

circZNF652 靶向 miR-496 调控糖氧剥夺诱导 PC12 细胞氧化应激和凋亡的实验研究

郭兰凯 张唯聪 刘小倩

[摘要] 目的 探讨 circZNF652 对糖氧剥夺(OGD)诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡的影响及机制。方法 体外培养神经细胞 PC12, 建立 OGD 模型, 检测细胞中 circZNF652 和 miR-496 表达量。分别转染 si-circZNF652、miR-496 mimics 或共转染 si-circZNF652 与 anti-miR-496 至 PC12 细胞中, 检测乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、细胞凋亡率、细胞中活化的半胱天冬酶(cleaved-caspases)3 和 cleaved-caspase9 蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验验证 circZNF652 和 miR-496 的调控关系。结果 OGD 组 PC12 细胞中 circZNF652 表达明显高于 Con 组($t=22.57, P<0.05$), miR-496 的表达量明显低于 Con 组($t=40.50, P<0.05$); 与 Con 组比较, OGD 组 PC12 细胞培养上清液中 LDH 释放量、细胞中 MDA 含量均升高(t 分别=20.66、23.88, P 均 <0.05)。与 OGD+si-NC 组比较, OGD+si-circZNF652 组 PC12 细胞培养上清液中 LDH 释放量、细胞中 MDA 含量均降低(t 分别=17.04、20.30, P 均 <0.05); 与 Con 组比较, OGD 组 PC12 细胞凋亡率、cleaved-caspase3、cleaved-caspase9 蛋白表达均升高(t 分别=23.95、26.74、28.17, P 均 <0.05); 与 OGD+si-NC 组比较, OGD+si-circZNF652 组 PC12 细胞凋亡率、cleaved-caspase3、cleaved-caspase9 蛋白表达均降低(t 分别=20.36、21.61、20.61, P 均 <0.05)。与 OGD+miR-NC 组比较, OGD+miR-496 组 miR-496 的表达量明显升高($t=20.22, P<0.05$); 与 OGD+si-circZNF652+anti-miR-NC 组比较, OGD+si-circZNF652+anti-miR-496 组 miR-496 的表达量明显降低($t=72.00, P<0.05$)。结论 下调 circZNF652 可能通过靶向上调 miR-496 抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡。

[关键词] circZNF652; miR-496; 氧化应激; 细胞凋亡

Experimental study of circZNF652 regulate oxidative stress and apoptosis of PC12 cells induced by oxgen-glucose deprivation through targeting miR-496 GUO Lankai, ZHANG Weicong, LIU Xiaoqian. Department of Neurology, Zhoushan Branch of Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Zhoushan 316012, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of circZNF652 in oxygen-glucose deprivation (OGD)-induced oxidative stress and apoptosis of PC12 cells. **Methods** PC12 cells were cultured in vitro, and the OGD model was established. The expression of circZNF652 and miR-496 in cells was detected. The PC12 cells were transfected with si-circZNF652, miR-496 mimics, or co-transfected with si-circZNF652 and anti-miR-496, the lactate dehydrogenase (LDH) and malondialdehyde (MDA), cell apoptosis rate, activated caspases 3 and cleaved caspases 9 were detected. The dual luciferase reporter gene experiment was conducted to verify the regulatory relationship between circZNF652 and miR-496. **Results** The expression of circZNF652 in PC12 cells of OGD group was significantly higher than that of Con group ($t=22.57, P<0.05$), and the expression of miR-496 was significantly lower than that of Con group ($t=40.50, P<0.05$). Compared with Con group, the level of LDH and the content of MDA in PC12 cell culture supernatant in OGD group increased ($t=20.66, 23.88, P<0.05$). Compared with OGD+si-NC group, LDH level and MDA content in PC12 cell culture supernatant of OGD+si-circZNF652 group decreased ($t=17.04, 20.30, P<0.05$). Compared with Con group, the apoptosis rate of PC12 cells, the expression of cleaved caspase 3 and cleaved caspase 9 protein in OGD group increased ($t=23.95, 26.74, 28.17, P<0.05$). Compared with OGD+si-NC group, the apoptosis rate of PC12

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2023.004.005

作者单位: 316012 浙江舟山, 上海交通大学医学院附属瑞金医院舟山分院神经内科

cells and the expression of cleaved caspase 3 and cleaved caspase 9 protein in OGD+si-circZNF652 group decreased ($t=20.36, 21.61, 20.61, P<0.05$).

