

网络出版时间:2024-04-30 10:23:08 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240429.1129.002

过表达环状 RNA HIPK3 抑制大鼠小胶质细胞活化的研究

周玉婷¹, 刘睿¹, 王思雯¹, 胡圳圳², 郑大同^{1,2}

摘要 目的 探讨环状 RNA 同源域相互作用蛋白激酶 3 (circHIPK3) 与大鼠小胶质 (RM) 细胞活化的关系。方法 体外培养 RM 细胞,并随机分为正常组和氧糖剥夺/再灌注 (OGD/R) 组,RT-qPCR 检测各组细胞内 circHIPK3 表达水平。构建具有嘌呤霉素抗性的 circHIPK3 慢病毒载体,设置过表达 (OE) 组和阴性对照 (NC) 组,根据荧光表达强度选择 RM 细胞最佳感染复数 (MOI),采用嘌呤霉素筛选稳定表达 circHIPK3 的 RM 细胞。将 OE 组和 NC 组细胞置于 OGD/R 条件下培养,Western blot 检测各组细胞中小胶质细胞活化标志蛋白钙结合衔接分子 1 (Iba-1)、肿瘤坏死因子受体超家族成员 5 (CD40) 表达水平。通过 circRNADB 数据库分析 circHIPK3 翻译蛋白潜能,利用 circBank 和 Starbase 数据库预测 circHIPK3 潜在结合的微小 RNA (miRNA)。结果 与正常组相比,OGD/R 组 RM 细胞中 circHIPK3 的表达水平显著下调 ($P < 0.0001$)。测序比对结果正确,成功构建 circHIPK3 过表达慢病毒载体。感染 RM 细胞最佳 MOI = 80,以 2 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素筛选得到稳定过表达 circHIPK3 的 RM 细胞。RT-qPCR 结果显示,OE 组细胞中 circHIPK3 表达水平较 NC 组显著增高 ($P < 0.01$)。Western blot 结果显示,在 OGD/R 培养条件下,OE 组细胞中 Iba-1 和 CD40 蛋白表达水平较 NC 组显著降低 ($P < 0.05$)。蛋白翻译分析显示,circHIPK3 具有 2 个内部核糖体进入位点 (IRES) 和 1 个开放阅读框 (ORF),可编码由 404 个氨基酸组成的多肽。miRNA 结合分析显示,circHIPK3 可能与 8 个靶向 miRNAs 结合: hsa-miR-3529-5p、hsa-miR-379-5p、hsa-miR-506-3p、hsa-miR-33、hsa-miR-450b-5p、hsa-miR-551b-3p、hsa-miR-193、hsa-miR-508-3p。结论 过表达 circHIPK3 显著抑制 OGD/R 诱导的 RM 细胞活化,circHIPK3 有编码多肽潜能,可能通过海绵 miRNA 发挥功能。

关键词 circHIPK3; 环状 RNA; 小胶质细胞; 氧糖剥夺/再灌注; 慢病毒

中图分类号 R 722.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0753-08

2023-12-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82371715);南京医科大学第二附属医院 789 人才项目(编号:789ZYRC202080235)

作者单位:南京医科大学第二附属医院¹ 儿童医学中心、² 临床分子检测中心,南京 210003

作者简介:周玉婷,女,硕士研究生;

郑大同,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: dtzheng@njmu.edu.cn

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.002

小胶质细胞是中枢神经系统主要免疫细胞,参与神经损伤修复、炎症反应等生物学环节^[1]。小胶质细胞活化介导的神经炎症是缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 的重要病理基础^[2-3]。因此,深入研究小胶质细胞活化的调节机制对于 HIBD 的防治具有重要意义。

近年来,环状 RNA (circular RNA, circRNA) 可能为阐明小胶质细胞活化的机制提供新思路。circRNA 是通过共价键首尾相接形成的闭环 RNA 分子,具有高度稳定性、组织特异性表达、物种间高度保守等特征,主要功能有海绵 miRNA、编码蛋白等^[4-5]。课题组通过 circRNA 测序发现在氧糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 活化的大鼠小胶质 (rat microglia, RM) 细胞中 circHIPK3 明显下调,提示 circHIPK3 可能参与 OGD/R 诱导的 RM 细胞活化。文献^[6]回顾分析,circHIPK3 在多种疾病中发挥作用,尤其是在肿瘤中,如乳腺癌、骨肉瘤、前列腺癌等。circHIPK3 海绵 miRNA 促进心肌缺血再灌注损伤^[7]。在帕金森病中,circHIPK3 通过调节 miR-124-3p/STAT3/NLRP3 通路来促进神经炎症^[8]。然而,circHIPK3 与 RM 细胞活化的关系目前尚不清楚。因此,该实验通过慢病毒介导的 circHIPK3 感染 RM 细胞,观察过表达 circHIPK3 对 OGD/R 诱导 RM 细胞活化的影响,为进一步研究 HIBD 过程中 RM 细胞活化的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 大鼠小胶质细胞、293T 人胚肾上皮细胞购自北京 BNCC 公司; DNA ladder Marker 购自美国 Fermentas 公司;GV689 载体、Age I/BamH I 内切酶、pHelper 1.0、pHelper 2.0 购自上海吉凯基因化学技术有限公司;引物由上海捷瑞生物合成;琼脂糖购自广州赛百盛公司;Taq polymerase 购自北京 Sino Biological 公司;反转录试剂购自日本 Takara 公司;In-FusionTM PCR Cloning 试剂盒购自美国 Clontech

