

circRNA_0076631 通过调控焦亡介导糖尿病视网膜病变的机制研究

张艳艳^{1,2*}, 王彦彦^{1*}, 邵雪丽¹, 易全勇¹, 席亚慧³

引用:张艳艳,王彦彦,邵雪丽,等. circRNA_0076631 通过调控焦亡介导糖尿病视网膜病变的机制研究. 国际眼科杂志, 2025, 25(3):351-358.

基金项目:黑龙江省卫生健康委科研课题(No.2020-142);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(No.2020-KYYWF-1444);宁波市医学科技计划项目(No.2021Y57);宁波市自然科学基金项目(No.2024J244);宁波市鄞州区农社发展科技计划项目{No.鄞科[2022]8号-22}

作者单位:¹(315100)中国浙江省宁波市眼科医院;²(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科;³(725000)中国陕西省安康市中心医院眼科

*:张艳艳和王彦彦对本文贡献一致。

作者简介:张艳艳,女,博士,副主任医师,眼底外科科研副主任,研究方向:眼底病;王彦彦,女,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:易全勇,男,博士,主任医师,眼底外科主任,研究方向:眼底病. yiquanyongteam@163.com;席亚慧,女,硕士,主治医师,研究方向:眼底病. yahuixijy@163.com

收稿日期:2024-08-15 修回日期:2025-02-07

摘要

目的:研究焦亡在糖尿病视网膜病变(DR)发生过程中的作用机制,探索介导DR的环状RNA(circRNA)及其靶向微小RNA(miRNA)调控焦亡的机制,为防治DR提供新靶点、新思路。

方法:建立STZ诱导的SD大鼠1型糖尿病模型。检测糖尿病大鼠视网膜组织中circRNA_0076631、miR-214和焦亡相关因子的表达情况。应用CCK-8、小管样结构形成实验测定不同浓度葡萄糖对人视网膜微血管内皮细胞(HRMECs)的增殖能力及成管能力的影响。通过qRT-PCR、Westernblot检测circRNA_0076631、miR-214和焦亡相关因子(NLRP3、caspase-1和IL-1 β)在HRMECs中的表达,并检测干扰circRNA_0076631后焦亡信号通路因子的表达情况。采用共转染circRNA_0076631抑制剂(ASO-circRNA_0076631)、miR-214过表达转染试剂和miR-214抑制剂(AMO-miR-214)实验进一步明确circRNA_0076631、miR-214、caspase-1三者的作用关系,阐明该通路在DR中的作用机制。

结果:circRNA_0076631及焦亡信号通路因子(NLRP3、caspase-1和IL-1 β) mRNA在糖尿病组视网膜及25 mmol/L葡萄糖干预24 h的HRMECs中异常高表达,而miR-214 mRNA表达降低(均 $P<0.05$)。过表达miR-214后焦亡核心因子caspase-1 mRNA表达降低,抑制miR-214后caspase-1 mRNA表达上调(均 $P<0.05$)。干扰circRNA_0076631后HRMECs中caspase-1 mRNA表达下调($P<0.05$)。联合转染实验发现干扰circRNA_0076631

后caspase-1 mRNA表达被抑制(均 $P<0.05$),但在共转染miR-214抑制剂后caspase-1 mRNA表达增加(均 $P<0.05$)。

结论:circRNA_0076631和焦亡均参与DR的发生,circRNA_0076631可能通过调节miR-214介导焦亡信号通路因子caspase-1表达,从而参与DR的焦亡信号通路,进而影响DR的发生,而circRNA_0076631有望作为一种新的治疗靶点,为防控DR提供新思路。

关键词:circRNA_0076631;糖尿病视网膜病变;微小RNA;半胱氨酸天冬氨酸酶-1;焦亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2025.3.03

Mechanism of circRNA_0076631 mediated diabetic retinopathy by regulating pyroptosis

Zhang Yanyan^{1,2*}, Wang Yanyan^{1*}, Shao Xueli¹, Yi Quanyong¹, Xi Yahui³

Foundation items: Research Project of Health Commission of Heilongjiang Province (No.2020-142); Basic Research Funds for Universities of Heilongjiang Province (No.2020-KYYWF-1444); Ningbo Medical Science and Technology Project (No.2021Y57); Natural Science Foundation of Ningbo (No.2024J244); Ningbo Yinzhou District Agricultural Community Development Science and Technology Project {No.Yin Branch [2022] 8-22}

¹Ningbo Eye Hospital, Ningbo 315100, Zhejiang Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China; ³Ankang Central Hospital, Ankang 725000, Shaanxi Province, China

* Co-first authors: Zhang Yanyan and Wang Yanyan

Correspondence to: Yi Quanyong. Ningbo Eye Hospital, Ningbo 315100, Zhejiang Province, China. yiquanyongteam@163.com; Xi Yahui. Ankang Central Hospital, Ankang 725000, Shaanxi Province, China. yahuixijy@163.com

Received:2024-08-15 Accepted:2025-02-07

Abstract

• AIM: To investigate the role of pyroptosis in the development of diabetic retinopathy (DR) and to explore the regulatory mechanism by which circular RNA (circRNA) and its targeted microRNA (miRNA) mediate pyroptosis in DR, providing new therapeutic targets and strategies for the prevention and treatment of DR.

• METHODS: A streptozotocin (STZ)-induced model of type 1 diabetes in SD rats was established. The expression

of circRNA_0076631, miR-214, and pyroptosis-related factors were measured in retinal tissues. CCK-8 and tube formation assays were used to detect the effect of different concentration of glucose on cell proliferation and angiogenic abilities of human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs). The expression levels of circRNA_0076631, miR-214, and pyroptosis-related markers were evaluated through qRT-PCR and Western blot analysis, with additional experiments conducted following circRNA_0076631 knockdown to assess its effect on pyroptosis markers. Previous bioinformatics analysis and luciferase reporter assays identified a shared binding site among circRNA_0076631, miR-214, and caspase-1. To clarify the interaction between these molecules, co-transfection experiments using circRNA_0076631 inhibitors (ASO-circRNA_0076631), miR-214 overexpression transfection reagent, and miR-214 inhibitors (AMO-miR-214) were conducted to elucidate the regulatory pathway involved in DR.