Compared with OGD+miR-NC group, the expression of miR-496 in OGD+miR-496 group increased significantly ($t=20.22, P<0.05$), compared with OGD+si-circZNF652+anti-miR-NC group, the expression of miR-496 in OGD+si-circZNF652+anti-miR-496 group decreased significantly ($t=72.00, P<0.05$). **Conclusion** Down-regulation of circZNF652 may inhibit OGD-induced oxidative stress and apoptosis of PC12 cells by up-regulation of miR-496.

[Key words] circZNF652; miR-496; oxidative stress; cell apoptosis

脑部缺血缺氧引起的神经功能损伤是缺血性卒中中发生发展的主要原因^[1]。circZNF652是一种环状RNA(circular RNA, circRNA),在骨关节炎中表达上调,其促进脂多糖诱导的软骨细胞凋亡,加重软骨细胞损伤^[2];但对脑部缺血缺氧引起的神经功能损伤的影响和机制还未知。研究显示,miR-496可能是circZNF652的靶向结合位点^[3]。糖氧剥夺(glucose oxygen deprivation, OGD)诱导的PC12细胞损伤模型常被用于模拟缺血性脑损伤^[4]。本次研究观察circZNF652和miR-496对OGD诱导的PC12细胞氧化应激和凋亡的影响及circZNF652与miR-496靶向调控关系。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料 选取2022年1月至2022年5月上海交通大学医学院附属瑞金医院舟山分院神经内科收治的9例缺血性卒中患者为实验组,其中男性5例、女性4例;平均年龄(64.50 ± 2.03)岁;脑部MRI或CT证实缺血性脑卒中的诊断,排除患有脑出血、血液病、炎症或感染性疾病、肾功能衰竭或肝功能衰竭、肿瘤、过去3个月内接受过手术或其他疾病的患者。留取患者入院后清晨空腹静脉血3 ml,置入抗凝管中待检。另取同期在本院进行健康体检的健康志愿者9例的空腹静脉血作为对照组,其中男性5例、女性4例;平均年龄(65.20 ± 2.18)岁。两

组研究对象的性别、年龄比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。本次研究所有参与者均签署知情同意书,且研究经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将PC12细胞系(由武汉普诺赛生命科技有限公司生产)接种至含10%胎牛血清(由浙江天杭生物科技有限公司生产)的DMEM完全培养液(由北京索莱宝科技有限公司生产)中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养。当细胞生长至90%左右密度时,加入0.25%胰蛋白酶(由北京索莱宝科技有限公司生产)消化后传代培养。

1.2.2 circZNF652和miR-496表达检测 将PC12细胞按 5.0×10^5 个/孔接种至6孔板中,加入完全培养液培养12 h,弃培养液,分为Con组和OGD组。Con组用常规培养液培养,OGD组参照文献[6]方法建立OGD模型:先将PC12细胞用不含糖的培养液培养置于缺氧培养箱(5%CO₂、95%N₂)缺氧处理4 h。然后用Trizol试剂盒(由宝生物工程大连有限公司生产)提取细胞总RNA,逆转录合成cDNA,以cDNA为模板行PCR反应(试剂盒由宝生物工程大连有限公司生产)。引物序列见表1。circZNF652和miR-496分别以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)和U6为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其相对表达量。