公司;质粒抽提试剂盒购自美国 Promega 公司;RIPA 裂解液、BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;lba-1、CD40、GAPDH 兔抗体和 HRP 标记山羊抗兔二抗购自武汉 ABclonal 公司;2 × Syber Green qPCR Mix (With 100 × ROX) 购自南京普诺恩生物技术有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生化公司。2720 thermal cycler PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司;positive clone 测序由上海美季生物技术公司完成;TGL-16G-A 高速离心机、ABI3730 测序仪购自美国赛默飞世尔科技公司;DNA 电泳仪购自美国 BioRad 公司;Tino-2500 凝胶成像仪购自上海天能公司。

1.2 构建 OGD/R 模型 生长对数期 RM 细胞接种至 6 孔板,24 h 后 PBS 清洗 2 次,换成无糖培养基(不含胎牛血清)置于 95% CO₂、5% N₂、37 °C 中 4 h 后,PBS 清洗 2 次,换成含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 24 h 后,细胞密度达 90%,TRIzol 法提取 RNA。反转录合成 cDNA 后 PCR:94 °C、2 min;94 °C 30 s、57 °C 30 s、72 °C 30 s,40 个循环;72 °C、5 min;PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。引物见表 1。

表 1 相关引物序列

扩增产物	引物序列(5'-3')
circHIPK3	F: TCGGCCAGTCATGTATCAAA
PCR 引物	R: TTCACACTACAAAAGGCACTTGA
GAPDH	F: CAGTCCAGCCTCCTCTCAT
PCR 引物	R: AGGGGCCATCCACAGTCTCC
circHIPK3	F: CTCGCCACCATCACTTTTGTAGGTATGGCCTCACAA-
酶切引物	GTCTTGGTCTACC
	R: AACTTGGGAAATTCCTTTGTACCTATAGTACCGAG- ATTCTAGATAC
重组质粒	F: CTCGCCACCATCACTTTTGTAGGTATGGCCTCACAA-
鉴定引物	GTCTTGGTCTACC
	R: ACATCACTTTCCAGTTTACC
ACTB	F: GCGGGCACCACCATGTACCCT
qPCR 引物	R: AGGGCCCGACTCGTCATACT
circHIPK3	F: TCGACAGCCATACAGGGTTA
qPCR 引物	R: CTTCGTGGAAGGAAGAGGAT

1.3 重组质粒构建和鉴定

1.3.1 目的基因的全长扩增并插入线性载体 根据 circHIPK3 序列设计合成引物进行 PCR 扩增(表 1),将产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收。GV689 载体中加入限制性内切酶 Age I 和 BamH I,37 °C 反应 3 h。反应体系 10 × CutSmart Buffer 5 μl, GV689 质粒载体 2 μl,内切酶各 1 μl,ddH₂O 补足 50 μl。酶切产物电泳切胶回收。上述线性载体与

扩增基因按照 1 : 2 摩尔比 37 °C 反应 30 min 后,冰水浴中 5 min 后立即转化。10 μl 反应物加入大肠埃希菌 DH5α 中,冰上 30 min;42 °C 热激 90 s,冰水浴 2 min 后加入 LB 培养基,37 °C 摇床孵育 1 h,将菌液均匀涂抹在含嘌呤霉素平板上,37 °C 过夜培养。通过酶切后重组反应,实现体外环化,获得重组质粒。

1.3.2 重组质粒的 PCR 鉴定、测序和抽提 设计合成重组质粒 PCR 引物(表 1),挑取单菌落至提前配制好的 20 μl 反应体系中,其中 2 × Taq Plus Master Mix 10 μl、引物各 0.4 μl 和 ddH₂O 补足,混匀后 PCR 仪反应。上述鉴定出阳性转化子接种于含有嘌呤霉素的 LB 培养基,37 °C 孵育过夜后 DNA 测序,结果与目的基因比对分析。测序正确的菌液进行扩菌培养后质粒抽提,测定浓度用于后续实验。

