

# 环状RNA-SCAF8通过miR-93-5p/TXNIP通路促进血管内皮细胞焦亡

王冰<sup>1</sup>, 于欣雨<sup>1</sup>, 陈天驰<sup>1</sup>, 邱宸阳<sup>1</sup>, 陆炜<sup>2</sup>, 郑祥韬<sup>3</sup>, 吴子衡<sup>1</sup>

1. 浙江大学医学院附属第一医院血管外科, 浙江 杭州 310003

2. 温州医科大学附属衢州医院血管外科, 浙江 衢州 324000

3. 温州医科大学附属第二医院血管外科, 浙江 温州 325027

**[摘要]** **目的:** 探究环状RNA(circRNA)-SR相关CTD相关因子8(SCAF8)在高糖环境下对血管内皮细胞焦亡发挥的作用及机制。**方法:** 将来源于人脐静脉内皮细胞分为正常对照组、高糖对照组分别置于5、33 mmol/L葡萄糖浓度的细胞培养基培养, RNA对照组、circRNA-SCAF8抑制组、微RNA(miR)-93-5p过表达组和miR-93-5p抑制组分别在高糖环境下加入无功能siRNA、circRNA-SCAF8抑制分子、miR-93-5p过表达分子和miR-93-5p抑制剂。采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)法、流式细胞术和Hoechst 33342/碘化丙啶双荧光染色法检测细胞存活率和焦亡率, 采用蛋白质印迹法和酶联免疫吸附法检测凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶1(caspase-1)、Gasdermin D蛋白(GSDMD)、NOD样受体家族蛋白3(NLRP-3)、硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)、IL-18和IL-1 $\beta$ 等焦亡相关因子表达, 采用定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测circRNA-SCAF8、miR-93-5p和TXNIP的基因表达, 采用荧光原位杂交法定位circRNA-SCAF8和miR-93-5p, 采用双荧光素酶实验验证miR-93-5p与上下游分子的靶向调控关系。**结果:** 与RNA对照组比较, circRNA-SCAF8抑制组和miR-93-5p过表达组细胞存活率升高(均 $P<0.01$ ), 细胞焦亡率降低(均 $P<0.01$ ), TXNIP、NLRP-3、caspase-1、GSDMD、ASC、IL-18和IL-1 $\beta$ 等焦亡相关因子的表达量显著减少(均 $P<0.05$ ); 抑制circRNA-SCAF8后miR-93-5p的表达量显著增加( $P<0.01$ ), 过表达miR-93-5p后circRNA-SCAF8的表达有降低趋势, 但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。miR-93-5p通过与circRNA-SCAF8的3' UTR区结合下调circRNA-SCAF8表达, miR-93-5p通过与TXNIP的3' UTR区结合下调TXNIP表达。circRNA-SCAF8和miR-93-5p均位于细胞质中, 在细胞中高度关联。qRT-PCR结



收稿日期(Received): 2023-02-23 接受日期(Accepted): 2023-07-24 网络预发表日期(Online): 2023-08-02

基金项目(Funding): 浙江省医药卫生科技计划(2020RC008); 国家自然科学基金(81970694, 82002926, 82271336); 浙江省自然科学基金(LQ21H070001, Y23H020027); 衢州市重点科技攻关项目(2022K49)

第一作者(First author): 王冰, 硕士研究生, 主要从事血管外科临床研究; E-mail: 3170104484@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0009-0006-7735-5813>. 于欣雨, 硕士研究生, 主要从事外科学研究; E-mail: 3180105451@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0003-2826-1176>

通信作者(Corresponding author): 吴子衡, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事主动脉及外周血管疾病研究; E-mail: wuziheng@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0001-8960-9733>. 郑祥韬, 主任医师, 博士生导师, 主要从事主动脉及外周血管疾病研究; E-mail: vashengxiangtao@126.com; <https://orcid.org/0009-0000-3975-1416>

果显示,过表达或抑制 miR-93-5p 后, *TXNIP* 的相对表达量较 RNA 对照组分别增加或减少(均  $P < 0.05$ ),证明 miR-93-5p 可调控 *TXNIP* 基因表达。结论:circRNA-SCAF8/miR-93-5p/*TXNIP* 通路可能参与调控高糖环境下血管内皮细胞焦亡。

[关键词] 2型糖尿病;细胞焦亡;人脐静脉内皮细胞;硫氧还蛋白相互作用蛋白;环状 RNA-SR 相关 CTD 相关因子 8;微 RNA-93-5p

[中图分类号] R654.3 [文献标志码] A

## CircRNA-SCAF8 promotes vascular endothelial cell pyroptosis by regulating the miR-93-5p/*TXNIP* axis

WANG Bing<sup>1</sup>, YU Xinyu<sup>1</sup>, CHEN Tianchi<sup>1</sup>, QIU Chenyang<sup>1</sup>, LU Wei<sup>2</sup>, ZHENG Xiangtao<sup>3</sup>, WU Ziheng<sup>1</sup> (1. Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; 2. Department of Vascular Surgery, Quzhou Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Quzhou 324000, Zhejiang Province, China; 3. Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China)

WANG Bing and YU Xinyu contributed equally to the paper.

Corresponding authors: WU Ziheng, E-mail: wuziheng@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0001-8960-9733>; ZHENG Xiangtao, E-mail: vaszhengxiangtao@126.com, <https://orcid.org/0009-0000-3975-1416>

[Abstract] **Objective:** To investigate the role and mechanism of circRNA-SR-related CTD associated factor 8 (SCAF8) in regulating endothelial cell pyroptosis in high glucose environment. **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured and divided into six groups. The normal control group and high glucose control group were cultured in cell culture medium with 5 and 33 mmol/L glucose, respectively. The RNA control group, circRNA-SCAF8 inhibition group, miR-93-5p overexpression group and miR-93-5p inhibition group were added with non-functional siRNA, circRNA-SCAF8 inhibitor, miR-93-5p overexpression molecule and miR-93-5p inhibitor in high glucose environment, respectively. Cell viability and pyroptosis were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, flow cytometry and Hoechst 33342/propidium iodide fluorescence double staining. Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay were used to detect the expression of pyroptosis-related factors including apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cysteine aspartic acid specific protease-1 (caspase-1) and Gasdermin D (GSDMD), NOD like receptor protein 3 (NLRP-3), thioredoxin interacting proteins (*TXNIP*), IL-18 and IL-1 $\beta$ . The expression of circRNA-SCAF8, miR-93-5p and *TXNIP* was detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used to locate circRNA-SCAF8 and miR-93-5p. Dual luciferase assay was used to verify the targeted regulatory relationship between miR-93-5p and upstream and downstream molecules. **Results:** Compared with the RNA control group, the cell survival rate of circRNA-SCAF8 inhibition group and miR-93-5p overexpression group increased (both  $P < 0.01$ ), the pyroptosis decreased (both  $P < 0.01$ ), and the expressions of pyroptosis-related factors such as *TXNIP*, NLRP-3, caspase-1, GSDMD, ASC, IL-18 and IL-1 $\beta$  were significantly decreased (all

$P<0.05$ ). The expression of miR-93-5p was significantly increased after inhibition of circRNA-SCAF8 ( $P<0.01$ ), and the expression of circRNA-SCAF8 tended to decrease after overexpression of miR-93-5p, but with no statistical significance ( $P>0.05$ ). Dual luciferase assay showed that miR-93-5p downregulated circRNA-SCAF8 expression by binding to the 3' UTR region of circRNA-SCAF8, and miR-93-5p downregulated TXNIP expression by binding to the 3' UTR region of TXNIP. FISH showed that circRNA-SCAF8 and miR-93-5p were both located in the cytoplasm and were highly associated in the cells. qRT-PCR showed that the relative expression of TXNIP increased or decreased after overexpression or inhibition of miR-93-5p compared with the RNA control group, respectively (both  $P<0.05$ ), suggesting that miR-93-5p could regulate TXNIP gene expression. **Conclusion:** CircRNA-SCAF8/miR-93-5p/TXNIP axis is involved in the regulation of pyroptosis in HUVECs under high glucose.

