

· 实验研究 ·

circBPTF 靶向 miR-224-3p 对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞损伤的影响

杨慧慧¹ 雷祥² 孟自军² 刘慧红¹ 于璐¹ 袁慧娟¹¹河南省人民医院内分泌科, 郑州 450003; ²河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院, 郑州 450003

通信作者: 袁慧娟, Email: hjyuan@zzu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨环状 RNA 溴结构域 PHD 指状转录因子 (circBPTF) 靶向微小 RNA (miR)-224-3p 对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞 (HRECs) 损伤的影响。**方法** 将体外培养的 HRECs 分为对照组和高糖组, 分别采用含 5.5 和 30 mmol/L 葡萄糖培养基培养 48 h。另取 HRECs 采用 Lipofectamine 2000 分别转染 siRNA 阴性对照 (si-NC)、circBPTF 的 siRNA (si-circBPTF)、miRNA 模拟物对照 (miR-NC)、miR-224-3p, 于 30 mmol/L 葡萄糖培养基培养 48 h, 分别记作 si-NC 组、si-circBPTF 组、miR-NC 组和 miR-224-3p 组; 采用双转染法将 si-circBPTF 与 anti-miR-NC 以及 si-circBPTF 与 anti-miR-224-3p 转染至 HRECs, 于 30 mmol/L 葡萄糖培养基培养 48 h, 分别记为 anti-miR-NC 组和 anti-miR-224-3p 组。采用实时荧光定量 PCR 检测 circBPTF 和 miR-224-3p 的表达; 采用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况; 采用 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯探针检测活性氧 (ROS) 水平; 采用比色法检测超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量; 采用 Western blot 法检测 cleaved-caspase-3/caspase-3 和 cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白表达量。采用双荧光素酶报告实验验证 circBPTF 与 miR-224-3p 的相互作用。**结果** 与对照组比较, 高糖组细胞凋亡率、cleaved-caspase-3/caspase-3 蛋白表达量、cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白表达量、ROS 水平、MDA 含量、circBPTF 相对表达量显著升高, SOD 活性、miR-224-3p 相对表达量降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 si-NC 组相比, si-circBPTF 组 circBPTF 相对表达量、ROS 水平、MDA 含量、cleaved-caspase-3/caspase-3 和 cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白表达量以及细胞凋亡率显著降低, SOD 活性明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 miR-NC 组比较, miR-224-3p 组 HRECs 中 miR-224-3p 相对表达量、SOD 活性显著升高, ROS 水平、MDA 含量、cleaved-caspase-3/caspase-3 和 cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白表达量以及细胞凋亡率显著降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验结果显示, 野生型 circBPTF 和 miR-224-3p 模拟物共转染后细胞相对荧光素酶活性为 0.43 ± 0.04 , 较野生型 circBPTF 和 miR-NC 共转染细胞的 0.99 ± 0.06 显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 23.297, P < 0.05$)。与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-224-3p 组 miR-224-3p 表达量及 SOD 活性显著降低, ROS 水平、MDA 含量、细胞凋亡率以及 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白表达量显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** 干扰 circBPTF 通过靶向 miR-224-3p 抑制高糖诱导的 HRECs 凋亡和氧化应激损伤。

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 凋亡; 氧化应激; 环状 RNA 溴域 PHD 手指转录因子; miR-224-3p; 高糖; 人视网膜血管内皮细胞

基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (LHGJ20220009)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20241128-00327

Effect of circBPTF targeting miR-224-3p on high glucose induced human retinal vascular endothelial cells injury

Yang Huihui¹, Lei Xiang², Meng Zijun², Liu Huihong¹, Yu Lu¹, Yuan Huijuan¹¹Department of Endocrinology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China; ²Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Yuan Huijuan, Email: hjyuan@zzu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of circular RNA bromodomain PHD finger transcription factor (circBPTF) targeting microRNA (miR)-224-3p on the damage of human retinal vascular endothelial cells (HRECs) induced by high glucose. **Methods** HRECs were divided into control group and high glucose group, which were cultured with medium containing 5.5 mmol/L glucose and 30 mmol/L glucose for 48 hours, respectively. HRECs

were transfected with siRNA negative control (si-NC), siRNA of circBPTF (si-circBPTF), miRNA mimic control (miR-NC), and miR-224-3p by Lipofectamine 2000, followed by cultured in 30 mmol/L glucose medium for 48 hours and were recorded as si-NC group, si-circBPTF group, miR-NC group and miR-224-3p group, respectively. HRECs were transfected with si-circBPTF and anti-miR-NC or si-circBPTF and anti-miR-224-3p by double transfection method, and then treated with 30 mmol/L glucose medium for 48 hours and were recorded as anti-miR-NC group and anti-miR-224-3p group, respectively. The expression of circBPTF and miR-224-3p was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Reactive oxygen species (ROS) level was determined by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate probe. Superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were detected by colorimetric method. Expression of cleaved-caspase-3/caspase-3 and cleaved-caspase-9/caspase-9 proteins was detected by Western blot. The interaction between circBPTF and miR-224-3p was identified by the dual luciferase reporter method. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate, cleaved-caspase-3/caspase-3 protein expression, cleaved-caspase-9/caspase-9 protein expression, ROS level, MDA content, and circBPTF relative expression were significantly increased and SOD activity and miR-224-3p expression were decreased in the high glucose group (all $P < 0.05$). Compared with the si-NC group, circBPTF relative expression, ROS level, MDA content, cleaved-caspase-3/caspase-3 protein expression, cleaved-caspase-9/caspase-9 protein expression, and cell apoptosis rate were significantly reduced and SOD activity was significantly increased in the si-circBPTF group (all $P < 0.05$). Compared with the miR-NC group, miR-224-3p relative expression and SOD activity were significantly enhanced and ROS level, MDA content, cleaved-caspase-3/caspase-3 protein expression, cleaved-caspase-9/caspase-9 protein expression and cell apoptosis rate were significantly reduced in the miR-224-3p group (all $P < 0.05$). The relative luciferase activity of HRECs after co-transfection of wild type circBPTF and miR-224-3p mimic was 0.43 ± 0.04 , which was significantly decreased compared with 0.99 ± 0.06 after co-transfection of wild type circBPTF and miR-NC ($t = 23.297, P < 0.05$). Compared with anti-miR-NC group, the relative expression of miR-224-3p and SOD activity were significantly decreased and ROS level, MDA content, cell apoptosis rate, cleaved-caspase-3/caspase-3 protein expression, and cleaved-caspase-9/caspase-9 protein expression were significantly increased in the anti-miR-224-3p group (all $P < 0.05$). **Conclusions** Interfering with circBPTF can inhibit high glucose induced HRECs apoptosis and oxidative stress damage by targeting miR-224-3p.

