

本文引用: 王克华, 王金, 王磊, 等. circ-SKA3 通过 miR-1303 调控 TLR4 轴在动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(11): 945-957. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.11.004.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-11-0945-13

· 实验研究 ·

circ-SKA3 通过 miR-1303 调控 TLR4 轴在动脉粥样硬化中的作用

王克华, 王金, 王磊, 任小璐, 李颖

(宁夏医科大学总医院, 宁夏回族自治区银川市 750004)

[摘要] **[目的]** 探究环状 RNA 纺锤体与动粒相关蛋白 3 (circ-SKA3) 通过 miR-1303 调控 Toll 样受体 4 (TLR4) 轴在动脉粥样硬化 (As) 中的作用。**[方法]** 收集 2019 年 4 月—2022 年 4 月收治的 30 例 As 患者经颈动脉内膜剥脱术切除的颈动脉斑块及病变血管组织、对应斑块旁正常组织与静脉血, 另收集 30 例健康对照者静脉血。微阵列分析、实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)、荧光原位杂交 (FISH) 实验检测 circ-SKA3 在 As 患者斑块组织和对照样本、血浆外泌体、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)、As 模型小鼠主动脉组织中的表达和定位。通过生物信息学、双荧光素酶报告基因检测、RNA 免疫共沉淀等方法验证 circ-SKA3、miR-1303、TLR4 之间的相互关系。通过 CCK-8、细胞划痕实验、Transwell 实验、血管形成实验检测 HUVEC 增殖、迁移、血管形成能力, 蛋白质印迹法检测 TLR4 轴相关蛋白表达。油红 O 染色、HE 染色、Masson 染色观察 As 模型小鼠主动脉组织病变情况, 免疫组织化学、免疫荧光检测 As 模型小鼠主动脉组织 TLR4 的表达情况。**[结果]** As 患者斑块组织、血浆外泌体、氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 处理的 HUVEC 和 As 模型小鼠主动脉组织中 circ-SKA3、TLR4 的表达水平上调 ($P < 0.05$), miR-1303 的表达水平下调 ($P < 0.05$)。功能分析表明, circ-SKA3 在体外实验中促进 HUVEC 损伤, 在体内实验中促进 As 进展。机制分析表明, circ-SKA3 可通过海绵吸附 miR-1303 促进 TLR4 表达, 抑制 circ-SKA3/miR-1303/TLR4 轴可抑制 As 病变形成。**[结论]** circ-SKA3 在 As 患者颈动脉斑块、血浆外泌体、ox-LDL 处理的 HUVEC 和 As 模型小鼠主动脉中的表达显著增高, circ-SKA3/miR-1303/TLR4 轴可促进体内外 As 模型发展。

[关键词] 环状 RNA 纺锤体与动粒相关蛋白 3; miR-1303; Toll 样受体 4; 动脉粥样硬化; 氧化型低密度脂蛋白

[中图分类号] R5; R363

[文献标识码] A

circ-SKA3 regulates the role of TLR4 axis in atherosclerosis through miR-1303

WANG Kehua, WANG Jin, WANG Lei, REN Xiaolu, LI Ying

(General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, the Ningxia Hui Autonomous Region 750004, China)

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of circular RNA spindle and kinetochore-associated protein 3 (circ-SKA3) in regulating Toll-like receptor 4 (TLR4) axis in atherosclerosis (As) through miR-1303. **Methods** Carotid artery plaque, diseased vascular tissue, normal tissue adjacent to plaque and venous blood were collected from 30 patients with As treated by carotid endarterectomy from April 2019 to April 2022. Another 30 normal venous blood samples were collected. Microarray analysis, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) were used to detect the expression and localization of circ-SKA3 in plaque tissue of As patients, control samples, plasma exosome, human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and aorta of As model mice. The relationship among circ-SKA3, miR-1303 and TLR4 was verified by bioinformatics, double luciferase reporter gene detection and RNA immunoprecipitation. The proliferation, migration and angiogenesis of HUVEC were detected by CCK-8, scratch, Transwell and angiogenesis experiments. TLR4 axis-related protein expression was detected by Western blotting. Pathological changes of aorta in As model mice was observed by Oil red O staining, HE staining and Masson staining. TLR4 expression in aorta of As model mice was detected by immunohistochemistry and immunofluorescence.

Results The expression levels of circ-SKA3 and TLR4 in plaque tissue, plasma exosome, oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) treated HUVEC and circ-SKA3, TLR4 in aortic of As model mice were up-regulated ($P < 0.05$), while the expression level of miR-1303 was down-regulated ($P < 0.05$). Functional analysis showed that circ-SKA3 promoted HUVEC

The expression levels of circ-SKA3 and TLR4 in plaque tissue, plasma exosome, oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) treated HUVEC and circ-SKA3, TLR4 in aortic of As model mice were up-regulated ($P < 0.05$), while the expression level of miR-1303 was down-regulated ($P < 0.05$). Functional analysis showed that circ-SKA3 promoted HUVEC

[收稿日期] 2022-12-20

[修回日期] 2023-02-22

[基金项目] 宁夏医科大学 2021 年校级科研项目 (XM2021001)

[作者简介] 王克华, 硕士, 副主任医师, 研究方向为外周血管疾病, E-mail: wkhgrant@163.com。通信作者王金, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为激光医学, E-mail: 1049606456@qq.com。

damage *in vitro* and As progress *in vivo*. Mechanism analysis showed that circ-SKA3 could promote TLR4 expression by adsorbing miR-1303 by sponge. Inhibition of circ-SKA3/miR-1303/TLR4 axis can inhibit the formation of As lesions.

Conclusions circ-SKA3 is overexpressed in carotid plaque, plasma exosome, ox-LDL-treated HUVEC and As model mouse aorta in As patients. circ-SKA3/miR-1303/TLR4 axis can promote the development of As model *in vivo* and *in vitro*.

[KEY WORDS] circular RNA spindle and kinetochore-associated protein 3; miR-1303; Toll-like receptor 4; atherosclerosis; oxidized low density lipoprotein

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种以动脉内膜脂质沉积和纤维帽形成为特征的动脉血管壁慢性炎症性病变,可进一步引发多种严重心血管疾病^[1-2]。血管内皮细胞(endothelial cells, EC)异常增殖、迁移、血管平滑肌细胞功能障碍等因素在 As 的形成中起着关键作用^[3]。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是 LDL 的氧化代谢产物,可使血管内皮损伤、脂质堆积,促进 As 病变形成^[4]。受损的 EC 能够产生炎症细胞因子、黏附分子、基质金属蛋白酶等多种细胞因子,可加速 As 的发展^[5]。因此,探索 EC 功能变化与 As 形成相关的分子机制有利于挖掘 As 的潜在治疗靶点。环状 RNA(circular RNA, circRNA)是 mRNA 前体的外显子反向剪接形成的,其结构较为稳定,半衰期较长,具有作为疾病生物标志物的可能^[6]。多项研究表明, circRNA 能通过直接与蛋白质结合或通过微小 RNA(microRNA, miRNA)海绵吸附机制改变靶基因表达水平,影响细胞发育、分化^[7-8]。circRNA 纺锤体与动粒相关蛋白 3(circular RNA spindle and kinetochore-associated protein 3, circ-SKA3)是一种源自 SKA3 基因的 circRNA, Xu 等^[9]的研究显示,缺血性卒中患者外周血中 circ-SKA3 表达显著增加。miR-1303 与 circ-SKA3 存在结合位点^[10], 在心肌梗死的早期诊断中发挥了重要作用^[11]。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)参与机体免疫炎症反应,其缺失可降低载脂蛋白 E 基因缺陷(apolipoprotein E^{-/-}, ApoE^{-/-})小鼠内膜脂质沉积和炎症细胞因子水平,促使 As 斑块破裂^[12]。Liu 等^[13]的研究表明,TLR4 可进一步促进其下游信号转导及转录激活因子 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)的激活和核转位,促进巨噬细胞 M1 极化,加重 As 病变,而具有促炎作用的 STAT1/干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)参与了 As 的进展^[14]。基于上述研究结果,本研究着重探索 circ-SKA3 通过 miR-1303 调控 TLR4 轴在 As 中的作用。