• **RESULTS:** Both the diabetic rat model and D-glucose-treated HRMECs showed significantly elevated expression of circRNA_0076631 and pyroptosis-related factors (NLRP3, caspase-1, and IL-1 β), while miR-214 expression was reduced (all $P < 0.05$). The mRNA expression of pyroptosis-related factors caspase-1 was reduced after the overexpression of miR-214, and it was upregulated after the inhibition of miR-214 (all $P < 0.05$). Knockdown of circRNA_0076631 reduced the mRNA expression of pyroptosis markers caspase-1 ($P < 0.05$). Co-transfection experiments revealed that the inhibition circRNA_0076631 suppressed pyroptosis (all $P < 0.05$), but this suppression was reversed upon co-transfection with miR-214 inhibitors, leading to increased mRNA expression of the pyroptosis marker caspase-1 (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The circRNA_0076631 and pyroptosis play critical roles in the pathogenesis of DR, and circRNA_0076631 may regulate pyroptosis by modulating miR-214, which in turn influences the expression of caspase-1 in the pyroptosis signaling pathway, thereby contributing to DR progression. The circRNA_0076631 may serve as a novel therapeutic target, providing new insights for the prevention and treatment of DR.

• **KEYWORDS:** circRNA_0076631; diabetic retinopathy; microRNA; cysteine aspartase-1; pyroptosis

Citation: Zhang YY, Wang YY, Shao XL, et al. Mechanism of circRNA_0076631 mediated diabetic retinopathy by regulating pyroptosis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25 (3): 351-358.

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见的微血管并发症^[1]。现有的诊治手段 [包括眼底荧光素血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA)、激光、玻璃体切割术、抗 VEGF 药物等] 因存在诊断滞后、手术创伤及并发症风险、费用昂贵等问题, 增加患者的经济负担^[2]。研究发现, 糖尿病患者 DR 发生前就已出现视网膜血管缺血和形态学改变^[3]。因此, 从源头探索 DR

微血管病变的发生机制, 寻找更及时有效地防治措施尤为重要。非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA) 在人体中执行多种生物学功能, 参与与糖尿病相关并发症的发生、发展过程, 其中环状 RNA (circular RNA, circRNA) 更是受到学者重视, 具有较为稳定的结构, 不易被降解等特点, 使它在基因表达调控中发挥重要作用^[4-5]。其富含微小 RNA (microRNA, miRNA) 结合位点, 可作为 miRNA 的竞争性内源 RNA 来调控下游靶基因的表达^[6-7]。其中, circRNA_0076631 已被证实可以作为 miR-214 的竞争性内源 RNA 调控焦亡信号通路因子表达介导糖尿病大血管并发症的发生^[8]。我们通过前期实验亦证实 miR-214 与 caspase-1 有共结合位点, 然而 circRNA_0076631 是否能通过类似作用介导糖尿病微血管并发症 DR 的发生仍未知。circRNA_0076631 可能通过海绵效应吸附某些与炎症或血管新生相关的 miRNA, 导致这些 miRNA 功能的抑制, 从而影响下游基因的表达, 进一步加重视网膜的损伤和病变^[8]。细胞焦亡是细胞在受到外界刺激后发生的调节性细胞死亡, 是一种促炎性细胞死亡方式。目前已有大量研究证实, DR 与细胞焦亡有着十分密切的关系。当高糖环境刺激视网膜细胞时, NLRP3 炎性小体被激活, 随后促使 caspase-1 活化, 促使炎症因子如 IL-1 β 和 IL-18 等的释放, 从而加重视网膜炎症反应, 促进血管新生和视网膜神经细胞损伤, 最终加重 DR 的病程^[9]。据此, 我们致力于探索介导 DR 的 circRNA 及其靶向 miRNA 作用机制, 为防治 DR 提供新靶点、新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **细胞** 人视网膜微血管内皮细胞 (hRMECs) 购买于南京万木春生物公司 (编号: C1165)。

1.1.2 **动物** 从哈尔滨医科大学动物实验中心购买6周龄的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 体质量约 150 g, 在标准条件下饲养, 并持续提供水和食物。所有研究经伦理委员会批准 (批号: 2018002)。

1.1.3 **主要试剂与仪器** ASO-circRNA_0076631、mimic-miR214、AMO-miR214、对应的阴性对照 (mimic-NC 和 AMO-NC) 均购自于锐博生物公司, XtremeGENE siRNA 转染试剂购自瑞士 Roche 公司, DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 HyClone 公司, 链脉佐菌素 (Streptozotocin, STZ)、葡萄糖购自美国 Sigma 公司, 4% 多聚甲醛、柠檬酸钠缓冲液、SDS-PAGE (7.5% - 10% 聚丙烯酰胺凝胶) 购自北京 Solarbio 公司, 二甲苯、石蜡、无水乙醇、3% H₂O₂ 购自中国 Sinopharm 公司, 一抗 caspase-1 和 NLRP3 购自中国 Bioss 公司, IL-1 β 购自英国 Abcam 公司, 二抗、DAB 显色液购自北京 ZSGB-Bio 公司, BCA 蛋白定量试剂盒购自中国碧云天公司, CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司, TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, Toyobo SYBR qPCR Mix 试剂盒购自日本 Toyobo 公司, 双色预染蛋白 Marker、ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒、PAGE 凝胶制备试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 酶标仪购自美国 Thermo 公司, 显微镜购自日本 Olympus 公司, 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司, ABI7500 FAST PCR 仪器购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组方法及建立模型 60只SD大鼠随机分为糖尿病组30只与对照组30只。糖尿病组大鼠禁食禁水6h后,按60 mg/kg的剂量连续2d腹腔内注射1%链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ),1% STZ于临用前新鲜配制(冰浴条件下,STZ溶于pH=4.5的0.1 mol/L柠檬酸钠缓冲液中)。给药后24h及每周测尾静脉血糖,3次血糖均高于16.7 mmol/L即为1型糖尿病模型建立成功^[10],最终建模成功30只。对照组仅腹腔注射等量柠檬酸钠缓冲液。将两组大鼠(分别30只)进行过量戊巴比妥钠腹腔注射麻醉处死后取材眼球视网膜组织,进行视网膜免疫组化、PCR、Western blot检测,其中PCR针对焦亡信号通路因子、circRNA及miR-214进行mRNA水平检测,而免疫组化、Western blot针对焦亡信号通路因子进行蛋白水平检测。

