

文章编号:1003-2754(2022)06-0503-07

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbz.2022.0129

Circ_HECTD1 调节 miR-135a-5p/TP53INP1 轴对 OGD/R 诱导的海马神经元损伤的影响

逯 琴, 张文敏, 赵 敏

摘要: 目的 通过进行体外氧葡萄糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导海马神经元损伤,观察环状 RNA 含 HECT 结构域的 E3 泛素连接酶 1 (Circ_HECTD1) 对 HT22 细胞增殖、凋亡的影响以及对微小 RNA-135a-5p (miR-135a-5p)/肿瘤蛋白 53 诱导型核蛋白 1 (TP53INP1) 轴的调控机制。方法 常规培养 HT22 细胞,将细胞分为 Con 组、OGD/R 组、si-NC 组、si-Circ_HECTD1 组、miR-NC 组、miR-135a-5p 组、si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC 组、si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p 组。qRT-PCR 法检测 Circ_HECTD1、miR-135a-5p、TP53INP1 mRNA 表达;MTT 检测细胞活性;流式细胞术检测细胞凋亡;双荧光素酶报告基因实验验证 Circ_HECTD1 与 miR-135a-5p、miR-135a-5p 与 TP53INP1 的靶向关系;Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、TP53INP1 蛋白表达。结果 OGD/R 诱导后 HT22 细胞中 Circ_HECTD1 与 TP53INP1 表达上调,miR-135a-5p 表达下调,细胞存活率和 Bcl-2 蛋白表达显著下降,凋亡率和 Bax 蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$)。沉默 Circ_HECTD1 表达能够显著上调 OGD/R 诱导的 HT22 细胞中 miR-135a-5p 表达,下调 TP53INP1 表达,提高细胞存活率和 Bcl-2 蛋白表达,降低细胞凋亡率和 Bax 蛋白表达(均 $P < 0.05$)。Circ_HECTD1 与 miR-135a-5p、miR-135a-5p 与 TP53INP1 之间均存在靶向关系。过表达 miR-135a-5p 能够显著下调 TP53INP1 表达,提高细胞存活率、Bcl-2 蛋白表达,降低细胞凋亡率、Bax 蛋白表达(均 $P < 0.05$)。而抑制 miR-135a-5p 表达能够部分逆转沉默 Circ_HECTD1 对 HT22 细胞损伤的保护作用。结论 沉默 Circ_HECTD1 可通过调节 miR-135a-5p/TP53INP1 轴,促进细胞存活,抑制细胞凋亡,保护 OGD/R 诱导的海马神经元损伤。

关键词: 环状 RNA 含 HECT 结构域的 E3 泛素连接酶 1; 微小 RNA-135a-5p; 肿瘤蛋白 53 诱导型核蛋白 1; 氧葡萄糖剥夺/复氧; 海马神经元

中图分类号:R285.5 文献标识码:A

Influence of Circ_HECTD1 on OGD/R-induced hippocampal neuronal damage by regulating the miR-135a-5p/TP53INP1 axis LU Qin, ZHANG Wenmin, ZHAO Min. (Department of Neurology, Linfen People's Hospital, Linfen 041000, China)

Abstract: **Objective** To observe the influences of circular RNA HECT domain E3 ubiquitin ligase 1 (Circ_HECTD1) on the proliferation and apoptosis of HT22 cells and its regulatory mechanism on the microRNA-135a-5p (miR-135a-5p)/tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) axis by in vitro oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced hippocampal neuron damage. **Methods** HT22 cells were routinely cultured, and the cells were separated into Con group, OGD/R group, si-NC group, and si-Circ_HECTD1 group, miR-NC group, miR-135a-5p group, si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC group, and si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p group. qRT-PCR method was used to detect the expression of Circ_HECTD1, miR-135a-5p and TP53INP1 mRNA; MTT was used to detect cell viability; flow cytometry was used to detect apoptosis; dual-luciferase reporter gene experiment was applied to verify the targeting relationship between Circ_HECTD1 and miR-135a-5p, miR-135a-5p and TP53INP1; Western blot was applied to measure the protein expressions of Bax, Bcl-2 and TP53INP1. **Results** After OGD/R induction, the expressions of Circ_HECTD1 and TP53INP1 in HT22 cells were up-regulated, the expression of miR-135a-5p was down-regulated, the cell survival rate and the expression of Bcl-2 protein were remarkably decreased, the apoptosis rate and the expression of Bax protein were remarkably increased (all $P < 0.05$). Silencing the expression of Circ_HECTD1 could remarkably up-regulate the expression of miR-135a-5p in OGD/R-induced HT22 cells, down-regulate the expression of TP53INP1, increase cell survival rate and Bax protein expression, decrease cell apoptosis rate and Bcl-2 protein expression (all $P < 0.05$). There was a targeting relationship between Circ_HECTD1 and miR-135a-5p, between miR-135a-5p and TP53INP1. Overexpression of miR-135a-5p could remarkably down-regulate the expression of TP53INP1, increase cell survival rate and Bcl-2 protein expression, decrease cell apoptosis rate and Bax protein expression (all $P < 0.05$). Inhibition of miR-135a-5p expression could partially reverse the protective effect of silencing Circ_HECTD1 on HT22 cell damage. **Conclusion** Silencing Circ_HECTD1 can regulate the miR-135a-5p/TP53INP1 axis and promote cell survival, inhibit cell apoptosis, and protect against OGD/R-induced hippocampal neuron damage.

