

环状 RNA 在动脉粥样硬化中的研究进展

王丹¹, 谭真真², 付斯麒¹, 王婧¹, 郭会彩^{1,2}

(1. 河北医科大学公共卫生学院毒理学教研室, 河北省石家庄市 050017; 2. 内蒙古医科大学, 内蒙古呼和浩特市 010110; 3. 河北省环境与人群健康重点实验室, 河北省石家庄市 050017)

[专家简介] 郭会彩, 医学博士, 教授, 博士研究生导师。河北医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 河北医科大学医学与健康研究院公共卫生与健康风险管理研究中心 PI。主要从事环境污染物与健康研究, 侧重心血管毒理学研究。共主持国家自然科学基金 3 项, 河北省自然科学基金多项。以第一作者或通信作者在《Am J Physiol Heart Circ Physiol》《J Hypertens》《Toxicol Lett》等国际学术期刊发表 SCI 论文 12 篇, 核心期刊文章 18 篇。中国毒理学会青年委员会委员, 中国毒理学会免疫毒理专业委员会委员, 河北省毒理学会秘书长。河北省“三三三人才工程”第二层次人选。

[关键词] 环状 RNA; 动脉粥样硬化; 内皮细胞; 平滑肌细胞; 免疫炎症细胞; 生物标志物

[摘要] 环状 RNA(circRNA) 是一类新型内源性非编码 RNA, 广泛存在于真核生物体中, 因其含量丰富、序列保守、结构稳定等特性, 是近年来热门的基因表达调节因子。越来越多的研究表明 circRNA 在影响内皮完整性、血管平滑肌细胞和免疫炎症细胞的功能, 以及在驱动动脉粥样硬化(As) 斑块起始和稳定中发挥重要作用, 因此其可能作为 As 新型诊断生物标志物和治疗靶标。因此, 文章就 circRNA 在 As 中研究现状, 综述其在 As 中的功能以及调节机制。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A



Research progress of circular RNAs in atherosclerosis

WANG Dan¹, TAN Zhenzhen², FU Siqi¹, WANG Jing¹, GUO Huicai^{1,2}

(1. Department of Toxicology, School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China; 2. Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010110, China; 3. Hebei Province Key Laboratory of Environment and Human Health, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

[KEY WORDS] circular RNA; atherosclerosis; endothelial cells; smooth muscle cells; immune inflammatory cells; biomarkers

[ABSTRACT] Circular RNA (circRNA) is a new type of endogenous non-coding RNA, widely present in eukaryotic organisms, due to its rich content, conserved sequence, stable structure and other characteristics, it has been a popular gene expression regulator in recent years. More and more studies have shown that circRNA plays an important role in affecting endothelial integrity disorders, the function of vascular smooth muscle cells and immune inflammatory cells, and driving atherosclerosis (As) plaque initiation and stability. It can be used as a new diagnostic biomarker and therapeutic target for As. Therefore, this paper summarized the function and regulatory mechanism of circRNA in As based on the current research status of circRNA in this disease.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作为一种动脉血管壁慢性炎症病变, 是缺血性心脏病、中风和

猝死等心脑血管疾病的常见原因。其作为一种复杂的多因素病变, 血管内皮细胞(endothelial cells,

[收稿日期] 2020-07-28

[修回日期] 2020-09-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81473292、21976050); 2020 年河北医科大学“大学生创新性实验计划”项目(USIP2020078); 河北省自然科学基金项目(B2018206283)

[作者简介] 王丹, 硕士研究生, 研究方向为环境心血管毒理学, E-mail 为 wangdand545@163.com。通信作者郭会彩, 博士研究生导师, 研究方向为环境心血管毒理学, E-mail 为 huicaiguo@hotmail.com。

EC)、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的功能异常和炎症细胞浸润在 As 的形成中至关重要。环状 RNA(circular RNA, circRNA)作为调控分子参与了 As 过程中的细胞增殖迁移、凋亡衰老以及炎症因子的释放。随着生物信息学的发展和高通量测序技术的进步,目前已发现多种 circRNA 在 As 发生和发展过程中的关键信号转导和分子调控机制,为 As 的诊断和治疗提供了新思路。因此,现就 circRNA 调节 As 过程相关的细胞和分子机制予以综述。

1 circRNA 的生物学特征及功能

circRNA 是一类共价闭环状结构的非编码 RNA,与常规线性 RNA 不同, circRNA 是通过反向剪接形成,不具有 5'端帽子和 3'端 Poly(A)尾结构,因此具有线性 RNA 不具备的特征和功能^[1]。

circRNA 可充当海绵吸附微小 RNA(miRNA, miRNA),作为竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)结合 miRNA,影响 mRNA 表达。当 circRNA 作为 miRNA 海绵与其结合后, miRNA 将无法转录调控其靶基因,使得被 miRNA 抑制的 mRNA 得以翻译,从而促进靶基因的表达。但是只有满足特定化学计量要求的 circRNA 才能充当内源性 miRNA 海绵,即发生海绵效应的 circRNA 的丰度必须与 miRNA 的丰度相匹配^[2]。

除作为 miRNA 海绵外, circRNA 还可与特定蛋白结合以调节其活性。当 circRNA 与 RNA 结合蛋白结合时,可作为转运或诱导因子分离或存储宿主基因蛋白到特定亚细胞位置,从而发挥蛋白海绵作用,降低靶蛋白水平^[3];或者 circRNA 充当“蛋白支架”,搭建几种蛋白相互作用平台,形成复合物,调节其结合蛋白表达^[4]。

circRNA 还可转录调控宿主基因以及编码蛋白质。能够调控转录的 circRNA 一般为外显子-内含子 circRNA 和环状内含子 circRNA,它们通过与小核糖核蛋白 U1 相互作用调节 RNA 聚合酶 II 活性,促进其亲本基因转录^[5]。对于能够翻译成蛋白质的基因而言, mRNA 的 5'端帽子结构相当重要。 circRNA 虽不具有 5'端帽子,但能够与核糖体相互作用,并以 5'端帽子非依赖性方式编码蛋白质,其翻译可能在内部核糖体进入位点的 circRNA 上进行^[6]。

circRNA 的生物学特征主要有以下几点:(1)在真核生物体内表达丰富;(2)拥有保守特性;(3)由

于是闭环结构,不易被 RNA 核酸外切酶降解,半衰期长,可在血浆中长期稳定存在;(4)在生物体的不同组织、不同发育阶段存在显著的表达差异。根据其独特的生物学特征, circRNA 可在特定时间内作为细胞转录历史的记忆分子^[6],用以记录 mRNA 转录翻译情况,使得 circRNA 有望成为潜在的理想生物标志物。