1.2.2 免疫组织化学法 4%多聚甲醛固定取材眼球组织。50%二甲苯+50%石蜡浸蜡3h后包块。切片3 μm厚度,贴片烤片干燥60℃2h。二甲苯脱蜡切片,无水乙醇中浸泡2次,3% H₂O₂作用10 min, PBS冲洗。乙醇梯度(100%、95%、80%、75%)浸泡,柠檬酸盐(pH=6.0)溶液中高压2 min进行抗原修复。滴加一抗(caspase-1、NLRP3和IL-1β),浓度为1:200,4℃过夜。次日二抗(1:500)室温孵育30 min。DAB显色,苏木素复染,反蓝。脱水封片后,显微镜下观察并拍照大鼠视网膜。

1.2.3 HRMECs 培养及检测 取出冻存的细胞,迅速放入37℃恒温水浴锅中,使冻存细胞快速溶解,在超净台中,将细胞悬液转移至培养瓶中,使用DMEM培养基(含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素),37℃、5% CO₂培养箱中进行培养。取3-6代的细胞进行实验。

1.2.4 CCK-8 实验测定细胞增殖能力 将细胞以1×10⁴密度接种于96孔板并按照实验设计进行干预,用不同浓度(5、25、50 mmol/L)葡萄糖(high glucose, HG)干预6、12、24 h后,按CCK-8试剂盒操作说明,弃去孔内培养液,加入含有10 μL的CCK-8试剂溶液的无血清培养液,避光孵育2h后置于酶标仪检测吸光度值,重复3次后取平均值统计分析。确定有效干预浓度后,正常组采用基础培养基(含5 mmol/L葡萄糖)培养细胞,高糖组采用25 mmol/L葡萄糖浓度的培养液培养细胞。

1.2.5 小管样结构形成实验 将100 μL基质胶加入96孔板,37℃聚合1h,将25 mmol/L葡萄糖干预24h后的HRMECs(4×10⁴)接种于孔板上继续培养,每组设3个复孔,倒置相差显微镜观察、拍照。

1.2.6 细胞转染 按照Lipofectamine RNAiMAX说明书,将细胞转染分组:(1)过表达对照组(HG+mimic-NC):25 mmol/L葡萄糖处理HRMECs细胞转染;阴性过表达对照组(mimic negative control, mimic-NC);(2)miR-214过表达组(HG+mimic-miR-214):25 mmol/L葡萄糖处理HRMECs细胞转染过表达miR-214(mimic-miR-214);(3)抑制剂对照组(AMO-NC):25 mmol/L葡萄糖处理HRMECs细胞转染miRNA阴性抑制剂对照以排除非特异性影响;(4)miR-214抑制剂组(HG+AMO-miR-214):25 mmol/L葡萄糖处理HRMECs细胞转染miR-214抑制剂组。

在高糖环境下进行circRNA_0076631转染实验,分组为:(1)circRNA_0076631抑制剂对照组(HG+ASO-NC):

HRMECs细胞转染circRNA阴性抑制剂对照以排除非特异性影响;(2)circRNA_0076631抑制剂组(HG+ASO-circRNA_0076631):HRMECs细胞转染circRNA_0076631抑制剂组。

进行交叉联合转染circRNA_0076631和miR-214抑制剂,分组为:(1)抑制剂对照组(ASO-NC+AMO-NC):HRMECs细胞转染miRNA和circRNA阴性抑制剂对照以排除非特异性影响;(2)在高糖环境下的抑制剂对照组(HG+ASO-NC+AMO-NC):25 mmol/L葡萄糖处理HRMECs细胞后,转染miRNA和circRNA阴性抑制剂;(3)在高糖环境下的抑制剂对照组(HG+ASO-circRNA_0076631+AMO-NC):高糖环境下HRMECs细胞转染miRNA阴性抑制剂和circRNA_0076631抑制剂;(4)在高糖环境下的抑制剂对照组(HG+ASO-circRNA_0076631+AMO-miR-214):高糖环境下HRMECs细胞转染miR-214抑制剂和circRNA_0076631抑制剂。

转染过程:用25 mmol/L葡萄糖继续培养细胞24h后,将转染复合物加入培养皿中,均匀分布后置于培养箱内(37℃,5% CO₂)培养4-6h。再用新鲜培养基替换,并根据实验要求进行收集细胞样品行PCR、Western blot及CCK-8实验,检测焦亡信号通路因子(如caspase-1、NLRP3、IL-1β)的表达水平及细胞活力。

1.2.7 qRT-PCR 测定 将视网膜组织、葡萄糖培养及转染实验的细胞按照操作流程提取总RNA样品, RNA提取试剂购自TRIzol。逆转录后,应用Toyobo SYBR qPCR Mix试剂盒进行qRT-PCR,检测目标基因(焦亡信号通路因子、circRNA_0076631及miR-214)的表达量,每个样本设立三个平行对照孔,以U6和GAPDH分别作为非编码RNA和焦亡信号通路因子的内参,应用ABI7500 FAST PCR仪器进行PCR反应扩增,反应条件如下:第一步:95℃60s,第二步:95℃15s,60℃15s,72℃15s,共40个循环。反应结束后,样本Ct值采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因相对含量进行结果分析。