[ **Key words** ] Diabetes mellitus type 2; Pyroptosis; Human umbilical vein endothelial cells; Thioredoxin interacting proteins; Circular RNA-SR-related CTD associated factor; MiR-93-5p

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2023, 52(4): 473-484.]

[ **缩略词** ] 胱天蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, caspase); NOD样受体家族蛋白(NOD like receptor protein, NLRP); 凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC); Gasdermin D蛋白(Gasdermin D, GSDMD); 环状RNA(circular RNA, circRNA); SR相关CTD相关因子(SR-related CTD associated factor, SCAF); 微RNA(microRNA, miRNA, miR); 信使RNA(messenger RNA, mRNA); 硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin interacting proteins, TXNIP); 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC); 细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK); 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC); 放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA); 荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH); 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP); 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH); 小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA); 定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS); T细胞活性低分泌因子(reduced upon activation, normal T cell expressed and secreted factor, RANTES); 沉默信息调节因子(silence information regulator, SIRT); 肌质网/内质网钙ATP酶(sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SERCA)

血管并发症是2型糖尿病患者死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。糖尿病血管并发症与血管内皮功能受损密切相关,但高糖环境诱发内皮功能障碍的机制目前尚不完全清楚,研究表明可能与细胞焦亡相关<sup>[3-7]</sup>。细胞焦亡又称细胞炎性坏死,是一种依赖于caspase-1亚族(caspase-1、4、5、11)诱导的坏死性和炎症性细胞程序性死亡,与细胞凋亡之间存

在质膜破裂等共同特征<sup>[8]</sup>。研究显示,经典和非经典信号通路都参与细胞焦亡<sup>[9-10]</sup>。在经典通路中,NLRP-3感知外部刺激<sup>[11-12]</sup>,与ASC结合后激活caspase-1,caspase-1切割促炎性细胞因子IL-18和IL-1 $\beta$ 从而引起细胞炎症;在非经典通路中,caspase-4、5、11可以感知细菌脂多糖,形成炎性小体来切割GSDMD,从而释放炎症介质、产生炎症反

应<sup>[13]</sup>。三磷酸腺苷也可以激活巨噬细胞中的 caspase-3,诱导细胞焦亡<sup>[14]</sup>。

circRNA 是一类没有 3'-5' 多聚腺苷酸化尾的闭环结构内源性非编码 RNA,在癌症、骨关节炎和血管功能障碍等多种疾病的发展中起着至关重要的作用<sup>[15-19]</sup>。目前,已有研究证实 circRNA-SCAF8 在细胞焦亡中发挥作用<sup>[20-21]</sup>,但其通过何种通路调控血管内皮细胞焦亡尚未证实。研究显示, circRNA 可以通过精准调控 miRNA<sup>[22-23]</sup>,沉默靶 mRNA 或修饰 mRNA 翻译来影响蛋白质编码基因的表达,这条通路在肝细胞癌中已经得到了印证<sup>[24]</sup>。此外, circRNA 作用于 miR-93-5p 在糖尿病和动脉粥样硬化中也发挥重要作用<sup>[25-26]</sup>。miR-93-5p 下游的 TXNIP 不仅在葡萄糖摄取、代谢和利用方面发挥重要作用<sup>[27-28]</sup>,还能引发内皮细胞功能障碍<sup>[28]</sup>。本研究通过细胞实验,以期验证高糖条件下 circRNA-SCAF8 通过作用于 miR-93-5p 来调控 TXNIP 的表达促进血管内皮细胞焦亡。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、试剂和主要仪器

HUEVC(产品号 CM-H082)来源于 ScienCell 公司;人胚胎肾 293 细胞(Expi293F GnTI 细胞系)来源于 ThermoFisher Scientific 公司。

细胞培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素溶液为 Biological Industries 公司产品;CCK-8 试剂盒为 Dojindo 公司产品;Annexin-FITC 溶液和碘化丙啶溶液为 BD Bioscience 公司产品;Hoechst 33342/碘化丙啶双荧光染色试剂盒、BCA 蛋白检测盒、RIPA 缓冲液为上海碧云天生物技术有限公司产品;细胞转染液、FISH 试剂盒和 Lipofectamine™ 2000 转染液为 ThermoFisher Scientific 公司产品;质粒小量制备试剂盒为上海捷瑞生物工程有限公司产品;SDS 聚丙烯酰胺凝胶、聚偏二氟乙烯膜为 Invitrogen 公司产品;TXNIP 为 Abcam 公司产品;鼠单抗 caspase-1 (42 000、45 000)、兔多抗 NLRP3 (118 000)为 Santa Cruz 公司产品;兔单抗 TXNIP (44 000)、兔多抗 ASC (25 000)和兔多抗 GSDMD (35 000/53 000)为 Affinity 公司产品;HRP 标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗为武汉博士德生物工程有限公司产品;NLRP3 为 Novus 公司产品;caspase-1 为 Santa Cruz 公司产品;IL-18 和 IL-1β ELISA 试剂盒为上海鼎桑生物科技有限

公司产品;TRIzol 试剂为 Ambion 公司产品;HiScript 逆转录酶试剂盒为南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品。

GAPDH、TXNIP、miR-93-5p 和 circRNA-SCAF8 引物由青岛科技有限公司设计并合成;circRNA-SCAF8 抑制分子(序列号 CAGCAGTTGTATCCCC TGA)、miR-93-5p 过表达分子(序列号 CAAAGTG CTGTTCGTGCAGGTAG)、miR-93-5p 抑制剂、无功能 siRNA (序列号 TTCTCCGAACGTGTCACGT)由广州锐博生物技术有限公司设计并合成。

共聚焦显微镜为 Leica 公司产品;酶标仪为 Molecular Devices 公司产品;倒置显微镜为 Olympus 公司产品;低速离心机来源于德国 Eppendorf 公司;微量分光光度计为上海奥盛集团有限公司产品;紫外分析仪为北京君意东方电泳设备有限公司产品;qRT-PCR 仪为美国 ABI 公司产品;双荧光素酶报告分析系统为美国 Promega 公司产品。

### 1.2 HUVEC 复苏和培养

从液氮中取出细胞冻存管,迅速放入 37 °C 水浴中解冻。用 75% 乙醇擦拭冻存管后,吸取内容物至 15 mL 无菌离心管中,逐滴加入预温至 37 °C 的培养液 4~5 mL,混匀,室温 500×g 离心 10 min,弃上清液。用培养液 4~5 mL 洗涤一次后离心弃去上清液,加 HUVEC 完全培养液 4~5 mL 备用。每支 HUVEC 冻存管含细胞数为 5×10<sup>5</sup> 个。

用去离子水配制 0.5% 明胶溶液,过滤除菌。取 2~4 个 T25 培养瓶,每个培养瓶中加入 2~3 mL 0.5% 明胶溶液并摇匀,使包被液布满培养瓶底面,置于 37 °C 培养箱内放置 2 h。细胞接种前吸净包被液,每瓶加培养液 3~5 mL,按 2500~5000 个/cm<sup>2</sup> 接种,摇匀后置于 37 °C, 5% 二氧化碳培养箱内培养 24 h,至细胞完全贴壁。更换培养液后继续培养。每周更换培养液两次,至细胞长至覆盖培养面的 70%~80% 后进行传代或冻存。