表1 引物序列

基因	上游	下游
circZNF652	5'-GTCGCAGAGCTAGGGCATGC-3'	5'-ACGATGCCTGAGCTAGCGAC-3'
GAPDH	5'-AAGATGGTGAAGGTCGGTGT-3'	5'-GCTTCCCATTCTCAGCCTTG-3'
miR-496	5'-TCACAAGCTTACCTTTAACAA-3'	5'-TTAGAGGAAATTCGAATTTC-3'
U6	5'-GCTGGTGGAGCTGAAGAATG-3'	5'-GCAGGTACTTGATGGTGCTG-3'

1.2.3 细胞转染和分组 取PC12细胞按 5.0×10^5 个/孔接种至6孔板中,加入完全培养液培养12 h。将PC12细胞分为Con组、OGD组、OGD+si-NC组[转染阴性对照序列(Negative control sequence, si-NC)]、OGD+si-circZNF652组[转染circZNF652小干

扰RNA(si-circZNF652)]、OGD+miR-NC组[转染模拟对照序列(miR-NC)]、OGD+miR-496组[转染miR-496模拟物(mimics)]、OGD+si-circZNF652+anti-miR-NC组[共转染si-circZNF652与抑制剂阴性序列(anti-miR-NC)]、OGD+si-circZNF652+anti-

miR-496组[共转染 si-circZNF652 与 miR-496 抑制剂(anti-miR-496)],通过 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(由美国 Invitrogen 公司生产)进行转染,以上转染序列均由上海生工生物工程有限公司生产。转染 12 h 后,弃培养液,qRT-PCR 检测分别 circZNF652、miR-496 表达以验证转染效果。将转染后的细胞制成单细胞悬液,以 5.0×10^5 个/孔接种至 6 孔板,加入完全培养液培养 12 h,建立 OGD 模型。收集各组细胞培养上清液及细胞。将细胞培养上清液以 3 500 r/min(离心半径 6 cm)离心 10 min,取上清液,采用 ELISA 试剂盒检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.4 兔抗人活化的半胱天冬酶(cleaved-caspases)3 和 cleaved-caspase9 蛋白表达检测 在各组细胞中分别加入 RIPA 裂解液试剂提取细胞总蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测试剂盒(由北京索莱宝科技有限公司生产)检测蛋白含量。电泳转膜后置于脱脂奶粉中封闭 2 h。加入 cleaved-caspase3(1:500)(由英国 Abcam 公司生产)、cleaved-caspase9(1:500)(由英国 Abcam 公司生产)和 GAPDH(1:1000)(由英国 Abcam 公司生产)一抗于 4 ℃冰箱中孵育过夜, TBST 洗膜,次日加入山羊抗兔二抗(1:2000)(由英国 Abcam 公司生产)于 37 ℃条件下孵育 1 h。显影曝光,采用 Image J 软件分析 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9 蛋白相对表达量。

1.2.5 circZNF652 和 miR-496 的调控关系验证 扩增含 miR-496 结合位点及含突变的 miR-496 结合位点的 circZNF652 核苷酸序列,均插入 pGL3 载体,分别构建 circZNF652 野生型(WT-circZNF652)和突变型(MUT-circZNF652)荧光素酶报告基因载体,该过程由上海生工生物工程股份有限公司完成。取 PC12 细胞按 5.0×10^5 个/孔接种至 6 孔板培养 12 h 后,通过 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒,分别共转染 WT-circZNF652 与 miR-NC、WT-circZNF652 与 miR-496 mimic、MUT-circZNF652 与 miR-NC 或 MUT-circZNF652 与 miR-496 mimic 至 PC12 细胞。常规培养 12 h 后,弃培养液,裂解细胞。3 500 r/min(离心半径 6 cm)离心 10 min 取上清液,利用双荧光素酶(由北京索莱宝科技有限公司生产)报告基因检测试剂盒检测各细胞荧光素酶活性。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行实验数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行独立样本 *t* 检验;多组间计量资料比较采用 *F* 检验,两两比较采用 LSD-*t* 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circZNF652 和 miR-496 在缺血性脑卒中患者和健康者外周血以及 OGD 诱导的 PC12 细胞中的表达见表 2