1.2.8 Western blot 测定 收集大鼠视网膜组织、葡萄糖培养及转染实验的细胞进行蛋白定量做标准曲线。蛋白样品采用SDS-PAGE(7.5%-10%聚丙烯酰胺凝胶)进行分离,并转移到PVDF膜上。一抗稀释浓度为1:200 caspase-1、NLRP3、IL-1β,4℃孵育过夜。次日用封闭液稀释的HRP标记的二抗孵育膜2h。GAPDH作为内参。

统计学分析:使用GraphPad Prism 7.0软件完成统计学分析和制图。计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较使用LSD-t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立 STZ 诱导的 SD 大鼠糖尿病模型 糖尿病组大鼠出现脂肪和肌肉组织萎缩、多尿、毛发污秽稀疏,部分大鼠出现腹泻。对照组大鼠体质量保持稳定增长,而糖尿病组大鼠体质量增长低于对照组,且随时间延长,体质量呈下降趋势,两组体质量差异有统计学意义(P<0.05)。糖尿病组大鼠血糖均维持在较高水平(>16.7 mmol/L)(图1A-C)。

2.2 糖尿病大鼠视网膜中焦亡信号通路因子和 circRNA_0076631 及 miR-214 的表达情况 自糖尿病组大鼠造模

日起室温常规饮食饲养 6 mo 后取材眼球,通过免疫组化方法检测糖尿病大鼠视网膜组织中焦亡信号通路因子(NLRP3、caspase-1、IL-1 β)的蛋白表达水平(图 1D)。通过 qRT-PCR 发现在糖尿病组大鼠视网膜组织中焦亡信号通路因子、circRNA_0076631 的 mRNA 表达水平较对照组均有不同程度的升高,miR-214 的 mRNA 表达水平较对照组降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$) (图 1E、F)。

2.3 不同浓度葡萄糖培养的 HRMECs 中焦亡信号通路因子的表达情况 使用 5、25、50 mmol/L 的葡萄糖处理 HRMECs 细胞系 6、12、24 h 后,用 CCK-8 试剂盒分析细胞增殖情况。当 25 mmol/L 高糖培养 24 h 后,OD 值降低,

差异有统计学意义($P < 0.05$),细胞增殖受到抑制,且呈剂量依赖性趋势(图 2A)。用 25 mmol/L 葡萄糖(高糖组)孵育 24 h 细胞,以模拟高糖环境,Westernblot 显示经葡萄糖处理的细胞中 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β 的蛋白表达水平也升高(图 2B)。这些结果表明经典途径的焦亡信号通路因子可能与 DR 疾病的发生相关。

2.4 不同浓度葡萄糖培养 HRMECs 小管样结构形成实验情况 随着葡萄糖浓度增加,HRMECs 成管能力减弱(图 2C)。高糖组与对照组相比,焦亡相关因子的 mRNA 表达水平上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图 2D)。qRT-PCR 检测高糖组 circRNA_0076631 mRNA 表达水平升高,而 miR-214 表达水平降低,差异均有统计学意义