### 1.3 HUEVC 分组及干预

正常对照组:HUVEC 置于 5 mmol/L 葡萄糖浓度的细胞培养基(10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素溶液)中生长,置于 37 °C、含 5% 二氧化碳的加湿二氧化碳培养箱中培养;高糖对照组:HUVEC 置于 33 mmol/L 葡萄糖浓度的细胞培养基,其余条件同正常对照组;RNA 对照组:高糖环境下加入无功能 siRNA;circRNA-SCAF8 抑制组:高糖环境下加入 circRNA-SCAF8 抑制分子;miR-93-5p 过表达组:

高糖环境下加入miR-93-5p过表达分子;miR-93-5p抑制组:高糖环境下加入miR-93-5p抑制剂。

#### 1.4 CCK-8法检测细胞存活率

选取生长状态良好的对数生长期HUVEC制作细胞悬液,混匀,将HUVEC以 $1 \times 10^5$ 个/孔接种于六孔板中,使细胞密度不低于1000个/孔,培养板置于37℃、5%二氧化碳培养箱内培养24 h。每孔加入CCK-8试剂10  $\mu$ L,轻振混匀,另设空白对照组(含培养基和CCK-8溶液,不含细胞)。将培养板置于37℃、5%二氧化碳培养箱孵育1~4 h,最佳孵育时间通过目测染色程度或用酶标仪测定决定。使用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度值,重复测定三次。细胞存活率(%)=(各组细胞吸光度值/空白对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。

#### 1.5 流式细胞术和Hoechst 33342/碘化丙啶双荧光染色法检测细胞焦亡

流式细胞术:在六孔板培养HUVEC,待细胞生长达到60%~70%后把细胞培养液吸出至离心管内,PBS洗涤贴壁细胞一次,加入适量胰蛋白酶细胞消化液消化细胞。室温孵育,吸除胰蛋白酶细胞消化液。收集的细胞培养液稍混匀,转移到离心管内,1000 $\times g$ 离心5 min,弃上清液,收集细胞,用PBS轻轻重悬细胞并计数。每管加入5  $\mu$ L膜联蛋白V-FITC液和碘化丙啶溶液后混匀,避光孵育15 min。采用流式细胞仪检测,实验结果以荧光强度散点图表示,通过观察荧光染色的细胞在四象限的分布判断焦亡细胞比例。

Hoechst 33342/碘化丙啶双荧光染色法:将HUVEC以 $5 \times 10^3$ 个/孔接种于24孔板中,用腺病毒转染液转染细胞。稳定转染的细胞使用5  $\mu$ L Hoechst 33342在37℃下避光孵育10 min,再用3  $\mu$ L碘化丙啶溶液在室温下处理15 min。通过荧光显微镜显像观察焦亡细胞在视野中的比例。

#### 1.6 蛋白质印迹法检测焦亡相关蛋白表达

采用RIPA缓冲液从 $1 \times 10^5$ 个细胞中分离总蛋白,采用BCA蛋白检测盒进行蛋白浓度定量。用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白,并将分离的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜封闭1 h后,与一抗在4℃环境下孵育过夜,然后与二抗在室温下孵育1 h。电泳检测TXNIP、NLRP-3、caspase-1、ASC、GSDMD和GAPDH。用ECL化学发光试剂对蛋白条带进行可视化处理,用ImageJ软件分析其灰度。以GAPDH为内参,分别计算

TXNIP、NLRP-3、caspase-1、ASC和GSDMD与GAPDH的相对表达量并归一化处理。

#### 1.7 ELISA法检测细胞中IL-18和IL-1 $\beta$ 的表达

使用ELISA试剂盒测定HUVEC中IL-1 $\beta$ 和IL-18的浓度。用包被缓冲液稀释特异性抗体球蛋白至最适浓度(1~10  $\mu$ g/mL),每孔加0.3 mL,4℃过夜。次日弃去溶液,用洗涤缓冲液洗三次,每次3 min。每孔加入0.2 mL用稀释缓冲液稀释的含抗原的被检标本,置于37℃环境孵育1~2 h,然后洗涤。各孔再加入0.2 mL用稀释缓冲液稀释的酶标记特异性抗体溶液,37℃作用1~2 h,然后洗涤。再加入0.2 mL底物溶液,室温作用30 min。最后各孔中加入2 mol/L柠檬酸0.05 mL。目测或用酶标比色计测定吸光度值。颜色越深说明阳性程度越强,阴性反应为无色或极浅。使用ELISA检测仪于450 nm波长处测定各孔吸光度值,以空白对照孔调零,大于规定的阴性对照吸光度值的2.1倍即为阳性。

#### 1.8 qRT-PCR检测circRNA-SCAF8、miR-93-5p和TXNIP的基因表达

采用TRIzol试剂分离RNA,使用HiScript逆转录酶试剂盒和qRT-PCR仪将RNA逆转录成cDNA后进行检测。采用GenBank数据库查询基因序列并设计引物,见表1。将20  $\mu$ L反应液中含10 $\times$ PCR扩增缓冲液2  $\mu$ L、四种dNTP(10 mmol/L)2  $\mu$ L、RNA酶抑制剂20 U、mRNA 1~2  $\mu$ g(或RNA 5~10  $\mu$ g)、引物1  $\mu$ L等充分混匀后,于42℃反应60 min,反应完毕后将反应管在95℃下加热5 min,使逆转录酶失活和RNA-cDNA杂合物变性。以该cDNA第一链为模板,以内参GAPDH为对照进行平衡,同体系扩增目的基因的相对量。反应结束后根据扩增曲线数据,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA相对转录水平。

#### 1.9 FISH观察circRNA-SCAF8和miR-93-5p定位

使用Lipofectamine™ 2000转染液将含有过表达质粒的pcDNA载体转染至 $2 \times 10^5$ 个HUVEC。用PBS清洗细胞,并用4%多聚甲醛固定10 min。使用70%乙醇渗透12 h,再次用PBS洗涤三次,然后将细胞在50%甲酰胺和2 mol/L柠檬酸钠缓冲液中水化10 min。取200  $\mu$ L复染溶液滴加在玻片标本上,用共聚焦显微镜观察,通过细胞内红色荧光(miRNA)和绿色荧光(circRNA)观察circRNA-SCAF8和miR-93-5p定位。

表1 各目的基因引物序列

Table 1 Primer sequences for target genes

| 目的基因          | 序列(5'→3')                                                    |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| GAPDH         | 正向:TCAAGAAGGTGCTGAAGCAGG                                     |
|               | 反向:TCAAAGGTGGAGGAGTGCGT                                      |
| TXNIP         | 正向:TGAAGGCTTTTCTTGACCGC                                      |
|               | 反向:TCGAGCAGAGACAGACACC                                       |
| miR-93-5p     | 环引物:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA<br>GGTATTCGCACTGGATACGACCTACCTGC |
|               | 正向:TGCGCCAAAGTGCTGTTCTGTCGA<br>反向:CCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT     |
| circRNA-SCAF8 | 正向:GGATTCCGCCTCCAGTTGTC                                      |
|               | 反向:GGATTCCGCCTCCAGTTGTC                                      |

GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;TXNIP:硫氧还蛋白相互作用蛋白;miR:微RNA;circRNA:环状RNA;SCAF:SR相关CTD相关因子。

