

研究论文

CircRNA-0028171调控三氧化二砷诱导的血管内皮细胞凋亡

吴继臣¹, 金赛迪², 宋佳航², 刘鑫琪², 马文俊¹, 常琳¹, 官晓翔², 张明宇², 刘嘉祺¹, 付惠¹, 王莹^{3,*}, 许超千^{2,*}

¹牡丹江医学院药学院, 牡丹江 157400; ²哈尔滨医科大学药学院, 哈尔滨 150081; ³牡丹江医学院基础医学院, 牡丹江 157400

摘要: 本文旨在研究circRNA-0028171对三氧化二砷(As_2O_3)诱导的血管内皮细胞凋亡的调控作用。用0~15 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 24 h, 用MTT法检测HUVECs损伤情况, 用实时定量PCR检测circRNA-0028171及凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax mRNA表达水平, 用Western blot检测Bcl-2、Bax蛋白表达水平。通过转染circRNA-0028171过表达质粒和siRNA观察circRNA-0028171是否参与 As_2O_3 对HUVECs的调控。结果显示, 与对照组相比, As_2O_3 组细胞活性显著下降, Bcl-2/Bax mRNA比值和蛋白比值显著降低, circRNA-0028171显著低表达。过表达circRNA-0028171抑制 As_2O_3 诱导的HUVECs凋亡, 而敲减circRNA-0028171促进 As_2O_3 诱导的HUVECs凋亡。上述结果提示, circRNA-0028171参与调控 As_2O_3 诱导的血管内皮细胞凋亡过程。

关键词: 环状RNA; 血管内皮细胞; 三氧化二砷; 凋亡

CircRNA-0028171 regulates arsenic trioxide-induced apoptosis in vascular endothelial cells

WU Ji-Chen¹, JIN Sai-Di², SONG Jia-Hang², LIU Xin-Qi², MA Wen-Jun¹, CHANG Lin¹, GUAN Xiao-Xiang², ZHANG Ming-Yu², LIU Jia-Qi¹, FU Hui¹, WANG Ying^{3,*}, XU Chao-Qian^{2,*}

¹College of Pharmacy, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157400, China; ²College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China; ³College of Basic Medicine, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157400, China

Abstract: The present study was aimed to investigate the effects of circRNA-0028171 on the apoptosis of vascular endothelial cells induced by arsenic trioxide (As_2O_3). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with 0–15 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 for 24 h. Then, cellular viability was measured by MTT assay. The expression levels of circRNA-0028171, Bcl-2 and Bax mRNA were detected by real-time quantitative PCR. Bcl-2/Bax protein ratio was detected by Western blot. Whether circRNA-0028171 was involved in the regulation of HUVECs by As_2O_3 was investigated by transfection with overexpression plasmid of circRNA-0028171 and siRNA. The results showed that compared with the control group, As_2O_3 group showed decreased cellular viability, reduced Bcl-2/Bax mRNA and protein ratios, and significantly lower expression of circRNA-0028171. Overexpression of circRNA-0028171 inhibited apoptosis of HUVECs induced by As_2O_3 . Knockdown of circRNA-0028171 by siRNA promoted As_2O_3 -induced apoptosis in HUVECs. These results suggest that circRNA-0028171 is involved in the vascular endothelial cell apoptosis induced by As_2O_3 .

Key words: circular RNAs; vascular endothelial cells; arsenic trioxide; apoptosis

三氧化二砷(As_2O_3)又名砒霜, 20世纪70年代我国张亭栋教授及其团队在 As_2O_3 对急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的治

疗方面取得了突破性的进展, 发现“癌灵1号”(主要含 As_2O_3 和微量汞, 二者重量比为100:1)对血液疾病尤其是急性粒细胞白血病具有显著的临床疗

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82070240).

*Corresponding authors. WANG Ying: E-mail: wangxingliang78@163.com; XU Chao-Qian: E-mail: xuchaoqian@ems.hrbmu.edu.cn

效^[1,2]。目前, As₂O₃ 被认为是治疗 APL 首选药物之一^[3,4]。多项研究显示, As₂O₃ 治疗实体瘤作用良好^[5-7]。但在治疗期间 As₂O₃ 的毒副作用限制了其临床应用^[8]。As₂O₃ 可引起心脏传导异常, 应用 As₂O₃ 治疗的患者常见心电图 QTc 间隔延长, 约 11% 的新确诊患者和 40% 的复发 APL 患者应用 As₂O₃ 治疗后会出现 QTc 间隔延长^[9], 有较低几率会发生完全性房室传导阻滞和尖端扭转型室性心律失常, 一旦发生就会危及生命^[10]。As₂O₃ 延长心肌细胞 Ca²⁺ 调节的心肌动作电位平台期, 下调心脏 K⁺ 通道基因 *ether-a-go-go* 表达, 影响心脏复极后期阶段^[11]。研究表明, As₂O₃ 可通过提高血管内皮细胞内活性氧含量诱导细胞凋亡^[12]。砷化物可与一氧化氮结合形成过氧化氢亚硝酸盐, 上调白介素 6 (interleukin 6, IL-6) 等炎症相关因子, 诱发动脉粥样硬化。As₂O₃ 可降低一氧化氮合酶和蛋白激酶 B 活性, 从而降低一氧化氮的生物利用度, 减弱一氧化氮的内皮舒张功能, 诱发血管内皮功能障碍和心血管并发症^[13]。研究显示, As₂O₃ 下调血管内皮细胞之间连接蛋白 (缝隙连接蛋白、紧密连接蛋白等) 表达, 破坏血管内皮的选择通透性和完整性^[14]。血管内皮功能障碍被认为是动脉粥样硬化、血栓形成、高血压和糖尿病性心脏病等一系列心血管疾病发病的关键和始动步骤^[15-17]。因此, 研究 As₂O₃ 血管损伤及其机制可以为改善 As₂O₃ 血管毒性、扩展临床应用提供理论依据和方案。