表 2 circZNF652 和 miR-496 在缺血性脑卒中患者和健康者外周血以及在 OGD 组中的表达

组别	circZNF652	miR-496
实验组	2.16±0.19*	0.53±0.07*
对照组	1.00±0.12	1.01±0.10
OGD 组	2.58±0.21 [#]	0.46±0.04 [#]
Con 组	1.00±0.00	1.00±0.00

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; [#]: 与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。

由表 2 可见,实验组 circZNF652 表达量明显高于对照组($t=15.35$, $P < 0.05$),而 miR-496 的表达量明显低于对照组($t=117.80$, $P < 0.05$);且 OGD 组 PC12 细胞中 circZNF652 表达明显高于 Con 组($t=22.57$, $P < 0.05$),miR-496 的表达量明显低于 Con 组($t=40.50$, $P < 0.05$)。

2.2 下调 circZNF652 表达对 OGD 诱导的 PC12 细胞 LDH 释放量和 MDA 含量的影响见表 3

表 3 各组 PC12 细胞 LDH 释放量和 MDA 含量比较

组别	LDH/U/L	MDA/μg/L
Con 组	33.27±3.04	2.79±0.24
OGD 组	83.49±6.63*	9.21±0.77*
OGD+si-NC 组	85.28±6.44	9.47±0.86
OGD+si-circZNF652 组	41.95±4.09 [#]	3.37±0.27 [#]

注: *: 与 Con 组比较, $P < 0.05$; [#]: 与 OGD+si-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

由表 3 可见,与 Con 组比较,OGD 组 PC12 细胞培养上清液中 LDH 释放量、细胞中 MDA 含量均升高(t 分别=20.66、23.88, P 均 < 0.05)。与 OGD+si-NC 组比较,OGD+si-circZNF652 组 PC12 细胞培养上清液中 LDH 释放量、细胞中 MDA 含量均降低(t 分别=17.04、20.30, P 均 < 0.05)。

2.3 下调 circZNF652 表达对 OGD 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响见表 4

表4 下调circZNF652表达对OGD诱导的PC12细胞凋亡的影响

组别	凋亡率/%	cleaved-caspase3蛋白	cleaved-caspase9蛋白
Con组	5.15±0.46	0.25±0.02	0.15±0.02
OGD组	24.42±2.37*	0.73±0.05*	0.57±0.04*
OGD+si-NC组	25.37±2.35	0.75±0.05	0.58±0.05
OGD+si-circ ZNF652组	8.78±0.67#	0.33±0.03#	0.21±0.02#

注:*,与Con组比较, $P<0.05$;#:与OGD+si-NC组比较, $P<0.05$ 。

由表4可见,与Con组比较,OGD组PC12细胞凋亡率、cleaved-caspase3、cleaved-caspase9蛋白表达均升高(t 分别=23.95、26.74、28.17, P 均 <0.05)。与OGD+si-NC组比较,OGD+si-circZNF652组PC12细

胞凋亡率、cleaved-caspase3、cleaved-caspase9蛋白表达均降低(t 分别=20.36、21.61、20.61, P 均 <0.05)。

2.4 circZNF652靶向调控miR-496的表达 转染si-circZNF652的PC12细胞中miR-496的表达量为 3.13 ± 0.28 ,明显低于转染si-NC的PC12细胞中circZNF652表达量 1.00 ± 0.00 ,差异有统计学意义($t=22.82$, $P<0.05$)。StarBase数据库预测显示circZNF652与miR-496存在结合位点,见图1。