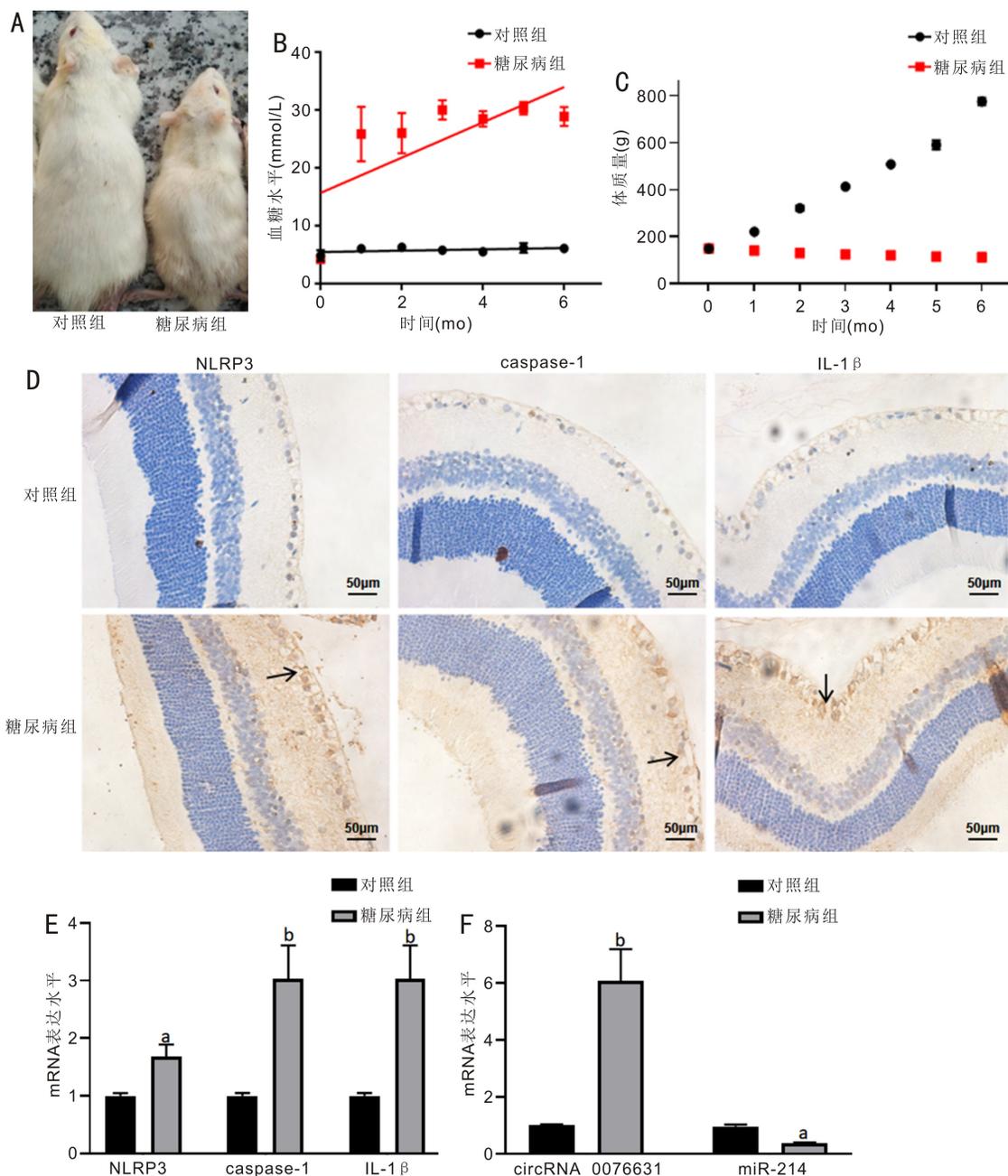


图 1 糖尿病大鼠模型实验结果 A:2次腹腔注射 STZ 后常规饲养 6 mo 两组大鼠的生长状况;B:两组大鼠血糖比较($n=3$);C:两组大鼠体质量比较($n=3$);D:免疫组化检测两组大鼠视网膜组织中 NLRP3 和 caspase-1 及 IL-1 β 的蛋白(箭头所示);E:qRT-PCR 检测两组大鼠视网膜组织中 NLRP3 和 caspase-1 及 IL-1 β 的 mRNA 表达情况;^a $P < 0.05$ vs 对照组;^b $P < 0.01$ vs 对照组;F: qRT-PCR 检测两组大鼠视网膜组织中 circRNA_0076631 和 miR-214 的 mRNA 表达情况;^a $P < 0.05$ vs 对照组;^b $P < 0.01$ vs 对照组。

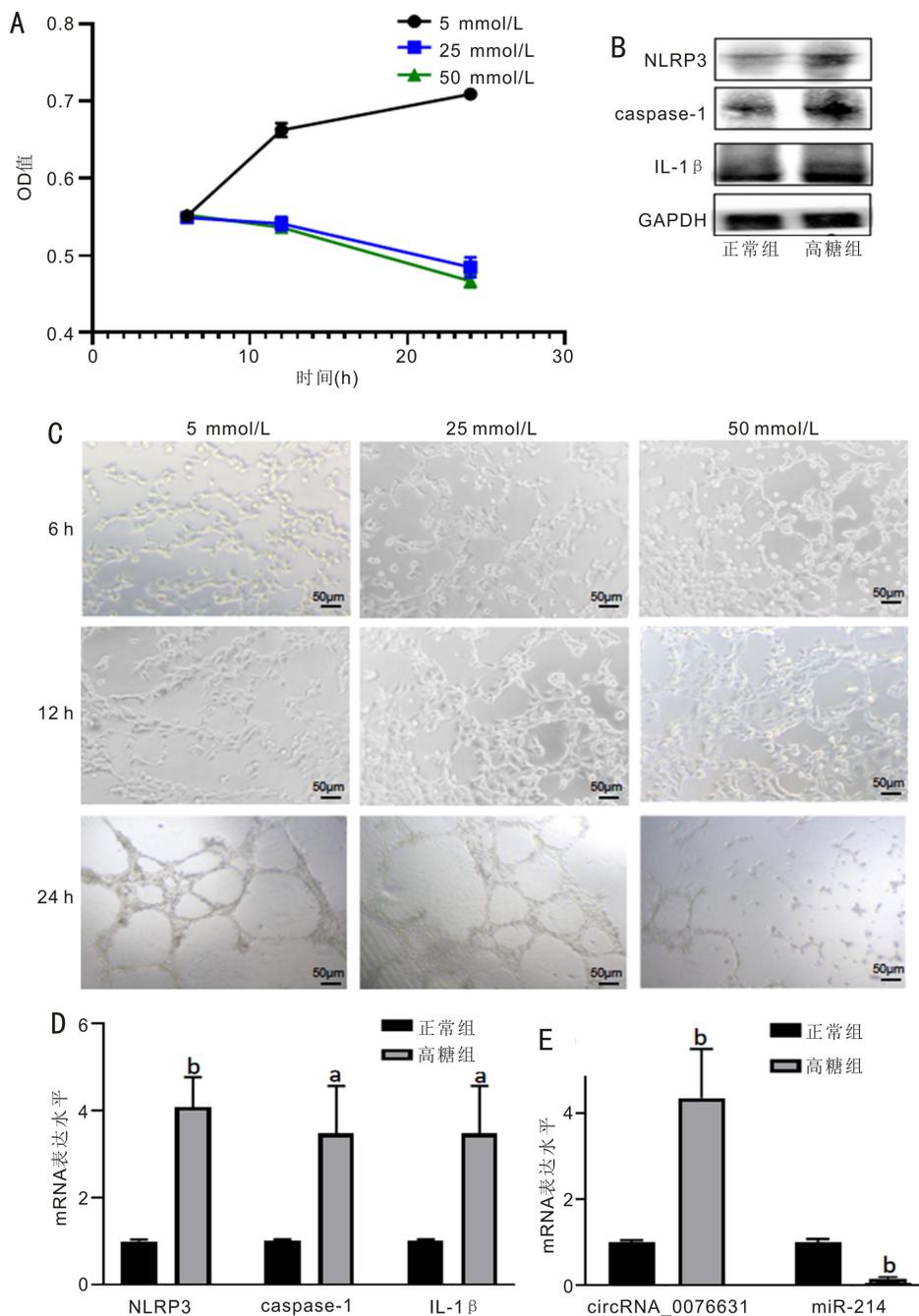


图2 不同浓度葡萄糖培养的 HRMECs 实验结果 A: CCK-8 实验结果; B: Westernblot 检测对照组和高糖组细胞的 NLRP3 和 caspase-1 及 IL-1 β 蛋白表达情况; C: 不同浓度葡萄糖培养 HRMECs 小管样结构形成实验情况; D: qRT-PCR 检测两组细胞中 NLRP3 和 caspase-1 及 IL-1 β 的 mRNA 表达情况; ^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^b $P < 0.01$ vs 正常组; E: qRT-PCR 检测两组细胞中 circRNA_0076631 和 miR-214 的 mRNA 表达情况; ^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^b $P < 0.01$ vs 正常组。

