

circ_0007897 通过调控 PDCD4 介导缺血性心肌损伤的机制研究

洪承吕 高瞻 施翔翔 周希

[摘要] 目的 探讨 circ_0007897 通过调控程序性细胞死亡因子4(PDCD4)介导缺血性心肌损伤的机制。方法 分离原代 C57 小鼠心肌细胞,并分为空白组、缺氧复氧组、缺氧复氧+circ_con 组、缺氧复氧+circ_0007897 组。检测各组细胞活力、细胞凋亡、细胞乳酸脱氢酶(LDH)水平及细胞内丙二醛(MDA)含量、circ_0007897 表达情况及 PDCD4 蛋白表达情况。结果 与空白组相比,缺氧复氧组的细胞活力明显下降,细胞凋亡明显升高,LDH 水平及细胞内 MDA 明显升高,circ_0007897 表达水平明显下降,PDCD4 的表达明显升高,差异具有统计学意义(q 分别=13.86、40.78、14.45、8.12、8.91、9.70, P 均 <0.05);与缺氧复氧组相比,缺氧复氧+circ_0007897 组的细胞活力明显升高,细胞凋亡明显下降,LDH 水平及细胞内 MDA 明显下降,circ_0007897 表达水平明显升高,PDCD4 表达水平明显下降,差异具有统计学意义(q 分别=9.68、20.96、9.13、8.18、14.84、6.51, P 均 <0.05)。结论 circ_0007897 对心肌细胞有明显的保护作用,而这种保护作用是通过下调 PDCD4 来进行调控的。

[关键词] circ_0007897; 程序性细胞死亡因子4; 缺血性心肌损伤

Mechanism of circ_0007897 mediated ischemic myocardial injury by regulating PDCD4 HONG Chenglyu, GAO Zhan, SHI Xiangxiang, et al, Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of circ_0007897 mediated ischemic myocardial injury through the regulation of programmed cell death 4 (PDCD4). **Methods** The cardiomyocytes from primary C57 mouse were isolated. They were divided into four groups: blank group, hypoxia reoxygenation group, hypoxia reoxygenation+circ_con group, and hypoxia reoxygenation+circ_0007897 group. Cell viability, apoptosis, LDH level, MDA content, circ_0007897 expression and PDCD4 protein expression were detected. **Results** Compared with the blank group, the cell viability of the hypoxia-reoxygenation group was significantly decreased, cell apoptosis was significantly increased as well as LDH and intracellular MDA level, the expression of circ_0007897 was significantly decreased while the expression of PDCD4 was significantly increased ($q=13.86, 40.78, 14.45, 8.12, 8.91, 9.70, P<0.05$). When compared with the hypoxia-reoxygenation group, the cell viability of the hypoxia reoxygenation+circ_0007897 group was significantly increased, the cell apoptosis, LDH, and intracellular MDA level was significantly decreased. the expression of circ_0007897 was significantly increased, while the expression of PDCD4 was significantly decreased ($q=9.68, 20.96, 9.13, 8.18, 14.84, 6.51, P<0.05$). **Conclusion** circ_0007897 has obvious protective effect on myocardial cells through downregulating PDCD4.

[Key words] circ_0007897; programmed cell death 4; ischemic myocardial injury

研究显示,在急性心肌缺血发生后,尽早恢复

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.002.003

基金项目:温州市科技局计划资助项目(2020Y1360);浙江省科技厅项目(LGF20H310002)

作者单位:325000 浙江温州,温州医科大学附属第一医院心血管内科

缺血区心肌血流供应是减小心肌梗死面积最有效的治疗措施^[1]。环状 RNA(circular RNA, circRNA)是一类由前体 mRNA 成熟时外显子反向剪切形成的单链、闭合 RNA。circRNA 绝大多数存在于细胞质中^[2],部分含有内含子的 circRNA 也可以定位于细胞核内^[3]。正常成年人的心肌组织测序发现有

300多种 circRNA 的富集, circRNA 在心肌组织中有丰富的表达。目前认为 circRNA 的功能包括调节转录^[4]、结合蛋白^[5]及 miRNA 海绵^[6]等, 与肿瘤、心血管等多种疾病的发生发展有着密切关联。

程序性细胞死亡因子4(programmed cell death 4, PDCD4)是近年来新发现的重要的抑癌基因, 最初研究表明其在致瘤性转化小鼠表皮细胞模型中能抑制由致癌物质诱发的致瘤性转化^[7]。目前研究发现 PDCD4 基因敲除后能减轻对白介素 10 翻译的抑制, 导致抗炎因子白介素 10 的表达升高, 白介素 6 的产生减少, 从而抑制炎症的发生, 在肿瘤、肥胖、糖尿病和心血管等疾病的发生发展中发挥重要作用^[8-10]。