[Key words] Diabetic retinopathy; Apoptosis; Oxidative stress; Circular RNA bromodomain PHD finger transcription factor; miR-224-3p; High glucose; Human retinal vascular endothelial cells

Fund program: Science and Technology Projects of Henan Province (LHGJ20220009)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20241128-00327

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见和严重的眼部并发症,随着糖尿病患者数量增加和寿命的延长,DR患病率显著升高^[1]。高血糖诱导的人视网膜血管内皮细胞(human retinal vascular endothelial cells, HRECs)氧化应激和凋亡是DR发病的关键机制^[2-3];因此,改善高糖诱导的HRECs损伤对防治DR具有重要价值。环状RNA(circular RNA, circRNA)具有单链共价封闭结构,其通过充当微小RNA(microRNA, miRNA)分子海绵广泛参与调控细胞分化、增殖、凋亡、炎症、氧化应激等多种生物学过程^[4-6]。有研究显示,环状RNA溴域PHD手指转录因子(circular RNA bromodomain PHD finger transcription factor, circBPTF)在高糖诱导的血管炎症模型中表达上调,敲低circBPTF可抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡、促炎细胞因子释放和氧化应激反应^[7]。有研究报道过表达miR-224-3p可减轻氧葡萄糖培养诱导的细胞凋亡^[8]。circBPTF是否可通过靶向miR-

224-3p介导高糖诱导的HRECs损伤尚不清楚。本研究拟观察高糖诱导HRECs中circBPTF和miR-224-3p表达情况,探讨circBPTF靶向miR-224-3p对高糖诱导HRECs损伤的影响,旨在为DR的治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HRECs购自武汉普诺赛生物公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 Lipofectamine 2000(上海信帆生物科技有限公司);小干扰RNA阴性对照(small interfering RNA negative control, si-NC)、si-circBPTF、pcDNA过表达对照载体、pcDNA circBPTF过表达载体(pcDNA-circBPTF)、miRNA拟似物对照(miR-NC)、miR-224-3p、miRNA抑制剂对照(anti-miR-NC)、miR-224-3p抑制剂(anti-miR-224-3p)(广州锐博生物科技



有限公司); M-MLV 逆转录酶、2×SYBR Green PCR Master mix、双染法细胞凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);氧化应激评估试剂盒、Trizol 试剂、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(A0208)、兔抗 caspase-3 一抗(AC030)、兔抗剪切型 caspase-3(cleaved-caspase-3)一抗(AC033)、兔抗磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗(AF1186)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(S0101S)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(S0131S)(上海碧云天生物技术股份有限公司);活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司];兔抗 caspase-9(ab23539)一抗、兔抗 cleaved-caspase-9 一抗(ab2324)(美国 Abcam 公司)。实时荧光定量 PCR 仪(CFX96 CFX6 Touch, 美国 Bio-Rad 公司);流式细胞仪(LSRFortessa TM X-20, 美国 BD Biosciences 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组处理 HRECs 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养, 每 2~3 d 换液 1 次。将 HRECs 分为对照组和高糖组, 分别在含有 5.5、30 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基中培养 48 h。将细胞接种至 24 孔板中, 用 Lipofectamine 2000 分别将 si-NC、si-circBPTF、pcDNA、pcDNA-circBPTF、miR-NC、miR-224-3p 转染至 HRECs 后, 置于 30 mmol/L 葡萄糖培养基培养 48 h, 分别记为 si-NC 组、si-circBPTF 组、pcDNA 组、pcDNA-circBPTF 组、miR-NC 组、miR-224-3p 组; si-circBPTF 分别与 anti-miR-NC、anti-miR-224-3p 转染至 HRECs 后, 加入 30 mmol/L 葡萄糖培养基处理 48 h, 记为 anti-miR-NC 组、anti-miR-224-3p 组。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 circBPTF 和 miR-224-3p 表达 将各组细胞用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤 2 次, 每孔加入 1 ml Trizol 试剂处理 30 s, 提取细胞 RNA, 并用无 RNase 酶的双蒸水溶解 RNA; M-MLV 逆转录酶合成 cDNA, 用 SYBR Green Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增。扩增体系: cDNA 5.0 μl、正向和反向引物各 1.5 μl、SYBR Green 12.5 μl、双蒸水 4.5 μl。扩增条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 循环 40 次。以 GAPDH、U6 基因分别作为 circBPTF 和 miR-224-3p 内源对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 circBPTF 和 miR-224-3p 的相对表达量。各基因引物序列见表 1。实验独立重复 3 次。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因		引物序列(5'-3')
circBPTF	正向	ACAAGTAATCACAGGGCCTCA
	反向	TTGCAATCACTGTCTGGCTTC
GAPDH	正向	TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG
	反向	GACACTCGCTCAGCTTCTTG
miR-224-3p	正向	AGTCTCTGGCTGACTACATCACAG
	反向	CTACTCACAAAACAGGAGTGGAATC
U6	正向	CCCTGGCAGCCAGCAC
	反向	GCCGATCCACAGGAGTAC