2 circRNA 在动脉粥样硬化形成中的作用

circRNA 参与多种疾病的病理发展过程,其潜在机制可能与 circRNA 上调或下调密切相关。在以 As 为特征的冠心病(coronary heart disease, CHD)患者外周血中检测到 73 种 circRNA 表达上调, 37 种 circRNA 表达下调^[7]。患者急性破裂的颈动脉斑块中 circRNA-16 表达明显升高^[8]。通过分析兔 As 模型中 circRNA、miRNA 和 mRNA 表达谱,构建差异表达的 circRNA-miRNA-mRNA 三重网络,证实了 circRNA 在 As 发病机制中作为 ceRNA 竞争 miRNA 调节 mRNA 表达^[9]。以上研究均提示 circRNA 与 As 的发生有关。内皮细胞、平滑肌细胞以及免疫炎症细胞是参与 As 形成的重要细胞。目前已发现多种 circRNA 对内皮细胞、平滑肌细胞以及免疫炎症细胞具有明显的调控作用,从而参与 As 的形成过程。鉴于此,以下主要叙述 circRNA 在这些细胞中的调节机制。

2.1 circRNA 与内皮细胞

内皮解剖完整性的丧失是 As 的初始阶段。当内皮受到各种刺激(如缺氧、促炎细胞因子、氧化应激、高血压、高血糖)时会损害内皮细胞(endothelial cells, EC)的功能,随着 EC 进入功能障碍状态,血管动态平衡受到损害,表现出促氧化、促炎、促凝血、血管黏附及内皮通透性增强,使得 EC 增殖、迁移、凋亡、衰老,促进血管生成和炎症,继而一连串事件导致 As 早期病变形成。多种 circRNA 参与了 EC 功能调控,具体总结见表 1。

2.1.1 circRNA 调控内皮细胞增殖、迁移 氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL)是 EC 功能异常的危险因素,导致 EC 异常增殖、迁移和新血管生成。较早研究发现, ox-LDL 引起 hsa_circ_0003575 的表达增加可降低人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的增殖和血管生成能力^[10],提示 circRNA 可能在 As 中充当 EC 异常表型的关键调节剂。在此基础上,

Zhang 等^[11]发现 circ_0003204 可以充当 miR-370 ceRNA 调节 TGF β R2 及其下游基因,抑制 ox-LDL 所致的人主动脉内皮细胞增殖、迁移和毛细血管形成(图 1A)。已知 Bcl-2 和 c-myc 蛋白在调控细胞增殖和凋亡中起重要作用,参与调节 As 的发生,Shen 等^[12]在 As 患者血细胞中发现 circ_0044073 水平相较于健康者显著增加,其通过靶向 miR-107 激活 JAK1/STAT3 信号通路并上调促 As 的下游蛋白 Bcl-2 和 c-myc 水平增加细胞增殖和侵袭,为 As 的治疗提供了新目标。研究发现, circ_HIPK3 在糖尿

病导致的视网膜病变中表达显著上调引起 EC 功能障碍、细胞增殖增加^[14]。除此之外,缺氧处理下心肌细胞中 circ_HIPK3 表达显著升高, circ_HIPK3 可通过外泌体转移到心脏微血管内皮细胞中使得 EC 免受氧化损伤,其主要机制为海绵吸附与血管生成相关的 miR-29a,从而使 miR-29a 活性降低而上调 IGF-1 表达,减少微血管功能障碍^[15]。胰岛素样生长因子 1(IGF-1)被广泛认为具有抗 As 作用,尤其在促进斑块稳定方面作用显著,提示 circ_HIPK3 可能对 As 具有预防和治疗作用。

表 1. circRNA 在内皮细胞中的调控和功能

Table 1. Regulation and function of circRNA in endothelial cells

circRNA	生物学功能	目标 miRNA	调控基因	功能	参考文献
hsa_circ_0003575	miRNA 海绵	未知	未知	抗增殖和血管生成	[10]
circ_0003204	miRNA 海绵	miR-370-3p	TGF β R2/phospho-SMAD3	抗增殖、迁移和血管形成	[11]
circ_0044073	miRNA 海绵	miR-107	JAK1/STAT3	促增殖和侵袭	[12]
circ_DNMT3B	miRNA 海绵	miR-20b-5p	BAMBI	促功能障碍	[13]
circ_HIPK3	miRNA 海绵	miR-30a	未知	促增殖和功能障碍	[14]
	miRNA 海绵	miR-29a	IGF-1	抗氧化损伤	[15]
circ_RELL1	miRNA 海绵	miR-6873-3p	MyD88/NF- κ B	促炎	[16]
hsa_circ_0068087	miRNA 海绵	miR-197	TLR4/NF- κ B/NLRP3	促炎,促功能障碍	[18]
circ_ANRIL	未知	未知	未知	促凋亡和炎症	[19]
ciRS-7	miRNA 海绵	miR-26a-5p	PI3K/Akt JNK/p38	促增殖、迁移和血管形成及抗凋亡	[22]
hsa_circ_0010729	miRNA 海绵	miR-186	HIF-1 α	促凋亡	[21]

2.1.2 circRNA 调控内皮细胞炎症 在 As 的发生阶段,EC 被损伤激活,表达单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、细胞间黏附分子 1(intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1),促进单核细胞和淋巴细胞向血管壁募集,使得炎症由此开始。沉默 circ_RELL1 可减少 ICAM-1 和 VCAM-1 表达,以减轻炎症反应。同时,研究发现 circ_RELL1 海绵吸附细胞质内 miR-6873-3p 靶向 MyD88 减少 NF- κ B 活性及炎症因子水平调节 EC 炎症,为 As 的治疗提供了以 circ_RELL1/miR-6873-3p/MyD88 为轴的抗炎机制^[16](图 1B)。已知 miR-197 参与血管内炎症和血小板活化,被认为是诊断冠心病的生物标志物^[17]。研究证实 miR-197 可作为 hsa_circ_0068087 的靶点,介导 NLRP3 炎症小体和 NF- κ B 炎症通路增强 EC 炎症^[18]。虽然已证实 circ_ANRIL 表达增加可促进大鼠冠状动脉的 EC 炎症,但其致炎机制还需进一步