1 材料和方法

1.1 组织标本

收集 2019 年 4 月—2022 年 4 月于宁夏医科大

学总医院收治的 30 例 As 患者经颈动脉内膜剥脱术切除的颈动脉斑块及病变血管组织、对应斑块旁正常组织与静脉血,斑块组织经美国心脏学会分类标准判定为 IV-V 期病变^[15]。另收集 30 例于本院进行体检的健康对照者静脉血。As 患者中男性 16 例,女性 14 例,年龄 49~76 岁,平均(66.42±5.68)岁;健康对照者中男性 15 例,女性 15 例,年龄 47~75 岁,平均(64.28±4.97)岁;两组性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究已通过我院伦理委员会批准,所有患者均自愿提供组织样本并签署实验知情同意书。

1.2 实验动物

12 只 SPF 级雄性 C57BL/6J ApoE^{-/-}小鼠购自安徽医科大学动物实验中心,动物合格证号为 SCXK(皖)2022-004。于 SPF 房内适应性饲养 1 周后进行实验,饲养期间允许小鼠自由摄食饮水。实验中的所有操作均遵守动物实验伦理指导守则。

1.3 主要试剂

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)购自北京汇智和源生物技术有限公司;人胚肾细胞 HEK 293T、ECM 完全培养基购自上海盈湾生物科技有限公司;Trizol 试剂购自美国 Thermo Fisher 公司;慢病毒表达载体的构建、鉴定、包装与滴度测定由广州源井生物科技有限公司完成;PCR 引物与内参购自上海生工生物工程股份有限公司;RNA 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)荧光探针由无锡怀信生物医药科技有限公司设计合成, circ-SKA3 探针序列为 5'-Cy3-CACAATGGGACTTAAAAATGCGAG-Cy3-3', miR-1303 探针序列为 5'-Fam-TTTAGAGACGGGGTCTTGCTCT-Fam-3'; FISH 试剂盒购自广州伯信生物科技有限公司;ox-LDL 购自北京康瑞纳生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒、油红 O 染色试剂盒、HE 染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Masson 染色试剂盒购自上海沪震实业有限公司;Matrigel 基质胶购自上海研卉生物科技有限公司;小鼠 TLR4、兔 STAT1、兔 p-STAT1、兔 STING、兔核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、兔 p-NF- κ B、兔干扰素调节因子 3(interferon regulatory

factor 3, IRF3)、兔 p-IRF3 购自英国 Abcam 公司;低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。其他试剂均为市售分析纯。

1.4 circRNA 微阵列分析

使用 Trizol 试剂提取 As 患者斑块组织和对照样本中的总 RNA,用 RNase R 消化,除去线性 RNA 并富集 circRNA。扩增纯化后的 circRNA 转录成 cRNA,将标记的 cRNA 杂交到 circRNA 微阵列芯片上,在 65 °C 杂交炉中孵育 17 h。经清洗、修复后用 Agilent Scanner G2505C 扫描仪扫描芯片,并用 Agilent Feature Extraction 软件采集图像数据。对数据进行分位数归一化,根据折叠变化、*P* 值和原始强度筛选出斑块组织和对照样本之间显著差异表达的 circRNA。

1.5 放线菌素 D 与 circRNA RNase R 检测

使用 2 mg/L 放线菌素 D,3 kU/g RNase R 分别处理 HUVEC 24 h,20 min,qRT-PCR 检测 circ-SKA3 的稳定性。

1.6 FISH 实验

取生长至 80% 融合度的 HUVEC,4% 多聚甲醛固定 10 min 后用 0.5% Triton X-100 通透 15 min。荧光标记的 circ-SKA3、miR-1303、CD31 探针与细胞在 37 °C 下杂交过夜,由 FISH 试剂盒检测探针信号,细胞核用 DAPI 染色,于激光共聚焦扫描显微镜下观察拍照。

1.7 血浆外泌体提取

使用乙二胺四乙酸抗凝管收集 As 患者与健康对照者静脉血,于 4 °C、3 000 r/min 条件下离心 10 min 获得血浆,用 ExoQuick 外泌体提取试剂盒提取外泌体,于扫描电子显微镜下观察拍照后采用 qRT-PCR 检测 circ-SKA3 的表达情况。

1.8 细胞培养与分组

使用 ECM 完全培养基,于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的电热恒温培养箱中培养 HUVEC。HUVEC 分为 control+NC 组(正常培养,转染阴性对照)、control+sh-NC 组(正常培养,转染 shRNA)、control+SKA3 组(正常培养,转染 SKA3)、control+sh-SKA3 组(正常培养,转染 sh-SKA3)、control+sh-SKA3+miR-NC 组(正常培养,转染 sh-SKA3+miR-NC)、control+sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组(正常培养,转染 sh-SKA3+miR-1303 inhibitor)、control+miR-1303 inhibitor 组(正常培养,转染 miR-1303 inhibitor)、control+miR-1303 mimic 组(正常培养,转染 miR-1303

mimic)、control+miR-1303 mimic+TLR4 组(正常培养,转染 miR-1303 mimic+TLR4)、control+sh-SKA3+TLR4 组(正常培养,转染 sh-SKA3+TLR4)、control+TLR4 组(正常培养,转染 TLR4)、ox-LDL+NC 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染阴性对照)、ox-LDL+sh-NC 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 shRNA)、ox-LDL+SKA3 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 SKA3)、ox-LDL+sh-SKA3 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 sh-SKA3)、ox-LDL+sh-SKA3+miR-NC 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 sh-SKA3+miR-NC)、ox-LDL+sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 sh-SKA3+miR-1303 inhibitor)、ox-LDL+miR-1303 inhibitor 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 miR-1303 inhibitor)、ox-LDL+miR-1303 mimic 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 miR-1303 mimic)、ox-LDL+miR-1303 mimic+TLR4 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 miR-1303 mimic+TLR4)、ox-LDL+sh-SKA3+TLR4 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 sh-SKA3+TLR4)、ox-LDL+TLR4 组(添加 100 mg/L ox-LDL,转染 TLR4)。按照病毒设计制造商的说明,使用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂将慢病毒表达载体按照分组名称转染至 HUVEC 细胞中,48 h 后收集细胞用于后续实验。

1.9 CCK-8 法检测细胞增殖能力

取处于对数生长期的各组细胞,胰酶消化后接种于 96 孔板上正常培养,于培养 0、12、24、48 及 72 h 进行 CCK-8 检测,每孔加入 CCK-8 溶液后继续培养 2 h,于 450 nm 波长下检测各孔吸光度。

1.10 细胞划痕实验、Transwell 实验检测细胞迁移能力

细胞划痕实验:各组处于对数生长期的细胞以 1×10^6 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板中,细胞覆盖率达到 90%,用 200 μ L 移液器枪头划出划痕,洗去脱落的细胞,加入无血清培养基继续培养 24 h。分别于划痕后和培养 24 h 后拍照,用 Image J 软件测量划痕宽度,细胞迁移率=(最初划痕宽度-24 h 后划痕宽度)/最初划痕宽度 $\times 100\%$ 。

Transwell 实验:取处于对数生长期的各组细胞并制成细胞悬液,接种于 Transwell 小室上室,向下室中加入含 10% 胎牛血清的 ECM 培养基,正常培养 24 h。穿过上室的细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min,加入 0.5% Triton X-100,室温通透 15 min 后用 1 \times PBS 清洗 3 遍。加入 DAPI,避光反应 5 min,滴加防荧光淬灭剂,封片,于荧光显微镜下避光观察拍照,统计各组迁移细胞数量。

1.11 血管形成实验检测细胞体外血管生成能力

各组细胞以 2×10^8 个/L 的细胞密度制成细胞悬液,以 1:1 比例加入 90 μL Matrigel 基质胶,接种于 96 孔板中,培养 24 h 后于光学显微镜下观察拍照,统计各组血管形成数量。

1.12 qRT-PCR 检测 circ-SKA3、miR-1303 及 TLR4 的相对表达

使用 Trizol 试剂提取 As 斑块、对照组织、各组细胞总 RNA,用反转录试剂盒将总 RNA 转录成 cDNA。使用 cDNA 模板 1 μg 、上下游引物各 0.5 μg 和 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒配制 20 μL PCR 反应体系,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,循环 40 次。引物序列见表 1。使用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪完成 qRT-PCR 操作,应用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 circ-SKA3、miR-1303、TLR4 的相对表达水平。

表 1. qRT-PCR 引物序列
Table 1. qRT-PCR primer sequence

基因	引物序列
circ-SKA3	F:5'-ACAGAATCCAGGCTCAATGAT-3' R:5'-AGAGTCTGAAGTCTGAATGAAGG-3'
miR-1303	F:5'-ACGGGGTCTTGCTCTAAAAA-3' R:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'
TLR4	F:5'-GTACCTGGGGAACAACCTCTT-3' R:5'-GCAGCTTGACTAGACTCTCCA-3'
GAPDH	F:5'-CTCACCAGGATGCACCAATGTT-3' R:5'-CGCGTTGCTCACAATGTTTCAT-3'
U6	F:5'-AAAGCAAATCATCGGACGACC-3' R:5'-GTACAACACATTGTTTCCTCGGA-3'