Key words: Circular RNA HECT domain E3 ubiquitin ligase 1; MicroRNA-135a-5p; Tumor protein 53-induced nuclear protein 1; Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; Hippocampal neurons

脑卒中是一种严重的心脑血管疾病,主要包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中主要表现为脑血管破裂或阻塞导致血流量减少,引起神经功能受损,最终导致脑部病变,发病率、致死

收稿日期:2022-04-20;修订日期:2022-05-30

作者单位:(临汾市人民医院神经内科,山西 临汾 041000)

通讯作者:赵 敏, E-mail:zhaominys@163.com

致残率均极高^[1,2]。缺血性脑卒中的发生机制复杂,多种因素导致神经元损伤与凋亡,如代谢异常、氧化应激及钙离子超载等^[3],目前临床上对于脑卒中仍缺少有效的治疗药物。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种单链环状、共价闭合的非编码 RNA,可通过调控多种信号通路参与多种疾病的发生发展^[4~6]。环状 RNA 含 HECT 结构域的 E3 泛素连接酶 1 (circRNA HECT domain E3 ubiquitin ligase 1, Circ_HECTD1) 在缺血脑组织中表达升高,抑制 Circ_HECTD1 表达能够显著改善脑梗死,减轻神经元损伤^[7]。研究发现,miR-135a-5p 在氧葡萄糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导的 PC12 细胞中表达减少,过表达 miR-135a-5p 能够显著改善 OGD/R 诱导产生的氧化应激反应,抑制炎症反应,减少细胞凋亡^[8]。肿瘤蛋白 53 诱导型核蛋白 1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1, TP53INP1) 是一种促凋亡蛋白,参与多种肿瘤引起的细胞应激反应,可诱导细胞生长停滞,引起细胞凋亡^[9,10]。生物信息学网站预测可知 TP53INP1 是 miR-135a-5p 的靶基因。本研究通过进行体外 OGD/R 诱导海马神经元损伤,观察 Circ_HECTD1 对 HT22 细胞增殖、凋亡的影响以及对 miR-135a-5p/TP53INP1 轴的调控机制。

1 材料和方法

1.1 细胞与主要试剂

HT22 小鼠海马神经元细胞由中科院细胞生物研究所提供。胎牛血清 (FBS, 10099-141)、Lipofectamine 2000 转染试剂盒 (BT11668-019) 均购自美国赛默飞公司;青链霉素 (R3470) 购自北京康纳瑞生物公司;si-Circ_HECTD1、miR-135a-5p 模拟物 (miR-135a-5p)、anti-miR-135a-5p 及其阴性转染物 (si-NC、miR-NC、anti-miR-NC)、Circ_HECTD1 野生型质粒 (Circ_HECTD1-WT) 与突变型质粒 (Circ_HECTD1-MUT)、TP53INP1 野生型质粒 (TP53INP1-WT) 与突变型质粒 (TP53INP1-MUT) 均购自北京六合华大基因公司;TRIzol 试剂盒 (SH-2366) 购自北京凯诗源生物公司;荧光定量 PCR 检测试剂盒 (BK2100) 购自百奥迈科生物公司;MTT 细胞增殖检测试剂盒 (M1020) 购自北京索莱宝生物公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (K201-100) 购自北京博迈斯科技公司;双荧光素酶报告基因实验检测试剂盒 (AAT-12518) 购自美国 AAT Bioquest 公司;Bax 抗体 (ab182733)、Bcl-2 抗体 (ab196495)、TP53INP1 抗体 (ab202026)、羊抗兔二抗 (ab6721) 购自英国 Abcam 公司。