($P < 0.05$, 图 2E)。上述结果表明在体外细胞实验中, circRNA_0076631 和 miR-214 均参与了 DR 的发生, 并且两者呈现相反的作用关系。

2.5 细胞转染实验结果 miR-214 过表达 (mimic-miR-214) 降低 caspase-1 mRNA 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 miR-214 抑制剂 (AMO-miR-214) 则提高 caspase-1 mRNA 的表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3A)。Westernblot 检测 caspase-1 的蛋白表达趋势与之相同 (图 3B)。上述结果表明, miR-214 通过靶向 caspase-1 信号通路在 DR 中发挥负调控作用。转染 circRNA_0076631 特异性抑制剂 ASO-circRNA_0076631 后 caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达水平降低, 差异均有统

计学意义 ($P < 0.05$, 图 3C、D)。结果提示 circRNA_0076631 对焦亡的发生具有促进作用。

在高糖条件下 caspase-1 的 mRNA 表达升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染 circRNA_0076631 特异性抑制剂 ASO-circRNA_0076631 后 caspase-1 mRNA 和蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 联合转染 circRNA_0076631 抑制剂 (ASO-circRNA_0076631) 和 miR-214 抑制剂 (AMO-miR-214) 后 caspase-1 mRNA 表达水平升高, NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3E、F)。这表明 circRNA_0076631 通过靶向 miR-214 上调 caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达, 进而促进焦亡的发生。

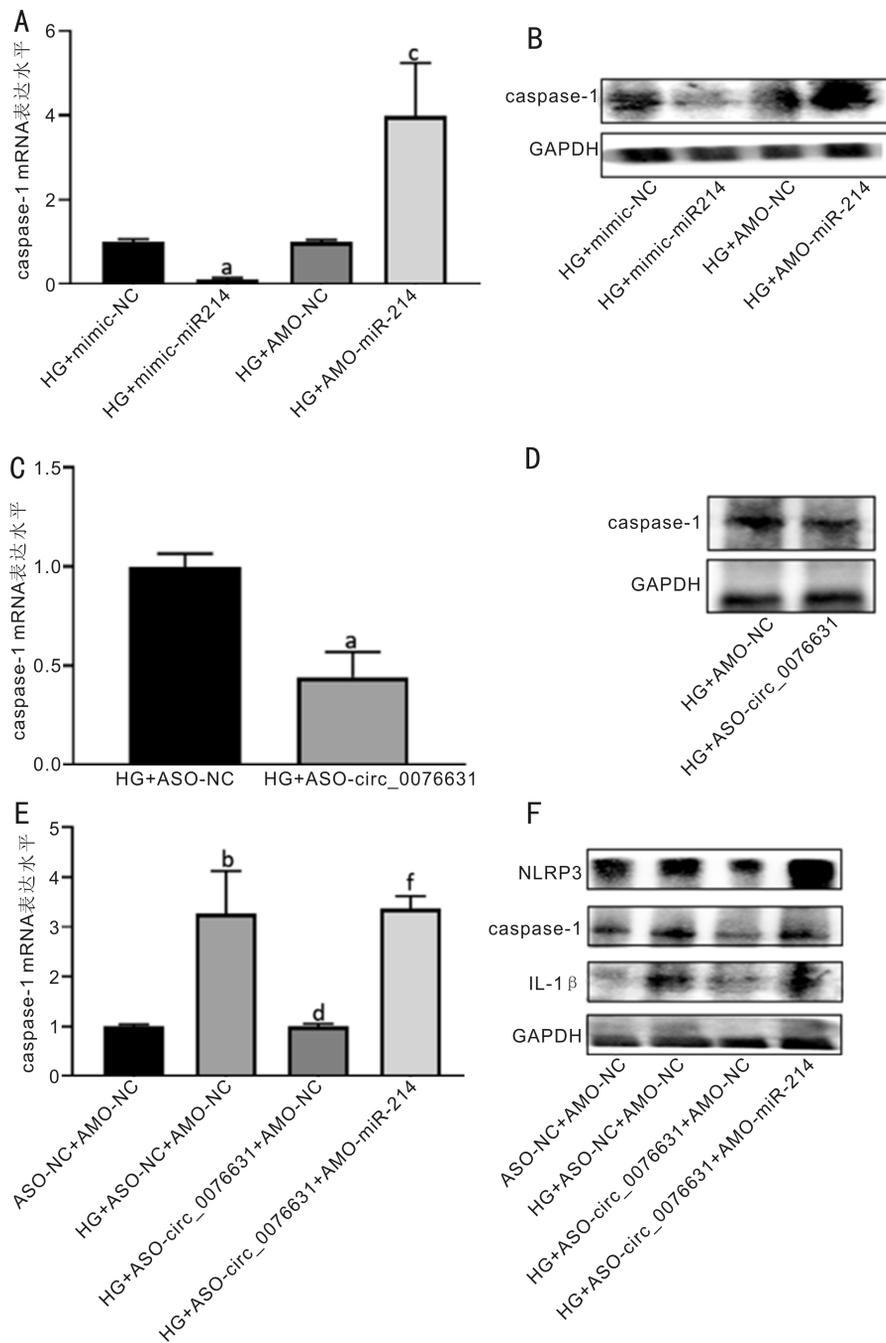


图3 细胞转染实验结果 A:miR-214对高糖组细胞中 caspase-1 mRNA 表达的影响;^a $P<0.05$ vs HG+mimic-NC 组;^c $P<0.05$ vs HG+AMO-NC 组;B:miR-214对高糖组细胞中 caspase-1 蛋白表达的影响;C: circRNA_0076631对高糖组细胞中 caspase-1 mRNA 表达的影响;^a $P<0.05$ vs HG+ASO-NC 组;D:circRNA_0076631对高糖组细胞中 caspase-1 蛋白表达的影响;E:circRNA_0076631和 miR-214对高糖组细胞中 caspase-1 mRNA 的影响;^b $P<0.01$ vs ASO-NC+AMO-NC 组;^d $P<0.01$ vs HG+ASO-NC+AMO-NC 组;^f $P<0.01$ vs HG+ASO-circ_0076631+AMO-NC 组;F:circRNA_0076631和 miR-214对高糖组细胞中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 的蛋白表达的影响。