1.13 蛋白质印迹法检测 TLR4 轴相关蛋白表达

将 As 斑块、对照组织样本制成匀浆,加入适量预冷 RIPA,充分混匀后冰上孵育 1.5 h;各组细胞加入适量预冷 RIPA,充分混匀后冰上孵育 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 定量后制样。凝胶电泳分离样品蛋白,转膜,截取目的条带浸于 5% 脱脂奶粉制成的封闭液中,置于摇床上室温封闭 1 h。封闭液稀释一抗制成孵育液,稀释比例为 1:500,充分摇匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下过夜。洗膜,加入稀释比例为 1:5 000 的对应二抗孵育液,室温孵育 2 h,洗膜后加入 ECL 化学发光液,避光反应 5 min,用定量成像仪收集结果。

1.14 RNA 免疫共沉淀

HUVEC 中加入适量裂解液充分裂解。磁珠中分别加入 AGO2 抗体、免疫球蛋白 G,室温孵育

30 min 后加入细胞裂解物,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育过夜,qRT-PCR 检测纯化的免疫沉淀 RNA。

1.15 双荧光素酶报告基因检测

使用生物信息学数据库 TargetScanHuman 预测分析 miR-1303 与 circ-SKA3、TLR4 的结合位点,分别构建野生型和突变型荧光质粒:psiCheck2-SKA3-Luc、psiCheck2-SKA3-MUT-Luc、psiCheck2-TLR4-Luc、psiCheck2-TLR4-MUT-Luc,与 miR-1303 模拟物共转染至 HEK 293T 细胞中,荧光素酶报告实验检测荧光信号强度。

1.16 As 小鼠模型的构建

小鼠分为 sh-NC 组与 sh-SKA3 组,每组 6 只。以含 0.25% 胆固醇和 15% 脂肪的高脂饮食喂养小鼠,建立 As 小鼠模型^[16]。自第 11 周起,sh-SKA3 组接受尾静脉注射 sh-SKA3 慢病毒,sh-NC 组接受尾静脉注射 sh-NC 慢病毒,1 次/周,第 17 周处死所有小鼠,采集静脉血与主动脉组织用于后续实验。

1.17 主动脉组织病理学检测

取部分主动脉组织,置于 10% 甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋并制成切片。按照油红 O 染色、HE 染色及 Masson 染色试剂盒说明书的操作步骤进行石蜡切片染色。每组随机挑选 5 个视野,在 200 倍光镜下观察拍照。

1.18 主动脉免疫组织化学与免疫荧光检测

免疫组织化学检测:取小鼠主动脉石蜡切片,经脱蜡、复水、抗原修复、封闭后加入稀释度为 1:100 的 TLR4 抗体,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育过夜,洗涤后加入生物素标记的二抗,室温孵育 30 min,加入链霉亲和素酶,室温孵育 30 min,二氨基联苯胺显色,苏木精复染,常规脱水、透明后用中性树脂胶封片,于 200 倍光镜下拍摄实验结果。

免疫荧光检测:取小鼠主动脉石蜡切片,常规脱蜡至水,切片置入 pH 值为 6 的 10 mg/L 柠檬酸钠缓冲液中,微波炉加热 15 min;加入 3% H_2O_2 ,室温孵育 10 min 后加入 5% 血清封闭 30 min;加入稀释度为 1:100 的 TLR4 抗体,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育过夜;加入对应荧光二抗,室温孵育 1 h,加入 DAPI 染核,滴加防荧光淬灭剂,封片,于荧光显微镜下避光观察拍照。

1.19 统计学分析

使用 SPSS 24.0 统计软件对数据进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 circ-SKA3 在 As 患者斑块组织、血浆外泌体中异常表达

微阵列分析筛选 As 患者斑块组织和对照样本中的 circRNA, 归一化结果以热图形式显示, 并用火山图显示差异表达的 circRNA。根据总体原始信号强度、统计值和折叠变化进一步缩小了列表范围, 最终选择了 4 个 circRNA 进行进一步研究 (circ-SKA3、circ-TUSC3、circ-DCTN2、circ-TXLNG)。qRT-PCR 检测结果显示, 与对照样本相比, As 患者斑块组织 circ-SKA3、circ-TUSC3、circ-TXLNG 的表达升

高, circ-DCTN2 的表达降低 (均 $P < 0.05$)。其中 circ-SKA3 水平与对照样本差异最为显著, 因此选择 circ-SKA3 进行研究。血浆外泌体 qRT-PCR 检测结果显示, 与健康对照者相比, As 患者 circ-SKA3 的表达升高 ($P < 0.05$)。放线菌素 D 与 RNase R 检测结果显示, circ-SKA3 半衰期较长, 6 h、12 h、18 h 及 24 h 差异倍数分别为 1.57、2.11、2.30、2.76 ($P < 0.05$), 对 RNase R 具有抗性, 与 Mock 相比升高了 3.18 倍 ($P < 0.05$)。FISH 实验结果显示, 斑块组织可见 circ-SKA3 表达, circ-SKA3 主要定位于 HUVEC 的胞质中 (图 1)。