1.2 主要仪器

JD-CW16 实时荧光定量 PCR 仪购自山东竞道光电科技有限公司;EXFLOW 系列流式细胞仪购自北京达科为生物技术公司;LONZA ELx808 酶标仪购自美国 LONZA 公司;Azure Biosystems C150 凝胶成像系统购自美国 Azure 公司。

1.3 细胞培养与分组转染

常规培养复苏 HT22 细胞,并培养于含 10% FBS, 1% 青链霉素双抗的正常 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中进行传代培养,待细胞融合 ≥ 80% 后采用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒将 si-NC、si-Circ_HECTD1、miR-NC、miR-135a-5p、si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC、si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p 分别转染至 HT22 细胞中,依次作为 si-NC 组、si-Circ_HECTD1 组、miR-NC 组、miR-135a-5p 组、si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC 组、si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p 组,另将未进行转染的细胞作为 Con 组、OGD/R 组。

1.4 模型建立

除 Con 组外,其它 7 组建立 OGD/R 模型:弃去原来的培养液,PBS 冲洗细胞,加入不含 FBS 的无糖 DMEM 培养基,置于常规恒温培养箱中培养 2 h,转移至含有 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 的缺氧培养基中培养 6 h,然后更换正常 DMEM 培养基,转移至常规恒温培养箱中继续培养 12 h。

1.5 qRT-PCR 法检测 Circ_HECTD1、miR-135a-5p、TP53INP1 mRNA 表达

收集各组 HT22 细胞,采用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA,逆转录得到 cDNA,采用荧光定量 PCR 检测试剂盒检测 Circ_HECTD1、miR-135a-5p、TP53INP1 mRNA 表达,以 GAPDH 和 U6 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因相对表达量。qRT-PCR 所需引物:Circ_HECTD1 上游引物 5'-CACGTGTTATCAGGGCCTT-3',下游引物 5'-CGCCACCCTTGCTTTTCATC-3';miR-135a-5p 上游引物 5'-ACAGCCTCCATGGGAATGGAAG-CAGGTTGA-3',下游引物 5'-TGGAGTGTGGCGTTCG-3';TP53INP1 上游引物 5'-TGGCACTTATTTCCGCTGTA-3',下游引物 5'-CGTGGCTGGAAGAAGTAGTGA-3';U6 上游引物 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3',下游引物 5'-TTCACGAATTTGCGTGTCAT-3';GAPDH 上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物 5'-GAAGATGCTGATGGGATTTTC-3'。

1.6 MTT 检测细胞活性

收集各组 HT22 细胞,将细胞密度调整为 1 × 10⁵ 个/ml,接种至 96 孔板,每孔加入 100 μl 细胞悬液,待细胞铺满孔底,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 10 μl,37 °C 培养 4 h,弃去培

养液,每孔加入 DMSO 150 μ l,摇床上震荡 10 min,使结晶充分溶解,使用酶标仪于 570 nm 波长处测定吸光度值(OD 值),计算各组细胞存活率:细胞存活率(%) = 实验组 OD 值/Con 组 OD 值 \times 100%。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组 HT22 细胞,调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml。取 500 μ l 细胞悬液,加入 5 μ l Annexin V-FITC 溶液和 5 μ l PI 溶液,孵育 10 min,混匀后采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.8 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-135a-5p 与 Circ_HECTD1、TP53INP1 的靶向关系 根据 miR-135a-5p 与 Circ_HECTD1、TP53INP1 序列间的互补结合位点,构建 Circ_HECTD1、TP53INP1 野生型和突变型质粒载体(Circ_HECTD1-WT 与 Circ_HECTD1-MUT、TP53INP1-WT 与 TP53INP1-MUT),并将其分别与 miR-NC 和 miR-135a-5p 共转染至 HT22 细胞中,转染 48 h 后,采用双荧光素酶报告基因实验检测试剂盒检测荧光素酶活性,以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值作为相对荧光素酶活性。