### 1.10 双荧光素酶实验验证 miR-93-5p 与上下游分子的靶向调控关系

通过双荧光素酶实验验证 miR-93-5p 与 circRNA-SCAF8 和 TXNIP 在基因层面的靶向调控关系。验证 miR-93-5p 与 circRNA-SCAF8 靶向互作时,使用质粒小量制备试剂盒构建荧光素酶报告质粒,产生携带野生型或突变型 circRNA-SCAF8 质粒的荧光素酶报告基因。使用 Lipofectamine™ 2000 转染液将含有 pcDNA circRNA-SCAF8 质粒的荧光素酶载体与 miR-93-5p 过表达分子、miR-93-5p 抑制剂或无功能 siRNA 共转染至人胚胎肾 293 细胞。48 h 后收集并裂解细胞。验证 miR-93-5p/TXNIP 信号通路是否激活时,构建荧光素酶报告质粒,产生携带野生型或突变型 TXNIP 基因质粒的荧光素酶报告基因,其余步骤同上所述。使用双荧光素酶报告分析仪评估荧光强度,通过荧光强度推断基因表达水平。

### 1.11 统计学方法

采用 GraphPad 7 软件进行统计分析。每个实验数据用三个样本进行重复分析,符合正态分布的计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 circRNA-SCAF8 抑制分子、miR-93-5p 过表达分子和 miR-93-5p 抑制剂的构建

circRNA-SCAF8 抑制组的 circRNA-SCAF8 相

对表达量为  $0.40 \pm 0.05$ , 显著低于正常对照组 ( $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ )、高糖对照组 ( $1.70 \pm 0.40$ ,  $P < 0.01$ ) 和 RNA 对照组 ( $1.55 \pm 0.57$ ,  $P < 0.05$ )。提示 circRNA-SCAF8 抑制分子对 circRNA-SCAF8 的表达具有显著抑制效果,证明 circRNA-SCAF8 抑制组模型构建成功。

miR-93-5p 过表达组的 miR-93-5p 相对表达量为  $10.21 \pm 1.67$ , 显著高于正常对照组 ( $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ )、高糖对照组 ( $0.40 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ) 和 RNA 对照组 ( $0.32 \pm 0.09$ ,  $P < 0.01$ )。提示 miR-93-5p 过表达分子对 miR-93-5p 的表达具有显著增强效果,证明 miR-93-5p 过表达组模型构建成功。

miR-93-5p 抑制组的 miR-93-5p 相对表达量为  $0.12 \pm 0.02$ , 显著低于正常对照组 ( $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ )、高糖对照组 ( $0.34 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) 和 RNA 对照组 ( $0.33 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ )。提示 miR-93-5p 抑制剂对 miR-93-5p 的表达具有显著抑制效果,证明 miR-93-5p 抑制组模型构建成功。

### 2.2 抑制 circRNA-SCAF8 表达对细胞焦亡、焦亡相关蛋白和 miR-93-5p 表达的影响

CCK-8 法和流式细胞术检测结果显示, circRNA-SCAF8 抑制组细胞存活率较 RNA 对照组显著升高 ( $P < 0.01$ ), 细胞焦亡率较 RNA 对照组显著下降 ( $P < 0.01$ ), 见表 2 和图 1。Hoechst 33342/碘化丙啶双荧光染色结果显示, circRNA-SCAF8 抑制组焦亡细胞在视野中的比例较 RNA 对照组下降, 见图 2。提示抑制 circRNA-SCAF8 可减少 HUVEC 焦亡。

蛋白质印迹法和 ELISA 检测结果显示, circRNA-SCAF8 抑制组 TXNIP、NLRP-3、caspase-1、GSDMD、ASC、IL-18 和 IL-1 $\beta$  等焦亡相关因子的

表2 circRNA-SCAF8 抑制组与各对照组的细胞存活率和细胞焦亡率比较

Table 2 Comparison of cell viability and pyroptosis rates in circRNA-SCAF8 inhibition group and the control groups

| ( $\bar{x} \pm s$ , %) |          |            |              |
|------------------------|----------|------------|--------------|
| 组别                     | <i>n</i> | 细胞存活率      | 细胞焦亡率        |
| 正常对照组                  | 3        | 110.6±2.7  | 3.13±0.46    |
| 高糖对照组                  | 3        | 92.9±1.7** | 15.53±0.57** |
| RNA 对照组                | 3        | 91.6±2.7   | 14.78±0.56   |
| circRNA-SCAF8 抑制组      | 3        | 99.8±1.2## | 9.23±0.80##  |

与正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 RNA 对照组比较, ## $P < 0.01$ 。  
circRNA: 环状 RNA; SCAF: SR 相关 CTD 相关因子。

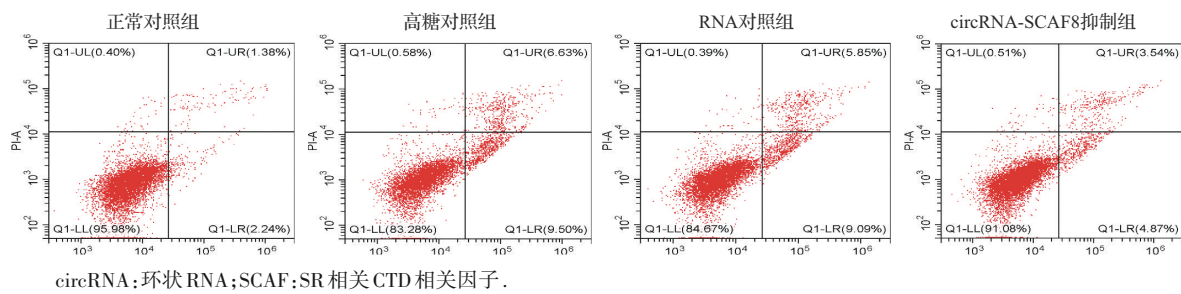


图1 circRNA-SCAF8抑制组与各对照组流式细胞检测结果

Figure 1 Flow cytometry results of circRNA-SCAF8 inhibition group and the control groups

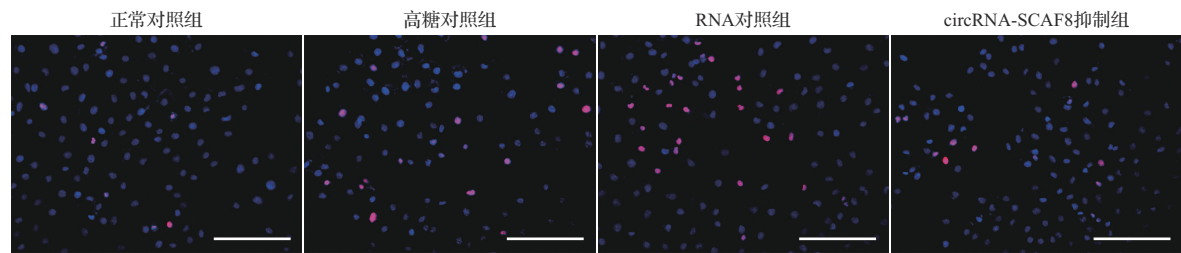


图2 circRNA-SCAF8抑制组与各对照组 Hoechst 33342/碘化丙啶荧光染色图

Figure 2 Hoechst 33342/propidium iodide staining results of circRNA-SCAF8 inhibition group and the control groups

表达量显著低于RNA对照组( $P<0.05$ ),见图3、表3。结果提示,抑制 circRNA-SCAF8可降低焦亡相关因子的表达。

qRT-PCR 结果显示,正常对照组、高糖对照组、RNA 对照组和 circRNA-SCAF8 抑制组

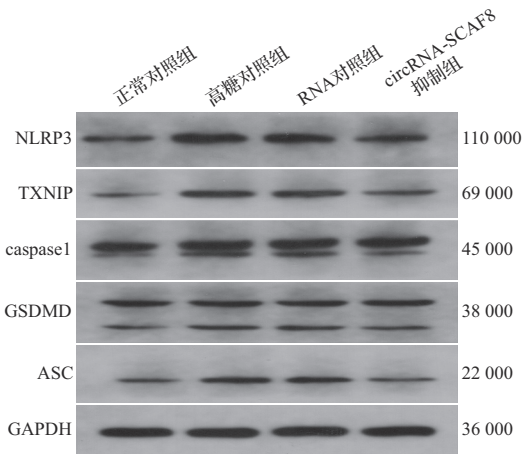
miR-93-5p 的表达量分别为  $1.00\pm0.00$ 、 $0.38\pm0.05$ 、 $0.41\pm0.13$  和  $0.74\pm0.07$ ,其中高糖对照组较正常对照组 miR-93-5p 表达量显著减少( $P<0.01$ ),而 circRNA-SCAF8 抑制组较 RNA 对照组 miR-93-5p 表达量显著增加( $P<0.01$ ),提示抑制 circRNA-SCAF8可促进 miR-93-5p 的合成。