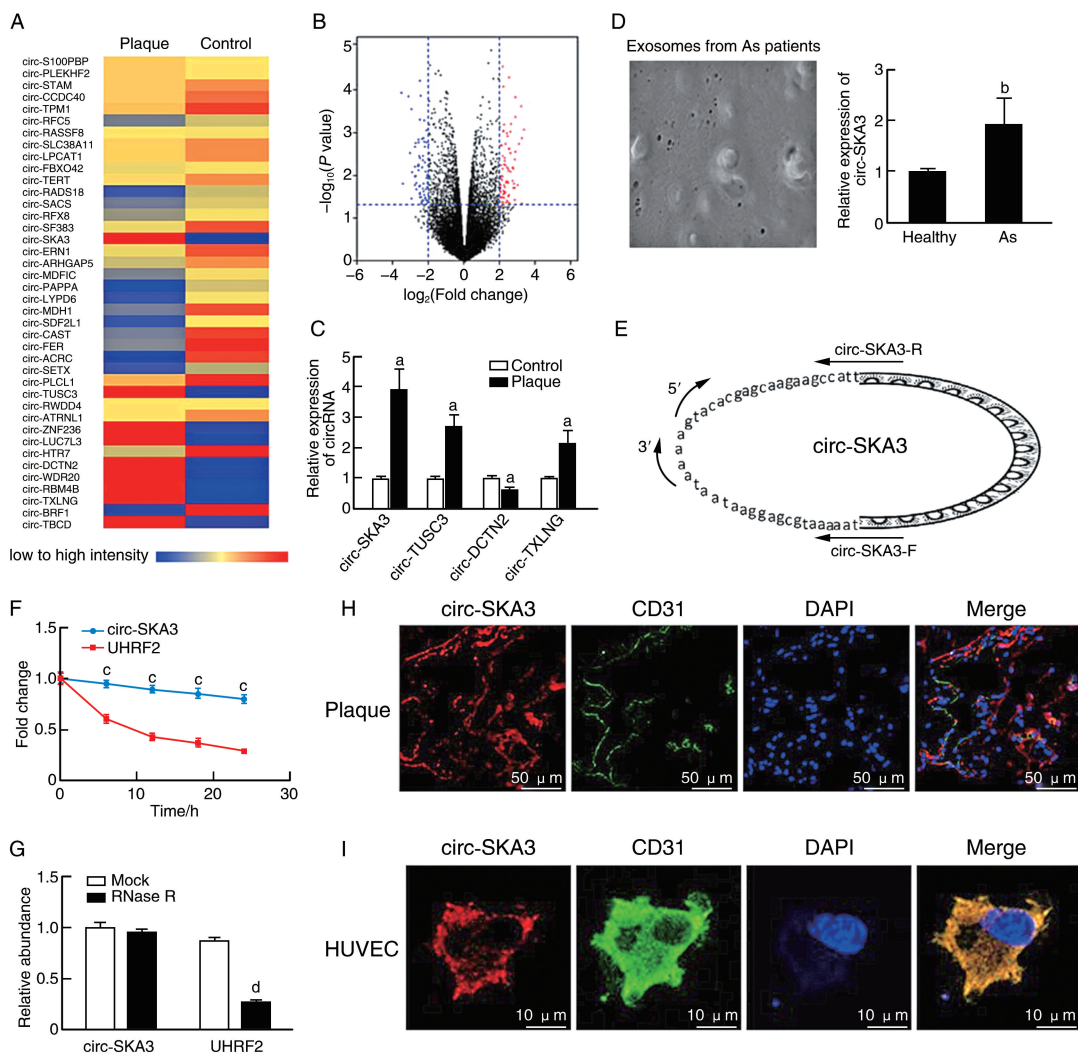


图 1. circ-SKA3 在 As 患者斑块组织、血浆外泌体中异常表达

A 为斑块组织与对照样本 circRNA 表达谱聚类热图, B 为斑块组织与对照样本 circRNA 表达谱火山图, C 为斑块组织与对照样本 qRT-PCR 检测结果, D 为 As 患者血浆外泌体扫描电子显微镜照片与 circ-SKA3 qRT-PCR 检测结果, E 为 circ-SKA3 结构图, F 为 circ-SKA3 放线菌素 D 检测结果, G 为 circ-SKA3 RNase R 检测结果, H 为 FISH 实验检测斑块组织 circ-SKA3 表达情况, I 为 FISH 实验检测 HUVEC 中 circ-SKA3 的定位情况。a 为 $P < 0.05$, 与对照样本比较; b 为 $P < 0.05$, 与健康对照血浆外泌体比较; c 为 $P < 0.05$, 与 UHRF2 比较; d 为 $P < 0.05$, 与 Mock 比较。

Figure 1. Abnormal expression of circ-SKA3 in plaque tissue and plasma exosomes of As patients

2.2 circ-SKA3 基因敲除抑制 ox-LDL 诱导的细胞增殖、迁移和血管形成

qRT-PCR 检测结果显示,与 NC 组、sh-NC 组相比,SKA3 组 circ-SKA3 的表达水平升高,sh-SKA3 组 circ-SKA3 的表达水平下降(均 $P < 0.05$)。CCK-8 检测结果显示,与 control+sh-NC 组相比,control+sh-SKA3 组细胞增殖活性升高($P < 0.05$);与 ox-LDL+sh-NC 组相比,ox-LDL+sh-SKA3 组细胞增殖活性升高($P < 0.05$);与 control+NC 组相比,control+SKA3 组细胞增殖活性下降($P < 0.05$);与 ox-LDL+NC 组相比,ox-LDL+SKA3 组细胞增殖活性下降($P < 0.05$)。细胞划痕实验结果显示,与 NC 组、sh-NC 组相比,SKA3 组细胞迁移率下降,sh-SKA3 组细胞迁移率升高(均 $P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示,与 control+NC 组、control+sh-NC 组相比,control+sh-SKA3 组细胞迁移数量增加,control+SKA3 组细胞迁移数量减少(均 $P < 0.05$);与 ox-LDL+NC 组、ox-LDL+sh-NC 组相比,ox-LDL+sh-SKA3 组细胞迁移数量增加,ox-LDL+SKA3 组细胞迁移数量减少(均 $P < 0.05$)。血管形成实验结果显示,与 control+NC 组、control+sh-NC 组相比,control+sh-SKA3 组血管形成数量增加,control+SKA3 组血管形成数量减少(均 $P < 0.05$);与 ox-LDL+NC 组、ox-LDL+sh-NC 组相比,ox-LDL+sh-SKA3 组血管形成数量增加,ox-LDL+SKA3 组血管形成数量减少(均 $P < 0.05$);图 2)。

2.3 circ-SKA3 对 miR-1303 的海绵吸附作用

生物信息学分析预测结果显示, circ-SKA3 与 miR-1303 存在结合位点。双荧光素酶报告基因检测结果显示,miR-1303 能够降低野生型 circ-SKA3 的荧光信号强度($P < 0.05$)。免疫共沉淀实验结果显示,抗 AGO2 抗体显著富集了 circ-SKA3 与 miR-1303($P < 0.05$)。qRT-PCR 检测结果显示,与对照样本相比,As 患者斑块组织 miR-1303 的表达降低($P < 0.05$);与健康对照者相比,As 患者血浆外泌体 miR-1303 的表达降低($P < 0.05$)。FISH 实验结果显示, circ-SKA3 与 miR-1303 共存于 HUVEC 的胞质中。CCK-8 检测结果显示,与 control+sh-SKA3+miR-NC 组相比,control+sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组细胞增殖活性降低($P < 0.05$);与 ox-LDL+sh-SKA3+miR-NC 组相比,ox-LDL+sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组细胞增殖活性降低($P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示,与 control+sh-SKA3+miR-NC 组相比,control+sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组细胞迁移数量减少($P < 0.05$);与 ox-LDL+sh-SKA3+miR-NC 组相比,ox-LDL+sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组细

胞迁移数量减少($P < 0.05$)。血管形成实验结果显示,与 control+sh-SKA3+miR-NC 组相比,control+sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组血管形成数量减少($P < 0.05$);与 ox-LDL+sh-SKA3+miR-NC 组相比,ox-LDL+sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组血管形成数量减少($P < 0.05$);图 3)。

2.4 TLR4 是 miR-1303 的直接靶标,促进 As 发展

生物信息学分析预测结果显示,miR-1303 与 TLR4 存在结合位点。双荧光素酶报告基因检测结果显示,miR-1303 能够降低野生型 TLR4 的荧光信号强度($P < 0.05$)。qRT-PCR 检测结果显示,与对照样本相比,As 患者斑块组织 TLR4 的表达升高($P < 0.05$);与健康对照者相比,As 患者血浆外泌体 TLR4 的表达升高($P < 0.05$);与 miR-NC 组相比,miR-1303 mimic 组 TLR4 的表达降低,miR-1303 inhibitor 组 TLR4 的表达升高(均 $P < 0.05$)。CCK-8 检测结果显示,与 control+NC 组相比,control+miR-1303 mimic 组细胞增殖活性升高($P < 0.05$);与 ox-LDL+NC 组相比,ox-LDL+miR-1303 mimic 组细胞增殖活性升高($P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示,与 control+NC 组相比,control+miR-1303 mimic 组细胞迁移数量增加($P < 0.05$);与 ox-LDL+NC 组相比,ox-LDL+miR-1303 mimic 组细胞迁移数量增加($P < 0.05$)。血管形成实验结果显示,与 control+NC 组相比,control+miR-1303 mimic 组血管形成数量增加($P < 0.05$);与 ox-LDL+NC 组相比,ox-LDL+miR-1303 mimic 组血管形成数量增加($P < 0.05$);图 4)。

2.5 circ-SKA3 通过 miR-1303 靶向 TLR4 促进 As 发展

蛋白质印迹法检测结果显示,与对照组相比,ox-LDL 组 NF- κ B、IRF3 的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),TLR4、STAT1、p-STAT1、STING、p-NF- κ B、p-IRF3 的表达水平升高($P < 0.05$);与 NC 组相比,sh-SKA3 组、sh-SKA3+TLR4 组 STAT1、NF- κ B、IRF3 的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),TLR4、p-STAT1、STING、p-NF- κ B、p-IRF3 的表达水平降低($P < 0.05$);与 sh-SKA3 组相比,sh-SKA3+TLR4 组 TLR4、p-STAT1、STING、p-NF- κ B、p-IRF3 的表达水平升高($P < 0.05$)。免疫荧光检测结果显示,与 Mock 组相比,sh-SKA3 组 TLR4 的表达水平降低($P < 0.05$);与 sh-SKA3 组相比,sh-SKA3+miR-1303 inhibitor 组 TLR4 的表达水平升高($P < 0.05$)。CCK-8 检测结果显示,与 control+NC 组相比,control+sh-SKA3 组细胞增殖活性升高($P < 0.05$);与 ox-LDL+NC 组相比,ox-LDL+sh-SKA3 组细胞增殖活性升高

($P < 0.05$)。Transwell 实验结果显示,与 control+NC 组相比, control + sh-SKA3 组细胞迁移数量增加, TLR4 组细胞迁移数量减少 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL+NC 组相比, ox-LDL+sh-SKA3 组细胞迁移数量增加, TLR4 组细胞迁移数量减少 ($P < 0.05$)。血管形成实验结果显示,与 control+NC 组相比, control+sh-SKA3