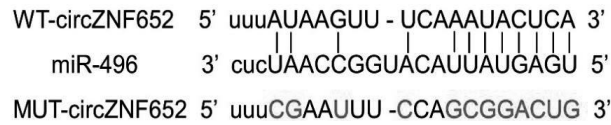


图1 circZNF652的序列中含有与miR-496互补的核苷酸序列

2.5 上调miR-496对OGD诱导的PC12细胞损伤的影响见表5

表5 miR-496过表达对OGD诱导的PC12细胞损伤的影响

组别	miR-496	LDH/U/L	MDA/ μ g/L	凋亡率/%	cleaved-caspase3蛋白	cleaved-caspase9蛋白
OGD+miR-496组	2.82±0.27*	50.88±4.06*	4.31±0.37*	13.36±1.08*	0.41±0.04*	0.29±0.03*
OGD+miR-NC组	1.00±0.00	86.28±7.85	9.67±0.69	26.36±2.35	0.76±0.05	0.59±0.04

注:*,与OGD+miR-NC组比较, $P<0.05$ 。

由表5可见,与OGD+miR-NC组比较,OGD+miR-496组miR-496的表达量明显升高($t=20.22$, $P<0.05$),LDH释放量、MDA含量、细胞凋亡率及cleaved-caspase3、cleaved-caspase9蛋白表达均降低

(t 分别为12.02、20.54、15.08、16.40、18.00, P 均 <0.05)。

2.6 下调miR-496表达逆转了下调circZNF652表达对OGD诱导的PC12细胞损伤的作用见表6

表6 下调miR-496表达逆转下调circZNF652对OGD诱导的PC12细胞损伤的作用

组别	miR-496	LDH/U/L	MDA/ μ g/L	凋亡率/%	cleaved-caspase3蛋白	cleaved-caspase9蛋白
OGD+si-circZNF652+anti-miR-496组	0.28±0.03*	73.58±5.74*	8.14±0.66*	18.05±1.15*	0.63±0.05*	0.48±0.04*
OGD+si-circZNF652+anti-miR-NC组	1.00±0.00	39.42±3.32	3.29±0.33	8.34±0.63	0.32±0.03	0.20±0.02

注:*,与OGD+si-circZNF652+anti-miR-NC组比较, $P<0.05$ 。

由表6可见,与OGD+si-circZNF652+anti-miR-NC组比较,OGD+si-circZNF652+anti-miR-496组miR-496的表达量明显降低($t=72.00$, $P<0.05$),LDH释放量、细胞中MDA含量、细胞凋亡率、cleaved-caspase3和cleaved-caspase9蛋白表达均升高(t 分别=15.46、15.45、19.72、22.22、15.95、18.78, P 均 <0.05)。

3 讨论

PC12细胞因具有神经细胞结构和功能特性,常被用作构建神经细胞OGD损伤模型^[5]。细胞受损时,LDH被释放^[6]。MDA是脂质过氧化产物之一^[7]。caspase9、caspase3分别作为caspase级联反应的启动分子、执行分子,完成向下游传递凋亡信号、诱导细胞凋亡^[8]。本次研究结果显示,PC12细胞经OGD

处理后,细胞培养上清液中LDH释放量、细胞中MDA含量、细胞凋亡率以及cleaved-caspase3、cleaved-caspase9蛋白表达均升高,说明OGD诱导PC12细胞产生了氧化应激和凋亡,模型建立成功。

circRNA可通过调控miRNA的表达参与脑血管疾病发生发展^[9,10]。本研究结果显示,缺血性脑卒中患者外周血中circZNF652表达量高于健康志愿者,且OGD促进PC12细胞中circZNF652的表达,下调circZNF652降低了OGD诱导的PC12细胞培养上清液中LDH含量及细胞中MDA含量,同时降低了OGD诱导的PC12细胞凋亡率及cleaved-caspase3、cleaved-caspase9蛋白表达,提示circZNF652有可能成为减轻缺血缺氧引起的神经细胞损伤的分子靶点。