本研究拟通过分离小鼠的原代心肌细胞缺血模型中 mmu_circ_0007897 的作用, 通过体外实验探索 mmu_circ_0007897 基因是否为调控心肌缺血过程中的重要因子, 以及 circRNA 的靶基因 PDCD4 的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 新生 C57BL/6 近交品系健康清洁型小鼠, 约 1~3 d 的乳鼠, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

1.2 实验试剂与仪器 circ_0007897 过表达慢病毒(由中洪博元公司生产); DMEM/F-12(由美国 Gibco 公司生产); circ_0007897 探针(由美国 BOSTER 生产); α -SMA(由英国 abcam 公司生产); cTn I(由美国 proteintech 公司生产); Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit(由杭州联科生物技术有限公司生产); Trizol Reagent(由康为世纪有限公司生产); Ultrapure RNA 超纯 RNA 提取试剂盒(由康为世纪有限公司生产); 小鼠乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)试剂盒(由酶免公司生产); 小鼠丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(由酶免公司生产); PVDF膜(IPVH00010, Millipore); 超敏发光液(由赛默飞公司生产); Rabbit Polyclonal Anti- β T(由上海合星生物科技有限公司生产); 荧光显微镜(由 OLYMPUS 生产); ubulin(由美国 Proteintech 公司生产); Rabbit Anti PDCD4(由上海爱必信生物科技有限公司); NovoCyte™流式细胞仪(由杭州艾森生物有限公司生产); 荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪[由伯乐生命医学产品(上海)有限公司生产]; 全自动酶标仪(由北京市六一仪器厂生产); 蛋白垂直电泳仪(由北京市六一

仪器厂生产); 超高灵敏度化学发光成像系统(由上海伯乐生命医学产品有限公司生产)。

1.3 造模及分组 空白组: 分离小鼠的原代心肌细胞, 常氧条件下细胞培养造模。缺氧复氧组: 分离小鼠的原代心肌细胞, 在缺氧 6 h 复氧 1 h 培养箱中培养造模。缺氧复氧+circ_con 组: 用对照基因过表达干预按照慢病毒操作手册进行操作, MOI=100, 转染 4 d, 在缺氧 6 h 复氧 1 h 培养箱中培养造模。缺氧复氧+circ_0007897 组: circ_0007897 基因过表达干预按照慢病毒操作手册进行操作, MOI=100, 转染 4 d, 在缺氧 6 h 复氧 1 h 培养箱中培养造模。

1.4 分离小鼠的原代心肌细胞 取新生 C57 小鼠心脏, 剔除心脏外膜和血管, 剪取心尖, 用眼科剪将组织剪至淤泥状, 自然沉降, 去除上清, 加入消化液胶原酶 I 1 g/L 37 °C 消化 30 min, 每 5 min 收集一次消化液加入完全培养基中终止。置于离心机 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入适量培养液将细胞制成悬液, 差数贴壁法纯化心肌细胞: 细胞悬液接种培养皿中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 条件下静置 30 min, 2 次, 吸出培养液置于另一皿中放入培养箱中培养。

1.5 免疫荧光鉴定 在培养板中将已培养好的细胞的培养皿用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)浸洗 3 次, 每次 3 min; 用 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 再用 PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 3 min; 用 0.5% Triton X-100(PBS 配制)室温通透 20 min。PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 5 min, 移液枪吸干 PBS, 在培养皿上滴加 5% 牛血清白蛋白溶液(bovine serum albumin, BSA), 37 °C 封闭 30 min。移液枪吸掉封闭液, 每个培养皿滴加足够量的稀释好的一抗 α -SMA (1:400), 4 °C 孵育过夜; PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 3 min, 移液枪吸干培养皿内多余液体后滴加稀释好的荧光二抗 Cy3 (1:200), 37 °C 孵育 30 min, PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 3 min; 从加荧光二抗起, 所有操作步骤都尽量在较暗处进行。PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 5 min, 用移液枪吸干 PBS, 在培养皿内滴加 5% BSA, 于 37 °C 封闭 30 min。用移液枪吸掉 PBS, 每个培养皿内滴加足够量的稀释好的一抗 cTn I (1:200), 37 °C 孵育 3 h。培养皿复温至室温后, PBS 浸洗培养皿 3 次, 每次 5 min, 移液枪吸干培养皿内多余液体后滴加稀释好的荧光二抗羊抗兔 IgG /488 (1:200), 37 °C 孵育 30 min, PBS 浸洗切片 3 次, 每次 5 min; 滴加 4, 6-联脒-2-苯基叫