组血管形成数量增加, TLR4 组血管形成数量减少 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL+NC 组相比, ox-LDL+sh-SKA3 组血管形成数量增加, TLR4 组血管形成数量减少 ($P < 0.05$)。qRT-PCR 检测结果显示,与 NC 组、sh-NC 组相比, TLR4 组 circ-SKA3 的表达升高, sh-TLR4 组 circ-SKA3 的表达降低 ($P < 0.05$; 图 5 和图 6)。

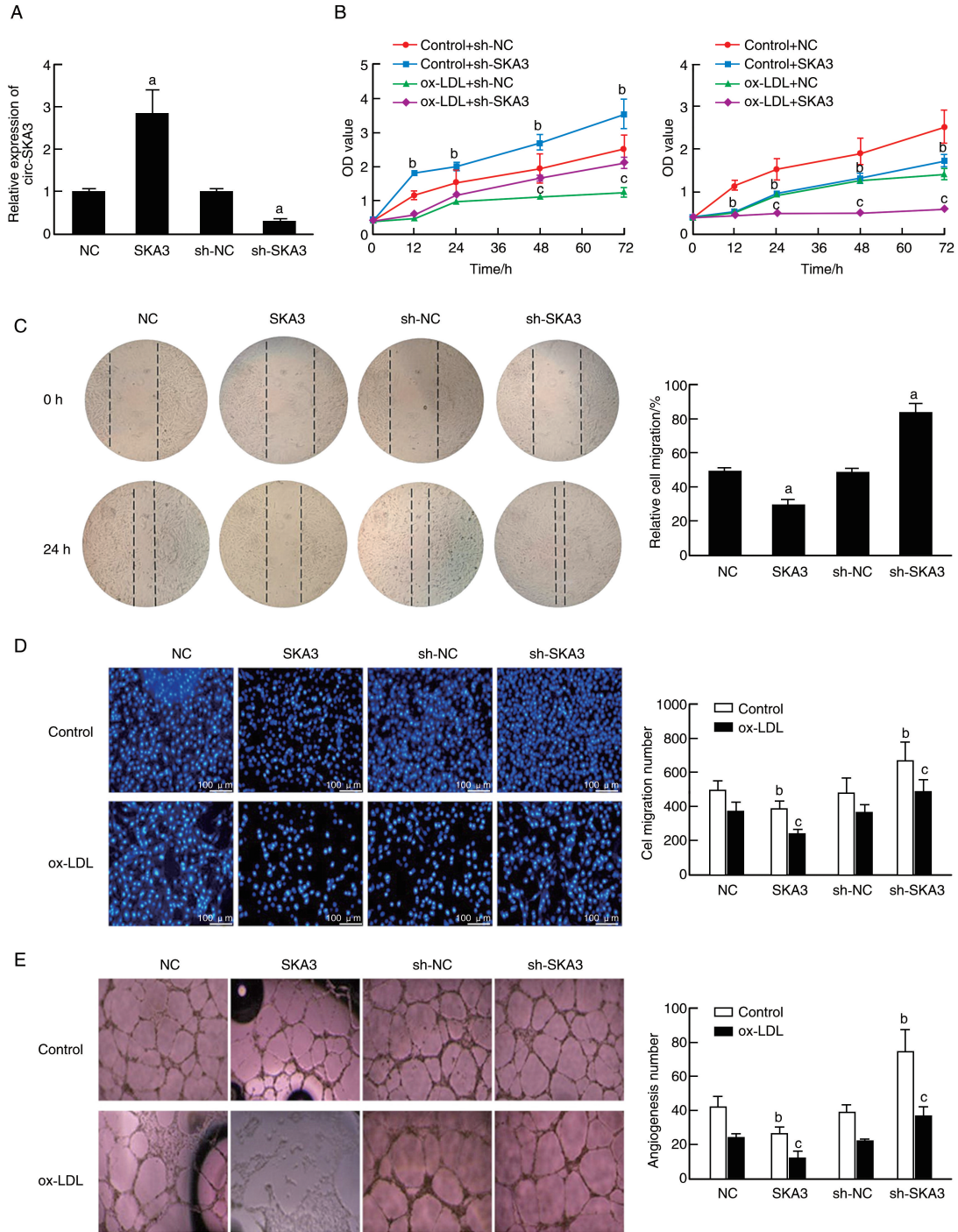


图 2. circ-SKA3 基因敲除抑制 ox-LDL 诱导的细胞增殖、迁移和血管形成

A 为 qRT-PCR 检测各组细胞 circ-SKA3 的表达, B 为 CCK-8 检测各组细胞增殖活性, C 为细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力, D 为 Transwell 实验检测各组细胞迁移能力, E 为血管形成实验检测各组细胞血管形成数量。a 为 $P < 0.05$, 与 NC 组、sh-NC 组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 control+NC 组、control+sh-NC 组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL+NC 组、ox-LDL+sh-NC 组相比。

Figure 2. circ-SKA3 gene knockout inhibits ox-LDL induced cell proliferation, migration and angiogenesis

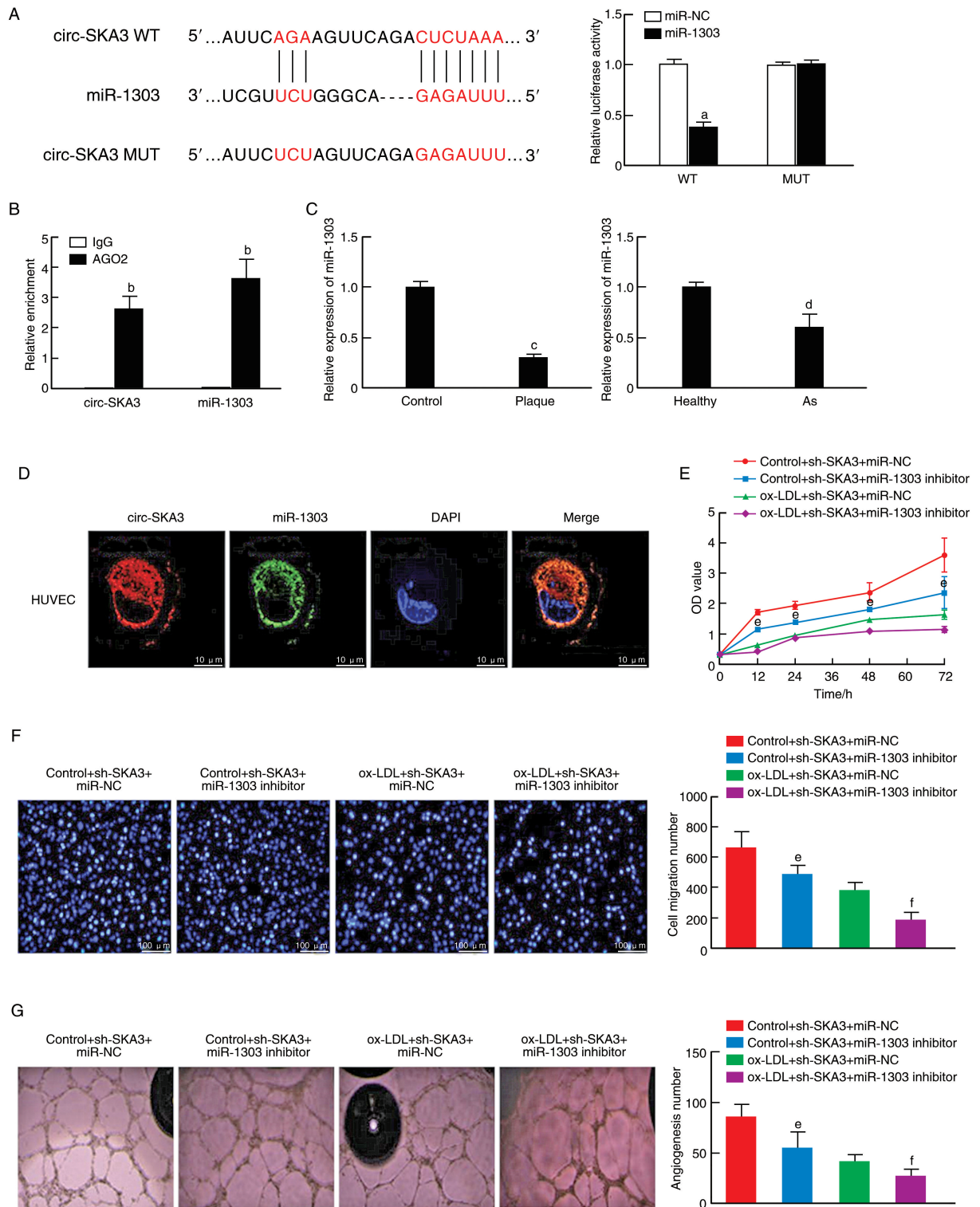


图 3. circ-SKA3 对 miR-1303 的海绵吸附作用

A 为 circ-SKA3、miR-1303 的结合位点与双荧光素酶报告基因检测结果, B 为免疫共沉淀实验检测 circ-SKA3、miR-1303 抗 AGO2 抗体富集情况, C 为 qRT-PCR 检测 As 患者斑块组织、血浆外泌体与相应对照样本 miR-1303 的表达水平, D 为 FISH 实验检测 HUVEC 内 circ-SKA3 与 miR-1303 的定位, E 为 CCK-8 检测各组细胞增殖活性, F 为 Transwell 实验检测各组细胞迁移能力, G 为血管形成实验检测各组细胞血管形成数量。a 为 $P < 0.05$, 与 miR-NC 比较; b 为 $P < 0.05$, 与 IgG 比较; c 为 $P < 0.05$, 与对照样本比较; d 为 $P < 0.05$, 与健康对照血浆外泌体比较; e 为 $P < 0.05$, 与 control+sh-SKA3+miR-NC 组比较; f 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL+sh-SKA3+miR-NC 组比较。