注: circBPTF: 环状 RNA 溴域 PHD 手指转录因子; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; miR: 微小 RNA

Note: circBPTF: circular RNA bromodomain PHD finger transcription factor; GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; miR: microRNA

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 各组 HRECs 用胰蛋白酶处理, PBS 清洗后, 1 000×g 离心 5 min 收集细胞, 用 500 μl PBS 重悬细胞, 调整细胞密度为 3×10^5 /ml。取 1×10^5 个细胞, 1 000×g 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 加入 Annexin-V-FITC 和碘化丙啶混匀, 避光反应 15 min 后用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.4 Western blot 检测 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白表达水平 用 RIPA 缓冲液提取各组 HRECs 总蛋白, 采用 BCA 法测量蛋白浓度, 取 80 μl 蛋白与 1 倍体积上样缓冲液混合煮沸 5 min 变性, 通过 SDS-PAGE 分离等量蛋白。湿法转膜后, 用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h, 并与兔抗 GAPDH 一抗(1:1 000)、兔抗 cleaved-caspase-3 一抗(1:1 000)、兔抗 caspase-3 一抗(1:1 000)、兔抗 cleaved-caspase-9 一抗(1:2 500)、兔抗 caspase-9 一抗(1:1 000)室温孵育 2 h, TBST 漂洗, 与羊抗兔 IgG(1:50 000)室温孵育 1 h。用增强化学发光法曝光条带, 用化学发光成像仪拍照, ImageJ 软件换算灰度值, 计算 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白水平。

1.2.5 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐探针检测 ROS 水平 根据 ROS 检测试剂盒说明书, 用不含胎牛血清的 DMEM 稀释 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐探针至终浓度为 10 μmol/L。用移液枪将各组细胞培养孔中的 DMEM 弃掉, 加入适当体积的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐探针, 37 ℃ 孵育 20 min。胰蛋白酶消化收集细胞, 用流式细胞仪检测 ROS 水平。

1.2.6 比色法检测 SOD 活性和 MDA 含量 胰蛋白

酶消化收集各组 HRECs,用 4 ℃ 生理盐水洗涤 1 遍,用细胞裂解液裂解,4 ℃ 离心取上清液作为待测样品,根据试剂盒说明书分析 SOD 活性和 MDA 含量。

1.2.7 双荧光素酶报告实验检测 circBPTF 与 miR-224-3p 的相互作用 通过 StarBase 数据库预测 circBPTF 和 miR-224-3p 的相互作用。通过 PCR 扩增包含 miR-224-3p 靶片段的野生型 (wild type, WT) circBPTF 序列,并克隆到 pmirGLO 构建重组质粒 WT-circBPTF。将包含 miR-224-3p 突变型 (mutant type, MUT) 靶片段的 circBPTF 序列克隆到 pmirGLO 构建重组质粒 MUT-circBPTF。将 0.3 μg 重组质粒分别与 20 nmol/L 的 miR-224-3p 拟似物或 miR-NC 共转染 HRECs,采用双荧光素酶报告基因检测系统测定细胞相对荧光素酶活性,评估 circBPTF 和 miR-224-3p 的相互作用。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Anderson-Darling 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 个组间各资料比较采用独立样本 *t* 检验;多组间各资料差异总体比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与高糖组 HRECs 中 circBPTF 和 miR-224-3p 表达量比较

与对照组相比,高糖组 HRECs 中 circBPTF 相对表达量升高,miR-224-3p 相对表达量降低,差异均有统计学意义($t = 26.679, 42.750$, 均 $P < 0.05$) (表 2)。

2.2 各组 HRECs 中 circBPTF 表达量、ROS 水平、SOD 活性及 MDA 含量比较

各组 HRECs 中 circBPTF 表达量、ROS 水平、SOD 活性和 MDA 含量总体比较,差异均有统计学意义($F = 413.554, 673.059, 397.963, 414.661$, 均 $P < 0.001$),其中与对照组相比,高糖组 HRECs 中 circBPTF 相对表达量、ROS 水平及 MDA 含量升高,SOD 活性降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与 si-NC 组相比,si-circBPTF 组 HRECs 中 circBPTF 相对表达量、ROS 水平及 MDA 含

量降低,SOD 活性升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 3)。

2.3 各组 HRECs 中凋亡相关蛋白及凋亡率比较

各组 HRECs 中 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 及凋亡率总体比较,差异均有统计学意义($F = 546.300, 253.700, 367.838$, 均 $P < 0.001$),其中高糖组 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 以及细胞凋亡率较对照组显著升高,si-circBPTF 组 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 以及细胞凋亡率较 si-NC 组显著降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图 1, 表 4)。