1.9 Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、TP53INP1 蛋白表达 收集各组 HT22 细胞,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,加入 Bax、Bcl-2、TP53INP1 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再加入 HRP 标记的二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,ECL 显色后使用凝胶成像系统获取图像并分析条带灰度值,以 β -actin 为内参,计算目的蛋白的相对表达量。

1.10 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验,两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Circ_HECTD1、miR-135a-5p、TP53INP1 在 OGD/R 诱导的 HT22 细胞损伤中的表达 与 Con 组比较,OGD/R 组 Circ_HECTD1 与 TP53INP1 mRNA

表达均上调,miR-135a-5p 表达下调($P < 0.05$)。结果(见表 1)。

2.2 沉默 Circ_HECTD1 表达对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞损伤及 miR-135a-5p、TP53INP1 表达的影响 与 Con 组比较,OGD/R 组 HT22 细胞存活率和 Bcl-2 蛋白表达降低,凋亡率和 Bax 蛋白表达升高($P < 0.05$);与 OGD/R 组、si-NC 组比较,si-Circ_HECTD1 组 Circ_HECTD1、TP53INP1 mRNA 和蛋白表达降低,miR-135a-5p 表达升高,存活率和 Bcl-2 蛋白表达升高,凋亡率和 Bax 蛋白表达降低($P < 0.05$)。结果(见图 1、图 2 和表 2、表 3)。

2.3 Circ_HECTD1 与 miR-135a-5p、miR-135a-5p 与 TP53INP1 的靶向关系 生物信息学网站(<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)预测可知,Circ_HECTD1 与 miR-135a-5p、miR-135a-5p 与 TP53INP1 序列间均具有互补结合位点(见图 3)。与转染 miR-NC 比较,转染 miR-135a-5p 的 HT22 细胞中 Circ_HECTD1-WT 以及 TP53INP1-WT 的相对荧光素酶活性降低($P < 0.05$);但对 Circ_HECTD1-MUT 和 TP53INP1-MUT 的相对荧光素酶活性无显著影响($P > 0.05$)。结果(见表 4)。

2.4 过表达 miR-135a-5p 对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞损伤及 TP53INP1 表达的影响 与 Con 组比较,OGD/R 组 TP53INP1 mRNA 和蛋白表达均升高($P < 0.05$);与 OGD/R 组、miR-NC 组比较,miR-135a-5p 组 miR-135a-5p 表达升高,TP53INP1 mRNA 和蛋白表达均降低,细胞存活率和 Bcl-2 蛋白表达升高,凋亡率和 Bax 蛋白表达降低($P < 0.05$)。结果(见图 4、图 5 和表 5、表 6)。

2.5 抑制 miR-135a-5p 逆转沉默 Circ_HECTD1 表达对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞损伤的影响 与 si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC 组比较,si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p 组 miR-135a-5p 表达降低,TP53INP1 mRNA 和蛋白表达升高,细胞存活率和 Bcl-2 蛋白表达降低,细胞凋亡率和 Bax 蛋白表达升高($P < 0.05$)。结果(见图 6、图 7 和表 7、表 8)。

表 1 各组 HT22 细胞中 Circ_HECTD1、miR-135a-5p、TP53INP1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Circ_HECTD1	miR-135a-5p	TP53INP1 mRNA
Con 组	1.01 \pm 0.09	1.00 \pm 0.10	1.07 \pm 0.11
OGD/R 组	2.46 \pm 0.23	0.33 \pm 0.03	2.73 \pm 0.32
<i>t</i> 值	14.381	15.719	12.017
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 各组 HT22 细胞 Circ_HECTD1、miR-135a-5p、TP53INP1 mRNA 表达存活率、凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Circ_HECTD1	miR-135a-5p	TP53INP1 mRNA	存活率(%)	凋亡率(%)
Con 组	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.09	1.03 ± 0.10	98.52 ± 5.41	7.61 ± 0.60
OGD/R 组	2.58 ± 0.35 ^a	0.35 ± 0.04 ^a	2.75 ± 0.34 ^a	53.96 ± 4.54 ^a	43.21 ± 3.83 ^a
si-NC 组	2.49 ± 0.32	0.34 ± 0.05	2.74 ± 0.35	54.28 ± 4.46	41.82 ± 4.33
si-Circ_HECTD1 组	1.54 ± 0.15 ^b	0.67 ± 0.06 ^b	1.97 ± 0.26 ^b	74.95 ± 5.29 ^b	23.95 ± 2.79 ^b