环状 RNA (circular RNAs, circRNAs) 在哺乳动物中广泛表达且进化上保守, 是真核生物中共价闭合的内源性生物分子, 其发挥功能的机制复杂, 与多种疾病的发生和发展相关^[18-20]: (1) CircRNAs 可作为竞争性内源 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNAs) 结合微小 RNA (microRNAs, miRNAs), 充当 miRNAs 抑制剂 (“海绵”) 从而调控基因表达; (2) CircRNAs 含有蛋白结合位点, 可以作为蛋白海绵, 抑制蛋白的功能; (3) 具有翻译功能的 circRNAs 分子, 可以翻译、编码多肽; (4) 细胞核内的 circRNAs 可能具有调控宿主基因转录的功能。CircRNAs 参与调控多种细胞凋亡^[21]。例如: CircRNAs 调控人晶状体上皮细胞凋亡, circHIPK3 靶向结合 miR-193a 发挥海绵吸附作用, 破坏 α -晶状体蛋白的保护功能, 调控人晶状体上皮细胞凋亡和细胞增殖^[22]; 在 FLT3-ITD 阳性急性髓性白血病中, circRNA-0000370 通过调控 miR-1299 调节 S100 钙结合蛋白

A7A (S100A7A, 是一种先天免疫系统相关蛋白质编码基因) 的表达, 降低白血病细胞活力, 促进细胞凋亡^[23]; 同时 circRNAs 在急性肾炎中也参与调节细胞的凋亡和炎症反应, 过表达的 circRNA-0114427 可以作为吸附海绵与 miR-494 结合, 通过转录激活因子 3、IL-6 抑制急性肾损伤早期细胞的凋亡和炎症反应^[24]。

多项研究证明 circRNAs 可参与调控血管内皮细胞凋亡^[25]。沉默 circRNA-0003645 通过核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 通路减轻氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的血管内皮细胞凋亡^[26]。CircRNA-0124644 作为 miR-149-5p 的分子海绵, 通过海绵吸附 miR-149-5p, 减少其对妊娠相关血浆蛋白 A 的抑制作用, 促进 ox-LDL 诱导的人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 凋亡^[27]。Guo 等人发现, 抑制 circRNA-ANKRD36 表达可能通过靶向上调 miR-127-5p 抑制脂多糖诱导的血管内皮细胞凋亡及氧化应激反应^[28]。

然而, circRNAs 是否参与由 As₂O₃ 诱导的血管内皮损伤有待进一步探究。本课题组针对 C57BL/6 小鼠急性心肌梗死模型的心肌组织, 基于芯片分析筛选出了 3 条异常低表达鼠源 circRNAs (mmu_circRNA_44440、mmu_circRNA_39310 和 mmu_circRNA_002890), 分别对应 3 条人源 circRNAs (hsa_circ_0104326、hsa_circ_0028171 和 hsa_circ_0068728), 这些 circRNAs 在急性心肌梗死中低表达, 提示具有潜在心肌保护作用 (数据未发表), 但 circRNAs 在 As₂O₃ 诱导的血管内皮损伤中是否具有调控作用有待研究。为了解决这一问题, 本研究通过在 As₂O₃ 诱导的 HUVECs 上过表达和敲减 circRNA-0028171, 探索 circRNA-0028171 是否参与调控 As₂O₃ 诱导的血管内皮细胞凋亡过程。

1 材料与方法

1.1 试剂和主要仪器 HUVECs (哈尔滨医科大学药理学实验室)、RPMI-1640 培养基、10% 的胎牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素和 PBS (Biological industries 公司, 以色列)、LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 公司, 美国)、circRNA-0028171 质粒 (莱德盟生物科技有限公司)、si-circRNA-0028171 (锐博生物技术生物有限公司)、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-

2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT, 赛国生物科技有限责任公司]、二甲基亚砷(恒兴化学试剂公司)、TRIzol 和实验用 PCR 引物(Invitrogen)、RNA 逆转录试剂盒和 6 × 蛋白上样缓冲液(全式金生物技术有限公司)、SYBR Green 荧光染料(东洋纺生物科技有限责任公司)、RIPA 高效裂解液(索莱宝科技有限公司)、兔抗人 Bax 多克隆抗体、兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗人 β -actin 多克隆抗体和山羊抗兔 IgG 二抗(Proteintech 公司, 美国)、0.25% 胰酶(碧云天生物技术有限公司)、三氯甲烷(大茂化学试剂)、异丙醇(富宇精细化工有限公司)、As₂O₃(哈尔滨医大药业股份有限公司)、CO₂ 细胞培养箱和 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific 公司, 美国)、摇床(Crystal 公司, 美国)、超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)、低温高速离心机(Sigma 公司)、电泳仪(Biometra GmbH 公司, 德国)、spectraMAX M3 多功能酶标分析仪(Molecular Devices 公司, 美国)、Amersham Imager 600 凝胶成像系统(Cytiva 公司, 美国)、96 孔实时荧光定量 PCR 仪(ABI 公司, 美国)、RNase free 吸头、RNase free EP 管(Axygen 公司, 美国)、K2800 核酸分析仪(北京凯奥)、Agarose(Biowest, 西班牙)、Nucleic Acid Stain 核酸染料(北京鼎国昌盛)、NormalRun™ 250 bp-II DNA ladder(上海捷瑞)、Genesee® II First Strand cDNA Synthesis Kit、Genesee® qPCR SYBR® Green Master Mix(吉赛生物科技)、RNaseR(Epicentre, 美国)、DNA 提取试剂盒(MAGEN 公司, 上海)。

1.2 HUVECs 培养 HUVECs 用 RPMI-1640 完全培养基(含 10% 的胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素)培养, 细胞长满瓶底面积 80%~90% 进行传代, 将需要传代的细胞用 PBS 冲洗 2 次, 弃去 PBS 加入预热的 0.25% 胰酶(含 EDTA) 1 mL 消化 2~3 min, 加入 3 mL RPMI-1640 完全培养基终止消化, 离心弃培养液, 加入新 RPMI-1640 完全培养基吹打均匀传代至新培养瓶中, 所有细胞均在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 选择生长对数期的细胞进行后续实验。

1.3 过表达及敲减 circRNA-0028171 选择生长良好的对数期细胞, 细胞融合度达 70% 时用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂将空载质粒载体、circRNA-0028171 过表达质粒、siRNA-NC(正常对照 siRNA, 无靶基因敲减功能)或 si-circRNA-0028171