2.4 circBPTF 和 miR-224-3p 的靶向关系及各转染组 miR-224-3p 表达比较

StarBase 数据库预测发现,miR-224-3p 与 circBPTF 的序列存在连续互补位点(图 2)。WT-circBPTF 和

表 2 对照组与高糖组 HRECs 中 circBPTF 和 miR-224-3p 相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of relative expression of circBPTF and miR-224-3p in HRECs between control group and high glucose group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	circBPTF	miR-224-3p
对照组	3	1.00±0.00	1.00±0.00
高糖组	3	3.49±0.28	0.43±0.04
<i>t</i> 值		26.679	42.750
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:(独立样本 *t* 检验) HRECs:人视网膜血管内皮细胞;circBPTF:环状 RNA 溴域 PHD 手指转录因子;miR:微小 RNA

Note:(Independent samples *t*-test) HRECs:human retinal vascular endothelial cells; circBPTF:circular RNA bromodomain PHD finger transcription factor; miR:miRNA

表 3 各组 HRECs 中 circBPTF 相对表达量、ROS 水平、SOD 活性及 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of circBPTF relative expression, ROS level, SOD activity and MDA content in HRECs among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	circBPTF	ROS 水平(%)	SOD 活性(U/mg)	MDA 含量(nmol/mg)
对照组	3	1.00±0.00	100.00±0.00	147.37±11.45	6.29±0.53
高糖组	3	3.57±0.24 ^a	434.02±26.01 ^a	42.95±4.12 ^a	35.68±3.23 ^a
si-NC 组	3	3.59±0.27	448.51±28.32	40.91±4.42	37.46±3.55
si-circBPTF 组	3	1.73±0.14 ^b	179.65±14.14 ^b	124.65±10.35 ^b	9.48±0.83 ^b
<i>F</i> 值		413.554	673.059	397.963	414.661
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 si-NC 组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) HRECs:人视网膜血管内皮细胞;circBPTF:环状 RNA 溴域 PHD 手指转录因子;ROS:活性氧;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;si:小干扰 RNA;NC:阴性对照

Note:Compared with control group,^a $P < 0.05$;compared with si-NC group,^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) HRECs:human retinal vascular endothelial cells; circBPTF:circular RNA bromodomain PHD finger transcription factor; ROS:reactive oxygen species; SOD:superoxide dismutase; MDA:malondialdehyde; si:small interfering RNA; NC:negative control

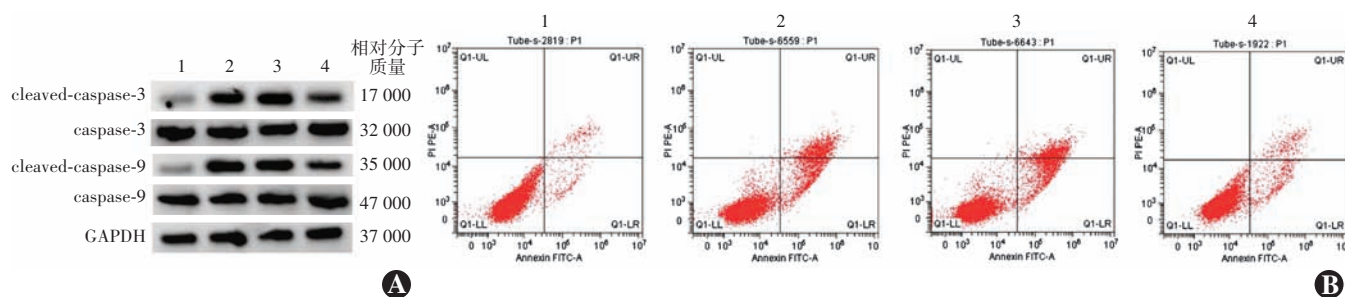


图 1 干扰 circBPTF 表达对高糖诱导的 HRECs 凋亡蛋白表达及凋亡率的影响 A: 各组细胞凋亡相关蛋白表达电泳图 B: 各组细胞凋亡流式细胞图 1: 对照组; 2: 高糖组; 3: si-NC 组; 4: si-circBPTF 组

Figure 1 Effect of interference with circBPTF expression on apoptosis-related proteins expression and apoptosis rate of high glucose-induced HRECs A: Electrophoretogram of apoptosis-related protein expression in each group B: Flow cytometry of apoptosis in each group 1: control group; 2: high glucose group; 3: si-NC group; 4: si-circBPTF group

表 4 各组 HRECs 中凋亡相关蛋白表达量和凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of apoptosis-related protein expression and apoptosis rate in HRECs among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	cleaved-caspase-3/ caspase-3 蛋白	cleaved-caspase-9/ caspase-9 蛋白	细胞凋亡率 (%)
对照组	3	0.11 ± 0.02	0.32 ± 0.03	5.81 ± 0.55
高糖组	3	0.73 ± 0.05 ^a	0.98 ± 0.08 ^a	25.98 ± 2.12 ^a
si-NC 组	3	0.75 ± 0.06	0.95 ± 0.09	26.93 ± 2.46
si-circBPTF 组	3	0.22 ± 0.03 ^b	0.42 ± 0.04 ^b	9.76 ± 0.89 ^b
F 值		546.300	253.700	367.838
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) HRECs: 人视网膜血管内皮细胞; si: 小干扰 RNA; NC: 阴性对照; circ BPTF: 环状 RNA 溴域 PHD 手指转录因子

Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with si-NC group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) HRECs: human retinal vascular endothelial cells; si: small interfering RNA; NC: negative control; circBPTF: circular RNA bromodomain PHD finger transcription factor

miR-224-3p 拟似物共转染后细胞相对荧光素酶活性为 0.43 ± 0.04 , 较 WT-circBPTF 和 miR-NC 共转染细胞的 0.99 ± 0.06 显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 23.297, P < 0.05$); MUT-circBPTF 和 miR-224-3p 拟似物共转染、MUT-circBPTF 和 miR-NC 共转染细胞相对荧光素酶活性分别为 0.96 ± 0.06 、 0.98 ± 0.07 , 差异无统计学意义 ($t = 0.651, P = 0.524$)。pcDNA 组、pcDNA-circBPTF 组、si-NC 组和 si-circBPTF 组 miR-

WT-circBPTF 5' caUGUUCAGCAGUAUACCAUUUg 3'
miR-224-3p 3' acAUCAGUGAUCCCGUGGUAaAa 5'
MUT-circBPTF 5' caGGUCAGGCCAUUAUGAUCCGCGg 3'

图 2 circBPTF 与 miR-224-3p 互补的核苷酸序列 WT: 野生型; circBPTF: 环状 RNA 溴域 PHD 手指转录因子; miR: 微小 RNA; MUT: 突变型

Figure 2 Complementary nucleotide sequences of miR-224-3p and circBPTF WT: wild type; circBPTF: circular RNA bromodomain PHD finger transcription factor; miR: microRNA; MUT: mutant type

224-3p 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 0.36 ± 0.04 、 0.97 ± 0.06 和 3.21 ± 0.24 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 898.414, P < 0.001$), 其中 pcDNA-circBPTF 组 miR-224-3p 相对表达量低于 pcDNA 组, si-circBPTF 组 miR-224-3p 相对表达量高于 si-NC 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.5 miR-NC 组与 miR-224-3p 组 miR-224-3p 表达量、ROS 水平、SOD 活性及 MDA 含量比较

与 miR-NC 组比较, miR-224-3p 组 HRECs 中 miR-224-3p 相对表达量、SOD 活性显著升高, ROS

水平、MDA 含量显著降低, 差异均有统计学意义 ($t = 22.560, 16.373, 20.410, 18.816$, 均 $P < 0.05$) (表 5)。

2.6 miR-NC 组与 miR-224-3p 组 HRECs 中凋亡相关蛋白表达量和凋亡率比较

与 miR-NC 组比较, miR-224-3p 组 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白水平及细胞凋亡率显著降低, 差异均有统计学意义 ($t = 26.560, 21.090, 13.760$, 均 $P < 0.05$) (图 3, 表 6)。

2.7 anti-miR-NC 组与 anti-miR-224-3p 组 miR-224-3p 表达量、ROS 水平、SOD 活性、MDA 含量、细胞凋亡率及凋亡相关蛋白水平比较

与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-224-3p 组 miR-224-3p 表达量及 SOD 活性显著降低, ROS 水平、MDA 含量、凋亡率以及 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白水平显著升高, 差异均有统计学意义 ($t = 65.000, 15.321, 23.334, 22.352, 17.800, 17.560, 19.920$, 均 $P < 0.05$) (图 4, 表 7)。



表 5 miR-NC 组与 miR-224-3p 组 miR-224-3p 相对表达量、ROS 水平、SOD 活性及 MDA 含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Comparison of miR-224-3p relative expression, ROS content, SOD activity and MDA content in HRECs between miR-NC group and miR-224-3p group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	miR-224-3p	ROS 水平 (%)	SOD 活性 (U/mg)	MDA 含量 (nmol/mg)
miR-NC 组	3	1.00±0.00	455.84±27.07	41.84±4.19	39.19±3.58
miR-224-3p 组	3	2.88±0.25	224.21±20.65	105.47±10.88	15.17±1.36
t 值		22.560	20.410	16.373	18.816
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: (独立样本 t 检验) miR: 微小 RNA; NC: 拟似物对照; ROS: 活性氧; SOD: 超氧化物歧化酶; MDA: 丙二醛

Note: (Independent samples t-test) miR: microRNA; NC: mimic control; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde

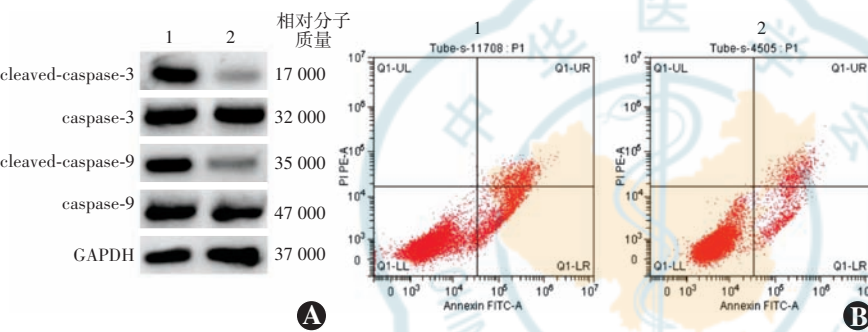


图 3 miR-224-3p 过表达对高糖诱导的 HRECs 凋亡蛋白及凋亡率的影响 A: 各组凋亡相关蛋白表达电泳图 B: 各组细胞凋亡流式细胞图 1: miR-NC 组; 2: miR-224-3p 组

Figure 3 Effect of miR-224-3p overexpression on apoptosis-related protein expression and apoptosis rate in high glucose-induced HRECs A: Electrophoretogram of apoptosis-related protein expression in different groups B: Flow cytometry of apoptosis in different groups 1: miR-NC group; 2: miR-224-3p group