与 Con 组比较 aP < 0.05; 与 si-NC 组比较 bP < 0.05

表 3 各组 HT22 细胞中 TP53INP1、Bax、Bcl-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TP53INP1	Bax	Bcl-2
Con 组	0.25 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.77 ± 0.07
OGD/R 组	0.68 ± 0.05 ^a	0.54 ± 0.05 ^a	0.22 ± 0.02 ^a
si-NC 组	0.69 ± 0.06	0.56 ± 0.08	0.24 ± 0.02
si-Circ_HECTD1 组	0.43 ± 0.04 ^b	0.29 ± 0.02 ^b	0.46 ± 0.06 ^b

与 Con 组比较 aP < 0.05; 与 si-NC 组比较 bP < 0.05

表 4 双荧光素酶报告基因实验 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Circ_HECTD1-WT	Circ_HECTD1-MUT	TP53INP1-WT	TP53INP1-MUT
miR-NC	1.08 ± 0.10	1.01 ± 0.10	1.02 ± 0.09	1.00 ± 0.07
miR-135a-5p	0.55 ± 0.05	0.92 ± 0.09	0.37 ± 0.04	0.98 ± 0.10
t 值	11.612	1.639	16.166	0.401
P 值	< 0.001	0.132	< 0.001	0.697

表 5 各组 HT22 细胞 miR-135a-5p、TP53INP1 mRNA 表达、存活率与凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-135a-5p	TP53INP1 mRNA	存活率(%)	凋亡率(%)
Con 组	1.02 ± 0.10	1.06 ± 0.10	97.33 ± 6.19	7.43 ± 0.77
OGD/R 组	0.37 ± 0.05 ^a	2.67 ± 0.26 ^a	54.26 ± 4.37 ^a	42.54 ± 2.33 ^a
miR-NC 组	0.36 ± 0.04	2.71 ± 0.31	54.87 ± 4.63	42.93 ± 2.51
miR-135a-5p 组	0.79 ± 0.06 ^b	1.72 ± 0.21 ^b	72.74 ± 5.26 ^b	24.36 ± 1.61 ^b

与 Con 组比较 aP < 0.05; 与 miR-NC 组比较 bP < 0.05

表 6 各组 HT22 细胞中 TP53INP1、Bax、Bcl-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TP53INP1	Bax	Bcl-2
Con 组	0.23 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.71 ± 0.07
OGD/R 组	0.65 ± 0.06 ^a	0.61 ± 0.05 ^a	0.26 ± 0.02 ^a
miR-NC 组	0.67 ± 0.07	0.58 ± 0.06	0.23 ± 0.02
miR-135a-5p 组	0.41 ± 0.04 ^b	0.32 ± 0.03 ^b	0.41 ± 0.05 ^b

与 Con 组比较 aP < 0.05; 与 miR-NC 组比较 bP < 0.05

表7 各组 HT22 细胞 miR-135a-5p、TP53INP1 mRNA 表达、存活率与凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-135a-5p	TP53INP1 mRNA	存活率 (%)	凋亡率 (%)
si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC 组	0.69 ± 0.06	2.03 ± 0.19	75.21 ± 5.23	23.75 ± 3.28
si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p 组	0.45 ± 0.03	1.32 ± 0.13	57.66 ± 4.37	42.71 ± 4.14
t 值	8.764	7.554	6.308	8.793
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表8 各组 HT22 细胞 TP53INP1、Bax、Bcl-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TP53INP1	Bax	Bcl-2
si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC 组	0.44 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.52 ± 0.05
si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p 组	0.72 ± 0.07	0.67 ± 0.07	0.24 ± 0.03
t 值	8.507	11.579	11.762
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