研究^[19]。这些研究表明 circRNA 在调控 EC 炎症中发挥着重要作用。

2.1.3 circRNA 调控内皮细胞凋亡 EC 凋亡可增强血管壁对脂蛋白的通透性和诱导炎症细胞浸润,参与 As 病变。EC 凋亡的发生造成斑块糜烂和破裂的概率明显增加,并可导致局部 EC 剥脱而触发血栓形成。有研究证实缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)能使巨噬细胞向促炎 M1 型转化,诱导细胞凋亡促使坏死核心形成,增加斑块破裂风险^[20]。在缺氧诱导的 HUVEC 损伤中发现, hsa_circ_0010729 充当 miR-186 的海绵,下调 miR-186 并靶向 HIF-1 α 促进 EC 凋亡,提示 hsa_circ_0010729 在影响斑块稳定性中的重要作用^[21]。通常有害刺激可激活不同信号通路影响 EC 凋亡, Cui 等^[22]在人类微血管内皮细胞中发现 ciRS-7 通过下调 miR-26a-5p 激活细胞中的 PI3K/Akt 通路抑制 JNK/p38 途径,促进细胞增殖迁移,而沉默该 circRNA 可抑制新血管生成,促进细胞凋亡(图 1C)。

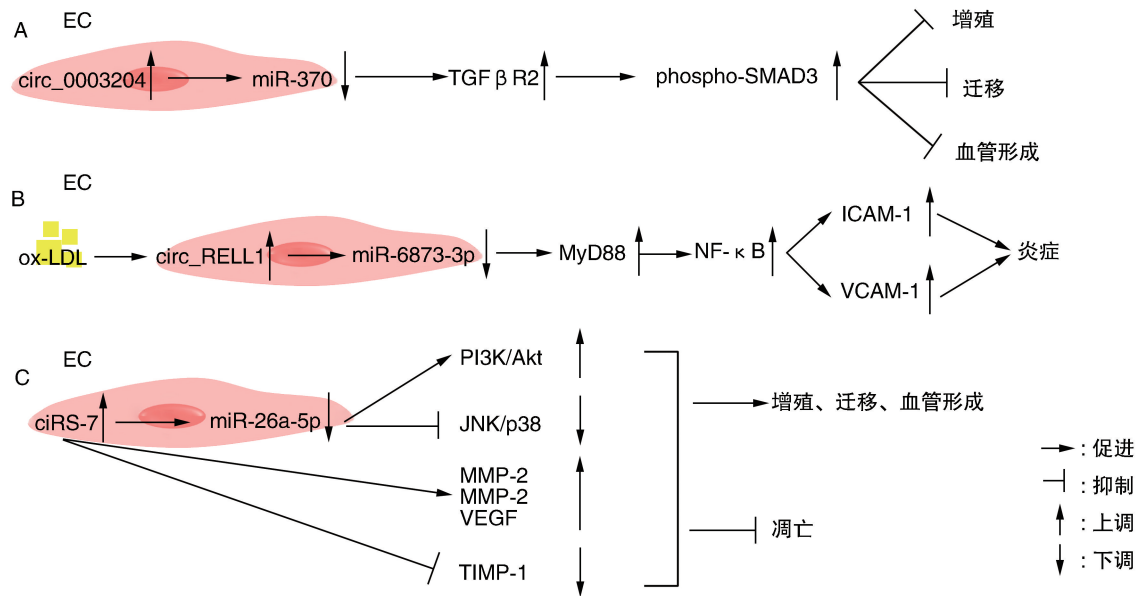


图 1. circRNA 通过不同分子机制调控内皮细胞

A 为 circ_0003204 海绵吸附 miR-370, 上调 TGFβR2, 激活 phospho-SMAD3, 抑制 EC 增殖、迁移和血管新生;

B 为 ox-LDL 刺激下 circ_RELL1 上调, 通过海绵吸附 miR-6873-3p, 激活 MyD88 和 NF-κB, 促使 ICAM-1、VCAM-1 升高引发 EC 炎症反应;

C 为 ciRS-7 海绵吸附 miR-26a-5p 激活 PI3K/Akt 通路, 抑制 JNK/p38 途径, 还可使 MMP-2、MMP-9、VEGF 上调, TIMP-1 下调, 从而促进 EC 增殖、迁移和血管形成, 抑制凋亡。

Figure 1. circRNA regulate endothelial cells through different molecular mechanisms

2.2 circRNA 与平滑肌细胞

VSMC 是血管的重要组成部分, 其增殖、迁移、凋亡和衰老影响着心脑血管疾病的发生和发展。VSMC 的增殖是 As 早期病变, 其损伤或炎症反应可促进 As。但晚期斑块中 VSMC 增殖对 As 有益, 其增殖增加能够防止斑块纤维帽破裂, 增加斑块稳定

性。相反, VSMC 凋亡、衰老促使斑块纤维帽变薄, 其表型转换衍生的巨噬细胞可能促进炎症, 导致坏死核心形成, 增加斑块易损性, 加重 As 病变^[23]。因此对这些过程的调节影响着 As 进展和斑块稳定。circRNA 作为重要调控因子参与 VSMC 功能调节, 其机制总结见表 2。