转染至 HUVECs 中, 24 h 后进行下一步实验, 严格按照说明书操作。si-circRNA-0028171 靶序列为: 5'-GGATTACAATGAGGTGAAT-3'。

1.4 MTT 法检测细胞活力 向待测 96 孔板每孔加入 20 μ L 新鲜配制的 5 mg/mL MTT 溶液, 并在 37 °C 细胞培养箱中处理 HUVECs 4 h, 然后小心弃去上层培养液, 保留 96 孔板底部沉淀, 向每孔中加入 180 μ L 二甲基亚砷, 室温摇床 10 min 充分溶解沉淀, 使用多功能酶标分析仪在波长 496 nm 处检测吸光度值。

1.5 实时定量 PCR 检测 RNA 表达 将待测 RNA 的细胞使用 TRIzol 提取总 RNA, NanoDrop 2000 测提取 RNA 的浓度及纯度, 使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 使用 96 孔实时荧光定量 PCR 仪检测, SYBR Green 作为荧光染料, 反应条件为: 95 °C 预变性 10 min, 循环程序: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环, 最后 95 °C 延伸 15 s, 结果通过 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析基因相对表达量。所有引物序列见表 1。

1.6 Western blot 分析 用 RIPA 高效裂解液裂解待测细胞, 提取总蛋白, 用 NanoDrop 2000 测蛋白浓度, 将适量 6 × 蛋白上样缓冲液加入收集的蛋白样品中, 在 100 °C 沸水浴中加热 10 min, 使蛋白充分变性。进行分离胶 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 在冰浴条件下 300 mA 1 h 转至硝化纤维素滤膜上, 转膜结束后用快速封闭液进行 10 min 快速封闭, 用抗 Bax (1:5 000)、Bcl-2 (1:1 000) 或 β -actin (1:1 000) 抗体在 4 °C 下摇床孵育过夜, PBST 洗 4 次后孵育山羊抗兔 IgG 抗体 (1:10 000), 常温摇床 1 h, PBST 洗 4 次使用 Amersham Imager 600 凝胶成像系统显影成像。利用 ImageJ 软件计算蛋白条带灰度。以 β -actin 为内参蛋白, 计算各目的蛋白的相对表达量。

1.7 RNase R 实验 RNase R 可消化几乎所有的线性 RNA 分子, 但不易消化 circRNAs, 因此常用于 circRNAs 的富集和鉴定实验。使用 Trizol 提取总 RNA, 用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 用 DNA 提取试剂盒提取细胞基因组 DNA (genomic DNA, gDNA), 与 1 μ L RNase R 37 °C 反应 15 min, 随后 85 °C 3 min 灭活 RNase R 酶活性。分别取 cDNA 和 gDNA 进行 PCR 扩增(引物见表 1), 然后行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析, 所有实验数据均用 mean $\pm$ SD

表1. 实时定量PCR引物序列

Table 1. Primer sequences for real-time quantitative PCR

Gene	Primer
CircRNA-0028171	F: 5'-CTTTGTAATGACTCTGCTTTGGA-3' R: 5'-ATCTTGGTTGACAGCTCGTG-3'
β -actin	F: 5'-GGCGGCACCAACCATGTACCCT-3' R: 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'
Bax	F: 5'-AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT-3' R: 5'-TCCGTGTCCACGTCAGCAATCA-3'
Bcl-2	F: 5'-CCTGTGGATGACTGAGTACCTG-3' R: 5'-AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'
CircRNA-0028171 (divergent primer)	F: 5'-GCTCAGACAAGACTGGTACA-3' R: 5'-CAGAGACAGATTACCTCATTGT-3'
CircRNA-0028171 (convergent primer)	F: 5'-TGCTGCTGGGAAAGCTATGG-3' R: 5'-TGAACCGGGTCATTGAAGTG-3'

表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 后续两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 时认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 As₂O₃ 诱导 HUVECs 凋亡

用不同浓度 (0–15 $\mu\text{mol/L}$) 的 As₂O₃ 孵育 HUVECs 24 h, MTT 检测结果显示, As₂O₃ 对 HUVECs 具有

损伤作用, 10 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 使 HUVECs 活性下降近 50% (图 1A), 因此后续实验选用 10 $\mu\text{mol/L}$ 为给药浓度。用 As₂O₃ 处理 HUVECs 24 h, 通过实时定量 PCR 和 Western blot 检测凋亡相关因子 Bcl-2/Bax mRNA 及蛋白表达水平。结果显示, 与对照组 (不加 As₂O₃) 相比, As₂O₃ 组 Bcl-2/Bax mRNA 比值显著降低 (图 1B, $P < 0.01$), Bcl-2/Bax 蛋白比值显著降低 (图 1C, $P < 0.01$)。用实时定量 PCR 验证