1.4 慢病毒载体包装及滴度测定 HEK-293T 细胞以含 10% 血清的培养基调整细胞密度为 5 × 10⁶/15 ml 接种于 10 cm 培养皿中,密度达 80% ~ 90% 转染,转染前 2 h 更换为无糖培养基。将获得 GV689-circHIPK3 重组质粒与病毒包装辅助质粒 Helper 1.0 和 Helper 2.0,分别取 20、15、10 μg 与转染试剂混匀,1 ml 反应体系,室温 15 min 后均匀加到培养基中,37 °C 培养 6 h 后,换为 DEME 培养 48 ~ 72 h。根据细胞状态,换液 48 h 后收集转染后细胞上清液,4 °C 10 000 r/min 离心 10 min;过滤上清液于 4 °C 25 000 r/min 离心 2 h,弃上清液加入病毒保存液重悬后,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液保存 -80 °C。

病毒滴度采用荧光定量法。将 293T 细胞按每孔 4 × 10⁴ 个/100 μl 接种至 96 孔板,10 个 EP 管各加入 90 μl 无血清培养基。将待测原液加入第 1 个 EP 管,混匀取 10 μl 加入第二个 EP 管,依次类推。用前述稀释病毒溶液替换 90 μl 培养基 24 h 后,加入 100 μl 培养基,4 d 后观察绿色荧光表达情况。根据公式病毒滴度 = 荧光细胞数/病毒原液量。

1.5 病毒感染复数确定及病毒筛选 RM 细胞属于神经胶质细胞,转染效率不高,采用慢病毒转染并探究其在 RM 细胞中的最佳感染条件。细胞接种于 96 孔板,37 °C、5% CO₂ 下培养,设置 3 个梯度(10/50/80)感染复数(MOI)组,感染 48 h 后,荧光表达丰度较高,荧光显微镜观察感染效率,选择最佳 MOI 为后续感染实验的依据。72 h 后改用 2 μg/ml 嘌呤霉素培养基筛选阳性细胞,通过观察绿色荧光情况,细胞密度达 90%,收集备用。

1.6 circHIPK3 过表达的 RM 细胞 RT-qPCR 鉴定

实验分为 OE 组和 NC 组,其中感染病毒空载体为 NC 组。当细胞密度达 90%,收集 6 孔板中细胞。TRIzol 法提取总 RNA,反转录 cDNA 后进行 RT-qPCR;95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 5 s,共 40 个循环。GAPDH 为内参,2^{-ΔΔCt} 计算基因相对表达量,实验重复 3 次。引物见表 1。

1.7 Western blot 检测 Iba-1 和 CD40 表达

将 OE 组、NC 组细胞置于 OGD/R 下及 Control 组细胞进行培养,RIPA 法提取总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,各取 30 μg 蛋白,12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转、裁膜,TBST 冲洗,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。一抗 4 °C 孵育过夜;Iba-1 (1 : 500)、CD40 (1 : 500)、GAPDH (1 : 5 000)。TBST 漂洗 3 遍,加入 HRP 标记山羊抗兔二抗 (1 : 10 000),室温孵育 1 h,TBST 漂洗 3 遍洗,ECL 化学发光液曝光。使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,GAPDH 作为内参,计算 Iba-1 和 CD 蛋白相对表达值。

1.8 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.5 软件对数据进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有实验均重复 3 次,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 OGD/R 影响 RM 中 circHIPK3 的表达

Divergent 引物用于 PCR 扩增,产物行琼脂糖凝胶电泳 (图 1A)。RT-qPCR 结果显示,经 OGD/R 处理的 RM 细胞中 circHIPK3 表达 (1.014 ± 0.194 5) 较 Control 组 (3.011 ± 0.131 0) 显著下调 (*P* < 0.000 1),见图 1B。

2.2 circHIPK3 过表达慢病毒载体的构建及鉴定

根据 circHIPK3 的全长 1 099 bp 序列,以 Age I 和 BamH I 双酶切连接到 GV689 载体中 (图 2A、2B)。通过 PCR 扩增 circHIPK3 全长序列,行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 1 142 bp 处可见 1 条清晰条带 (图 2C),与预期目的条带大小一致。将构建后的重组质粒 GV689-circHIPK3 经 PCR 鉴定后行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,得到大小为 1 977 bp 的均一条带 (图 3A)。将此条带回收并送测序,测序序列结果与 circular RNA Interactome 数据库中 circHIPK3 序列比对,比对结果一致 (图 3B),符合预期。circHIPK3 是由 HIPK3 基因的第 2 号外显子反向剪接形成,属于外显子环化形成的环状 RNA,Sanger 测序峰图结果验证反向剪接位点的序列,表明该环状 RNA 可正确成环 (图 3C)。