Figure 3. Sponge adsorption of miR-1303 by circ-SKA3

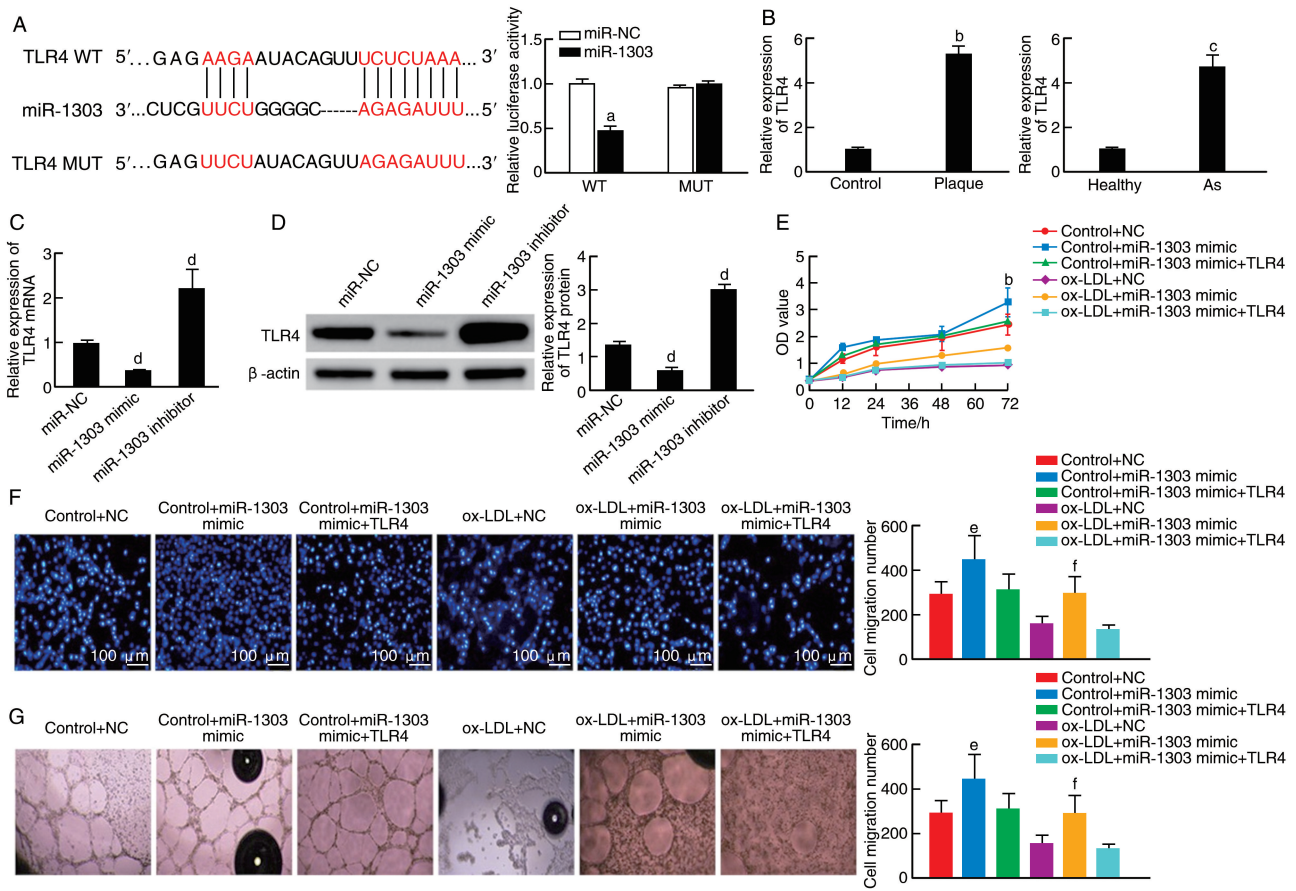


图 4. TLR4 是 miR-1303 的直接靶标, 促进 As 发展

A 为 miR-1303、TLR4 的结合位点与双荧光素酶报告基因检测结果, B 为 qRT-PCR 检测 As 患者斑块组织、血浆外泌体与相应对照样本 TLR4 的表达水平, C 为 qRT-PCR 检测各组细胞 TLR4 mRNA 表达水平, D 为蛋白质印迹法检测各组细胞 TLR4 蛋白表达水平, E 为 CCK-8 检测各组细胞增殖活性, F 为 Transwell 实验检测各组细胞迁移能力, G 为血管形成实验检测各组细胞血管形成数量。a 为 $P < 0.05$, 与 miR-NC 比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照样本比较; c 为 $P < 0.05$, 与健康对照血浆外泌体比较; d 为 $P < 0.05$, 与 miR-NC 组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 control+NC 组比较; f 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL+NC 组比较。

Figure 4. TLR4 is a direct target of miR-1303 and functions as a promoter in As

2.6 沉默 circ-SKA3 抑制 As 小鼠病变

油红 O 染色结果显示, 与 sh-NC 组相比, sh-SKA3 组小鼠主动脉组织脂质斑块面积减小 ($P < 0.05$)。qRT-PCR 检测结果显示, 与 sh-NC 组相比, sh-SKA3 组小鼠主动脉组织 circ-SKA3 的表达降低, miR-1303 的表达升高 ($P < 0.05$)。蛋白质印迹法检测结果显示, 与 sh-NC 组相比, sh-SKA3 组小鼠主动脉组织 NF- κ B、IRF3 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), TLR4、STAT1、p-STAT1、STING、p-NF- κ B、p-IRF3 表达降低 ($P < 0.05$)。血脂检测结果显示, 与 sh-NC 组相比, sh-SKA3 组小鼠血浆 TC、TG、LDLC 水平下降, HDLC 水平上升 ($P < 0.05$)。主动脉石蜡切片油红 O 染色、HE 染色、Masson 染色结果显示, 与 sh-NC 组相比, sh-SKA3 组脂质斑块与内膜损伤面积减小。免疫组织化学、免疫荧光检测结果显示, 与 sh-NC 组相比, sh-

SKA3 组 TLR4 的表达降低 ($P < 0.05$; 图 7)。

3 讨论

As 是导致心肌梗死、心力衰竭、心肌缺血和中风的主要原因, 在世界范围内具有很高的死亡率和发病率^[17]。尽管至今已经开发出许多有效的治疗方法, 但某些亚组患者仍处于 As 发生和进展的高风险状态^[18], 因此, 探索新的治疗靶点或更有效的治疗方法对 As 的防治意义重大。越来越多的证据表明, circRNA 表达异常与 As 病变形成有关, 可能成为潜在的药物靶点, 例如, circ-USP36 可与 miR-637 竞争性结合, 调节无翅型小鼠乳房肿瘤病毒整合位点家族成员 4 表达水平, 加重 ox-LDL 对 EC 的损伤^[19]; circ-RSF1 可通过调节 As 中 miR-135B-5p/