啉(4,6-diamino-2-phenyl indole, DAPI)避光孵育5 min,对标本进行染核,用PBS浸洗多余的DAPI;用20%甘油封闭培养皿,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.6 检测细胞凋亡 收集 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞,加1 ml PBS 1 500 r/min离心3 min,洗2次。用双蒸水将5×Binding Buffer稀释为1×Binding Buffer。取300 μl 预冷的1×Binding Buffer重悬细胞。每管各

加入5 μl Annexin V-FITC和10 μl PI。轻微混匀后,室温避光孵育10 min。再向每管中加入200 μl 预冷的1×Binding Buffer。混匀后上流式仪检测。

1.7 实时荧光定量PCR 各组提取RNA后根据逆转录试剂盒合成cDNA,以cDNA为模板,在荧光定量PCR仪上进行检测,以β-actin为内参,算出各组中PDCD4和circ_0007897的相对表达量。引物见表1。

表1 引物序列

引物名称	引物序列	引物长度/nt	产物长度/bp
PDCD4 F	GGAGATACAAATGAAGTTGCGGAG	24	270
PDCD4 R	AGCTCTAGCAATAAACTGGCCC	22	
circ_0007897 F	TGAGACCGCATTTGAGAAGA	20	210
circ_0007897 R	CAAGGCAGGGTTAGGACA	19	
β-actin F	AGGGAAATCGTGCGTGAC	18	192
β-actin R	CATACCCAAGAAGGAAGGCT	20	

1.8 CCK8检测 按上述分组进行铺板,0 h,24 h后,每孔加10 μl CCK8检测试剂,在37℃孵育2 h;酶标仪在450 nm波长处检测每孔的吸光度值计算存活率。

1.9 ELISA检测 分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中加样品50 μl,加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。每孔加入酶标试剂100 μl,空白孔除外。用封板膜封板后置37℃温育60 min。将20倍浓缩洗涤液用蒸馏水20倍稀释后备用。小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30 s后弃去,如此重复5次,拍干。每孔先加入显色剂A 50 μl,再加入显色剂B 50 μl,轻轻震荡混匀,37℃避光显色15 min。每孔加终止液50 μl,终止反应(此时蓝色立转黄色)。以空白孔调零,450 nm波长依序测量各孔的吸光度值。测定应在加终止

液后15 min以内进行。

1.10 Western blot 蛋白提取掉培养皿中细胞培养液,每孔加入100 μl的细胞裂解液,置于冰上15 min,用枪头将细胞吹打下来,放入已做好标记的EP管中,12 000 r/min离心10 min。取上清液,移至新的EP管(BCA测定),弃沉淀,按100 μl裂解液加入25 μl 5×loadingbuffer缓冲液,沸水煮5 min,置于-20℃保存。按照BCA蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量。根据定量结果计算出蛋白电泳上样体积。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,抗原抗体反应,化学发光和显影。

1.11 统计学方法 采用SPSS 20.0软件。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用单因素方差分析和采用 q 检验。设 $P < 0.05$ 为差异具统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞活力、细胞凋亡、细胞LDH水平及细胞内MDA含量结果见表2

表2 各组细胞活力、细胞凋亡、细胞LDH水平及细胞内MDA含量

组别	细胞活力/%	细胞凋亡/%	LDH/ng/ml	MDA/nmol/ml
空白组	100.02 ± 2.59	15.25 ± 0.87	7.06 ± 0.22	4.98 ± 0.26
缺氧复氧组	80.01 ± 3.84*	35.71 ± 0.21*	8.44 ± 0.11*	5.92 ± 0.53*
缺氧复氧+circ_con组	73.91 ± 3.13	31.65 ± 1.27	8.41 ± 0.45	6.14 ± 0.13
缺氧复氧+circ_0007897组	94.43 ± 3.39#	25.19 ± 0.78#	7.57 ± 0.25#	4.97 ± 0.35#