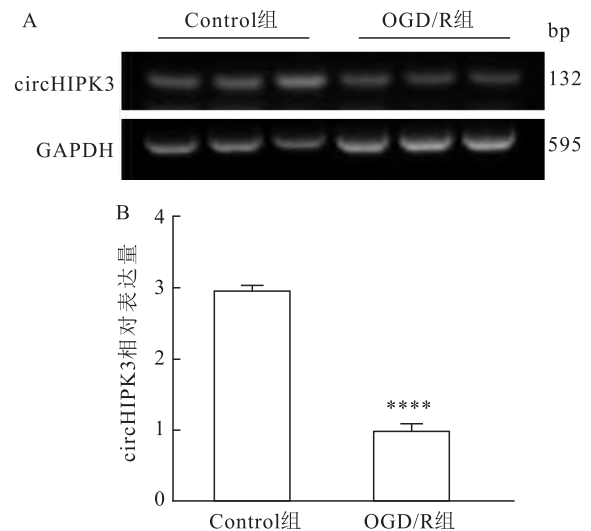


图 1 Control 组和 OGD/R 组的 RM 细胞中 circHIPK3 表达水平
A: PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图; B: RT-qPCR 相对表达量; 与 Control 组比较: **** *P* < 0.000 1

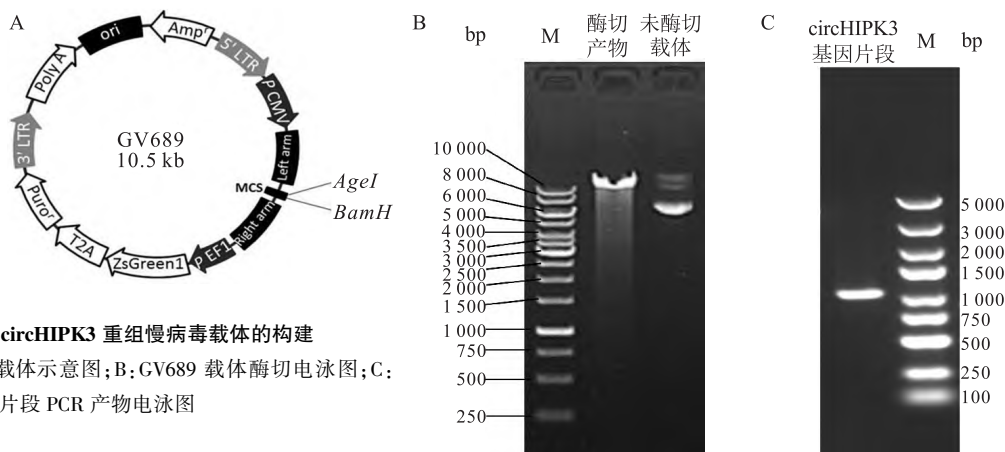


图 2 circHIPK3 重组慢病毒载体的构建
A: GV689 载体示意图; B: GV689 载体酶切电泳图; C: circHIPK3 基因片段 PCR 产物电泳图



图3 重组体 GV689-circHIPK3 的鉴定

A: 重组慢病毒质粒 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图; B: circHIPK3 全长测序结果比对图; C: 环化位点测序图谱及对比序列; 1、2: 阴性对照 (ddH₂O 和空载体对照) 组; 3: 阳性对照 (GAPDH) 组; 4: maker; 5-12: 重组体; query: circHIPK3 全序列或环化序列; subject: 测序序列

2.3 circHIPK3 过表达 RM 细胞效果检测 将构建成功的慢病毒载体与包装质粒共转染 293T 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下观察绿色荧光达 80% 以上(图 4)。采用逐孔稀释法, 根据公式计算, circHIPK3 过表达病毒滴度为 2×10^9 TU/ml, 阴性对照病毒滴度为 5×10^8 TU/ml。收集病毒颗粒感染 RM 细胞, 设立 3 个 MOI: 10、50 和 80。感染 48 h 后, MOI = 80 组荧光表达丰度最高, 感染效率可达 80% 以上(图 5)。接着用嘌呤霉素 ($2 \mu\text{g/ml}$) 筛选细胞 72 h 后, RT-qPCR 结果显示, OE 组 RM 细胞中 circHIPK3 的表达水平 ($1\ 703 \pm 286.8$) 较 NC 组 (1.000 ± 0.041) 显著升高 ($P < 0.01$) (图 6)。

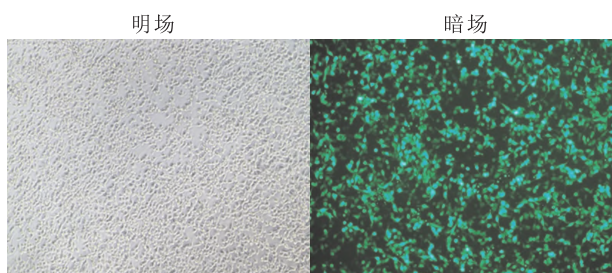


图 4 circHIPK3 慢病毒颗粒包装及感染 293T 细胞效果 $\times 100$

2.4 circHIPK3 过表达对 RM 细胞活化的影响

Western blot 结果(图 7)显示, NC 组 RM 细胞中 Iba-1 和 CD40 蛋白表达水平较 Control 组明显升高 ($F_{\text{Iba-1}} = 13.13, P < 0.01; F_{\text{CD40}} = 10.62, P < 0.01$); 在 OGD/R 条件下, OE 组 RM 细胞中 Iba-1 和 CD40 蛋白表达水平较 NC 组显著降低 ($F_{\text{Iba-1}} = 3.071, P < 0.01; F_{\text{CD40}} = 2.252, P < 0.05$)。