表 6 miR-NC 组与 miR-224-3p 组 HRECs 凋亡相关蛋白表达和凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Comparison of apoptosis-related protein expression and apoptosis rate in HRECs between miR-NC group and miR-224-3p group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	cleaved-caspase-3/ caspase-3	cleaved-caspase-9/ caspase-9	细胞凋亡率 (%)
miR-NC 组	3	0.77±0.06	0.68±0.05	27.37±2.27
miR-224-3p 组	3	0.21±0.02	0.27±0.03	15.04±1.44
t 值		26.560	21.090	13.760
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: (独立样本 t 检验) miR: 微小 RNA; NC: 拟似物对照; HRECs: 人视网膜血管内皮细胞

Note: (Independent samples t-test) miR: microRNA; NC: mimic control; HRECs: human retinal vascular endothelial cells

3 讨论

DR 是由于长期高血糖导致视网膜血管内皮损伤, 进而引发的一系列眼底病变, 病变早期可无明显症状, 但随着病情进展患者可能会出现眼前黑影、视物不

清, 甚至致盲, 严重影响生活质量。既往研究已表明, 高血糖会诱导氧化应激的激活, 并在 HRECs 内产生过量 ROS。随后, ROS 的积累导致 HRECs 迁移增多, 引发细胞凋亡, 增加了视网膜血管的通透性和基底膜渗漏。这些病理变化可能导致血-视网膜屏障的损坏和 DR 的发生^[9-10]。因此, 抑制 HRECs 的氧化应激和凋亡可降低 DR 进展的风险。而 miRNA 作为直接调节 mRNA 降解和翻译的短链小 RNA, 在 DR 的发生和发展中扮演着关键角色。已有多项研究表明, miRNA 表达失调与 DR 中细胞凋亡、血管新生、炎症等病理过程有关^[11-13]。因此, 我们推测 miRNA 可能也参与了高糖诱导的 HRECs 损伤过程。HRECs 作为高血糖损伤的主要靶点, 探讨高糖诱导 HRECs 损伤的机制对 DR 的早期预防和精准治疗具有重要意义。

在糖尿病病理状态下, circRNA 可调节 HRECs 增殖、活化、凋亡等生理过程。Zhu 等^[14]研究发现, circDNMT3B 低表达可促进 HRECs 的增殖、迁移和管生成能力, 过表达 circDNMT3B 可减轻糖尿病大鼠视觉障碍。circ_001209 可影响糖尿病大鼠 HRECs 功能, 加重视网膜损伤^[15]。本研究发现高糖处理后 HRECs 中 circBPTF 表达显著增加, 提示 circBPTF 异常表达参与高糖诱导的 HRECs 损伤。氧化剂的积累和内源性抗氧化剂的消耗都会导致氧化应激, 高糖刺激可诱发 ROS 的生成并抑制抗氧化防御系统, 导致脂质过氧化终产物 MDA 含量增加, 从而诱导 HRECs 发生严重的氧化应激反应, 通过检测 MDA 含量可间接反映

ROS 对 HRECs 的损伤程度^[16-18]。本研究显示, 高糖处理后 HRECs 中 ROS、MDA 水平显著增加, 但干扰 circBPTF 表达显著抑制 ROS、MDA 水平并上调抗氧化剂 SOD 活性, 这进一步表明干扰 circBPTF 表达可通过减少氧化应激反应发挥其细胞保护功能。有研究显示,

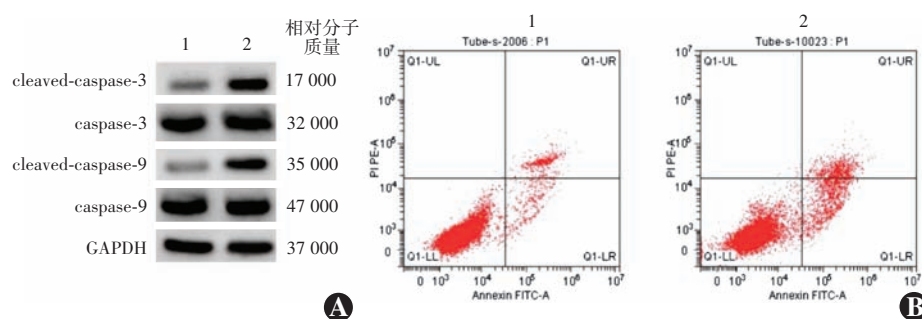


图 4 circBPTF 和 miR-224-3p 双抑制对高糖诱导 HRECs 凋亡蛋白及凋亡率的影响 A: 各组细胞凋亡相关蛋白表达电泳图 B: 各组细胞凋亡流式细胞图 1: si-circBPTF+anti-miR-NC 组; 2: si-circBPTF+anti-miR-224-3p 组

Figure 4 Effect of dual inhibition of circBPTF and miR-224-3p on apoptosis-related protein expression and apoptosis rate in high glucose-induced HRECs A: Electrophoretogram of cell apoptosis-related protein expression in different groups B: Flow cytometry of apoptosis in different groups 1: anti-miR-NC group; 2: anti-miR-224-3p group