表 2. circRNA 在平滑肌细胞中的调控和功能

Table 2. Regulation and function of circRNA in smooth muscle cells

circRNA	生物学功能	目标 miRNA	调控基因	功能	参考文献
circ_CHFR	miRNA 海绵	miR-370	FOXO1/CCND1	促增殖和迁移	[25]
	miRNA 海绵	miR-214-3p	Wnt3/β-catenin	促增殖、迁移和炎症	[37]
circ_WDR77	miRNA 海绵	miR-124	FGF-2	促增殖和迁移	[26]
circ_Lrp6	miRNA 海绵	miR-145	未知	促迁移、增殖和分化	[28]
circ_SATB2	miRNA 海绵	miR-939	Sirt1	促增殖和分化, 抗凋亡	[29]
circ_RUSC2	miRNA 海绵	miR-661	SYK	促增殖、迁移, 抗凋亡	[30]
circ_Diaph3	miRNA 海绵	miR-148a-5p	Igflr	促分化、增殖和迁移	[31]
circ_NRG-1	miRNA 海绵	miR-193b-5p	NRG-1	促凋亡	[33]
hsa_circ_000595	未知	未知	未知	促凋亡	[34]
circ_CBFβ	miRNA 海绵	miR-28-5p	LYPD3/GRIA4	促增殖, 抗凋亡	[35]
circ_ANRIL	蛋白支架	未知	PES1	诱导凋亡, 抑制增殖	[36]
circ_Sirt1	miRNA 海绵	miR-132/212	SIRT1/NF-κBp65	抗炎	[38]
	转录调控宿主基因	未知			
circRNA_0077930	miRNA 海绵	miR-622	Kras	促衰老	[41]
circ_TET3	miRNA 海绵	miR-351-5p	PTPN1	促增殖、迁移	[42]

2.2.1 circRNA 调控平滑肌细胞增殖、迁移 在 As 的发生过程中,VSMC 增殖是血管狭窄的病理基础。血管病变期间,VSMC 从中膜异常增殖迁移到内膜层触发血管重塑,加速 As。FOXO1 已被证实是调节血管重塑的重要靶点^[24]。Yang 等^[25]发现 circ_CHFR 在 ox-LDL 诱导的 VSMC 中表达异常,敲除 circ_CHFR 能有效抑制 VSMC 增殖迁移能力,进一步发现其调控机制是充当 miR-370 海绵介导下游转录因子 FOXO1 靶向调控 CCND1 转录翻译 Cyclin D1 蛋白,促进 VSMC 增殖迁移。Chen 等^[26]发现 circ_WDR77 充当 miR-124 海绵靶向成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor-2,FGF-2)调控高糖诱导下的 VSMC 增殖、迁移,为糖尿病相关心血管疾病研究开辟了新途径。具有 As 保护性的 miR-145 是 VSMC 中表达最多的 miRNA 之一,缺乏 miR-145 可导致 VSMC 从收缩状态向增殖迁移状态转变。Hall 等^[28]发现 circ_Lrp6 充当 miR-145 海绵促进 VSMC 迁移、增殖和分化,说明 circ_Lrp6 可以调控 miR-145 在 VSMC 中的表型调节作用。这一研究表明 VSMC 表型转化是 As 进展的关键因素,当 VSMC 从收缩型转化为合成型时,细胞增殖迁移加速,收缩蛋白减少。SM22a 作为 VSMC 收缩蛋白, circ_SATB2^[29](图 2A)以及 circ_RUSC2^[30]可抑制 SM22a 的表达,且在增殖性 VSMC 中表达上调,两者分别充当 miR-939 与 miR-661 海绵促进细胞增殖、迁移。当成熟的 VSMC 处于静止状态时, α 平滑肌肌动蛋白(α -smoothmuscle actin, α -SMA)和平滑肌肌球蛋白重链等收缩蛋白表达增加,而 circ_Diaph3 可抑制这些收缩蛋白表达,使 VSMC 转化为合成型,促进新内膜生成^[31],内膜增生是心血管疾病中血管再狭窄的主要原因,增加 As 患病风险。

2.2.2 circRNA 调控平滑肌细胞凋亡 血管重塑是心血管疾病的重要病理生理过程,导致血管壁增厚,管腔狭窄,VSMC 凋亡在调节血管重塑的过程中起着关键作用。在血管重塑早期,血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)促进 VSMC 增殖,抑制凋亡^[32]。相反,神经调节蛋白 1(neuregulin 1, NRG-1)促进 VSMC 中收缩蛋白 α -SMA 表达,抑制增殖迁移促进凋亡。研究证实, circ_NRG-1 充当 miR-193b-5p 海绵上调 NRG-1 诱导主动脉 VSMC 凋亡,调节 Ang II 的抗凋亡作用^[33],影响 As 血管重塑。随着 As 病变发展,粥样斑块中的 VSMC 凋亡水平增加,斑块纤维帽变薄,引发斑块破裂,加速 As 病变发展。miR-28-5p 与 VSMC 凋亡有功能相关性, circ_CBFB 充当 miR-28-5p 海绵,以 LYPD3/GRIA4 依赖方式在

VSMC 中发挥抗凋亡和促增殖作用^[35],进一步证实了 circRNA 在调节细胞凋亡中的重要作用。位于 9p21 染色体靠近 INK4 基因座中的环形反义非编码 RNA circ_ANRIL,通过与核仁蛋白 PES1 结合阻止 VSMC 和巨噬细胞中核糖体 RNA 的成熟,损害核糖体的生物合成并使 p53 激活导致细胞凋亡增加、增殖降低,减少 As 早期斑块形成^[36](图 2B)。除此之外,As 中的 VSMC 凋亡也与炎症相关,当斑块中凋亡的 VSMC 未被巨噬细胞及时清除则会引发继发性坏死,坏死的 VSMC 释放促炎因子白细胞介素 1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),引发斑块不稳定。