2.5 circHIPK3 翻译蛋白潜能分析 circRNAbd 数据库分析(图 8)显示, circHIPK3 由第 11 号染色体上 HIPK3 基因的第 2 个外显子反向剪接形成, 长度

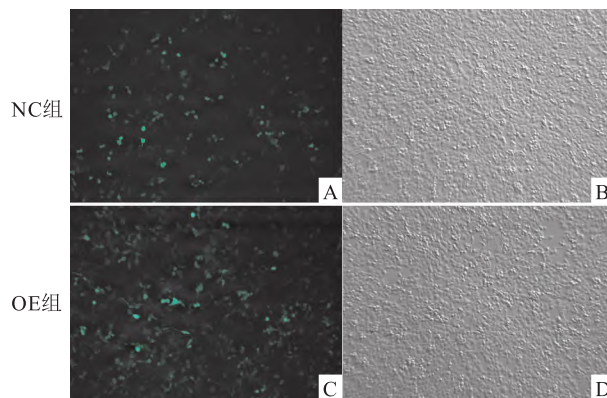


图 5 circHIPK3 慢病毒转染 RM 细胞 48 h 后 GFP 绿色荧光表达情况 $\times 100$
A、C: 暗场; B、D: 明场

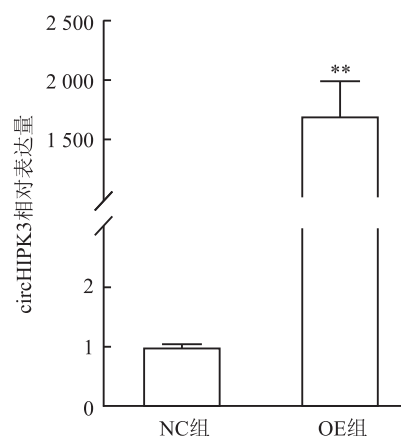


图 6 慢病毒转染 RM 细胞中 circHIPK3 的相对表达量与 NC 组比较: ** $P < 0.01$

1 099 bp。circHIPK3 具有 2 个内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES), 起始和终止位点分别为第 101、801 碱基和 274、974 碱基; 具有一个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 蛋白质翻译起始位点为第 1 051 位核苷酸, 终止位点位于

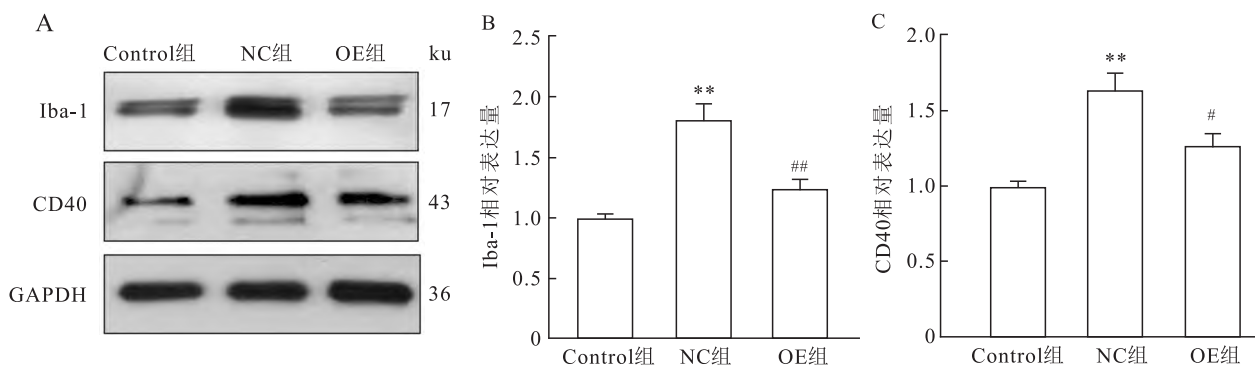


图 7 OGD/R 处理及 circHIPK3 慢病毒转染 RM 细胞对 Iba-1 和 CD40 蛋白表达影响

A: 在 OGD/R 条件下慢病毒转染 RM 细胞后 Iba-1 和 CD40 蛋白印迹图; B: Iba-1 相对表达量; C: CD40 相对表达量; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 条件下 NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