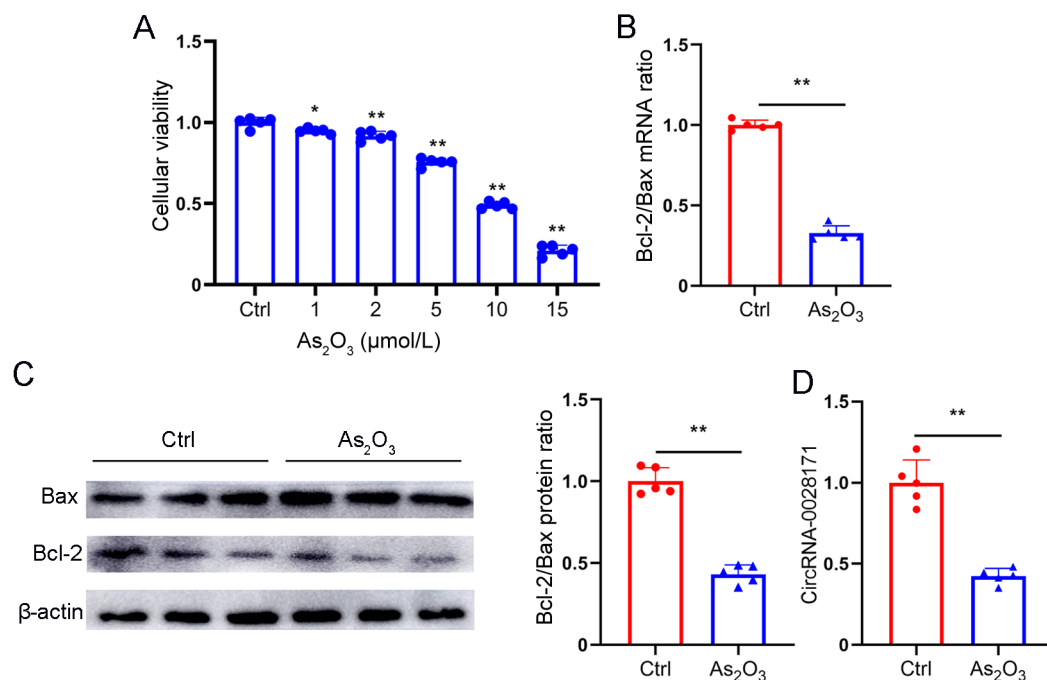


图 1. As₂O₃ 诱导人脐静脉血管内皮细胞凋亡

Fig. 1. As₂O₃ induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). A: Cellular viability tested by MTT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (Ctrl) group. B: Bcl-2/Bax mRNA ratio in HUVECs. C: Bcl-2/Bax protein ratio in HUVECs. D: Expression levels of circRNA-0028171 in HUVECs. Mean $\pm$ SD, $n = 5$. ** $P < 0.01$.

As₂O₃ 孵育后 circRNA-0028171 表达变化,结果显示,与对照组相比,As₂O₃ 组 circRNA-0028171 稳定低表达 (图 1D, $P < 0.01$),以上结果表明 As₂O₃ 诱导 HUVECs 凋亡,且 As₂O₃ 孵育 HUVECs 后 circRNA-0028171 稳定低表达。

2.2 验证circRNA-0028171环状结构

Sanger 测序结果显示 circRNA-0028171 具有环化位点 (图 2A)。RNase R 实验结果显示, circRNA-0028171 发散引物仅在 cDNA 模板中扩增出了 100~250 bp 产物,而在 gDNA 模板中 circRNA-0028171 发散引物未扩增出条带 (图 2B),表明 circRNA-0028171 是一种闭合环状的 RNA 分子,具有首尾相结合的序列。

2.3 过表达circRNA-0028171抑制As₂O₃诱导HUVECs凋亡作用

过表达质粒 circRNA-0028171 转染 HUVECs,

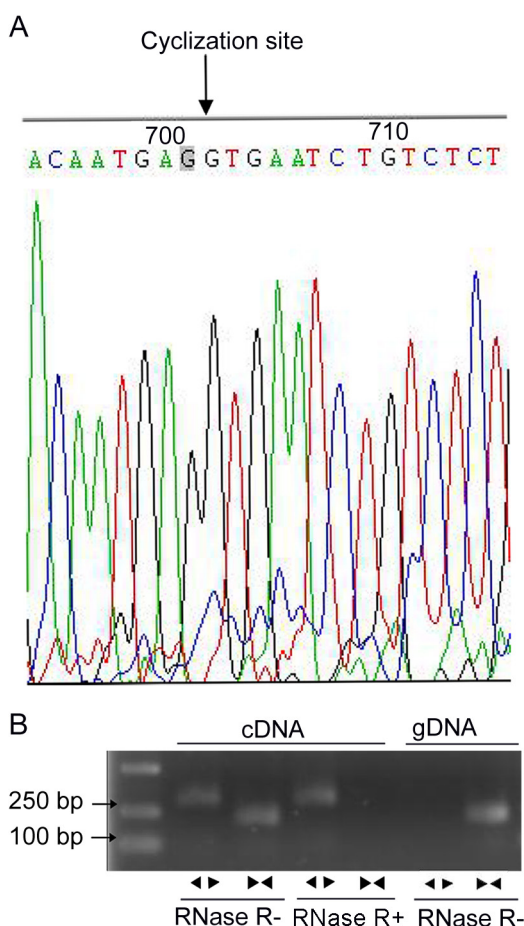


图 2. CircRNA-0028171 环状结构验证

Fig. 2. Verification of ring-shaped structure of circRNA-0028171. A: Cyclic site sequencing. B: RNase R test results showed circRNA-0028171 was circular and stable to RNase R exonuclease. <->: divergent primer; >-<: convergent primer.

48 h 后提取总 RNA, 实时定量 PCR 结果显示, 与空白对照组相比, 过表达 circRNA-0028171 组 circRNA-0028171 的表达量上调 20 倍以上 (图 3A, $P < 0.01$)。

与 Vector 组相比, circRNA-0028171 组细胞活力无显著改变 (图 3B), Bcl-2/Bax mRNA 比值 (图 3C) 和蛋白比值 (图 3D) 也无明显变化。在 HUVECs 中转染过表达质粒 circRNA-0028171 24 h 后加 As₂O₃ 继续培养 24 h, 与 As₂O₃+Vector 组相比, As₂O₃+circRNA-0028171 组细胞活力显著增加 (图 3E, $P < 0.05$), Bcl-2/Bax mRNA 比值 (图 3F, $P < 0.05$) 和 Bcl-2/Bax 蛋白比值 (图 3G, $P < 0.05$) 均显著提高。以上结果提示, 过表达 circRNA-0028171 可抑制 As₂O₃ 诱导 HUVECs 凋亡作用。

2.4 敲减circRNA-0028171加重As₂O₃诱导HUVECs凋亡

选择对数生长期 HUVECs, 转染 si-circRNA-0028171 48 h 后提取总 RNA, 利用实时定量 PCR 检测敲减效率。实时定量 PCR 结果显示, 与 NC 组 (转染 siRNA-NC) 相比, si-circRNA-0028171 组 circRNA-0028171 表达显著下调 (图 4A, $P < 0.05$)。与 NC 组相比, si-circRNA-0028171 组细胞活力无明显变化 (图 4B), Bcl-2/Bax mRNA 比值 (图 4C) 和蛋白比值 (图 4D) 均无明显变化。在 HUVECs 中转染 si-circRNA-0028171 24 h 后加入 As₂O₃ 继续培养 24 h, 结果显示, 与 As₂O₃+NC 组相比, As₂O₃+si-circRNA-0028171 组细胞活力显著下降 (图 4E, $P < 0.05$), Bcl-2/Bax 蛋白比值显著降低 (图 4F, $P < 0.05$)。