2.2.3 circRNA 调控平滑肌细胞炎症 炎症是整个 As 发生和发展过程中生理和病理变化的共同基础。脂质浸润有助于理解 As 斑块炎症,LDL 在血管损伤后修饰为 ox-LDL,ox-LDL 一方面在血管内壁聚集,诱导 As 斑块形成。Zhuang 等^[37]建立 ox-LDL 诱导下的 VSMC 炎症模型,证实 circ_CHFR 通过 miR-214-3p/Wnt3/ β -catenin 途径促进 ox-LDL 诱导的 VSMC 增殖、迁移和炎症反应,这一发现阐述了 As 相关心血管疾病进展新的分子机制,表明 circ_CHFR 可能是 As 的治疗靶点。另一方面,ox-LDL 被单核细胞分化的巨噬细胞或 VSMC 表型转化的巨噬细胞吞噬,转为泡沫细胞。NF- κ B 介导的 VSMC 炎症表型转化在 As 中起着核心作用,Kong 等^[38]首次证实来自 SIRT1 宿主基因的 circ_Sirt1 对 VSMC 的炎症表型转换有益,发现 circ_Sirt1 通过与 miR-132/212 结合,增强抑制血管炎症的 SIRT1 mRNA 表达、降低 SIRT1 蛋白水平抑制 NF- κ B 活化;同时发现 circ_Sirt1 不仅能直接影响 SIRT1 转录后蛋白水平促使核内 NF- κ B p65 去乙酰化失活还能与胞质内 NF- κ B p65 相互作用,使 NF- κ B p65 隔离在胞质中,抑制 NF- κ B 活化,说明 circ_Sirt1 既作为 miRNA 海绵也利用蛋白质-RNA 相互作用调控母本基因转录表达发挥协同抗炎作用(图 2C)。circ_Sirt1 的抗炎作用同时在人体和动物上得到证实,强烈提示 circ_Sirt1 为治疗 As 的潜在靶点。

2.2.4 circRNA 调控平滑肌细胞衰老 VSMC 衰老是导致斑块不稳定因素之一。由于衰老细胞丧失增殖能力,使得斑块破裂后的修复能力降低而直接引发斑块不稳定;其次,衰老的 VSMC 分泌多种促炎细胞因子,驱动斑块炎症和基质降解间接引发斑块不稳定。在正常细胞中,衰老主要通过 p53 途径介导,该途径可激活细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21,或通过 p16 途径抑制细胞周期蛋白依赖性

激酶,从而阻止 Rb 蛋白磷酸化,抑制细胞周期进程^[39]。当细胞处于各种刺激时(氧化应激、DNA 破坏)可使 p53/p21 和 p16/RB 途径异常激活诱导过早衰老。Kras 是氧化应激途径靶蛋白,诱导血管细胞早衰,促进 As^[40]。与正常 VSMC 相比,斑块 SMC 中 p21、p16 表达水平升高。此前,研究发现 EC 的衰老与 SMC 密切相关,在此基础上研究者发现 HU-

VEC 衍生的外泌体中 circRNA_0077930 促进 VSMC 衰老,当 circRNA_0077930 在外泌体中耗尽时将不再具有此功能,其调控机制是充当 miR-622 海绵导致靶基因 Kras 表达增加以及上调 p21、p53 和 p16 表达水平诱导 VSMC 衰老,表明外泌体中 circRNA_0077930 有望成为 VSMC 衰老治疗靶点^[41](图 2D)。

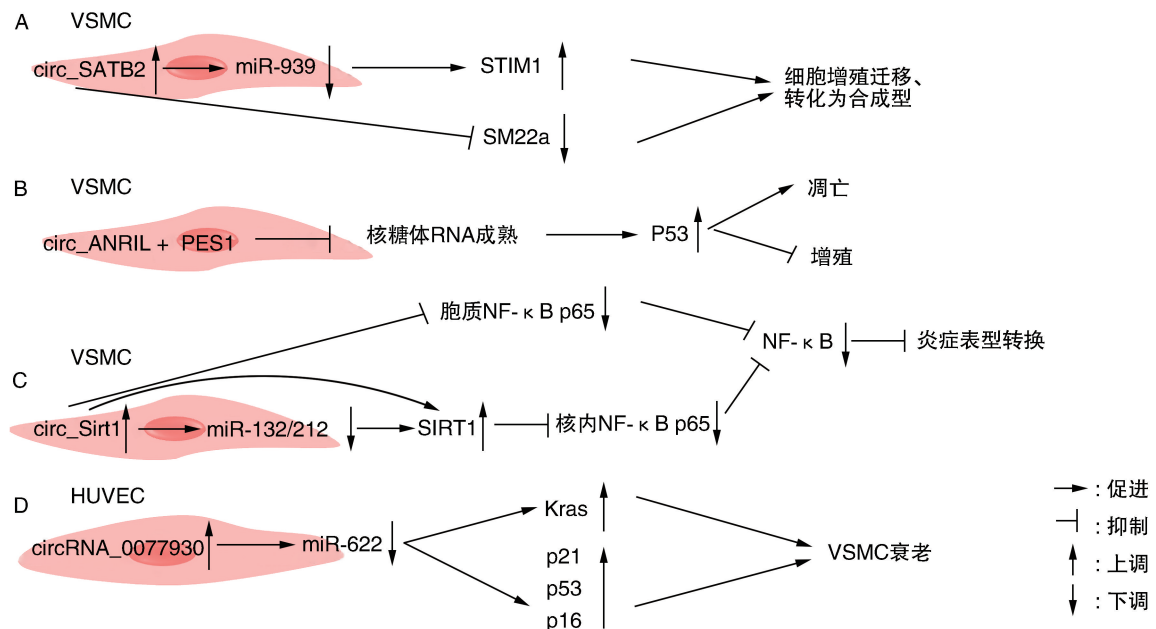


图 2. circRNA 通过不同分子机制调控平滑肌细胞

A 为 circ_SATB2 海绵吸附 miR-939,上调 STIM1 下调 SM22a,促 VSMC 增殖迁移,表型转化为合成型;B 为 circ_ANRIL 与核仁蛋白 PES1 结合,抑制核糖体 RNA 成熟,损害核糖体生物合成,激活 P53 基因,导致 VSMC 凋亡增加、增殖降低;C 为 circ_Sirt1 通过与 NF-κB p65 的序列相互作用控制 NF-κB 的活化,并通过在 VSMC 的炎症表型转化中掺入 miR-132/212 来增强 SIRT1 的表达,从而抑制 VSMC 炎症;D 为 HUVEC 衍生的外泌体中 circRNA_0077930 海绵吸附 miR-622,使 Kras、p21、p53、p16 表达上调,加速 VSMC 衰老。

Figure 2. circRNA regulate smooth muscle cells through different molecular mechanisms