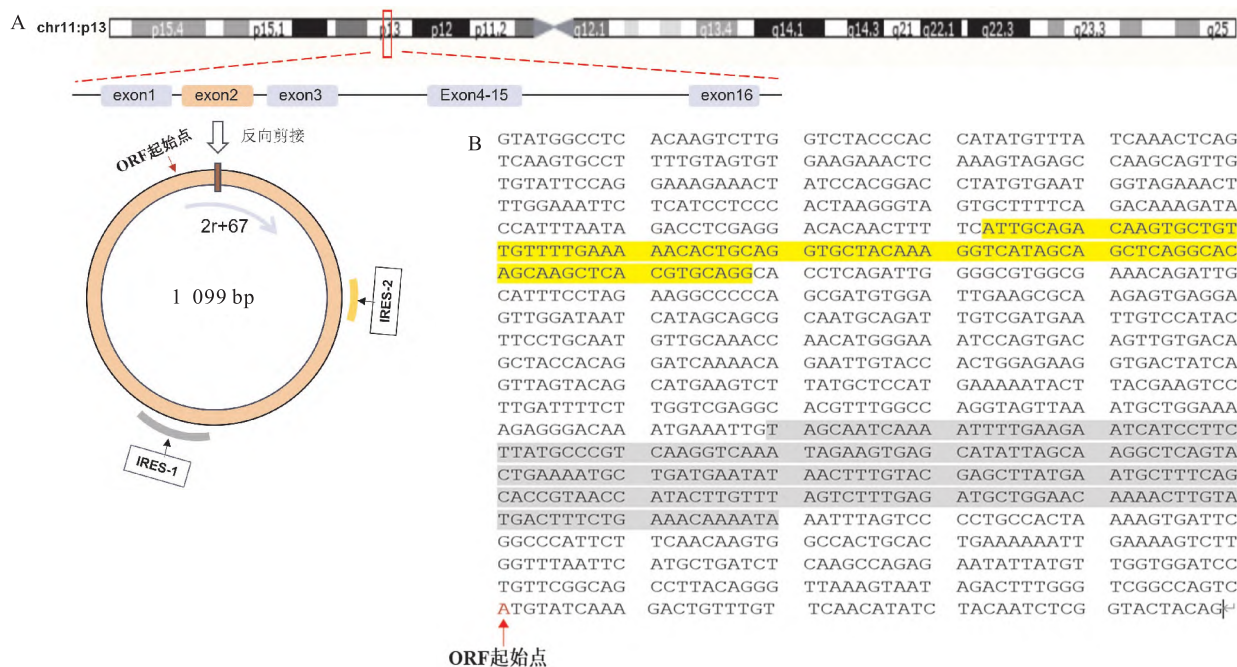


图8 circHIPK3 蛋白翻译潜能分析图

A: circHIPK3 形成及蛋白翻译分析图; B: circHIPK3 的 IRES 位点序列及 ORF 起始位点; 黄色、灰色标注: 预测 2 个 IRES

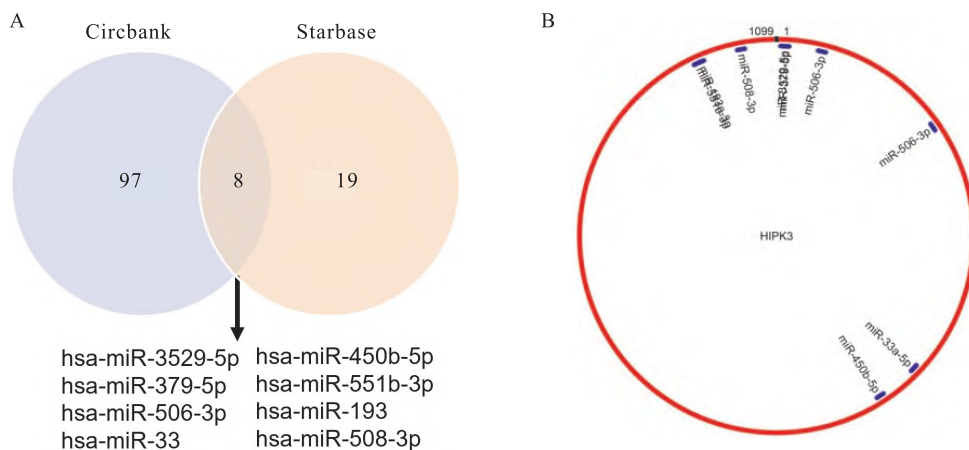


图9 circHIPK3 海绵 miRNA 潜能

A: Circbank 和 Starbase 数据库韦恩图; B: 8 个潜在 miRNAs 与 circHIPK3 可能结合位点图

绕环 2 周后的第 67 个核苷酸(2r + 67), 预测可编码一条含 404 个氨基酸的多肽。

2.6 circHIPK3 海绵 miRNA Circbank 数据库分析显示 circHIPK3 能结合 97 种 miRNAs。Starbase 数据库分析显示 circHIPK3 能结合 19 种 miRNAs。两者交集 miRNAs 共 8 个: hsa-miR-3529-5p、hsa-miR-379-5p、hsa-miR-506-3p、hsa-miR-33、hsa-miR-450b-5p、hsa-miR-551b-3p、hsa-miR-193、hsa-miR-508-3p(图 9A)。通过 circMIR 软件预测 8 个潜在 miRNAs 与 circHIPK3 结合位点(图 9B)。