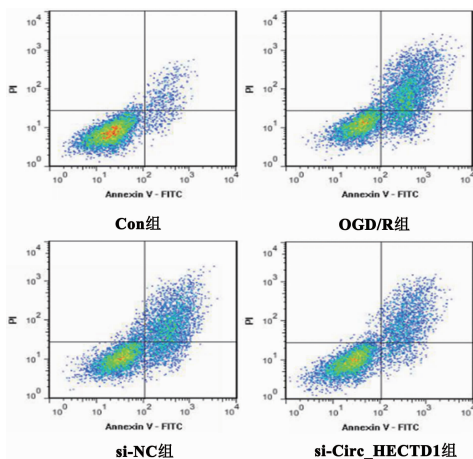


图1 各组 HT22 细胞凋亡流式图

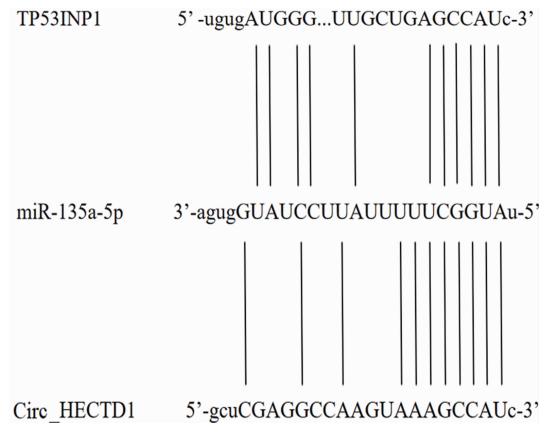
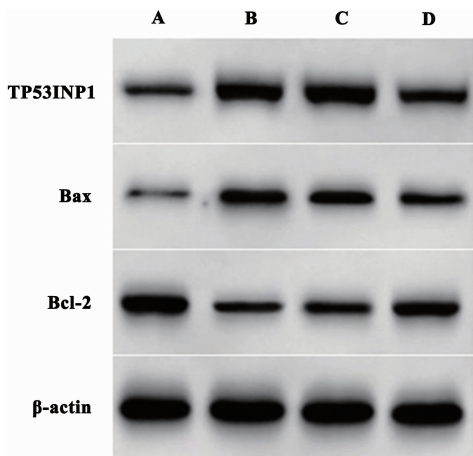


图3 Circ_HECTD1 与 miR-135a-5p、miR-135a-5p 与 TP53INP1 结合位点



A: Con 组; B: OGD/R 组; C: si-NC 组; D: si-Circ_HECTD1 组
图2 各组 HT22 细胞中 TP53INP1、Bax、Bcl-2 蛋白表达

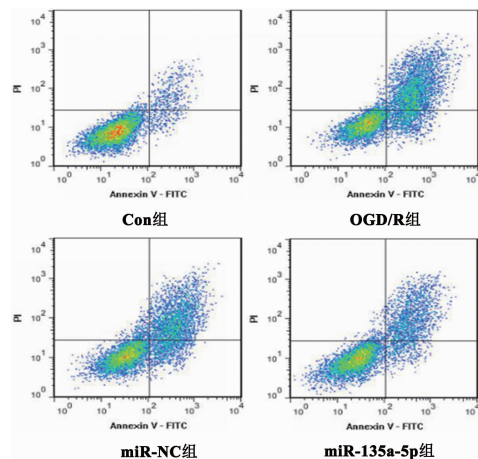
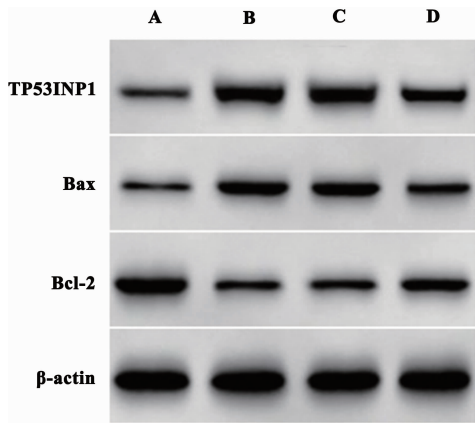
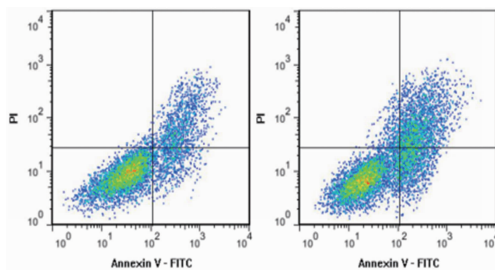