表 7 anti-miR-NC 组与 anti-miR-224-3p 组 miR-224-3p 表达量、ROS 水平、SOD 活性、MDA 含量、细胞凋亡率及凋亡相关蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Comparison of miR-224-3p expression, ROS level, SOD activity, MDA content, cell apoptosis rate and apoptosis-related protein levels between anti-miR-NC group and anti-miR-224-3p group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	miR-224-3p	ROS 水平 (%)	SOD 活性 (U/mg)	MDA 含量 (nmol/mg)
anti-miR-NC 组	3	1.00±0.00	178.61±11.82	125.05±11.77	9.21±0.80
anti-miR-224-3p 组	3	0.35±0.03	390.75±24.58	58.98±5.37	28.98±2.53
t 值		65.000	23.334	15.321	22.352
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

组别	样本量	细胞凋亡率 (%)	cleaved-caspase-3/caspase-3	cleaved-caspase-9/caspase-9
anti-miR-NC 组	3	9.04±0.61	0.21±0.03	0.19±0.02
anti-miR-224-3p 组	3	19.98±1.74	0.71±0.08	0.61±0.06
t 值		17.800	17.560	19.920
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: (独立样本 t 检验) miR: 微小 RNA; NC: 模拟物对照; ROS: 活性氧; SOD: 超氧化物歧化酶; MDA: 丙二醛

Note: (Independent samples t-test) miR: microRNA; NC: mimic control; ROS: reactive oxygen species; SOD: superoxide dismutase; MDA: malondialdehyde

circBPTF 敲减可改善高糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎症损伤和氧化应激^[19]。此外, 干扰 circBPTF 表达可显著减弱高糖处理诱导的 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白表达上调和细胞凋亡, 这表明干扰 circBPTF 表达在高糖诱导 HRECs 损伤中具有抗细胞凋亡功能。

为探讨 circBPTF 在高糖诱导 HRECs 损伤中的作用机制, 本研究探讨 circBPTF 下游靶 miRNA。与生物信息学的预测一致, 双荧光素酶报告基因检测表明 miR-224-3p 是 circBPTF 的直接靶点。miR-224-3p 作为致癌因子已被广泛报道参与调控非小细胞肺癌、视

网膜母细胞瘤细胞的增殖和凋亡^[20-21]。有研究表明, miR-224-3p 过表达可抑制高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞炎症损伤, 减轻糖尿病肾病肾小管病变^[22]。另有研究表明, 上调 miR-224-3p 可以减少动脉粥样硬化中 ROS 积累和内皮细胞凋亡, miR-224-3p 的上调可减轻小鼠动脉粥样硬化^[23]。本研究发现高糖处理 HRECs 中 miR-224-3p 表达显著减少, 过表达 miR-224-3p 可抑制高糖诱导的 ROS、MDA 表达, 并诱导 cleaved-caspase-3/caspase-3、cleaved-caspase-9/caspase-9 蛋白表达, 上调抗氧化剂 SOD 活性, 抑制细胞凋亡。由于 circBPTF 靶向负调控 miR-224-3p 表达, 且过表达 miR-224-3p 和干扰 circBPTF 表达对高糖诱导 HRECs 损伤的保护作用一致, 提示 circBPTF 通过靶向 miR-224-3p 发挥作用。深入分析发现, 下调 miR-224-3p 表达逆转了干扰 circBPTF 表达对高糖诱导 HRECs 凋亡和氧化应激损伤的作用, 进一步证实 circBPTF 靶向负调控 miR-224-3p 促进高糖诱导的 HRECs 损伤, 促进 DR 进展。

综上所述, 干扰 circBPTF 通过靶向 miR-224-3p 可抑制高糖诱导的 HRECs 凋亡和氧化应激损伤。后续将通过动物实验及临

床试验对该靶点进一步研究, 以期改善 DR 提供新的治疗策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杨慧慧: 实施研究、文章撰写及修改; 雷祥、孟自军、刘慧红、于璐: 实施研究、数据分析; 袁慧娟: 研究设计与指导、文章审阅及定稿

参考文献

- [1] 中华医学会眼科学分会眼底病学组, 中国医师协会眼科医师分会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南 (2022 年): 基于循证医学修订[J]. 中华眼底病杂志, 2023, 39(2): 99-124. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20230110-00018.