2.3 circRNA 与巨噬细胞

在 As 的早期阶段,动脉血管壁内的巨噬细胞通过吞噬 ox-LDL 成为泡沫细胞,当泡沫细胞在血管壁大量聚集则会导致炎症和坏死。因此,靶向泡沫细胞的形成已成为治疗 As 的主要研究之一。通过建立 ox-LDL 处理人 THP-1 巨噬细胞的 ceRNA 调控网络,Wang 等^[43]发现 circRNA 可与 lncRNA、miRNA 和 mRNA 相互作用共同调控 As 中的巨噬细胞泡沫化。根据 KEGG 和 GO 富集分析,天冬氨酸 β-羟化酶 (aspartate-β-hydroxylase, ASPH) 和磷酸二酯酶 3B (phosphodiesterase type3B, PDE3B) 在该 ceRNA 网络中至关重要,hsa_circ_0028198/hsa_circ_0092317/XIST-miR-543 轴与 hsa_circ_0092317/hsa_circ_0003546/H19/XIST-miR-326 轴共同调节

PDE3B 表达,ASPH 由 hsa_circ_0028198/hsa_circ_0092317/XIST-miR-543 轴单独调控,为 As 的研究提供了重要的分子机制,但仍需进行体内和体外实验确认其表达和功能机制。另外,巨噬细胞在 As 整个过程中具有高度异质性,可表现出不同的极化状态,不同极化表型及斑块中不同表型的相对比例对 As 进展有不同影响。M1 促炎表型可增加斑块生长和不稳定性,促进病变坏死区域微钙化导致斑块破裂;相反,M2 抗炎表型在稳定斑块中比例较高,可减小斑块大小,促进大钙化稳定斑块^[44]。使用干扰素 γ、脂多糖以及 IL-4 分别诱导小鼠骨髓来源的巨噬细胞极化为 M1 与 M2 型,得到了 189 个差异表达 circRNA,在 M1 型巨噬细胞中 circRNA_003780、circRNA_010056 和 circRNA_010231 表达水平较高,

circRNA_003424、circRNA_013630、circRNA_001489 和 circRNA_018127 在 M2 型巨噬细胞中高表达,为巨噬细胞极化相关 circRNA 的研究奠定了理论基础^[45]。除巨噬细胞外,其他炎症细胞也参与了 As 的发展过程。其中,中性粒细胞的浸润可引起血小板黏附增加和斑块破裂,淋巴细胞在刺激作用下可分化不同的促炎表型,有研究称中性粒细胞/淋巴细胞比率可能用作心血管炎症标志物^[46]。As 作为脑卒中的基础病变,Zuo 等^[47]发现脑卒中患者与健康对照者相比外周血中 circ_PDS5B 和 circ_CDC14A 水平升高,其升高原因可能与淋巴细胞和粒细胞水平升高有关。

3 circRNA 是动脉粥样硬化中的潜在生物标志物

根据 circRNA 闭环结构的稳定性、组织特异性以及物种进化的保守性等,证实 circRNA 比 miRNA 更适合作为生物标志物。利用 Meta 分析比较心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)患者与健康对照之间的 circRNA 表达谱,并参考 CVD 动物模型的 circRNA 表达谱的研究结果,发现 circRNA 作为潜在的 CVD 生物标志物具有很高的诊断价值,并候选出 circ_CDKN2BAS(circ_ANRIL)、circ_MACF1(hsa_circRNA_11783-2 和 hsa_circRNA_11806-2)为心血管疾病诊断和治疗的潜在生物标志物^[48]。此外,某些 circRNA 的表达水平可以作为评估血管疾病严重性的指标。Zhao 等^[49]通过调查冠状动脉疾病(CAD)患者外周血中 circRNA 谱,发现 circRNA 与 CAD 严重程度有相关性,其中 hsa_circ_0124644 在诊断 CAD 时拥有较高的特异度和灵敏度。研究指出 circ_0044073^[15]、circ_CHFR^[26]、circ_Sirt1^[38]、circ_0003204^[14]在 As 患者血浆中上调。hsa_circ_0001445 在 CAD 患者血浆中下调,其表达水平与 CAD 严重程度呈负相关,Vilades 等^[50]根据真实的临床情景,发现将血浆 hsa_circ_0001445 表达情况与动脉计算机断层扫描血管造影技术相结合可提高对 CAD 的识别率。

高血压和高血脂是 As 的重要致病因素,在 CAD 患者中,hsa_circ_0001879 与血压呈正相关,hsa_circ_0004104 与高密度脂蛋白水平呈负相关。将人 THP-1 衍生的巨噬细胞过表达 hsa_circ_0004104 发现 As 易感基因上调,抗 As 基因下调,证实这两种 circRNA 可作为 CAD 的新型生物标志

物^[51]。另外,circRNA 水平变化可作为斑块破裂的预测指标,通过比较脑缺血事件发生患者血清中 circRNA_284 和 miRNA-221 水平,发现 circRNA_284 与 miR-221 的比例在颈动脉斑块破裂后显著增加,有助于快速识别和诊断斑块破裂紧急患者和无症状患者,暗示了其作为斑块破裂生物标志物的潜力^[52]。

除从细胞或组织内获取 circRNA 信息,细胞间的囊泡传送系统如外泌体也是近年来的研究热点,其可作为心血管系统变化的媒介。通过检测液体中外泌体 circRNA 水平不仅可充分发挥外泌体从宿主细胞携带指示病理或生理状况的核酸和蛋白质的功能,而且相较于活检减轻了患者痛苦,因此从生物液体中分离外泌体作为生物标记物的使用为临床提供了一种无/微创诊断方法,使得体液外泌体 circRNA 有望成为诊断疾病的理想无创生物标志物。Wu 等^[53]通过对 CAD 患者和非患者血浆衍生的外泌体测序发现 CAD 患者 hsa_circ_0005540 显著增加并且在两个人群队列中得到验证,将 hsa_circ_0005540 与 FHS 危险因素相结合,发现两者结合后具有高度敏感性和特异性,诊断价值优于常规技术,表明外泌体 circRNA 作为 CAD 诊断生物标志物的潜在用途。但其作为临床生物标志物仍面临巨大挑战,由于从组织中释放的外泌体在组成和含量上存在个体差异,所以仍需更大的临床样本进一步验证液体中外泌体 circRNA 水平与 CAD 的关联,而且使用有效性需要与标准临床生物标志物进行比较。