注:*:与空白组比较, $P < 0.05$;#:与缺氧复氧组比较, $P < 0.05$ 。

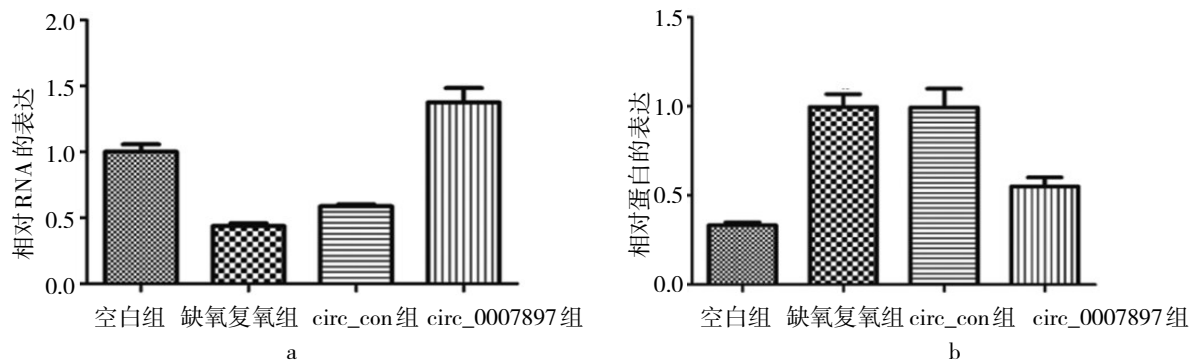
由表2可见,与空白组比较,缺氧复氧组的细胞活力明显下降,细胞凋亡明显升高,LDH水平及细

胞内MDA明显升高,差异具有统计学意义(q 分别为13.86、40.78、14.45、8.12, P 均 < 0.05);与缺氧复氧

组相比,缺氧复氧+circ_0007897 组的细胞活力明显升高,细胞凋亡明显下降,LDH 水平及细胞内 MDA 明显下降,差异具有统计学意义(q 分别=9.68、

20.96、9.13、8.18, P 均 <0.05)。

2.2 各组细胞中 circ_0007897 和 PDCD4 表达结果见图 1



注:a:circ_0007897;b:PDCD4。

图 1 各组细胞中 circ_0007897 和 PDCD4 表达结果

如图 1a、1b 所示,与空白组相比,缺氧复氧组的 circ_0007897 表达明显下降,PDCD4 的表达明显升高,差异具有统计学意义(q 分别=8.91、9.70, P 均 <0.05);与缺氧复氧组相比,缺氧复氧+circ_0007897 组的 circ_0007897 表达水平明显升高,PDCD4 表达水平明显下降,差异具有统计学意义(q 分别=14.84、6.51, P 均 <0.05)。缺氧复氧组与缺氧复氧+circ_con 组之间 circ_0007897、PDCD4 的表达水平比较,差异不具有统计学意义(q 分别=2.41、0.14, P 均 >0.05)。

3 讨论

目前 circRNA 在心血管系统的研究和报道仍然较少,一方面 circRNA 在心血管细胞中的表达调控方法依旧处于研究和改进的阶段,本研究主要是通过原代分离心肌细胞进行研究,本研究对心肌细胞进行缺氧复氧造模,通过流式凋亡检测判断模型构建成功,并且结果还发现 circ_0007897 在缺氧复氧模型中的心肌细胞中表达下调。

PDCD4 在许多病理生理过程中发挥重要的作用,尤其是在细胞死亡和炎症反应过程中发挥重要作用,因此广泛参与与癌症、自身免疫紊乱和动脉粥样硬化等多种疾病的发生发展过程^[11]。有研究发现肾缺血再灌注诱导急性肾损伤后肾脏 PDCD4 表达水平显著升高,并且在缺血再灌注肾活检病人组织中 PDCD4 的表达显著升高^[12]。通过 PDCD4 敲基因鼠进一步研究结果表明 PDCD4 缺失通过阻断细胞死亡和炎症反应,显著改善肾缺血再灌注后肾功能障碍和组织损害^[13]。研究发现,PDCD4 可能通过调控 Fgr-Notch1 介导的细胞死亡和炎症通路,加重肾

缺血再灌注损伤,阻断该通路上的分子,有望改善肾缺血再灌注损伤^[14]。本次研究结果也发现,心肌细胞在进行缺氧复氧处理后,细胞中 PDCD4 的表达显著升高。这些结果说明 PDCD4 在缺血再灌注损伤中具有重要的作用,并且丰富了缺血再灌注损伤的理论研究并为其临床治疗提供了靶点,具有重要的理论意义和临床价值。

为了进一步明确 circ_0007897 对心肌细胞是发挥保护作用还是损伤作用,本研究通过构建过表达 circ_0007897 慢病毒,并通过荧光定量 PCR 验证其过表达效果,结果发现,过表达 circ_0007897 慢病毒具有明显提高 circ_0007897 表达的效果。并且本研究检测了 circ_0007897 对心肌细胞活力和凋亡的影响,结果发现心肌细胞在经历缺氧复氧后细胞活力明显下降,细胞凋亡明显升高;过表达 circ_0007897 后,细胞活力得到改善并细胞凋亡也明显下降,提示 circ_0007897 对细胞有明显的保护作用。并且结果也发现过表达 circ_0007897 后,细胞中 PDCD4 表达明显下调,这结果说明 circ_0007897 对细胞有明显的保护作用可能是通过下调 PDCD4 来进行调控的。