### 2.3 过表达 miR-93-5p 对细胞焦亡、焦亡相关蛋白和 circRNA-SCAF8 表达的影响

CCK-8 法和流式细胞术检测结果显示,miR-93-5p 过表达组细胞存活率显著高于 RNA 对照组( $P<0.01$ ),细胞焦亡率显著低于 RNA 对照组( $P<0.01$ ),见表 4 和图 4。Hoechst 33342/碘化丙啶双荧光染色结果显示,miR-93-5p 过表达组焦亡细胞在视野中的比例较 RNA 对照组下降,见图 5。提示过表达 miR-93-5p 可减少 HUVEC 焦亡。

蛋白质印迹法和 ELISA 检测结果显示,miR-93-5p 过表达组 TXNIP、NLRP-3、caspase-1、GSDMD、ASC、IL-18 和 IL-1 $\beta$  等焦亡相关因子的表达量显著低于 RNA 对照组( $P<0.05$ ),见图 6、表 5。结果提示,过表达 miR-93-5p 可降低 TXNIP 等焦亡相关因子的表达。

qRT-PCR 结果显示,正常对照组、高糖对照组、RNA 对照组和 miR-93-5p 过表达组 circRNA-SCAF8 的表达量分别为  $1.00\pm0.00$ 、 $1.51\pm0.36$ 、



circRNA: 环状 RNA; SCAF: SR 相关 CTD 相关因子; NLRP: NOD 样受体家族蛋白; TXNIP: 硫氧还蛋白相互作用蛋白; caspase: 胱天蛋白酶; GSDMD: Gasdermin D 蛋白; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图3 circRNA-SCAF8抑制组与各对照组焦亡相关因子表达电泳图

Figure 3 Western blotting results of pyroptosis-related factors expression in circRNA-SCAF8 inhibition group and the control groups

表3 circRNA-SCAF8抑制组与各对照组焦亡相关因子表达比较

Table 3 Comparison of pyroptosis-related factors expression levels in circRNA-SCAF8 inhibition group and the control groups ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别               | NLRP-3      | caspase-1   | TXNIP       | GSDMD      | ASC         | IL-18(pg/mL) | IL-1 $\beta$ (pg/mL) |
|------------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|--------------|----------------------|
| 正常对照组            | 0.29±0.07   | 0.05±0.01   | 0.26±0.04   | 0.16±0.02  | 0.20±0.02   | 11.9±2.2     | 8.8±2.9              |
| 高糖对照组            | 0.62±0.10** | 0.19±0.04** | 0.64±0.08** | 0.34±0.04* | 0.51±0.04** | 41.2±6.6**   | 61.1±10.6**          |
| RNA对照组           | 0.58±0.09   | 0.20±0.06   | 0.63±0.09   | 0.32±0.06  | 0.50±0.05   | 41.8±4.6     | 60.1±6.5             |
| circRNA-SCAF8抑制组 | 0.43±0.06#  | 0.12±0.02#  | 0.35±0.06## | 0.21±0.03# | 0.26±0.04#  | 25.8±3.9#    | 27.1±5.6##           |

与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与RNA对照组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ . circRNA:环状RNA;SCAF:SR相关CTD相关因子;NLRP:NOD样受体家族蛋白;caspase:胱天蛋白酶;TXNIP:硫氧还蛋白相互作用蛋白;GSDMD:Gasdermin D蛋白;ASC:凋亡相关斑点样蛋白.

表4 miR-93-5p过表达组与各对照组的细胞存活率和细胞焦亡率比较

Table 4 Comparison of cell viability and pyroptosis rates in miR-93-5p overexpression group and the control groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别            | n | 细胞存活率      | 细胞焦亡率        |
|---------------|---|------------|--------------|
| 正常对照组         | 3 | 95.3±3.5   | 2.57±1.12    |
| 高糖对照组         | 3 | 78.1±2.9** | 13.63±0.97** |
| RNA对照组        | 3 | 75.9±1.4   | 14.25±0.83   |
| miR-93-5p过表达组 | 3 | 87.5±3.8## | 9.60±0.73##  |

与正常对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与RNA对照组比较,## $P<0.01$ . miR:微RNA.

1.56±0.18和1.22±0.26,其中高糖对照组较正常对照组 circRNA-SCAF8表达量显著增加( $P<0.05$ ),而

miR-93-5p过表达组较RNA对照组 circRNA-SCAF8的表达量有减少趋势,提示过表达miR-93-5p可抑制上游circRNA-SCAF8的表达。

## 2.4 miR-93-5p与上下游分子的靶向调控关系

miR-93-5p过表达分子+circRNA 3' UTR野生型组与miR-93-5p过表达分子+circRNA 3' UTR突变型组比较,野生型组荧光值显著低于突变型组(分别为0.69±0.06和1.34±0.12, $P<0.01$ ),说明miR-93-5p通过与circRNA-SCAF8的3' UTR区结合下调了circRNA-SCAF8表达,证明circRNA-SCAF8是miR-93-5p的靶基因。同时,FISH结果显示,circRNA-SCAF8和miR-93-5p均位于细胞质中,证明其在细胞中高度关联的空间关系(图7)。

miR-93-5p过表达分子+TXNIP 3' UTR野生

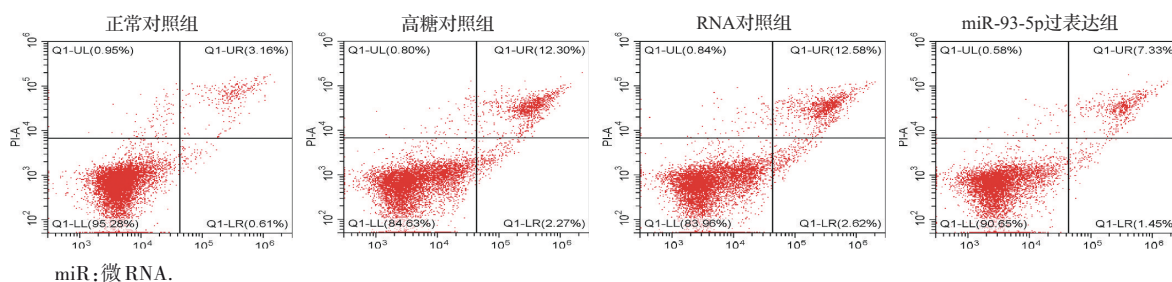
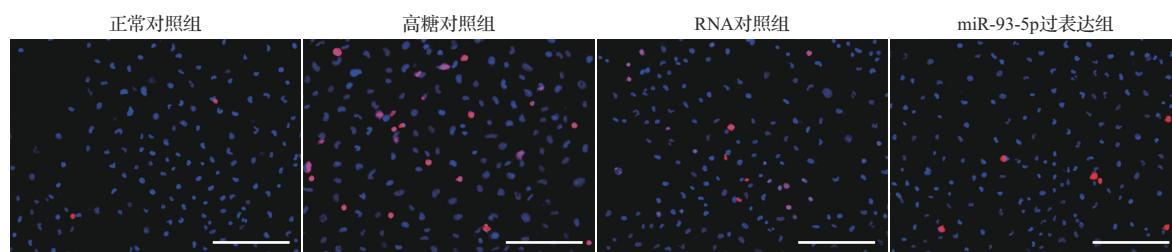


