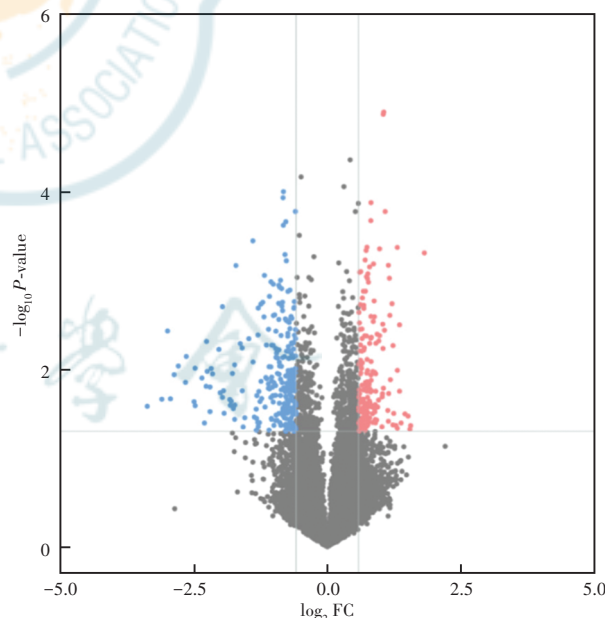


图 1 高糖组与正常对照组之间差异表达 circRNA 火山图 ($n=3$) 垂直线对应 0.67 倍和 1.5 倍 FC, 水平线标记的 P 值为 0.05。红色表示上调的 circRNA, 蓝色表示下调的 circRNA FC: 差异倍数

Figure 1 Volcano graph of differentially expressed circRNAs between high glucose group and normal control group ($n=3$)

The vertical lines corresponded to 0.67 and 1.5 fold change, while the horizontal line marked P value was 0.05. The red dots represented up-regulated circRNAs, and the blue dots represented down-regulated circRNAs FC: fold change

和 hsa_circ_0056550 (表 2); 10 个下调最显著的 circRNA 分别为 hsa_circ_0035277、hsa_circ_0008344、hsa_circ_0001874、hsa_circ_0082326、hsa_circ_0000858、hsa_circ_0092367、hsa_circ_0000598、hsa_circ_0049271、hsa_circ_0000253 和 hsa_circ_0044837 (表 3)。

2.2 差异 circRNA 的实时荧光定量 PCR 验证

正常对照组、高渗对照组和高糖组 3 个表达显著上调 circRNA (hsa_circ_0002938、hsa_circ_0008036 和 hsa_circ_0001946) 和 3 个表达显著下调 circRNA (hsa_circ_0035277、hsa_circ_0008344 和 hsa_circ_0001874) 的相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 7.571, 41.274, 5.249, 83.106, 11.011, 6.593$, 均 $P < 0.05$); 正常对照组与高渗对照组中各 circRNA 的相对表达量比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与正常对照组和高渗对照组相比, 高糖组中 hsa_circ_0002938、hsa_circ_0008036 和 hsa_circ_0001946 相对表达量显著升高, hsa_circ_0035277、hsa_circ_0008344 和 hsa_circ_0001874 相对表达量显著下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 4)。

2.3 部分差异表达 circRNA 的靶基因预测

根据结合位点个数以及紧密程度, 表 5 列出每个差异表达 circRNA 的 5 个最可能相互作用靶 miRNA。

表 2 排序前 10 的表达上调 circRNA
Table 2 Top 10 up-regulated circRNAs

基因	差异倍数	P 值	染色体编号
hsa_circ_0002938	2.739 751 2	0.031 829 2	chr2
hsa_circ_0008036	2.606 675 9	0.040 271 3	chr2
hsa_circ_0001946	2.554 833 5	0.003 108 2	chrX
hsa_circ_0087862	2.554 786 6	0.003 164 5	chr9
hsa_circ_0071935	2.554 537 2	0.017 673 2	chr5
hsa_circ_0000665	2.484 067 8	0.010 291 4	chr16
hsa_circ_0073748	2.481 503 4	0.000 425 4	chr5
hsa_circ_0000740	2.439 942 4	0.043 060 9	chr17
hsa_circ_0008697	2.369 068 3	0.031 415 5	chr5
hsa_circ_0056550	2.346 626 1	0.005 412 1	chr2

注: (配对样本 t 检验) circRNA: 环状 RNA
Note: (Paired sample t -test) circRNA: circular RNA