4 总结与展望

circRNA 通过与蛋白质、DNA 或其他类型 RNA 相互作用来发挥作用,既可作为细胞功能调节因子,也可作为 As 和相关心血管疾病的治疗靶点,具有成为新型诊断生物标志物的强大潜力^[54-55]。然而目前研究尚处于早期阶段,可靠检测 circRNA 的技术和生物信息学方法需要标准化。虽然越来越多与 As 相关的 circRNA 被发现,但只有少部分 circRNA 的具体分子机制得以阐明,基于 As 的病变发展与 VSMC、EC 生理、病理以及免疫细胞炎症过程息息相关,探索 circRNA 在这些细胞中的作用机制显得尤为重要,目前研究显示与 As 相关 circRNA 的生物学功能主要以 miRNA 分子海绵的形式参与 As 的调控,但是并非所有的 circRNA 都有完美的 miRNA 捕获位点,所以 circRNA 也可通过其他功能

发挥作用,目前已发现调控 As 且发挥 miRNA 分子海绵功能之外的 circRNA 数量有限,比如 circ_ANRIL^[25]作为蛋白支架调控 VSMC 增殖凋亡, circ_Sirt1^[38]调控母本基因 SIRT1 转录影响 VSMC 炎症因子表达,其他与 As 相关具有翻译或编码蛋白功能的 circRNA 有待研究者探寻。

随着高通量测序技术和生物信息学方法的高速发展,建立 circRNA 与其他 ncRNA、DNA 和蛋白质相互作用调控网络用以理解 As 确切的功能反应已成为大势所趋。除了深入探索 circRNA 在 As 中的分子机制,如何使这些 circRNA 的理论研究成为临床中可行的预测、诊断、治疗 As 的靶标同样值得关注。总之, circRNA 已成为心血管疾病的新型参与者,相信通过研究者的不懈努力 circRNA 将在心脑血管疾病的诊断治疗中大放异彩。

[参考文献]

- [1] Kristensen LS, Hansen TB, Venø MT, et al. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field[J]. *Oncogene*, 2018, 37(5): 555-565.
- [2] Aufiero S, Reckman YJ, Pinto YM, et al. Circular RNAs open a new chapter in cardiovascular biology[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(8): 503-514.
- [3] Ashwal-Fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Mol Cell*, 2014, 56(1): 55-66.
- [4] Du WW, Yang WN, Liu E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846-2858.
- [5] 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.
- [6] Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circRNAs[J]. *EMBO J*, 2019, 38(16): e100836.
- [7] Lin F, Zhao G, Chen Z, et al. circRNA-miRNA association for coronary heart disease[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 2527-2536.
- [8] Bazan HA, Lightell D, Sternbergh WC, et al. Increased circular-RNA-16 in acutely symptomatic carotid plaques; a novel mediator of carotid plaque rupture[J]. *J Vasc Surg*, 2014, 59(6): 84s.
- [9] Zhang F, Zhang R, Zhang X, et al. Comprehensive analysis of circRNA expression pattern and circRNA-miRNA-mRNA network in the pathogenesis of atherosclerosis in rabbits[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(9): 2266-2283.
- [10] Li CY, Ma L, Yu B. Circular RNA hsa_circ_0003575 regulates oxLDL induced vascular endothelial cells proliferation and angiogenesis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 1514-1519.
- [11] Zhang S, Song G, Yuan J, et al. Circular RNA circ_0003204 inhibits proliferation, migration and tube formation of endothelial cell in atherosclerosis via miR-370-3p/TGFβR2/phosph-SMAD3 axis[J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 11.
- [12] Shen L, Hu Y, Lou J, et al. CircRNA-0044073 is upregulated in atherosclerosis and increases the proliferation and invasion of cells by targeting miR-107[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 3923-3932.
- [13] Zhu K, Hu X, Chen H, et al. Downregulation of circRNA DMNT3B contributes to diabetic retinal vascular dysfunction through targeting miR-20b-5p and BAMBI[J]. *EBioMedicine*, 2019, 49: 341-353.
- [14] Shan K, Liu C, Liu BH, et al. Circular noncoding RNA HIPK3 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus[J]. *Circulation*, 2017, 136(17): 1629-1642.
- [15] Wang Y, Zhao R, Liu W, et al. Exosomal circHIPK3 released from hypoxia-pretreated cardiomyocytes regulates oxidative damage in cardiac microvascular endothelial cells via the miR-29a/IGF-1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019: 7954657.
- [16] Huang HS, Huang XY, Yu HZ, et al. Circular RNA circ-RELL1 regulates inflammatory response by miR-6873-3p/MyD88/NF-κB axis in endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(2): 512-519.
- [17] Schulte C, Molz S, Appelbaum S, et al. miRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145930.
- [18] Cheng J, Liu Q, Hu N, et al. Downregulation of hsa_circ_0068087 ameliorates TLR4/NF-κB/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation and endothelial cell dysfunction in high glucose conditioned by sponging miR-197[J]. *Gene*, 2019, 709: 1-7.
- [19] Song CL, Wang JP, Xue X, et al. Effect of circular ANRIL on the inflammatory response of vascular endothelial cells in a rat model of coronary atherosclerosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(3): 1202-1212.
- [20] Akhtar S, Hartmann P, Karshovska E, et al. Endothelial hypoxia-inducible factor-1α promotes atherosclerosis and monocyte recruitment by upregulating microRNA-19a[J]. *Hypertension*, 2015, 66(6): 1220-1226.
- [21] Dang RY, Liu FL, Li Y. Circular RNA hsa_circ_0010729 regulates vascular endothelial cell proliferation and apoptosis by targeting the miR-186/HIF-1α axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 104-110.
- [22] Cui M, Shen W, Qin W, et al. Circular RNA ciRS-7 promotes tube formation in microvascular endothelial cells through downregulation of miR-26a-5p[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(5): e22468.
- [23] 温进坤. 不要低估血管平滑肌细胞在动脉粥样硬化斑块形成中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(7): 649-654.
- [24] Tong X, Zhang D, Charney N, et al. DDB1-mediated CRY1 degradation promotes FOXO1-driven gluconeogenesis in liver[J]. *Diabetes*, 2017, 66(10): 2571-2582.
- [25] Yang L, Yang F, Zhao H, et al. Circular RNA circCHFR facilitates the proliferation and migration of vascular smooth muscle via miR-370/FOXO1/cyclin D1 pathway[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 434-441.
- [26] Chen J, Cui L, Yuan J, et al. Circular RNA WDR77 target FGF-2