图4 miR-93-5p过表达组与各对照组流式细胞检测结果

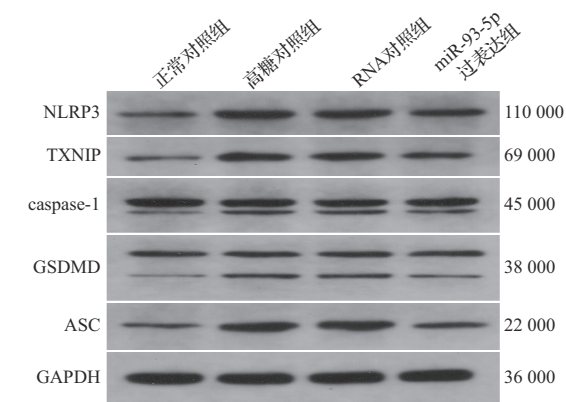
Figure 4 Flow cytometry results of miR-93-5p overexpression group and the control groups



蓝色荧光信号为活细胞,红色荧光信号为焦亡细胞.标尺=1000  $\mu\text{m}$ . miR:微RNA.

图5 miR-93-5p过表达组与各对照组Hoechst 33342/碘化丙啶荧光染色图

Figure 5 Hoechst 33342/propidium iodide staining results of miR-93-5p overexpression group and the control groups



miR: 微RNA; NLRP: NOD样受体家族蛋白; TXNIP: 硫氧还蛋白相互作用蛋白; caspase: 胱天蛋白酶; GSDMD: Gasdermin D蛋白; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

图6 miR-93-5p过表达组与各对照组焦亡相关因子表达电泳图  
Figure 6 Western blotting results of pyroptosis-related factors expression in miR-93-5p overexpression group and the control groups

型组与 miR-93-5p 过表达分子+TXNIP 3' UTR 突变型组比较,野生型组荧光值显著低于突变型组 (分别为  $0.58\pm0.04$  和  $1.33\pm0.04$ ,  $P<0.01$ ),说明 miR-93-5p 通过与 TXNIP 的 3' UTR 区结合下调了 TXNIP 表达,证明 TXNIP 是 miR-93-5p 的下游分子。同时,qRT-PCR 结果显示,miR-93-5p 过表达组的 TXNIP 相对表达量为  $2.48\pm0.11$ ,显著低于 RNA 对照组 ( $4.06\pm0.99$ ,  $P<0.01$ );miR-93-5p 抑制组的 TXNIP 相对表达量为  $2.03\pm0.64$ ,显著高于 RNA 对照组 ( $1.00\pm0.00$ ,  $P<0.05$ ),证明 miR-93-5p 可以调控 TXNIP 基因表达。

3 讨论

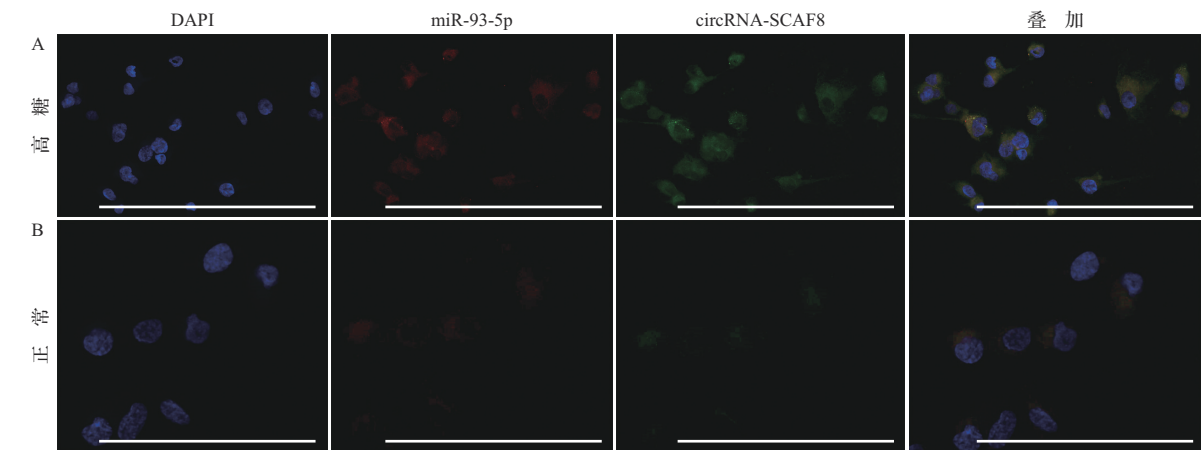
细胞焦亡又称细胞炎性坏死,表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂,释放大量促炎性细胞因子进而激活强烈的炎症反应,是一种近期发现的细胞程序性死亡方式<sup>[9-10]</sup>。细胞焦亡依

表5 miR-93-5p过表达组与各对照组焦亡相关因子表达比较

Table 5 Comparison of pyroptosis-related factors expression levels in miR-93-5p overexpression group and the control groups ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组 别           | NLRP-3      | caspase-1   | TXNLP       | GSDMD       | ASC         | IL-18(pg/mL) | IL-1β(pg/mL) |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 正常对照组         | 0.33±0.04   | 0.07±0.02   | 0.21±0.05   | 0.12±0.03   | 0.28±0.04   | 11.9±4.1     | 9.3±2.9      |
| 高糖对照组         | 0.69±0.09** | 0.26±0.03** | 0.63±0.07** | 0.33±0.04*  | 0.62±0.05** | 43.0±8.9**   | 62.2±10.9**  |
| RNA 对照组       | 0.66±0.09   | 0.27±0.05   | 0.65±0.07   | 0.34±0.05   | 0.71±0.09   | 41.1±5.6     | 59.3±11.0    |
| miR-93-5p过表达组 | 0.51±0.04#  | 0.13±0.03#  | 0.40±0.04## | 0.16±0.04## | 0.39±0.05#  | 23.8±4.1#    | 21.3±5.1##   |

与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 RNA 对照组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ . NLRP: NOD样受体家族蛋白; caspase: 胱天蛋白酶; TXNLP: 硫氧还蛋白相互作用蛋白; GSDMD: Gasdermin D蛋白; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; miR: 微RNA.



A: 高糖环境下 miR-93-5p 和 circRNA-SCAF8 在细胞中的相对位置; B: 正常环境下 miR-93-5p 和 circRNA-SCAF8 在细胞中的相对位置. 蓝色荧光信号为细胞核,红色荧光信号为 miR-93-5p,绿色荧光信号为 circRNA-SCAF8. 标尺=1000 μm. DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吡啶; miR: 微RNA; circRNA: 环状RNA; SCAF: SR 相关 CTD 相关因子.