3 讨论

基于小胶质细胞介导的神经炎症反应在 HIBD 发生和发展中的关键作用, 调控小胶质细胞活化已成为 HIBD 防治的研究热点。研究^[9]表明 circRNAs 参与了缺氧缺血诱导的脑损伤, 干预 circRNA 对于 HIBD 的防治具有潜在的应用价值。目前关于 circRNAs 参与小胶质细胞活化调控的报道较少, 因此, 该研究在前期 circRNAs 测序筛选的与小胶质细胞活化相关的 circRNAs 中, 最先关注了来源于 HIPK3

基因的 circHIPK3,并通过 PCR 首次证实了其在活化的 RM 细胞中呈低表达。

慢病毒是体内外表达外源基因的常用载体之一,具有设计灵活、感染细胞种类广泛、表达稳定及便于精确调节转基因表达等优点。基于其优势构建了 circHIPK3 过表达慢病毒载体。经过对 circHIPK3 全长序列的扩增及测序验证,成功构建了过表达 circHIPK3 慢病毒载体,并在 HEK293T 细胞中高效表达。在确定 circHIPK3 成功过表达后,进一步将 circHIPK3 过表达载体和空载体感染 RM 细胞,研究其对小胶质细胞活化的影响。RT-qPCR 结果显示,过表达 circHIPK3 显著抑制 OGD/R 诱导的 RM 细胞活化。

circRNA 目前最常见的作用机制是作为 miRNA 海绵吸附体,通过 Argonaute2 (AGO2) 蛋白与 miRNA 竞争性结合,调控基因表达^[10]。circHIPK3 作为一种重要的促癌因子,前期研究主要集中在肿瘤领域。circHIPK3 的异常表达与脑疾病的发生发展密切相关。Chen et al^[11] 研究表明,circHIPK3 高表达于大脑中动脉闭塞诱发的小鼠缺血性脑组织中,通过海绵 miR-148b-3p,上调 CDK5、下调 SIRT1,促进血管内皮细胞凋亡和线粒体功能紊乱。Zhao et al^[12] 的研究显示,在体内外脊髓损伤模型中,circHIPK3 通过 miR-588/DPYSL5 轴减轻神经元凋亡。但 circHIPK3 是否通过海绵吸附 miRNA 抑制小胶质细胞活化尚不清楚。利用生物信息学分析显示 circHIPK3 潜在结合的 miRNAs 共有 8 个,故推测 circHIPK3 可能通过海绵其中某个 miRNA 调控下游靶基因,从而抑制小胶质细胞活化。此外,有研究^[13]表明 circRNA 也可通过编码蛋白发挥生物学功能,但主要集中在肿瘤研究领域,在 HIBD 中尚未见相关报道。生物信息学分析显示,circHIPK3 具有编码蛋白的潜能。因此,课题组将进一步证实 circHIPK3 蛋白翻译能力并探究其是否通过海绵 miRNA 或翻译蛋白抑制小胶质细胞活化。

该研究结果显示,OGD/R 下调 RM 细胞中 circHIPK3 的表达,circHIPK3 过表达慢病毒载体显著抑制 OGD/R 诱导的 RM 细胞活化,为后续研究 circHIPK3 的功能和机制奠定了基础。该研究预测了 circHIPK3 具有潜在的翻译蛋白能力以及作为 miRNA 海绵的相关功能,其通过何种机制抑制小胶质