3 讨论

研究表明, As₂O₃ 可诱导血管内皮细胞凋亡, 改变血管内皮的通透性和促进炎症反应, 导致多种外周血管疾病的发生, 如脑卒中、动脉粥样硬化等^[15-17]。Bcl-2/Bax 形成二聚体可调控细胞凋亡, Bax/Bcl-2 比值升高代表细胞凋亡增加, 而 Bcl-2/Bax 比值降低则代表细胞凋亡减少^[29, 30]。因此 Bcl-2/Bax 比值可作为判断细胞凋亡的指标。本研究结果显示, As₂O₃ 可显著降低 HUVECs 存活率, 降低 Bcl-2/Bax mRNA 和蛋白比值, 表明 As₂O₃ 可诱导 HUVECs 凋亡, 这与 Cai 等人研究结果一致^[31], 但具体机制有待深入研究。本研究进一步探究了 As₂O₃ 诱导 HUVECs 凋亡机制。

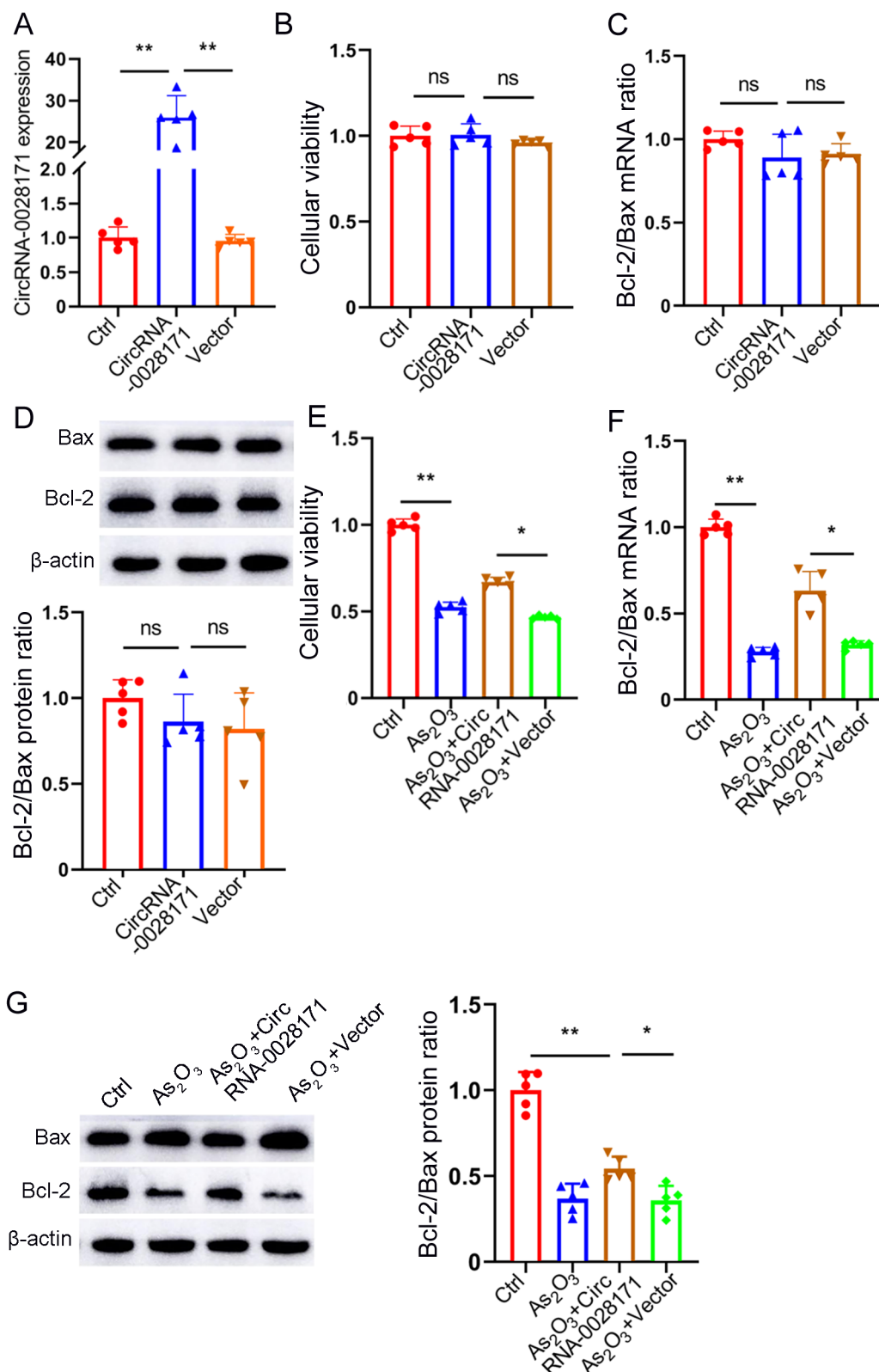


图 3. 过表达circRNA-0028171抑制As₂O₃诱导人脐静脉血管内皮细胞凋亡

Fig. 3. Overexpression of circRNA-0028171 inhibited apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by As₂O₃. A: CircRNA-0028171 expression in HUVECs. B: Cellular viability tested by MTT method. C: Bcl-2/Bax mRNA ratio in HUVECs. D: Bcl-2/Bax protein ratio in HUVECs. E–G: Effects of circRNA-0028171 overexpression on cellular viability (E), Bcl-2/Bax mRNA (F) and protein ratios (G) in HUVECs treated with As₂O₃. Mean ± SD, *n* = 5. **P* < 0.05, ***P* < 0.01. ns, no significance.