图7 circRNA-SCAF8和 miR-93-5p 空间位置关系荧光图  
Figure 7 Spatial location of circRNA-SCAF8 and miR-93-5p

赖于 caspase-1 亚族和 GSDMD 蛋白诱导, NF- $\kappa$ B、NLRP-3、ASC、IL-1 $\beta$  和 IL-18 等多种效应分子参与, 其中 GSDMD 的切割、IL-1 $\beta$  和 IL-18 前体的切割成熟和释放是关键信号<sup>[11-14]</sup>。细胞焦亡广泛参与感染性疾病、神经系统相关疾病和动脉粥样硬化性疾病等的发生发展, 是机体重要的天然免疫反应。

糖尿病血管并发症是糖尿病患者最常见的死亡原因。其中高血糖环境诱发血管内皮功能障碍是血管并发症的病理基础, 但血管内皮细胞的病变通路尚未完全证实<sup>[29-32]</sup>。近期研究报道, 细胞焦亡可能参与高糖环境导致血管内皮细胞病变, 涉及 circRNA 和竞争性内源 RNA 等多种分子参与调控<sup>[33-35]</sup>。

circRNA 是一类特殊的内源性环状非编码 RNA, 广泛存在于各种生物体中。随着 circRNA 富集和测序技术的进步, 检测到的 circRNA 数不断增加<sup>[35]</sup>。在数千种 circRNA 中, 仅有很少一部分已知具有特定生物学功能, 几乎所有研究都集中在其与 miRNA 的相互作用上。近年的研究提出了“竞争性内源 RNA”假说, 该假说认为 circRNA 分子富含 miRNA 结合位点, 在细胞中可起到调节 miRNA 的作用, 减少了 miRNA 的表达, 可解除 miRNA 对其靶基因的抑制作用。这一作用机制已被用来阐述包括神经系统、泌尿生殖系统、循环系统在内的多种疾病机制<sup>[36]</sup>。

已有证明, circRNA-SCAF8 与糖尿病和癌症的细胞通路有关<sup>[20-21, 37]</sup>。本研究试图确定 circRNA-SCAF8 是否在高糖水平影响细胞焦亡的过程中发挥作用。研究显示, circRNA 可以通过在竞争性内源 RNA 网络中充当富集体来影响 miRNA 表达<sup>[38]</sup>。例如, circITCH 作为 miR-330-5p 的富集体, 可以上调 SIRT6、存活蛋白和 SERCA2a 表达, 从而缓解阿霉素诱导的心肌细胞功能障碍<sup>[39]</sup>。本研究也假设 circRNA-SCAF8 是 miR-93-5p 的富集体, 实验结果支持该假设。在两者表达相关性方面, 当 circRNA-SCAF8 受抑制时, miR-93-5p 的表达增加; 而当 circRNA-SCAF8 在高糖环境中过表达时, miR-93-5p 的表达减少。同时双荧光素酶实验进一步证实了两者在翻译表达过程中的关联性。通过 FISH 发现了两者在细胞质中有高度相关的空间位置。因此认为 circRNA-SCAF8 作为上游分子调控 miR-93-5p 的表达。miR-93-5p 已知参与了癌症、动脉硬化、糖尿病、骨疾病等相

关致病通路的调节<sup>[22-26]</sup>。因此, 本研究通过合成 miRNA 过表达分子使其过表达, 并检测其下游分子, 发现 TXNIP 与其有着高度关联性, TXNIP 与 miR-93-5p 的表达呈强负相关。最后, 通过设计反向实验, 分别使用 circRNA 抑制分子和 miRNA 抑制剂来抑制 circRNA-SCAF8 和 miR-93-5p 的表达, 检测 TXNIP 的表达量, 进一步验证了 circRNA-SCAF8/miR-93-5p/TXNIP 轴的因果性和连贯性。

TXNIP 是  $\alpha$ -抑制素蛋白家族的成员, 通过与硫氧还蛋白结合而抑制其抗氧化功能, 诱发内质网和线粒体应激, 最终可导致炎症或细胞凋亡, 在糖尿病、癌症和心血管疾病等多种疾病的发生、发展过程中起重要的调控作用<sup>[40]</sup>。近期报道称 TXNIP 亦可介导焦亡过程<sup>[41-42]</sup>。本文资料显示, TXNIP 的表达与 circRNA-SCAF8、miR-93-5p 高度关联, circRNA-SCAF8 上调与 miR-93-5p 下调都可使 TXNIP 显著升高, 而 TXNIP 升高会造成血管上皮细胞整体存活率下降、细胞凋亡率上升, 与 TXNIP 在其他细胞中的作用相似<sup>[4, 7, 27]</sup>。

综上所述, 本研究通过细胞实验初步证实 circRNA-SCAF8 在高糖环境下通过 miR-93-5p/TXNIP 通路促进焦亡, 提示该信号通路可能可以作为糖尿病血管疾病的治疗靶点。

**致谢** 研究得到浙江省医药卫生科技计划(2020RC008)、国家自然科学基金(81970694, 82002926, 82271336)、浙江省自然科学基金(LQ21H070001, Y23H020027)、衢州市重点科技攻关项目(2022K49)支持

**Acknowledgements** This paper was supported by the Medical Science and Technology Project of Zhejiang Province (2020RC008), National Natural Science Foundation of China (81970694, 82002926, 82271336), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ21H070001, Y23H020027), Key Science and Technology Project of Quzhou City (2022K49)

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**Conflict of Interests** The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2023. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## 参考文献(References)

- [1] OGURTSOVA K, DA ROCHA FERNANDES J D,

- HUANG Y, et al. IDF diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040[J]. **Diabetes Res Clin Pract**, 2017, 128: 40-50.
- [2] KANNEL W B, MCGEE D L. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study[J]. **Circulation**, 1979, 59(1): 8-13.
- [3] MEZA C A, LA FAVOR J D, KIM D H, et al. Endothelial dysfunction: is there a hyperglycemia-induced imbalance of NOX and NOS? [J]. **Int J Mol Sci**, 2019, 20(15): 3775.
- [4] ZHU Q Q, LAI M C, CHEN T C, et al. LncRNA SNHG15 relieves hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via increased ubiquitination of thioredoxin-interacting protein[J]. **Lab Invest**, 2021, 101(9): 1142-1152.
- [5] ZHU Q Q, LAI M C, CHEN T C, et al. LncRNA SNHG15 relieves hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via increasing ubiquitination of thioredoxin-interacting protein[J]. **Life Sci**, 2021: 119255.
- [6] WU X, ZHANG H, QI W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis[J]. **Cell Death Dis**, 2018, 9(2): 171.
- [7] XU X, YANG Y, WANG G, et al. Low shear stress regulates vascular endothelial cell pyroptosis through miR-181b-5p/STAT-3 axis[J]. **J Cell Physiol**, 2021, 236(1): 318-327.
- [8] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications[J]. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2020, 21(11): 678-695.
- [9] ROBINSON N, GANESAN R, HEGEDŰS C, et al. Programmed necrotic cell death of macrophages: focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos[J]. **Redox Biol**, 2019, 26: 101239.
- [10] WU C, LU W, ZHANG Y, et al. Inflammasome activation triggers blood clotting and host death through pyroptosis [J]. **Immunity**, 2019, 50(6): 1401-1411.e4.
- [11] PERRI A, BOSSIO S, RAGO V, et al. NLRP3-inflammasome activation in male reproductive system diseases [J]. **Minerva Endocrinol (Torino)**, 2022. DOI: 10.23736/S2724-6507.22.03918-5.
- [12] BUJKO K, ADAMIAK M, ABDELBASET-ISMAIL A, et al. Novel evidence that the P2X1 purinergic receptor-NLRP3 inflammasome axis orchestrates optimal trafficking of hematopoietic stem progenitors cells[J]. **Folia Histochem Cytobiol**, 2022, 60(3): 280-290.
- [13] ZHANG L, WANG Y, LIU X, et al. NLRP3 inflammasome activation in MΦs-CRC crosstalk promotes colorectal cancer metastasis[J]. **Ann Clin Lab Sci**, 2022, 52(4): 571-579.
- [14] TAPIA CÁCERES F, GASPARI T A, HOSSAIN M A, et al. Relaxin inhibits the cardiac myofibroblast NLRP3 inflammasome as part of its anti-fibrotic actions via the angiotensin type 2 and ATP (P2X7) receptors[J]. **Int J Mol Sci**, 2022, 23(13): 7074.
- [15] QU S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. **Cancer Lett**, 2015, 365(2): 141-148.
- [16] WANG Q, WU J, ZENG Y, et al. Pyroptosis: a pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease [J]. **Clin Chim Acta**, 2020, 510: 62-72.
- [17] SUN Y M, WANG W T, ZENG Z C, et al. CircMYBL2, a circRNA from MYBL2, regulates FLT3 translation by recruiting PTBP1 to promote FLT3-ITD AML progression[J]. **Blood**, 2019, 134(18): 1533-1546.
- [18] SHEN S, WU Y, CHEN J, et al. CircSERPINE2 protects against osteoarthritis by targeting miR-1271 and ETS-related gene[J]. **Ann Rheum Dis**, 2019, 78(6): 826-836.
- [19] VO J N, CIESLIK M, ZHANG Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer[J]. **Cell**, 2019, 176(4): 869-881.e13.
- [20] GREGERSEN L H, MITTER R, UGALDE A P, et al. SCAF4 and SCAF8, mRNA anti-terminator proteins [J]. **Cell**, 2019, 177(7): 1797-1813.e18.
- [21] JIN L, WANG T, JIANG S, et al. The association of a genetic variant in SCAF8-CNKS3 with diabetic kidney disease and diabetic retinopathy in a Chinese population [J]. **J Diabetes Res**, 2017, 2017: 6542689.
- [22] ZHU L, FANG J. The structure and clinical roles of microRNA in colorectal cancer[J]. **Gastroenterol Res Pract**, 2016, 2016: 1360348.
- [23] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. **J Cell Physiol**, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [24] SHI X, LIU T T, YU X N, et al. MicroRNA-93-5p promotes hepatocellular carcinoma progression via a microRNA-93-5p/MAP3K2/c-Jun positive feedback circuit[J]. **Oncogene**, 2020, 39(35): 5768-5781.
- [25] ZHOU M, HOU Y, WU J, et al. MiR-93-5p promotes insulin resistance to regulate type 2 diabetes progression in HepG2 cells by targeting HGF[J]. **Mol Med Rep**, 2021, 23(5): 329.
- [26] YAN Y X, DONG J, LI Y L, et al. CircRNA hsa\_circ\_0071336 is associated with type 2 diabetes through targeting the miR-93-5p/GLUT4 axis[J/OL]. **FASEB J**, 2022, 36(5): e22324.
- [27] HUY H, SONG H Y, KIM M J, et al. TXNIP regulates AKT-mediated cellular senescence by direct interaction under glucose-mediated metabolic stress[J/OL]. **Aging Cell**, 2018, 17(6): e12836.
- [28] DUNN L L, SIMPSON P J, PROSSER H C, et al. A critical role for thioredoxin-interacting protein in diabetes-related impairment of angiogenesis[J]. **Diabetes**, 2014, 63(2): 675-687.
- [29] CIECHANOWSKA A, GORA I M, SABALINSKA S, et al. The effect of high and variable glucose on the viability of endothelial cells co-cultured with smooth muscle cells[J]. **Int J Mol Sci**, 2022, 23(12): 6704.
- [30] VICTORIO J A, GUIZONI D M, FREITAS I N, et al.