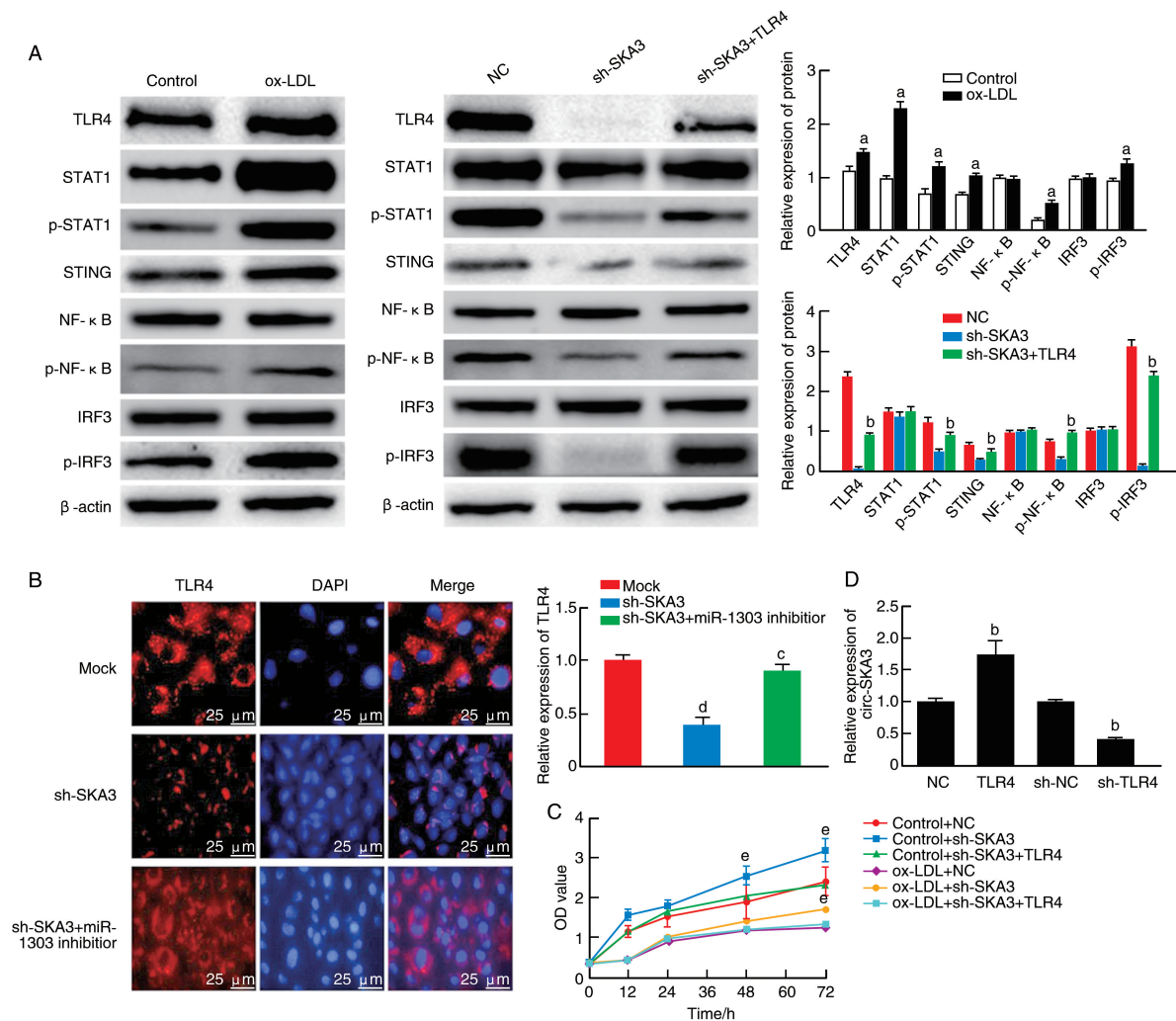


图 5. circ-SKA3 通过 miR-1303 调节 TLR4 及 As 相关蛋白表达

A 为蛋白质印迹法检测各组细胞 TLR4、As 相关蛋白表达, B 为免疫荧光检测各组细胞 TLR4 表达, C 为 CCK-8 检测各组细胞增殖活性, D 为 qRT-PCR 检测各组细胞 circ-SKA3 表达。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 NC 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 sh-SKA3 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 Mock 组比较; e 为 $P < 0.05$, 与 control+NC 组比较; f 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL+NC 组比较。

Figure 5. circ-SKA3 regulates the expression of TLR4 and As-related proteins through miR-1303

HDAC1 轴相关分子表达, 影响 ox-LDL 诱导的 EC 增殖、凋亡和炎症反应^[20]。然而目前涉及 As 病变和斑块堆积的 circRNA 相关研究仍较少。本研究发现, circ-SKA3 在 As 患者斑块组织、血浆外泌体中表达上调; 正常培养条件下, 过表达 circ-SKA3 降低了 HUVEC 的增殖活性、迁移与血管形成能力, 抑制 circ-SKA3 表达则能够促进 HUVEC 增殖、迁移与血管形成; ox-LDL 处理后, 过表达 circ-SKA3 进一步降低了 HUVEC 的增殖活性、迁移与血管形成能力, 而抑制 circ-SKA3 表达逆转了 HUVEC 增殖、迁移、血管形成受限的情况; sh-SKA3 慢病毒处理的 As 模型小鼠主动脉组织 As 病变程度减轻, 提示 circ-SKA3 的表达可能与 As 斑块形成相关, 其水平上调能够影响 HUVEC 功能促进 As 发展。

越来越多的证据表明, circRNA 介导的 ceRNA 串扰在心血管疾病的病理过程中起着至关重要的作用^[21-22]。本研究验证了 circ-SKA3 的 miRNA 海绵吸附作用。经生物信息学分析预测发现, miR-1303 与 circ-SKA3 存在结合位点, FISH 实验结果显示 circ-SKA3 与 miR-1303 共存于 HUVEC 的胞质中, 通过 RNA 下拉实验与双荧光素酶报告基因检测分析证实 circ-SKA3 能够与预测靶点 miR-1303 相互作用。miR-1303 在 As 患者斑块组织、血浆外泌体中表达下调; 正常培养与 ox-LDL 处理后, 同时抑制 circ-SKA3 与 miR-1303 的表达均可使 HUVEC 增殖、迁移、血管形成能力降低, 而过表达 miR-1303 可使 HUVEC 增殖、迁移、血管形成能力升高; sh-SKA3 慢病毒处理的 As 模型小鼠主动脉组织 miR-1303 表