Fundus Disease Group of Ophthalmological Society of Chinese Medical

- Association, Fundus Disease Group of Ophthalmologist Branch of Chinese Medical Doctor Association. Evidence-based guidelines for diagnosis and treatment of diabetic retinopathy in China (2022) [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2023, 39(2): 99-124. DOI: 10. 3760/cma. j. cn511434-20230110-00018.
- [2] Li WL, Li K, Chang WG, et al. 20 (R)-ginsenoside Rg3 alleviates diabetic retinal injury in T2DM mice by attenuating ROS-mediated ER stress through the activation of the Nrf2/HO-1 axis [J/OL]. Phytomedicine, 2024, 135: 156202 [2024-11-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39579577>. DOI: 10. 1016/j. phymed. 2024. 156202.
- [3] Tang K, Qin W, Wei R, et al. Ginsenoside Rd ameliorates high glucose-induced retinal endothelial injury through AMPK-STRT1 interdependence [J/OL]. Pharmacol Res, 2022, 179: 106123 [2024-11-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35150861>. DOI: 10. 1016/j. phrs. 2022. 106123.
- [4] Han D, Wang Y, Wang Y, et al. The tumor-suppressive human circular RNA CircITCH sponges miR-330-5p to ameliorate doxorubicin-induced cardiotoxicity through upregulating SIRT6, Survivin, and SERCA2a [J/OL]. Circ Res, 2020, 127(4): e108-e125 [2024-11-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32392088>. DOI: 10. 1161/CIRCRESAHA. 119. 316061.
- [5] Li Y, Cheng T, Wan C, et al. circRNA_0084043 contributes to the progression of diabetic retinopathy via sponging miR-140-3p and inducing TGFA gene expression in retinal pigment epithelial cells [J/OL]. Gene, 2020, 747: 144653 [2024-11-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32259630>. DOI: 10. 1016/j. gene. 2020. 144653.
- [6] 贾杨雪, 王志玲, 魏莹莹, 等. 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 [J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40(7): 617-622. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200602-00390.
- Jia YX, Wang ZL, Wei YY, et al. Differential expression analysis of circular RNA in human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40(7): 617-622. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200602-00390.
- [7] Zhang W, Sui Y. CircBPTF knockdown ameliorates high glucose-induced inflammatory injuries and oxidative stress by targeting the miR-384/LIN28B axis in human umbilical vein endothelial cells [J]. Mol Cell Biochem, 2020, 471(1-2): 101-111. DOI: 10. 1007/s11010-020-03770-2.
- [8] Deng Y, Ma G, Dong Q, et al. Overexpression of miR-224-3p alleviates apoptosis from cerebral ischemia reperfusion injury by targeting FIP200 [J/OL]. J Cell Biochem, 2019, 120(10): 17151-17158 [2024-11-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31134677>. DOI: 10. 1002/jcb. 28975.
- [9] Ding Y, Chen L, Xu J, et al. APAF1 silencing ameliorates diabetic retinopathy by suppressing inflammation, oxidative stress, and Caspase-3/GSDME-dependent pyroptosis [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2024, 17: 1635-1649. DOI: 10. 2147/DMSO. S449049.
- [10] Hsu YJ, Lin CW, Cho SL, et al. Protective effect of fenofibrate on oxidative stress-induced apoptosis in retinal-choroidal vascular endothelial cells: implication for diabetic retinopathy treatment [J/OL]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(8): 712 [2024-11-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32764528>. DOI: 10. 3390/antiox9080712.
- [11] Peng DW, Lan CL, Dong LQ, et al. Anti-angiogenic properties of microRNA-29a in preclinical ocular models [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(45): e2204795119 [2024-11-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36322719>. DOI: 10. 1073/pnas. 2204795119.
- [12] 高飞, 武志鹏, 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.
- [13] 顾顺, 詹鹏飞, 王文娟, 等. miR-146a 对糖尿病视网膜病变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.
- [14] 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.
- [15] Wang F, Zhang M. Circ_001209 aggravates diabetic retinal vascular dysfunction through regulating miR-15b-5p/COL12A1 [J/OL]. J Transl Med, 2021, 19(1): 294 [2024-11-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34233716>. DOI: 10. 1186/s12967-021-02949-5.
- [16] Li J, Yu S, Ying J, et al. Resveratrol prevents ROS-induced apoptosis in high glucose-treated retinal capillary endothelial cells via the activation of AMPK/Sirt1/PGC-1 α pathway [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 7584691 [2024-11-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29213353>. DOI: 10. 1155/2017/7584691.
- [17] 李朵, 韩笑言, 蒋沁. 糖尿病视网膜病变的生物治疗研究最新进展 [J]. 眼科新进展, 2024, 44(4): 317-323. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2024. 0062.
- Li D, Han XY, Jiang Q. Recent advances in biological therapy of diabetic retinopathy [J]. Recent Adv Ophthalmol, 2024, 44(4): 317-323. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2024. 0062.
- [18] Liu L, Xu H, Zhao H, et al. STEAP4 inhibits HIF-1 α /PKM2 signaling and reduces high glucose-induced apoptosis of retinal vascular endothelial cells [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 2573-2582. DOI: 10. 2147/DMSO. S251663.
- [19] Zhang W, Sui Y. CircBPTF knockdown ameliorates high glucose-induced inflammatory injuries and oxidative stress by targeting the miR-384/LIN28B axis in human umbilical vein endothelial cells [J]. Mol Cell Biochem, 2020, 471(1-2): 101-111. DOI: 10. 1007/s11010-020-03770-2.
- [20] Wang G, Liu L, Zhang J, et al. LncRNA HCG11 suppresses cell proliferation and promotes apoptosis via sponging miR-224-3p in non-small-cell lung cancer cells [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 6553-6563. DOI: 10. 2147/OTT. S244181.
- [21] Song L, Huang Y, Zhang X, et al. Downregulation of microRNA-224-3p hampers retinoblastoma progression via activation of the Hippo-YAP signaling pathway by increasing LATS2 [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(3): 32 [2024-11-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32186675>. DOI: 10. 1167/iovs. 61. 3. 32.
- [22] 胡绍兰, 孙蓓, 韩菲, 等. miR-224-3p 通过抑制 TLR4 改善高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞的炎症反应 [J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(22): 52-53. DOI: 10. 15887/j. cnki. 13-1389/r. 2017. 22. 028.
- Hu SL, Sun B, Han F, et al. miR-224-3p contributes to alleviate the inflammatory reaction by suppressing TLR4 expression in high glucose-induced NRK-E cells [J]. Chin J Clin Rational Drug Use, 2017, 10(22): 52-53. DOI: 10. 15887/j. cnki. 13-1389/r. 2017. 22. 028.
- [23] Wang H, Sugimoto K, Lu H, et al. HDAC1-mediated deacetylation of HIF1 α prevents atherosclerosis progression by promoting miR-224-3p-mediated inhibition of FOSL2 [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 23: 577-591. DOI: 10. 1016/j. omt. 2020. 10. 044.

(收稿日期: 2024-11-28 修回日期: 2025-04-09)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