心肌细胞缺血损伤因素众多而且复杂,其中氧自由基是造成缺血损伤的直接原因之一^[15]。心肌细胞在缺氧条件下 ATP 产生减少、代谢障碍,代谢产物堆积使膜稳定性降低,溶酶体释放,导致生物损伤、变性,使 LDH 释放在培养基中,同时再给氧时氧自由基增加,导致细胞膜损伤,细胞内 LDH 释放进一步增加^[16]。缺氧刺激可引起心肌细胞 DNA 的氢键断裂、碱基降解和主链解旋,其中脂质过氧自由

基和烷氧自由基可引起DNA碱基的氧化,其代谢产生MDA还可导致DNA链断裂和交联^[17]。脂质过氧化产物MDA含量变化可作为评定氧自由基生成及对膜脂质双层结构破坏的指标^[18]。本研究结果发现,心肌细胞在缺氧复氧处理后细胞中LDH和MDA的含量都明显升高,而过表达circ_0007897能使细胞中的LDH和MDA含量降低,这结果也说明circ_0007897对心肌细胞有明显的保护作用。

综上所述,circ_0007897对心肌细胞有明显的保护作用,而这种保护作用是通过下调PDCD4来进行调控的。但是,本研究仅限于体外细胞实验,还需构建体内动物模型来进一步研究circ_0007897对心肌细胞缺血再灌注损伤的机制。

参考文献

- 1 Wu G, Chen L, Gu Y, et al. Exploring the mechanism underlying the cardioprotective effect of shexiang baixin pill on acute myocardial infarction rats by comprehensive metabolomics[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 259: 113001.
- 2 Huang W, Yang Y, Wu J, et al. Circular RNA cESRP1 sensitises small cell lung cancer cells to chemotherapy by sponging miR-93-5p to inhibit TGF- β signalling[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(5): 1709-1727.
- 3 Guo W, Zhang B, Mu K, et al. Circular RNA GRB10 as a competitive endogenous RNA regulating nucleus pulposus cells death in degenerative intervertebral disk[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 319.
- 4 Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3): 256-264.
- 5 Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388.
- 6 You X, Vlatkovic I, Babic A, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(4): 603-610.
- 7 Cmarik JL, Min H, Hegamyer G, et al. Differentially expressed protein PDCD4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(24): 14037-14042.
- 8 Bosch MWMVD, Palsson-Mcdermott E, Johnson DS, et al. LPS induces the degradation of programmed cell death protein 4 (PDCD4) to release twist2, activating c-maf transcription to promote interleukin-10 production[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(33): 22980-22990.
- 9 Ramkumar HL, Shen DF, Tuo J, et al. IL-10 -1082 SNP and IL-10 in primary CNS and vitreoretinal lymphomas [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250(10): 1541-1548.
- 10 Santhanam AN. Have tumor suppressor PDCD4 and its counteragent oncogenic miR-21 gone rogue? [J]. *Mol Interv*, 2010, 10(2): 76-79.
- 11 Yajuan H, Jiawei H, Yun M, et al. Asiatic acid inhibits proliferation, migration and induces apoptosis by regulating PDCD4 via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway in human colon carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8223-8230.
- 12 Nana S, Ting Z, Xialian X, et al. miR-21 Protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by preventing epithelial cell apoptosis and inhibiting dendritic cell maturation[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 790.
- 13 Ru Y, Suxuan L, Jian W, et al. Inhibition of maternally expressed gene 3 attenuated lipopolysaccharide-induced apoptosis through sponging miR-21 in renal tubular epithelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(9): 7800-7806.
- 14 Wang K, Bei WJ, Liu YH, et al. miR21 attenuates contrast-induced renal cell apoptosis by targeting PDCD4[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6757-6763.
- 15 Yu L, Zhang W, Huang C, et al. FoxO4 promotes myocardial ischemia-reperfusion injury: The role of oxidative stress-induced apoptosis[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(9): 2890-2900.
- 16 Hu S, Cao S, Tong Z, et al. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11): 3677-3688.
- 17 Yang M, Kong DY, Chen JC, et al. Inhibition of miR-148b ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of Wnt/ β catenin signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17757-17766.
- 18 Wu CF, Ting L, Zhu BH, et al. Scoparone protects neuronal cells from oxygen glucose deprivation/reoxygenation injury[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(4): 2302-2308.

(收稿日期 2021-12-08)

(本文编辑 葛芳君)