- to regulate vascular smooth muscle cells proliferation and migration by sponging miR-124[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(1/2): 126-132.
- [27] Zhao W, Zhao SP, Zhao YH. MicroRNA-143/-145 in cardiovascular diseases[J]. *Biomed Res Int*, 2015; 531740.
- [28] Hall IF, Climent M, Quintavalle M, et al. Circ_Lrp6, a circular RNA enriched in vascular smooth muscle cells, acts as a sponge regulating miRNA-145 function[J]. *Circ Res*, 2019, 124(4): 498-510.
- [29] Mao YY, Wang JQ, Guo XX, et al. Circ-SATB2 upregulates STIM1 expression and regulates vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation through miR-939[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(1): 119-125.
- [30] Sun J, Zhang Z, Yang S. Circ_RUSC2 upregulates the expression of miR-661 target gene SYK and regulates the function of vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Cell Biol*, 2019, 97(6): 709-714.
- [31] Jy X, Chang NB, Rong ZH, et al. circDiaph3 regulates rat vascular smooth muscle cell differentiation, proliferation, and migration[J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 2659-2668.
- [32] Ping S, Li Y, Liu S, et al. Simultaneous increases in proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerate diabetic mouse venous atherosclerosis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141375.
- [33] Sun Y, Zhang S, Yue M, et al. Angiotensin II inhibits apoptosis of mouse aortic smooth muscle cells through regulating the circNRG-1/miR-193b-5p/NRG-1 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5): 362.
- [34] Zheng C, Niu H, Li M, et al. Cyclic RNA hsa-circ-000595 regulates apoptosis of aortic smooth muscle cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 6656-6662.
- [35] Yue J, Zhu T, Yang J, et al. CircCBFB-mediated miR-28-5p facilitates abdominal aortic aneurysm via LYPD3 and GRIA4[J]. *Life Sci*, 2020, 253: 117533.
- [36] Holdt LM, Stahnger A, Sass K, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12429.
- [37] Zhuang JB, Li T, Hu XM, et al. Circ_CHFR expedites cell growth, migration and inflammation in ox-LDL-treated human vascular smooth muscle cells via the miR-214-3p/Wnt3/ β -catenin pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(6): 3282-3292.
- [38] Kong P, Yu Y, Wang L, et al. circ-Sirt1 controls NF- κ B activation via sequence-specific interaction and enhancement of SIRT1 expression by binding to miR-132/212 in vascular smooth muscle cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(7): 3580-3593.
- [39] Wang J, Wang Z, Wang H, et al. Stress-induced premature senescence promotes proliferation by activating the SENEX and p16 (INK4a)/retinoblastoma (Rb) pathway in diffuse large B-Cell lymphoma[J]. *Turk J Haematol*, 2019, 36(4): 247-254.
- [40] Kulcheski FR, Christoff AP, Margis R. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker[J]. *J Biotechnol*, 2016, 238: 42-51.
- [41] Wang S, Zhan J, Lin X, et al. CircRNA-0077930 from hyperglycaemia-stimulated vascular endothelial cell exosomes regulates senescence in vascular smooth muscle cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 3543.
- [42] Yao QP, Liu Z, Yao AH, et al. Circular RNA circTET3 mediates migration of rat vascular smooth muscle cells by targeting miR-351-5p[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 6831-6842.
- [43] Wang L, Zheng Z, Feng X, et al. circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA network in oxidized low-density lipoprotein-induced foam cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(12): 1499-1511.
- [44] 范 斐, 陶 蓉, 张瑞岩, 等. 炎症反应在易损斑块中的作用及其机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(4): 301-306.
- [45] Zhang Y, Zhang Yad-Laboratory Medicine YH, Li X, et al. Microarray analysis of circular RNA expression patterns in polarized macrophages[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(2): 373-379.
- [46] Delcea C, Buzea CA, Dan G. The neutrophil to lymphocyte ratio in heart failure: a comprehensive review[J]. *Rom J Intern Med*, 2019, 57(4): 296-314.
- [47] Zuo L, Zhang L, Zu J, et al. Circulating circular RNAs as biomarkers for the diagnosis and prediction of outcomes in acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2020, 51(1): 319-323.
- [48] Li JJ, Wang W, Wang XQ, et al. A novel strategy of identifying circRNA biomarkers in cardiovascular disease by Meta-analysis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21601-21612.
- [49] Zhao Z, Li X, Gao C, et al. Peripheral blood circular RNA hsa_circ_0124644 can be used as a diagnostic biomarker of coronary artery disease[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39918.
- [50] Vilades D, Martínez-Cambor P, Ferrero-Gregori A, et al. Plasma circular RNA hsa_circ_0001445 and coronary artery disease: performance as a biomarker[J]. *FASEB J*, 2020, 34(3): 4403-4414.
- [51] Wang L, Shen C, Wang Y, et al. Identification of circular RNA Hsa_circ_0001879 and Hsa_circ_0004104 as novel biomarkers for coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 286: 88-96.
- [52] Bazan HA, Hatfield SA, Brug A, et al. Carotid plaque rupture is accompanied by an increase in the ratio of serum circR-284 to miR-221 levels[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2017, 10(4): e001720.
- [53] Wu WP, Pan YH, Cai MY, et al. Plasma-derived exosomal circular RNA hsa_circ_0005540 as a novel diagnostic biomarker for coronary artery disease[J]. *Dis Markers*, 2020: 3178642.
- [54] 严钰敏, 袁淑菁, 张 铭, 等. 环状 RNA _005647 通过结合 miR-99b-5p 抑制心肌细胞中肥厚相关基因的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(1): 10-16.
- [55] 余 皓, 冯松林, 施 森. 长链非编码 RNA H19 调节微小 RNA 影响腹主动脉瘤形成的潜在机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(1): 37-41.
- (此文编辑 秦旭平)