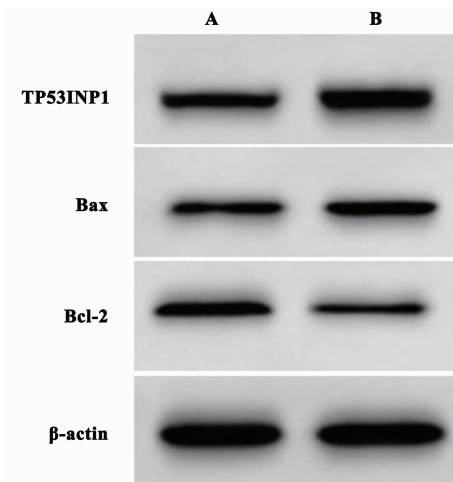
图4 各组 HT22 细胞凋亡流式图



A: Con 组; B: OGD/R 组; C: miR-NC 组; D: miR-135a-5p 组
图 5 各组 HT22 细胞中 TP53INP1、Bax、Bcl-2 蛋白表达



si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC 组; si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p 组
图 6 各组 HT22 细胞凋亡流式图



A: si-Circ_HECTD1 + anti-miR-NC 组; B: si-Circ_HECTD1 + anti-miR-135a-5p 组
图 7 各组 HT22 细胞 TP53INP1、Bax、Bcl-2 蛋白表达

3 讨论

近年来脑卒中的发病率与死亡率逐年升高,目前临床上对于脑卒中的治疗药物主要是神经保护类药物,其靶点单一,易出现耐药性,寻找新的治疗靶

点是脑血管疾病的研究重点^[11,12]。细胞凋亡是缺血性脑卒中神经元损伤的主要形式,缺血后脑组织中大量氧自由基的产生导致促炎因子释放,最终引起细胞损坏和凋亡^[13,14]。海马区是脑缺血后最易受损的区域^[15],本实验采用小鼠海马神经元 HT22 细胞建立 OGD/R 诱导细胞损伤体外模型,结果显示,OGD/R 诱导后 HT22 细胞存活率降低,凋亡率升高,Bax 表达升高,Bcl-2 表达降低,提示海马神经元 HT22 细胞受损,细胞发生凋亡,与袁美玲等^[16]研究结果一致。

研究发现^[17],沉默 Circ_HECTD1 表达可有效降低癫痫模型小鼠海马神经元凋亡,减轻炎症反应。另有研究证实^[18],Circ_HECTD1 敲除后,通过调节 miR-27a-3p/FSTL1 轴,减轻 OGD/R 诱导 HT22 细胞损伤,为脑梗死的治疗提供新的靶点。本研究发现沉默 Circ_HECTD1 可通过抑制细胞凋亡减轻 HT22 细胞损伤,与 Zhang 等^[18]研究结果一致,但具体作用机制尚不完全清晰。

miR-135a-5p 已被证实在脑缺氧/复氧损伤中发挥关键作用^[19]。研究发现,M2 小胶质细胞来源的 miR-135a-5p 表达上调,抑制神经元自噬,减轻缺血性脑损伤^[20]。TP53INP1 影响 OGD/R 诱导的神经元细胞活力,促进神经元中炎症与氧化应激的发生,诱导细胞凋亡^[21,22]。本研究结果显示,HT22 细胞中 TP53INP1 上调,miR-135a-5p 下调;双荧光素酶报告基因检测证实 TP53INP1 是 miR-135a-5p 的靶基因;且过表达 miR-135a-5p 可通过下调 TP53INP1 表达减轻 HT22 细胞损伤。另外,双荧光素酶报告基因检测证实,miR-135a-5p 是 Circ_HECTD1 的靶基因;且沉默 Circ_HECTD1 可显著上调 miR-135a-5p 表达,下调 TP53INP1 表达,而抑制 miR-135a-5p 表达能够显著逆转沉默 Circ_HECTD1 对 HT22 细胞损伤的保护作用。以上研究结果提示 Circ_HECTD1 可通过调控 miR-135a-5p/TP53INP1 信号轴发挥对海马神经元损伤的保护作用。

综上所述,沉默 Circ_HECTD1 表达能够有效减少细胞凋亡,促进细胞增殖,保护 OGD/R 诱导的海马神经元损伤,且其作用机制可能与调节 miR-135a-5p/TP53INP1 信号轴有关。但目前缺血性脑卒中发

病机制复杂, Circ_HECTD1 在缺血性脑卒中的研究尚少, 其具体影响机制还需进一步深入探索。

[参考文献]