细胞活化仍需相关实验进行研究。

参考文献

- [1] Kwon H S, Koh S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1):42.
- [2] Serdar M, Kempe K, Rizazad M, et al. Early pro-inflammatory microglia activation after inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 237.
- [3] Bernis M E, Schleeuber Y, Zweyer M, et al. Temporal characterization of microglia-associated pro- and anti-inflammatory genes in a neonatal inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury model [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:2479626.
- [4] Yang M, Wang W, Wang L, et al. Circ_0001052 promotes cardiac hypertrophy via elevating HIPK3 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15(4):1025-38.
- [5] Wen S Y, Qadir J, Yang B B. Circular RNA translation: Novel protein isoforms and clinical significance [J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28(5):405-20.
- [6] Wen J, Liao J, Liang J, et al. Circular RNA HIPK3: A key circular RNA in a variety of human cancers [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 773.
- [7] Qiu Z, Wang Y, Liu W, et al. CircHIPK3 regulates the autophagy and apoptosis of hypoxia/reoxygenation-stimulated cardiomyocytes via the miR-20b-5p/ATG7 axis [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1):64.
- [8] Zhang Y J, Zhu W K, Qi F Y, et al. circHIPK3 promotes neuroinflammation through regulation of the miR-124-3p/STAT3/NLRP3 signaling pathway in Parkinson's disease [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2023, 32(3):315-29.
- [9] Zhu H, Xing Z, Zhao Y, et al. The role of circular RNAs in brain injury [J]. *Neuroscience*, 2020, 428:50-9.
- [10] Hansen T B, Wiklund E D, Bramsen J B, et al. MiRNA-dependent gene silencing involving ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA [J]. *EMBO J*, 2011, 30(21):4414-22.
- [11] Chen G, Shan X, Li L, et al. CircHIPK3 regulates apoptosis and mitochondrial dysfunction induced by ischemic stroke in mice by sponging miR-148b-3p via CDK5R1/SIRT1 [J]. *Exp Neurol*, 2022, 355:114115.
- [12] Zhao J, Qi X, Bai J, et al. A circRNA derived from linear HIPK3 relieves the neuronal cell apoptosis in spinal cord injury via ceRNA pattern [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 528(2):359-67.
- [13] Lei M, Zheng G, Ning Q, et al. Translation and functional roles of circular RNAs in human cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 30.

Overexpression of circular RNA HIPK3 prevents activation of rat microglia

Zhou Yuting¹, Liu Rui¹, Wang Siwen¹, Hu Zhenzhen², Zheng Datong^{1,2}

(¹Children's Medical Center, ²Clinical Molecular Diagnostic Center,

The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003)

Abstract Objective To investigate the relationship between circular RNA homeodomain interacting protein kinase 3 (circHIPK3) and the activation of rat microglia (RM) cells. **Methods** *In vitro*, RM cells were cultured and randomized into normal and oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) groups, and the expression level of circHIPK3 in each group was detected by RT-qPCR. The circHIPK3 lentiviral vector with puromycin resistance was constructed, and the overexpression (OE) group and negative control (NC) group were set up. The optimal multiplicity of infection (MOI) for RM cells was determined based on fluorescence expression, and puromycin was used to screen RM cells stably expressing circHIPK3. The cells of OE and NC groups were treated with OGD/R, and the expression levels of ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) and eukaryotic tumor necrosis factor receptor superfamily (CD40) were detected by Western blot. The circHIPK3 translational protein potential was analyzed by the circRNAdb database, while the potential binding microRNAs on circHIPK3 were predicted by circBank and Starbase databases. **Results** OGD/R down-regulated circHIPK3 in RM cells ($P < 0.0001$). The sequencing results were accurate and the lentiviral vector of circHIPK3 was constructed successfully. The optimal MOI of RM cells was 80, puromycin at a concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was used to screen RM cell lines stably expressing circHIPK3. RT-qPCR results showed that the expression level of circHIPK3 was significantly higher in the OE group compared with the NC group ($P < 0.01$). Western blot results revealed that the expression levels of Iba-1 and CD40 in the OE group were markedly lower than those in the NC group ($P < 0.05$). Protein translation analysis showed that circHIPK3 encoded a polypeptide of 404 amino acids with two internal ribosome entry sites (IRES) and an open reading frame (ORF). Database analysis uncovered that circHIPK3 could target eight specific miRNAs, namely hsa-miR-3529-5p, hsa-miR-379-5p, hsa-miR-506-3p, hsa-miR-33, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-551b-3p, hsa-miR-193, and hsa-miR-508-3p. **Conclusion** The overexpression of circHIPK3 effectively suppresses OGD/R-induced activation of RM cells. It has the potential to encode peptides and may act as a miRNA sponge. These findings provide a foundation for further study of circHIPK3 functions.

Key words circHIPK3; circular RNA; microglia; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; *Lentivirus*

(上接第 752 页)

genes were upregulated and 2 799 genes were downregulated in cisplatin-treated HK-2 cells. GO and KEGG analysis showed that differential genes were enriched in energy metabolism. The GSEA analysis results showed that cisplatin caused an upregulation of the oxidative phosphorylation pathway and a downregulation of the glycolysis pathway in renal tubular epithelial cells, further KEGG analysis demonstrated that cisplatin caused changes in the expression of amino acid genes in renal cells. Metabolomics showed that the contents of glycolytic intermediates and several amino acids were altered in the kidney of cisplatin-treated mice. **Conclusion** Cisplatin-induced acute renal injury is accompanied by modification in renal tubular cell glycolysis and amino acid metabolism.

Key words cisplatin; acute kidney injury; cellular metabolism; glycolysis; amino acid metabolism