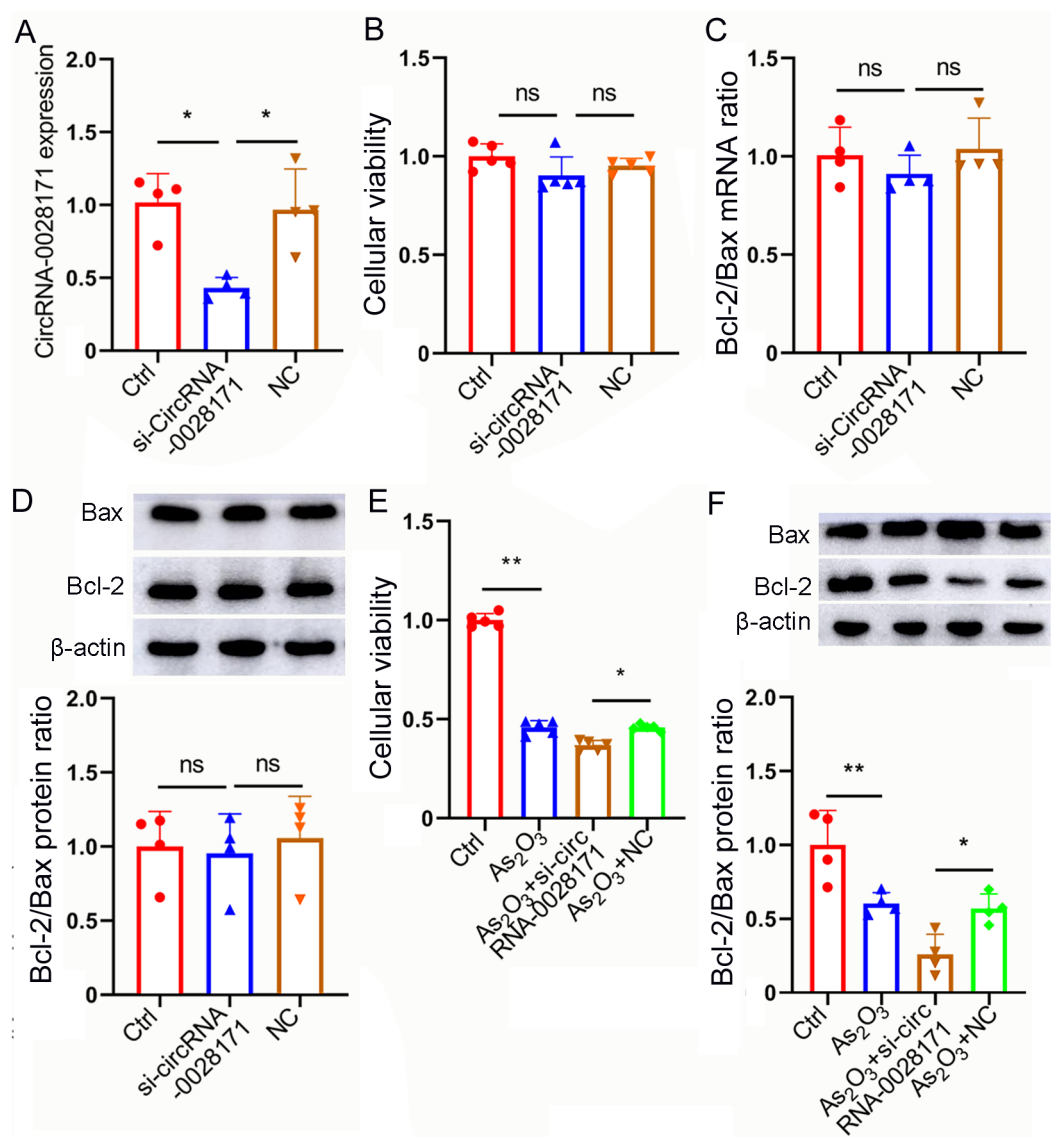


图 4. 敲减circRNA-0028171加重As₂O₃诱导人脐静脉血管内皮细胞凋亡

Fig. 4. Knockdown circRNA-0028171 enhanced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by As₂O₃. A: CircRNA-0028171 expression in HUVECs. $n = 4$. B: Cellular viability tested by MTT method. $n = 5$. C: Bcl-2/Bax mRNA ratio in HUVECs. $n = 4$. D: Bcl-2/Bax protein ratio in HUVECs. Mean $\pm$ SD, $n = 4$. E, F: Effects of circRNA-0028171 knockdown on cellular viability (E) and Bcl-2/Bax protein ratio (F) in HUVECs treated with As₂O₃. Mean $\pm$ SD, $n = 5$ (E) or 4 (F). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ns, no significance.

研究显示, circRNAs 参与调控多种细胞 (包括血管内皮细胞) 凋亡过程^[23-27], 例如: 沉默 circRNA-ZNF609 可促进内皮细胞的迁移和血管形成, 并保护内皮细胞免受氧化应激和缺氧应激的影响^[32]。另有研究显示, 敲减 circRNA-ANRIL 可减少血管内皮细胞的凋亡和炎症因子的表达, 预防冠心病^[33]。过表达 circRNA-ciRS-7 可激活磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B 通路, 抑制 c-Jun 氨基末端激酶 / p38 通路, 从而调控血管内皮细胞的凋亡^[34]。

本研究探究了 circRNA-0028171 对 As₂O₃ 诱导的血管内皮细胞凋亡的调控作用, 结果显示, circRNA-0028171 在 As₂O₃ 处理的 HUVECs 中低表达, 提示 circRNA-0028171 可能参与调控 As₂O₃ 诱导的 HUVECs 凋亡。用过表达质粒和 siRNA 分别过表达及敲减 circRNA-0028171 以验证其功能, 结果显示, 单独过表达 circRNA-0028171 对血管内皮细胞活力无明显影响, 对 Bcl-2/Bax mRNA 和蛋白比值无显著影响, 提示过表达 circRNA-0028171 在生理条件下对

HUVECs 无损伤；而过表达 circRNA-0028171 可抑制由 As_2O_3 诱导的 HUVECs 存活率及 Bcl-2/Bax 比值下降，表明过表达 circRNA-0028171 可抑制 As_2O_3 诱导的 HUVECs 凋亡。在生理条件下敲减 circRNA-0028171 对血管内皮细胞活力及 Bcl-2/Bax 比值无显著影响，提示单独敲减 circRNA-0028171 不能诱导生理条件下的内皮细胞发生凋亡，推测 circRNA-0028171 是在 As_2O_3 孵育的特定环境中发挥调控作用的。多项研究支持该推断，例如：肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 与功能性受体 (TRAIL-R) 结合后，可激活天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 级联反应，产生凋亡信号选择性诱导异常转化的细胞发生凋亡，而对无异常转化正常细胞无影响^[35]。Jin 等人^[36] 研究显示，与野生型 (WT) 对照小鼠相比，*TRAIL-R*^{-/-} 对照小鼠结肠组织凋亡指标无显著变化；加入葡聚糖硫酸钠诱导小鼠结肠炎后，与 WT 结肠炎小鼠相比，*TRAIL-R*^{-/-} 结肠炎小鼠出现炎症的时间更早，且炎症反应更为严重，凋亡指标活性有显著差异。与上述研究一致，本研究结果显示，在 HUVECs 中敲减 circRNA-0028171 可加重 As_2O_3 对细胞活力及 Bcl-2/Bax 的抑制作用，提示 circRNA-0028171 参与调控 As_2O_3 诱导 HUVECs 凋亡。