- [1] Su D, Li P, Wang X, et al. Observing malondialdehyde-mediated signaling pathway in cerebral ischemia reperfusion injury with a specific nanolight[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(3): 2748-2755.
- [2] Long M, Wang Z, Zheng D, et al. Electroacupuncture pretreatment elicits neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats associated with transient receptor potential vanilloid 1-mediated anti-oxidant stress and anti-inflammation[J]. *Inflammation*, 2019, 42(5): 1777-1787.
- [3] Reiche EMV, Gelinski JR, Alfieri DF, et al. Immune-inflammatory, oxidative stress and biochemical biomarkers predict short-term acute ischemic stroke death[J]. *Metab Brain Dis*, 2019, 34(3): 789-804.
- [4] Holdt LM, Kohlmaier A, Teupser D. Molecular functions and specific roles of circRNAs in the cardiovascular system[J]. *Noncoding RNA Res*, 2018, 3(2): 75-98.
- [5] Huang X, Zhang W, Shao Z. Prognostic and diagnostic significance of circRNAs expression in lung cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18459-18465.
- [6] Hua Q, Chen Y, Liu Y, et al. Circular RNA 0039411 Is involved in neodymium oxide-induced inflammation and antiproliferation in a human bronchial epithelial cell line via sponging miR-93-5p[J]. *Toxicol Sci*, 2019, 170(1): 69-81.
- [7] Han B, Zhang Y, Zhang Y, et al. Novel insight into circular RNA HECTD1 in astrocyte activation via autophagy by targeting MIR142-TIPARP; implications for cerebral ischemic stroke[J]. *Autophagy*, 2018, 14(7): 1164-1184.
- [8] Wang C, Hu F. Long noncoding RNA SOX2OT silencing alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury via miR-135a-5p-mediated NR3C2 inhibition[J]. *Brain Res Bull*, 2021, 173(1): 193-202.
- [9] Zhao XQ, Tang H, Yang J, et al. MicroRNA-15a-5p down-regulation inhibits cervical cancer by targeting TP53INP1 in vitro[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8219-8229.
- [10] Nishimoto M, Nishikawa S, Kondo N, et al. Prognostic impact of TP53INP1 gene expression in estrogen receptor α -positive breast cancer patients[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2019, 49(6): 567-575.
- [11] 《中国脑卒中防治报告》编写组. 《中国脑卒中防治报告 2019》概要[J]. *中国脑血管病杂志*, 2020, 17(5): 272-281.
- [12] Yang G, Wang N, Seto SW, et al. Hydroxysafflor yellow A protects brain microvascular endothelial cells against oxygen glucose deprivation/reoxygenation injury: Involvement of inhibiting autophagy via class I PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2018, 140(1): 243-257.
- [13] Zhao Q, Wang X, Chen A, et al. Rhein protects against cerebral ischemic/reperfusion induced oxidative stress and apoptosis in rats[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2802-2812.
- [14] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26-34.
- [15] Delattre C, Bournonville C, Auger F, et al. Hippocampal deformations and entorhinal cortex atrophy as an anatomical signature of long-term cognitive impairment: from the MCAO rat model to the stroke patient[J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(3): 294-305.
- [16] 袁美玲, 张云, 王艳, 等. 羟基红花红色素 A 抑制氧化应激和细胞凋亡改善 OGD/R 诱导的 HT22 细胞损伤[J]. *中南药学*, 2022, 20(1): 1-7.
- [17] 吕麦扣, 席聪. circ_HECTD1 在癫痫模型细胞中的表达及其对细胞凋亡和炎症反应的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(3): 435-439.
- [18] Zhang Z, He J, Wang B. Circular RNA circ_HECTD1 regulates cell injury after cerebral infarction by miR-27a-3p/FSTL1 axis[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(9): 914-926.
- [19] Chen H, Li X. LncRNA ROR is involved in cerebral hypoxia/reoxygenation-induced injury in PC12 cells via regulating miR-135a-5p/ROCK1/2[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9): 6145-6158.
- [20] Liu Y, Li YP, Xiao LM, et al. Extracellular vesicles derived from M2 microglia reduce ischemic brain injury through microRNA-135a-5p/TXNIP/NLRP3 axis[J]. *Lab Invest*, 2021, 101(7): 837-850.
- [21] Fan Y, Wei L, Zhang S, et al. LncRNA SNHG15 knockdown protects against OGD/R-induced neuron injury by downregulating TP53INP1 expression via binding to miR-455-3p[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(4): 1019-1030.
- [22] Li XQ, Yu Q, Tan WF, et al. MicroRNA-125b mimic inhibits ischemia reperfusion-induced neuroinflammation and aberrant p53 apoptotic signalling activation through targeting TP53INP1[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 74(1): 154-165.