表 3 排序前 10 的表达下调 circRNA
Table 3 Top 10 down-regulated circRNAs

基因	差异倍数	P 值	染色体编号
hsa_circ_0035277	0.209 494 7	0.486 667 8	chr15
hsa_circ_0008344	0.252 612 0	0.507 082 2	chr9
hsa_circ_0001874	0.257 731 7	0.325 160 8	chr9
hsa_circ_0082326	0.258 952 1	0.516 543 1	chr7
hsa_circ_0000858	0.283 102 2	0.553 271 4	chr18
hsa_circ_0092367	0.299 648 2	0.617 343 6	chr15
hsa_circ_0000598	0.322 714 1	0.394 815 1	chr15
hsa_circ_0049271	0.360 884 5	0.382 945 1	chr19
hsa_circ_0000253	0.387 327 3	0.609 878 7	chr10
hsa_circ_0044837	0.397 269 9	0.562 405 6	chr17

注: (配对样本 t 检验) circRNA: 环状 RNA
Note: (Paired sample t -test) circRNA: circular RNA

表 4 各组细胞中差异表达 circRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the relative expression of differently expressed circRNAs among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	hsa_circ_0002938	hsa_circ_0008036	hsa_circ_0001946	hsa_circ_0035277	hsa_circ_0008344	hsa_circ_0001874
正常对照组	3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
高渗对照组	3	1.104 ± 0.053	1.011 ± 0.117	0.964 ± 0.113	1.043 ± 0.030	1.099 ± 0.066	1.041 ± 0.108
高糖组	3	3.380 ± 0.845 ^{ab}	1.989 ± 0.099 ^{ab}	1.353 ± 0.117 ^{ab}	0.559 ± 0.045 ^{ab}	0.524 ± 0.166 ^b	0.696 ± 0.070 ^{ab}
F 值		7.571	41.274	5.249	83.106	11.011	6.593
P 值		0.023	<0.01	0.048	<0.01	0.01	0.031

注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与高渗对照组相比, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) circRNA: 环状 RNA
Note: Compared with normal control group, ^a $P < 0.05$; compared with hypertonic control group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) circRNA: circular RNA

表 5 部分差异表达 circRNA 的靶 miRNA 预测

Table 5 Target miRNA prediction of some differentially expressed circRNAs

基因	miRNA1	miRNA2	miRNA3	miRNA4	miRNA5
hsa_circ_0002938	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-541-3p	hsa-miR-557
hsa_circ_0008036	hsa-miR-4778-3p	hsa-miR-4659b-3p	hsa-miR-6499-3p	hsa-miR-1227-3p	hsa-miR-4776-3p
hsa_circ_0001946	hsa-miR-7-5p	hsa-miR-3529-5p	hsa-miR-8056	hsa-miR-1246	hsa-miR-139-3p
hsa_circ_0035277	hsa-miR-224-5p	hsa-miR-616-3p	hsa-miR-520g-5p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-708-3p
hsa_circ_0008344	hsa-miR-514a-5p	hsa-miR-433-3p	hsa-miR-148b-5p	hsa-miR-382-5p	hsa-miR-450b-3p
hsa_circ_0001874	hsa-miR-661	hsa-miR-662	hsa-miR-593-5p	hsa-miR-107	hsa-miR-103a-3p

注: circRNA: 环状 RNA; miRNA: 微小 RNA
Note: circRNA: circular RNA; miRNA: micro RNA

3 讨论

Zhang 等^[13]对比 3 名正常人和 2 例糖尿病患者的视网膜组织发现 529 个差异表达的 circRNA, 并证实 has_circRNA_0005015 分子可能与 miR-519d-3p 结合来调节血管内皮细胞功能。circRNA circHIPK3 抑制 miRNA-30a-3p 表达, 导致血管内皮生长因子 C、Wnt2 和卷曲受体 4 (frizzled class receptor 4, FZD4) 表达增加, 从而引起内皮细胞增生和血管功能障碍^[14]。在缺氧及高糖情况下, circRNA-ZNF609 表达明显上调, 可与内源性 miR-615-5p 结合, 抑制 miR-615-5p 活性, 增强 HRVECs 活力、迁移力及管腔成形能力^[15]。此外, 在 DR 患者和非糖尿病患者的玻璃体标本及高糖培养的人脐静脉血管内皮细胞中, 高通量测序筛选出差异表达的 circRNA, 证实 circRNA 通过靶向 miRNA 调节参与血管内皮功能和血管生成基因的表达^[16-17]。Liu 等^[18]对周细胞中存在的 circRNA-cPWWP2A 进行研究, 发现其可与 miR579 结合, 改善糖尿病动物模型的视网膜渗漏情况。但是, 本研究中未发现与这些针对 DR 研究相同的差异表达 circRNA 分子, 其可能与标本来源存在差异有关。

本研究中对比分析了高糖和正常培养 HRVECs 的 circRNA 表达谱, 发现 448 个差异表达 circRNA。通过实时荧光定量 PCR 对其中表达变化显著的 6 个 circRNA 分子进行验证, 其结果与芯片检测结果一致, 表明芯片检测具有较高的可靠性, 其中 hsa_circ_0001946 与本课题组前期对增生性 DR 患者血浆中差异表达 circRNA 分子相一致^[12]。