综上，本研究结果显示 circRNA-0028171 参与调控 As_2O_3 诱导的血管内皮细胞凋亡，不过有待在动物体内进一步验证。在 circRNAs 发挥调控功能的多种机制中，ceRNAs 机制的研究相对较成熟。研究显示，circArhgap12 通过吸附 miR-135a-5p 起到海绵的作用，调节阿霉素对大鼠原代心肌细胞的心脏毒性^[37]。CircRNA-000203 能同时结合乳鼠心室细胞中的 miR-26b-5p、miR-140p-3p，调控 Gata4 表达而加重心肌肥厚^[38]。CircNCX1 作为内源性 miR-133a-3p 海绵，可减少 miR-133a-3p 与促凋亡基因细胞死亡诱导蛋白的结合，促进心肌细胞凋亡^[39]。根据以上研究背景及本研究结果，我们推测在 As_2O_3 诱导的 HUVECs 模型中 circRNA-0028171 可能是通过海绵吸附 miRNAs 参与调控 HUVECs 的凋亡，这个推断有待后续研究进一步验证。

参考文献

- Zhang TD (张亭栋), Zhang PF, Wang SR, Han TY. Preliminary clinical observation on the treatment of 6 cases of leukemia with "Ailing injection". *Heilongjiang Med* (黑龙江医药) 1973; (03): 66–67 (in Chinese).
- Zhang TD (张亭栋), Fu RX. Ailing No.1 injection and treatment based on syndrome differentiation in the treatment of acute granulocytic leukemia. *Heilongjiang Med* (黑龙江医药) 1979; (04): 7–11 (in Chinese).
- Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997; 89(9): 3354–3360.
- Zhang TD, Chen GQ, Wang ZG, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 2001; 20(49): 7146–7153.
- Zhang L, Zhou Y, Kong J, Zhang L, Yuan M, Xian S, Wang Y, Cheng Y, Yang X. Effect of arsenic trioxide on cervical cancer and its mechanisms. *Exp Ther Med* 2020; 20(6): 169.
- Fang Y, Zhang Z. Arsenic trioxide as a novel anti-glioma drug: a review. *Cell Mol Biol Lett* 2020; 25: 44.
- Nasrollahzadeh A, Bashash D, Kabuli M, Zandi Z, Kashani B, Zaghal A, Mousavi SA, Ghaffari SH. Arsenic trioxide and BIBR1532 synergistically inhibit breast cancer cell proliferation through attenuation of NF- κ B signaling pathway. *Life Sci* 2020; 257: 118060.
- Wang QQ, Hua HY, Naranmandura H, Zhu HH. Balance between the toxicity and anticancer activity of arsenic trioxide in treatment of acute promyelocytic leukemia. *Toxicol Appl Pharmacol* 2020; 409: 115299.
- Roboz GJ, Ritchie EK, Carlin RF, Samuel M, Gale L, Provenzano-Gober JL, Curcio TJ, Feldman EJ, Kligfield PD. Prevalence, management, and clinical consequences of QT interval prolongation during treatment with arsenic trioxide. *J Clin Oncol* 2014; 32(33): 3723–3728.
- Chen B, Cao F, Lu X, Shen S, Zhou J, Le XC. Arsenic speciation in hair and nails of acute promyelocytic leukemia (APL) patients undergoing arsenic trioxide treatment. *Talanta* 2018; 184: 446–451.
- Ficker E, Kuryshv YA, Dennis AT, Obejero-Paz C, Wang L, Hawryluk P, Wible BA, Brown AM. Mechanisms of arsenic-induced prolongation of cardiac repolarization. *Mol Pharmacol* 2004; 66(1): 33–44.
- Tsai CL, Tsai CW, Chang WS, Lin JC, Hsia TC, Bau DT. Protective effects of baicalin on arsenic trioxide-induced oxidative damage and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *In Vivo* 2021; 35(1): 155–162.
- Balakumar P, Kaur J. Arsenic exposure and cardiovascular disorders: an overview. *Cardiovasc Toxicol* 2009; 9(4): 169–176.
- Mohammadi Kian M, Mohammadi S, Tavallaei M,