3 讨论

DR 是糖尿病最常见和严重的并发症之一,是全球主要的致盲性眼病^[11]。DR 严重影响人们的生活质量,然而现有治疗方法常呈滞后性,且治疗过程中存在一定副作用。因此,从机制源头探索 DR 发生机制,寻找更及时有效的防治措施尤为重要。DR 发病机制非常复杂,且其病理改变的内源性基因调控机制尚不清楚。随着后基因组时代的开启,非编码 RNAs(non-coding RNAs, ncRNAs)引起了各个研究领域的极大兴趣。最新研究报告,许多 ncRNA,比如 circRNA 和 miRNA,与糖尿病并发症的发生

相关^[12]。其中,circRNA 在疾病防治领域展现出巨大的应用前景,circRNA 具有高度保守性和组织、时序、疾病特异性,从而有望成为潜在的疾病诊断标志物和治疗靶点^[13]。有研究发现干扰非编码 RNA MALAT1 可减轻糖尿病小鼠视网膜神经变性。然而非编码 RNA 在 DR 中的作用仍有待挖掘^[14]。研究证实焦亡在糖尿病并发症中发挥着重要的作用的调控作用^[15]。在本研究中,我们揭示了 circRNA_0076631 可能通过调节 miR-214 介导 HRMECs 发生焦亡,从而引发 DR。

细胞焦亡是一种伴发细胞质膜孔形成、膜破裂、胞内

炎症因子外释的细胞程序性死亡方式^[16]。研究报道,焦亡参与多种糖尿病并发症的发生^[17-18]。高糖环境诱发氧化应激和视网膜血管内皮细胞的代谢紊乱,导致 NLRP3 炎症小体的激活,促使 caspase-1 的激活,进而导致细胞裂解和炎症因子的释放,如 IL-1 β 和 IL-18 等因子^[19]。在本研究中,我们发现糖尿病大鼠和葡萄糖干预的 HRMECs 细胞中的焦亡信号通路因子 NLRP3、caspase-1、IL-1 β mRNA 和蛋白表达水平均升高,从而推测 DR 中的高糖环境可诱发细胞焦亡的发生。

circRNA 其富含 miRNA 结合位点,可以发挥 ceRNA 作用,作为 miRNA“海绵”来解除对其靶基因的抑制效应^[6]。本项目研究 circRNA_0076631/miR-214/caspase-1 通路在 DR 中的作用机制,并有望将 circRNA 作为与 DR 的新型生物标志物,为 DR 的基因诊断和治疗提供临床早期诊断和治疗的新思路^[20],利用 circRNA_0076631 有望作为早期生物标志物进行 DR 检测。

本研究基于前期生物信息学软件筛选 circRNA、miRNA 及靶基因(焦亡核心因子 caspase-1)并行荧光素酶检测确定了共结合位点,发现 miR-214 与 circRNA_0076631 和 caspase-1 均有结合位点^[8-9],通过 DR 动物模型、葡萄糖干预的细胞模型实验及一系列表型实验包括 CCK-8 实验、小管样结构形成实验、免疫组化、qRT-PCR 和 Westernblot 方法证实葡萄糖对 HRMECs 的促焦亡作用。动物模型及葡萄糖干预的 HRMECs 中检测 circRNA_0076631、miR-214 和 caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达水平。我们发现糖尿病大鼠除了出现脂肪和肌肉组织萎缩、多尿、毛发污秽稀疏、腹泻等宏观上的改变,还在糖尿病大鼠及葡萄糖干预的细胞模型中检测到 circRNA_0076631 和焦亡相关因子 mRNA 表达水平异常增高,而 miR-214 mRNA 表达降低,说明 circRNA_0076631、miR-214 和 caspase-1 参与了 DR 的发生。为了进一步明确三者 DR 中的作用关系,我们又通过共转染细胞实验检测 circRNA_0076631、miR-214 和 caspase-1 作用关系,发现干扰 circRNA_0076631 能够抑制葡萄糖干预的 HRMECs 中 caspase-1 mRNA 和蛋白表达水平,而这一作用被 miR-214 抑制剂 AMO-miR-214 所逆转。说明 circRNA_0076631 可通过抑制 miR-214 激活焦亡信号通路。

综上所述,在本研究中我们揭示了 circRNA_0076631 调控 DR 的新机制,即葡萄糖可诱导 circRNA_0076631 mRNA 表达水平上调,后者与 caspase-1 竞争性结合 miR-214,使得游离 caspase-1 及其前体增多,激活的 caspase-1 促进炎症因子 pro-IL-1 β 成熟化并释放至细胞外,介导 DR 的病理过程(图 4)。揭示 circRNA_0076631 的作用对于理解 DR 的发病机制至关重要,并将有望成为防控 DR 的新型生物标记物,为发掘潜在治疗靶点提供新思路^[21]。

然而,本实验仍有需要完善之处,比如:更稳定的和无细胞毒性的玻璃体腔人工转染剂尚有待挖掘,因此,更高效、更精准、无毒害的动物 RNA 干扰方法仍有待探索和使用。未来将进一步于动物在体转染实验验证该 circRNA 的作用。