预测与 hsa_circ_0001946 有较强结合力的靶 miRNA 包括 hsa-miR-7-5p、hsa-miR-3529-5p、hsa-miR-8056、hsa-miR-1246、hsa-miR-139-3p, 其中 hsa-miR-7-5p 在高糖状态下与长链非编码小核仁 RNA 宿主基因 16(ncRNA small nucleolar RNA host gene 16, SNHG16) 结合, 使 SNHG16 作为白细胞介素-1 受体相关激酶 1 和胰岛素受体底物 1 竞争的内源性 RNA, 诱导视网膜微血管内皮细胞功能障碍, 抑制内皮细胞增生^[19]; hsa-miR-1246 在内皮组细胞衍生的外泌体中表达显著上调, 可促进成纤维细胞向内皮细胞表型变化和血管生成^[20]。hsa-miR-1246 还参与脂多糖诱导内皮细胞炎症反应和凋亡^[21], hsa-miR-139-3p 则可通过激活抑癌蛋白 p53、p21 和 p16, 参与宫颈癌的发生和发展^[22]。

miR-486-3p 是 hsa_circ_0002938 预测的靶 miRNA 分子之一, 已有报道显示, 该分子表达上调时, 可以抑制 DR 小鼠的氧化应激、炎症和凋亡过程, 促进高糖状

态下 Müller 细胞增生^[23]。miR-224-5p 是 hsa_circ_00035277 预测的靶 miRNA 分子之一, 有研究表明, 该分子可能通过 NLRP3 通路参与 2 型糖尿病患者海马区炎症反应^[24]。由此可见, 这些下游的部分 miRNA 可参与 DR 发病过程中的氧化应激、炎症等过程, 影响内皮细胞增生、迁移和管腔形成能力以及血管内皮生长因子表达。在 DR 特征性的新生血管形成过程中, 内皮细胞的激活和侵袭是其核心过程之一。因此, 我们推测 hsa_circ_0001946 等差异表达 circRNA 可能通过与相应靶 miRNA 结合, 导致视网膜内皮细胞功能障碍, 进而影响 DR 的发生和发展, 但需进一步的研究证实。

综上所述, 本研究获得了高糖培养 HRVECs 的 circRNA 差异表达谱, 并验证了其中 hsa_circ_0002938、hsa_circ_0008036、hsa_circ_0001946、hsa_circ_0035277、hsa_circ_0008344 和 hsa_circ_0001874 这 6 个表达变化最显著的 circRNA 分子, 预测其可能的靶 miRNA 分子, 这些 circRNA 可能通过 miRNA 参与 DR 的发生和发展。本研究为 circRNA 在 DR 中的机制研究提供了新的依据, 但这些 circRNA 分子在 DR 过程中可能扮演的角色以及具体的作用机制仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢中国科技大学生命科学院、上海康成生物工程有限公司对本实验的帮助

作者贡献声明 贾杨雪: 实验实施、数据整理及分析、论文撰写; 王志玲、魏莹莹、朱恺: 数据整理和分析; 顾永昊: 实验设计、论文修改及定稿

参考文献

- [1] 王芳, 王春芳, 闫建林. 45 岁以上糖尿病患者中糖尿病视网膜病变的患病率调查及相关危险因素分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(8): 783-787. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 08. 018.
Wang F, Wang CF, Yan JL. Survey of diabetic retinopathy of the diabetic population over 45 years old [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(8): 783-787. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 08. 018.
- [2] Roy MS, Klein R, O'Colmain BJ, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adult type 1 diabetic persons in the United States [J]. Arch Ophthalmol, 2004, 122(4): 546-551. DOI: 10. 1001/archophth. 122. 4. 546.
- [3] 廖烽, 陈华. 补体功能失调对糖尿病视网膜病变的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(1): 68-72. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2020. 01. 014.
Liao Y, Chen H. Effects of complement dysfunction on diabetic retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(1): 68-72. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2020. 01. 014.
- [4] Sorrentino FS, Matteini S, Bonifazzi C, et al. Diabetic retinopathy and endothelin system: microangiopathy versus endothelial dysfunction [J]. Eye (Lond), 2018, 32(7): 1157-1163. DOI: 10. 1038/s41433-018-0032-4.