- Chahardouli B, Rostami S, Zahedpanah M, Ghavamzadeh A, Nikbakht M. Inhibitory effects of arsenic trioxide and thalidomide on angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in leukemia cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018; 19(4): 1127–1134.
- 15 Liu D, Wu M, Lu Y, Xian T, Wang Y, Huang B, Zeng G, Huang Q. Protective effects of 6-Gingerol on vascular endothelial cell injury induced by high glucose via activation of PI3K-AKT-eNOS pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 788–795.
 - 16 Liu J, Jiang C, Ma X, Wang J. Notoginsenoside Fc attenuates high glucose-induced vascular endothelial cell injury via upregulation of PPAR- γ in diabetic Sprague-Dawley rats. *Vascul Pharmacol* 2018; 109: 27–35.
 - 17 Deng HF, Wang S, Li L, Zhou Q, Guo WB, Wang XL, Liu MD, Liu K, Xiao XZ. Puerarin prevents vascular endothelial injury through suppression of NF- κ B activation in LPS-challenged human umbilical vein endothelial cells. *Biomed Pharmacother* 2018; 104: 261–267.
 - 18 Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath HT, Orejuela MR, Piechotta M, Levanon EY, Landthaler M, Dieterich C, Rajewsky N. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Rep* 2015; 10(2): 170–177.
 - 19 Kelly S, Greenman C, Cook PR, Papantonis A. Exon skipping is correlated with exon circularization. *J Mol Biol* 2015; 427(15): 2414–2417.
 - 20 Fang Y, Wang X, Li W, Han J, Jin J, Su F, Zhang J, Huang W, Xiao F, Pan Q, Zou L. Screening of circular RNAs and validation of circANKRD36 associated with inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Med* 2018; 42(4): 1865–1874.
 - 21 Qi Y, Han W, Chen D, Zhao J, Bai L, Huang F, Dai Z, Li G, Chen C, Zhang W, Zhang J, Jin B, Wang Y. Engineering circular RNA regulators to specifically promote circular RNA production. *Theranostics* 2021; 11(15): 7322–7336.
 - 22 Liu X, Liu B, Zhou M, Fan F, Yu M, Gao C, Lu Y, Luo Y. Circular RNA HIPK3 regulates human lens epithelial cells proliferation and apoptosis by targeting the miR-193a/CRYAA axis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503(4): 2277–2285.
 - 23 Zhang L, Bu Z, Shen J, Shang L, Chen Y, Wang Y. A novel circular RNA (hsa_circ_0000370) increases cell viability and inhibits apoptosis of FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia cells by regulating miR-1299 and S100A7A. *Biomed Pharmacother* 2020; 122: 109619.
 - 24 Cao Y, Mi X, Zhang D, Wang Z, Zuo Y, Tang W. Transcriptome sequencing of circular RNA reveals a novel circular RNA-hsa_circ_0114427 in the regulation of inflammation in acute kidney injury. *Clin Sci (Lond)* 2020; 134(2): 139–154.
 - 25 Jia C, Zhuge Y, Zhang S, Ni C, Wang L, Wu R, Niu C, Wen Z, Rong X, Qiu H, Chu M. IL-37b alleviates endothelial cell apoptosis and inflammation in Kawasaki disease through IL-1R8 pathway. *Cell Death Dis* 2021; 12(6): 575.
 - 26 Qin M, Wang W, Zhou H, Wang X, Wang F, Wang H. Circular RNA circ_0003645 silencing alleviates inflammation and apoptosis via the NF- κ B pathway in endothelial cells induced by oxLDL. *Gene* 2020; 755: 144900.
 - 27 Wang G, Li Y, Liu Z, Ma X, Li M, Lu Q, Li Y, Lu Z, Niu L, Fan Z, Lei Z. Circular RNA circ_0124644 exacerbates the ox-LDL-induced endothelial injury in human vascular endothelial cells through regulating PAPP-A by acting as a sponge of miR-149-5p. *Mol Cell Biochem* 2020; 471(1–2): 51–61.
 - 28 Guo FB (郭飞波), Wu B. Molecular mechanism of CircRNA-ANKRD36 targeting miR-127-5p to regulate apoptosis and oxidative stress of vascular endothelial cells in sepsis. *Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报)* 2021; 43(9): 1756–1766 (in Chinese).
 - 29 Toscano ECB, Vieira ÉLM, Portela ACDC, Reis JIJ, Caliri MV, Giannetti AV, Gonçalves AP, Siqueira JM, Suemoto CK, Leite REP, Nitrini R, Teixeira AL, Rachid MA. Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy. *Neuropathology* 2019; 39(5): 348–357.
 - 30 Yang Z, Geng Y, Yao Z, Jia H, Bai Y, Wang W. Spatiotemporal expression of Bcl-2/Bax and neural cell apoptosis in the developing lumbosacral spinal cord of rat fetuses with anorectal malformations. *Neurochem Res* 2017; 42(11): 3160–3169.
 - 31 Cai Z, Zhang Y, Zhang Y, Miao X, Li S, Yang H, Ling Q, Hoffmann PR, Huang Z. Use of a mouse model and human umbilical vein endothelial cells to investigate the effect of arsenic exposure on vascular endothelial function and the associated role of calpains. *Environ Health Perspect* 2019; 127(7): 77003.
 - 32 Liu C, Yao MD, Li CP, Shan K, Yang H, Wang JJ, Liu B, Li XM, Yao J, Jiang Q, Yan B. Silencing of circular RNA-ZNF609 ameliorates vascular endothelial dysfunction. *Theranostics* 2017; 7(11): 2863–2877.
 - 33 Song CL, Wang JP, Xue X, Liu N, Zhang XH, Zhao Z, Liu JG, Zhang CP, Piao ZH, Liu Y, Yang YB. Effect of circular ANRIL on the inflammatory response of vascular endothelial cells in a rat model of coronary atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem* 2017; 42(3): 1202–1212.
 - 34 Cui M, Shen W, Qin W, Wang X, Li Y, Xu F, Xin Z. Circular RNA ciRS-7 promotes tube formation in microvascular endothelial cells through downregulation of miR-26a-5p. *J*

- Biochem Mol Toxicol 2020; 34(5): e22468.
- 35 von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(6): 352–366.
- 36 Jin YL (金颖莉), Xia XP, Cao SG, Lin DP, Hu YD, Xia SL, Jiang Y. Effect of TRAIL-R gene knockout on apoptosis of Th17 cells in mice with colitis induced by sodium dextran sulfate. *J Wenzhou Med Univ (温州医科大学学报)* 2020; 50(12): 947–954 (in Chinese).
- 37 Wang X, Cheng Z, Xu J, Feng M, Zhang H, Zhang L, Qian L. Circular RNA Arhgap12 modulates doxorubicin-induced cardiotoxicity by sponging miR-135a-5p. *Life Sci* 2021; 265: 118788.
- 38 Li H, Xu JD, Fang XH, Zhu JN, Yang J, Pan R, Yuan SJ, Zeng N, Yang ZZ, Yang H, Wang XP, Duan JZ, Wang S, Luo JF, Wu SL, Shan ZX. Circular RNA circRNA_000203 aggravates cardiac hypertrophy via suppressing miR-26b-5p and miR-140-3p binding to Gata4. *Cardiovasc Res* 2020; 116(7): 1323–1334.
- 39 Li M, Ding W, Tariq MA, Chang W, Zhang X, Xu W, Hou L, Wang Y, Wang J. A circular transcript of *ncx1* gene mediates ischemic myocardial injury by targeting miR-133a-3p. *Theranostics* 2018; 8(21): 5855–5869.