- Effects of high-fat and high-fat/high-sucrose diet-induced obesity on PVAT modulation of vascular function in male and female mice[J]. **Front Pharmacol**, 2021, 12: 720224.
- [31] SILVERSTEIN J H. Vascular disease risk in type 2 diabetes: high sugars, fluctuating sugars, both?[J]. **J Pediatr**, 2016, 172: 1-4.
- [32] MACDONALD I A. A review of recent evidence relating to sugars, insulin resistance and diabetes[J]. **Eur J Nutr**, 2016, 55(Suppl 2): 17-23.
- [33] WANG Y, LIU X, SHI H, et al. NLRP3 inflammasome, an immune-inflammatory target in pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases[J]. **Clin Transl Med**, 2020, 10(1): 91-106.
- [34] ZHANG W, XU W, FENG Y, et al. Non-coding RNA involvement in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy[J]. **J Cell Mol Med**, 2019, 23(9): 5859-5867.
- [35] YANG F, LI A, QIN Y, et al. A novel circular RNA mediates pyroptosis of diabetic cardiomyopathy by functioning as a competing endogenous RNA[J]. **Mol Ther Nucleic Acids**, 2019, 17: 636-643.
- [36] BOSE R, AIN R. Regulation of transcription by circular RNAs[J]. **Adv Exp Med Biol**, 2018, 1087: 81-94.
- [37] BECKER R, LOLL B, MEINHART A. Snapshots of the RNA processing factor SCAF8 bound to different phosphorylated forms of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II [J]. **J Biol Chem**, 2008, 283(33): 22659-22669.
- [38] ZHU L, LI N, SUN L, et al. Non-coding RNAs: the key detectors and regulators in cardiovascular disease [J]. **Genomics**, 2021, 113(1 Pt 2): 1233-1246.
- [39] 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.
- [40] CHEN Y, NING J, CAO W, et al. Research progress of TXNIP as a tumor suppressor gene participating in the metabolic reprogramming and oxidative stress of cancer cells in various cancers[J]. **Front Oncol**, 2020, 10: 568574.
- [41] HEO M J, KIM T H, YOU J S, et al. Alcohol dysregulates miR-148a in hepatocytes through FoxO1, facilitating pyroptosis via TXNIP overexpression[J]. **Gut**, 2019, 68(4): 708-720.
- [42] JIA Y, CUI R, WANG C, et al. Metformin protects against intestinal ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via TXNIP-NLRP3-GSDMD pathway[J]. **Redox Biol**, 2020, 32: 101534.

[本文编辑 余方沈敏]

## · 学术动态 ·

## 戈万忠研究员/吕卫国教授团队合作揭示 R-loop 稳态调控新分子机制

2023年6月15日,浙江大学医学院附属妇产科医院戈万忠研究员团队与吕卫国教授团队合作在《细胞死亡与分化》(*Cell Death and Differentiation*)在线发表题为“NKAP acts with HDAC3 to prevent R-loop associated genome instability”的研究论文(DOI:10.1038/s41418-023-01182-5)。该研究首次揭示了核因子 $\kappa$ B激活蛋白(NKAP)和组蛋白脱乙酰酶3(HDAC3)在R-loop稳态调控中的关键作用,并阐明了其失调导致R-loop介导的基因组不稳定性的分子机制。

R-loop是指转录过程中在基因组上形成三条核苷酸链的特殊结构,其包含转录时新生RNA链与DNA模板链形成的RNA:DNA杂交链以及非模板DNA单链。该结构在多种生物学过程中发挥重要调控作用。在探究NKAP是否通过有丝分裂调控以外机制来影响基因组不稳定性 and 肿瘤发生的实验过程中,研究人员发现NKAP在R-loop稳态维持和防止DNA损伤方面具有重要作用。NKAP敲降导致细胞核中异常R-loop积累,进而引发DNA损伤和DNA复制叉进展缺陷。此外,研究人员还鉴定了与NKAP相互作用的重要蛋白HDAC3在R-loop稳态调控中的作用,发现NKAP/HDAC3复合物的形成关键在于阻止R-loop的积累和DNA损伤。进一步研究发现,NKAP可能通过维持RNA聚合酶II的暂停来阻止R-loop的形成。最后,研究人员也发现NKAP或HDAC3缺失诱导的R-loop会被XPF和XPG内切酶加工处理造成DNA双链断裂。

综上,该研究不仅揭示了NKAP和HDAC3在R-loop稳态维持中的功能,而且提出了NKAP/HDAC3复合物阻止R-loop及DNA复制压力形成的模型,为利用R-loop调控因子来开发抗肿瘤药物提供了思路。

浙江大学医学院张行博士研究生为论文第一作者。研究得到国家自然科学基金和国家重点研发计划的资助。