在本研究中,缺血性脑卒中患者外周血中miR-496的表达量低于健康志愿者,这与PC12细胞经OGD诱导后细胞中circZNF652表达升高而miR-496表达降低的结果一致。双荧光素酶实验证实circZNF652可靶向负调控miR-496。研究显示,miR-496在脑缺血/再灌注大鼠及神经细胞SH-SY5Y中表达下调,上调miR-496可减轻脑缺血再灌注损伤^[11,12]。在本研究中,上调miR-496降低了OGD诱导的PC12细胞培养上清液中LDH释放量及细胞中MDA含量,同时降低了OGD诱导的PC12细胞凋亡率及cleaved-caspase3、cleaved-caspase9蛋白表达,说明上调miR-496抑制了OGD诱导的PC12细胞氧化应激和凋亡。此外,同时下调miR-496和circZNF652的PC12细胞经OGD诱导后其氧化应激和凋亡程度明显高于仅下调circZNF652的PC12细胞,进一步提示circZNF652可能通过靶向上调miR-496的表达来抑制OGD诱导的PC12细胞氧化应激和凋亡。

综上所述,OGD促进PC12细胞中circZNF652的表达,而抑制miR-496的表达;下调circZNF652能够有效抑制OGD诱导的PC12细胞氧化应激和凋亡,可能是通过靶向负调控miR-496实现的,circ-ZNF652/miR-496轴可能为减轻缺血缺氧引起的神经功能损伤提供了分子靶点。

参考文献

- 刘玉林,闵瑜,黄臻.骨髓间充质干细胞移植在缺血性脑卒中治疗中的应用研究进展[J].山东医药,2020,60(35):102-105.
- Yuan XF, Zhang YC, Cai C, et al. Circular RNA circ-ZNF652 is overexpressed in osteoarthritis and positively regulates LPS-induced apoptosis of chondrocytes by up-regulating PTEN[J]. Autoimmunity, 2021, 54(7):415-421.
- Liu XX, Zhao PF, Ge W. Knockdown of circular RNA circ-ZNF652 remits LPS-induced inflammatory damage by regulating miR-181a[J]. Biofactors, 2020, 46(6):1031-1040.
- 张城,马剑平,沈育桦,等.活性多肽GRGDS对氧糖剥夺诱导PC12细胞损伤的保护作用及其机制研究[J].药学实践杂志,2021,39(4):317-321,330.
- 汪业铭,李树铁,高艳,等.右美托咪定对PC12细胞氧糖剥夺损伤的保护作用[J].郑州大学学报:医学版,2019,54(4):611-614.
- Qi H, Zhang JC, Shang Y, et al. Argon inhibits reactive oxygen species oxidative stress via the miR-21-mediated PDCD4/PTEN pathway to prevent myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):5529-5539.
- Zhong CY, Yin CG, Niu GZ, et al. MicroRNA miR-497 is closely associated with poor prognosis in patients with cerebral ischemic stroke[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):2851-2862.
- Zheng TT, Chen KK, Zhang X, et al. Knockdown of TXNDC9 induces apoptosis and autophagy in glioma and mediates cell differentiation by p53 activation[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(18):18649-18659.
- Zhang ZD, He JB, Wang BL. Circular RNA circ-HECTD1 regulates cell injury after cerebral infarction by miR-27a-3p/FSTL1 axis[J]. Cell Cycle, 2021, 20(9):914-926.
- Cao YQ, Liu H, Zhang J, et al. Circular RNA cZNF292 silence alleviates OGD/R-induced injury through up-regulation of miR-22 in rat neural stem cells (NSCs)[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1):594-601.
- Yao XX, Yao R, Yi JP, et al. Upregulation of miR-496 decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by negatively regulating BCL2L14[J]. Neurosci Lett, 2019, 696(1):197-205.
- Mao ZM, Wang WJ, Gong HX, et al. Upregulation of miR-496 rescues propofol-induced neurotoxicity by targeting rho associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2) in prefrontal cortical neurons[J]. Curr Neurovasc Res, 2020, 17(2):188-195.

(收稿日期 2022-03-27)

(本文编辑 高金莲)