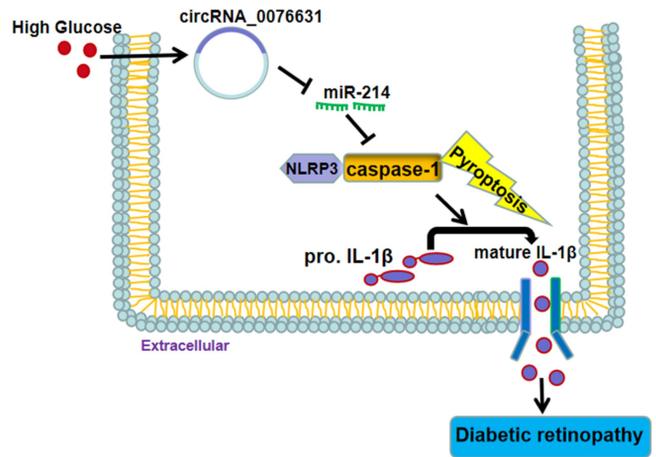


图 4 circRNA_0076631 调控 DR 机制。

利益冲突声明: 本文不存在利益冲突。

作者贡献声明: 张艳艳论文选题与修改,实验(手术)操作,初稿撰写;王彦彦协助选题,初稿撰写;邵雪丽文献检索,数据分析;席亚慧选题指导,数据分析,论文修改;易全勇协助选题,指导实验,论文修改。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

- [1] Tan TE, Wong TY. Diabetic retinopathy: looking forward to 2030. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022,13:1077669.
- [2] Fung TH, Patel B, Wilmot EG, et al. Diabetic retinopathy for the non-ophthalmologist. *Clin Med(Lond)*, 2022,22(2):112-116.
- [3] Li XY, Yu Y, Liu XT, et al. Quantitative analysis of retinal vessel density and thickness changes in diabetes mellitus evaluated using optical coherence tomography angiography: a cross-sectional study. *BMC Ophthalmol*, 2021,21(1):259.
- [4] Yuan Q, Sun YW, Yang F, et al. CircRNA DICAR as a novel endogenous regulator for diabetic cardiomyopathy and diabetic pyroptosis of cardiomyocytes. *Signal Transduct Target Ther*, 2023,8(1):99.
- [5] Wu Q, Liu CL, Shu XW, et al. Mechanistic and therapeutic perspectives of non-coding RNA-modulated apoptotic signaling in diabetic retinopathy. *Cell Biol Toxicol*, 2024,40(1):53.
- [6] Ma BC, Wang SH, Wu WZ, et al. Mechanisms of circRNA/lncRNA-miRNA interactions and applications in disease and drug research. *Biomed Pharmacother*, 2023,162:114672.
- [7] Yang Y, Yujiao W, Fang W, et al. The roles of miRNA, lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis. *Biol Res*, 2020,53(1):40.
- [8] Yang F, Li AQ, Qin Y, et al. A novel circular RNA mediates pyroptosis of diabetic cardiomyopathy by functioning as a competing endogenous RNA. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019,17:636-643.
- [9] Zhang YY, Song Z, Li XR, et al. Long noncoding RNA KCNQ10T1 induces pyroptosis in diabetic corneal endothelial keratopathy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020,318(2):C346-C359.
- [10] Zhou L, Sun HY, Chen GY, et al. Indoxyl sulfate induces retinal microvascular injury via COX-2/PGE₂ activation in diabetic retinopathy. *J Transl Med*, 2024,22(1):870.
- [11] Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*, 2010,376(9735):124-136.
- [12] Xia HQ, Yang JR, Zhang KX, et al. Molecules related to diabetic retinopathy in the vitreous and involved pathways. *Int J Ophthalmol*, 2022,15(7):1180-1189.

[13] Xu YX, Pu SD, Li X, et al. Exosomal ncRNAs: Novel therapeutic target and biomarker for diabetic complications. *Pharmacol Res*, 2022, 178:106135.

[14] Zhang YL, Hu HY, You ZP, et al. Targeting long non-coding RNA MALAT1 alleviates retinal neurodegeneration in diabetic mice. *Int J Ophthalmol*, 2020,13(2):213-219.

[15] Meng LP, Lin H, Huang XX, et al. METTL14 suppresses pyroptosis and diabetic cardiomyopathy by downregulating TINCR lncRNA. *Cell Death Dis*, 2022,13(1):38.

[16] Vasudevan SO, Behl B, Rathinam VA. Pyroptosis - induced inflammation and tissue damage. *Semin Immunol*, 2023,69:101781.

[17] Cao ZH, Huang D, Tang CF, et al. Pyroptosis in diabetes and diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*, 2022,531:188-196.

[18] Mu X, Wu X, He W, et al. Pyroptosis and inflammasomes in diabetic wound healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13:950798.

[19] Park C, Cha HJ, Hwangbo H, et al. β -asarone alleviates high-glucose-induced oxidative damage *via* inhibition of ROS generation and inactivation of the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway in human retinal pigment epithelial cells. *Antioxidants*, 2023,12(7):1410.

[20] Yuan LL, Duan JS, Zhou H. Perspectives of circular RNAs in diabetic complications from biological markers to potential therapeutic targets (Review). *Mol Med Rep*, 2023,28(4):194.

[21] Li J, Li C, Zhao Y, et al. Integrated bioinformatics analysis for novel miRNAs markers and CeRNA network in diabetic retinopathy. *Front Genet*, 2022,13:874885.

2024 版《中国科技期刊引证报告》核心版眼科期刊主要指标及排名 (以综合评价总分为序)

期刊名称	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	2013	2	1.328	1	63.8	1
国际眼科杂志	2806	1	1.125	2	58.2	2
眼科新进展	1208	3	0.826	3	52.7	3
中国眼耳鼻喉科杂志	423	7	0.542	7	40.9	4
中华眼科医学杂志电子版	173	11	0.318	10	32.0	5
中华实验眼科杂志	924	4	0.614	5	30.2	6
中华眼底病杂志	684	6	0.549	6	29.1	7
临床眼科杂志	336	8	0.278	11	23.0	8
中华眼视光学与视觉科学杂志	764	5	0.767	4	22.9	9
眼科	292	9	0.323	9	19.8	10
中国斜视与小儿眼科杂志	236	10	0.385	8	13.4	11

摘编自 2024 版《中国科技期刊引证报告》核心版