- [5] Li JY, Huang WQ, Tu RH, et al. Resveratrol rescues hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of Akt [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38 (2) : 182-191. DOI: 10. 1038/aps. 2016. 109.
- [6] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495 (7441) : 384-388. DOI: 10. 1038/nature11993.
- [7] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22 (3) : 256-264. DOI: 10. 1038/nsmb. 2959.
- [8] Dong R, Zhang XO, Zhang Y, et al. CircRNA-derived pseudogenes [J]. *Cell Res*, 2016, 26 (6) : 747-750. DOI: 10. 1038/cr. 2016. 42.
- [9] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. *Nature*, 2014, 505 (7483) : 344-352. DOI: 10. 1038/nature12986.
- [10] 曹莹, 张徐, 蒋鹏程. 环状 RNA 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *癌症进展*, 2020, 18 (13) : 1297-1300, 1400. DOI: 10. 11877/j. issn. 1672-1535. 2020. 18. 13. 01.
Cao X, Zhang X, Jiang PC. Research progress of circular RNA in malignant tumors [J]. *Cancer Prog*, 2020, 18 (13) : 1297-1300, 1400. DOI: 10. 11877/j. issn. 1672-1535. 2020. 18. 13. 01.
- [11] 白雨, 刘文虎. 环状 RNA 与糖尿病及其并发症 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2020, 20 (5) : 421-424. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-2390. 2020. 05. 014.
Bai Y, Liu WH. Correlation of circular RNAs with diabetes mellitus and its complications [J]. *J Clin Nephrol*, 2020, 20 (5) : 421-424. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-2390. 2020. 05. 014.
- [12] Gu Y, Ke G, Wang L, et al. Altered expression profile of circular RNAs in the serum of patients with diabetic retinopathy revealed by microarray [J]. *Ophthalmic Res*, 2017, 58 (3) : 176-184. DOI: 10. 1159/000479156.
- [13] Zhang SJ, Chen X, Li CP, et al. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in diabetes retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (14) : 6500-6509. DOI: 10. 1167/iovs. 17-22698.
- [14] Shan K, Liu C, Liu BH, et al. Circular noncoding RNA HIPK3 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus [J]. *Circulation*, 2017, 136 (17) : 1629-1642. DOI: 10. 1161/CIRCULATIONAHA. 117. 029004.
- [15] Liu C, Yao MD, Li CP, et al. Silencing of circular RNA-ZNF609 ameliorates vascular endothelial dysfunction [J]. *Theranostics*, 2017, 7 (11) : 2863-2877. DOI: 10. 7150/thno. 19353.
- [16] He M, Wang W, Yu H, et al. Comparison of expression profiling of circular RNAs in vitreous humour between diabetic retinopathy and non-diabetic mellitus patients [J]. *Acta Diabetol*, 2020, 57 (4) : 479-489. DOI: 10. 1007/s00592-019-01448-w.
- [17] Jin G, Wang Q, Hu X, et al. Profiling and functional analysis of differentially expressed circular RNAs in high glucose-induced human umbilical vein endothelial cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9 (9) : 1640-1651. DOI: 10. 1002/2211-5463. 12709.
- [18] Liu C, Ge HM, Liu BH, et al. Targeting pericyte-endothelial cell crosstalk by circular RNA-cPWWP2A inhibition aggravates diabetes-induced microvascular dysfunction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (15) : 7455-7464. DOI: 10. 1073/pnas. 1814874116.
- [19] Cai F, Jiang H, Li Y, et al. Upregulation of long non-coding RNA SNHG16 promotes diabetes-related RMEC dysfunction via activating NF- κ B and PI3K/AKT pathways [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 24 : 512-527. DOI: 10. 1016/j. omt. 2021. 01. 035.
- [20] Huang Y, Chen L, Feng Z, et al. EPC-derived exosomal miR-1246 and miR-1290 regulate phenotypic changes of fibroblasts to endothelial cells to exert protective effects on myocardial infarction by targeting ELF5 and SP1 [J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9 : 647763 [2022-03-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34055778>. DOI: 10. 3389/fcell. 2021. 647763.
- [21] Fang Y, Gao F, Hao J, et al. MicroRNA-1246 mediates lipopolysaccharide-induced pulmonary endothelial cell apoptosis and acute lung injury by targeting angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9 (3) : 1287-1296.
- [22] Sannigrahi MK, Sharma R, Singh V, et al. Role of host miRNA hsa-miR-139-3p in HPV-16-induced carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23 (14) : 3884-3895. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-16-2936.
- [23] Li W, Jin L, Cui Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-induced exosomal microRNA-486-3p protects against diabetic retinopathy through TLR4/NF- κ B axis repression [J]. *J Endocrinol Invest*, 2021, 44 (6) : 1193-1207. DOI: 10. 1007/s40618-020-01405-3.
- [24] Du P, Wang J, Han Y, et al. Blocking the lncRNA MALAT1/miR-224-5p/NLRP3 axis inhibits the hippocampal inflammatory response in T2DM With OSA [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14 : 97 [2022-03-13]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32477065>. DOI: 10. 3389/fncel. 2020. 00097.

(收稿日期:2021-11-26 修回日期:2022-06-13)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再版的稿件,如 2 个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过 Email 发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知识进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者须认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外,作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期 2 个月不修回者,视作自行撤稿。

(本刊编辑部)