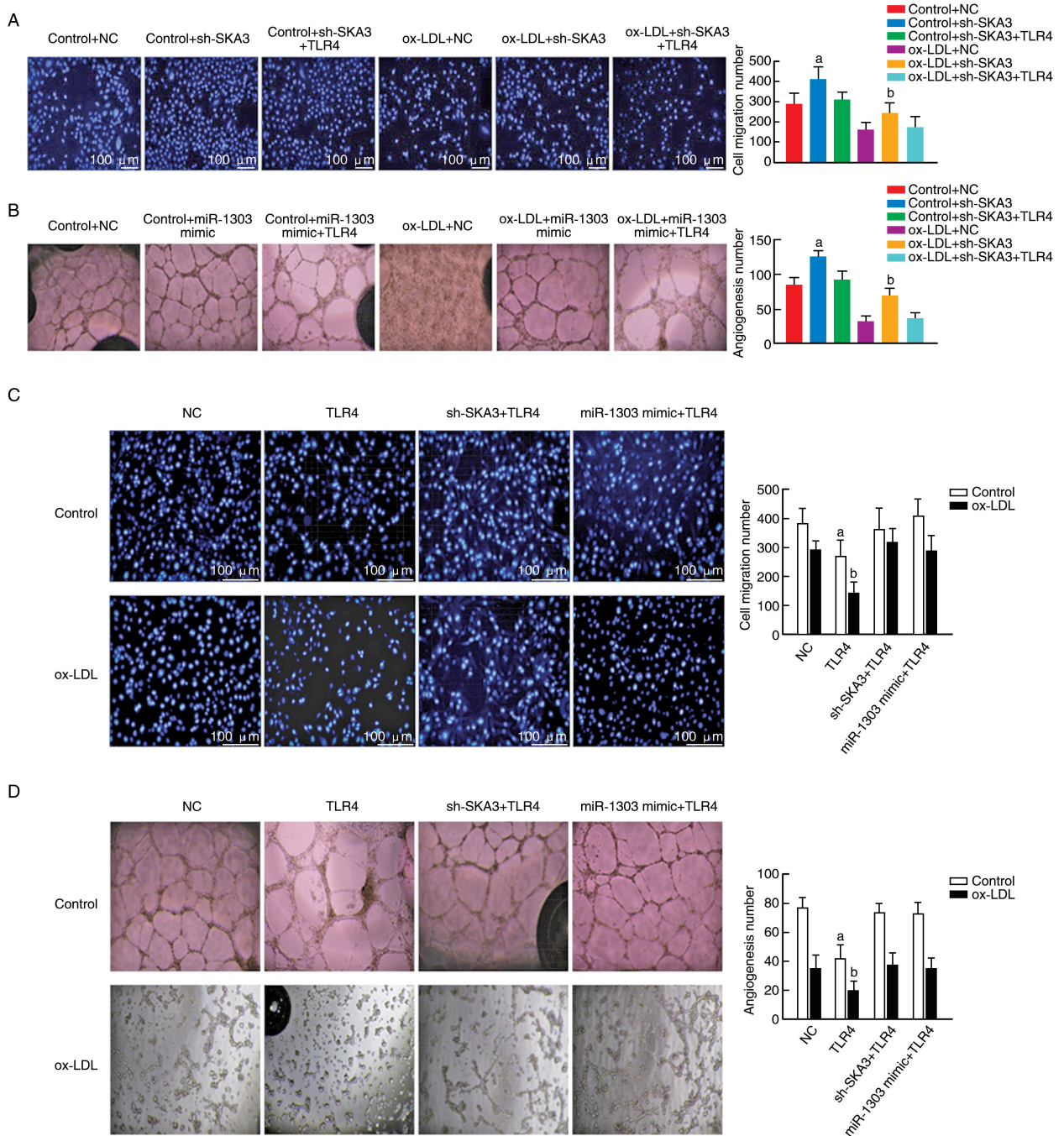


图 6. circ-SKA3/miR-1303/TLR4 轴促进内皮细胞增殖、迁移和血管形成

A、C 为 Transwell 实验检测各组细胞迁移能力, B、D 为血管形成实验检测各组细胞血管形成数量。

a 为 $P < 0.05$, 与 control+NC 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL+NC 组比较。

Figure 6. circ-SKA3/miR-1303/TLR4 axis promotes endothelial cell proliferation migration and angiogenesis

达升高,提示 miR-1303 对 As 发展具有抑制作用。

TLR4 是一种跨膜蛋白,属于模式识别受体家族,它的激活可以导致炎性细胞因子、细胞内信号转导途径 NF- κ B 产生,在病原体识别和激活天然免疫中起着基础作用^[23],其下游 STAT1 的表达与主动脉 As 病变形成关系密切^[24]。大量研究表明,STAT1/STING 信号通路抑制介导抗炎反应^[25-26]。

STING 被认为是一种细胞质 DNA 传感器,可识别细菌和病毒 DNA 以及内源性 DNA,调节先天免疫反应,与细胞内第二信使环二核苷酸结合激活 IRF3 和 NF- κ B 信号通路^[27]。Cai 等^[14]的研究表明,巴拉苏酰胺衍生物 3C 可激活腺苷酸活化蛋白激酶,减弱 STAT1/STING 信号通路分子表达,从而降低高脂饮食 ApoE^{-/-}小鼠血清 TC 水平和斑块数量。Pham

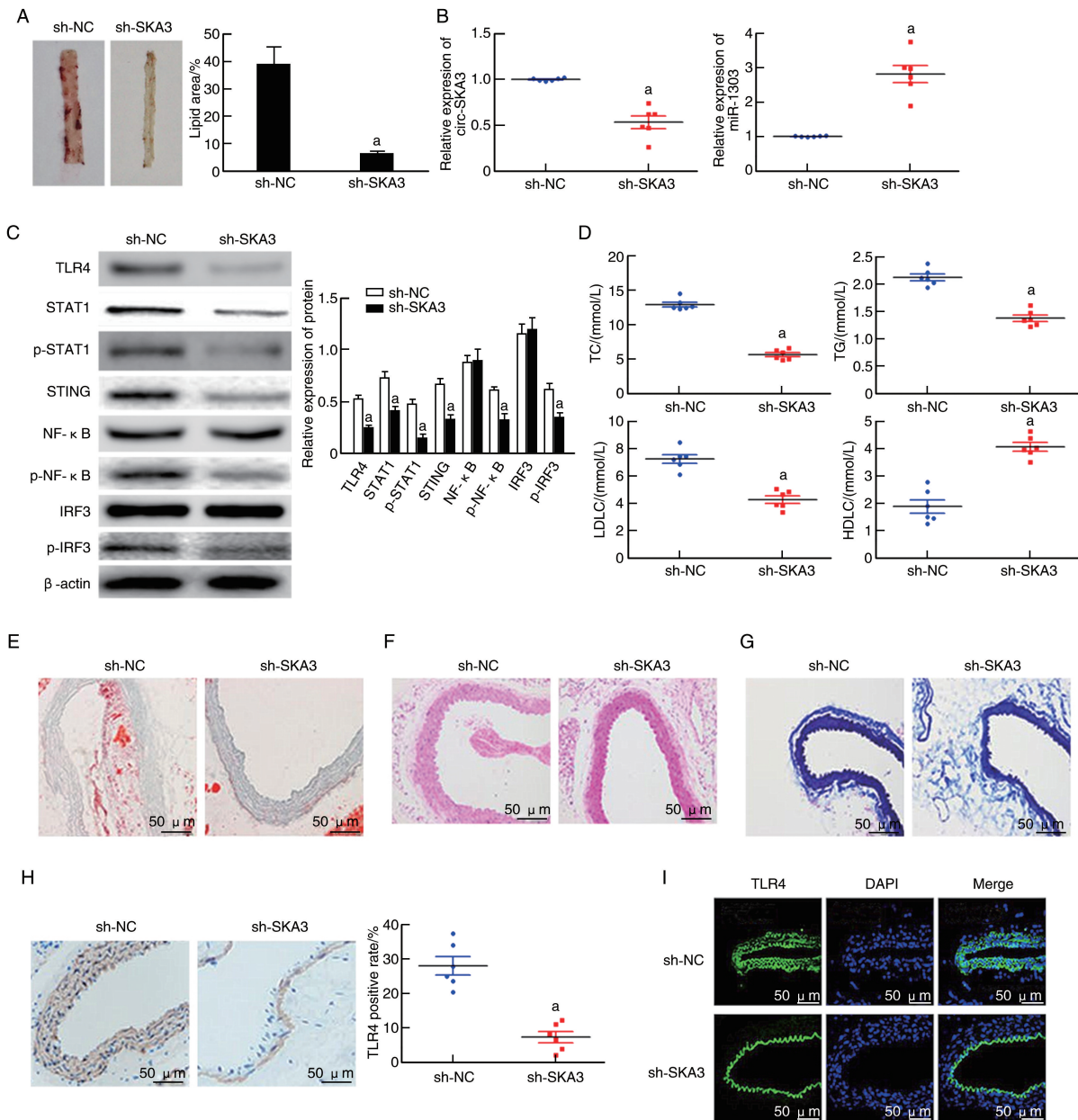


图 7. 沉默 circ-SKA3 抑制 As 小鼠病变

A 为小鼠主动脉组织油红 O 染色结果, B 为 qRT-PCR 检测主动脉组织 circ-SKA3、miR-1303 的表达, C 为蛋白质印迹法检测主动脉组织 TLR4、As 相关蛋白表达, D 为小鼠血脂指标检测结果, E 为主动脉石蜡切片油红 O 染色结果, F 为主动脉石蜡切片 HE 染色结果, G 为主动脉石蜡切片 Masson 染色结果, H 为主动脉石蜡切片免疫组织化学检测结果, I 为主动脉石蜡切片免疫荧光检测结果。
a 为 $P < 0.05$, 与 sh-NC 组比较。

Figure 7. Inhibition of pathological changes in As mice by silencing circ-SKA3

等^[28]的研究显示,沉默 STING 基因的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉弓中 As 病变、斑块中脂质和巨噬细胞的积聚减少,主动脉中炎症因子表达降低。在本研究中,ox-LDL 处理的 HUVEC 中 TLR4、STAT1、p-STAT1、STING、p-NF-κB、p-IRF3 的表达均升高,同时抑制 circ-SKA3 以及过度表达 TLR4,不但能逆转 circ-SKA3 引起的蛋白低表达,同时能抑制 miR-1303 及 TLR4 表达,对 HUVEC 增殖、迁移与血管形成有促进作

用。sh-SKA3 慢病毒处理的 As 模型小鼠主动脉组织 TLR4、STAT1、p-STAT1、STING、p-NF-κB、p-IRF3 表达较 sh-NC 组降低,提示 TLR4 的表达受 circ-SKA3、miR-1303 调控,能够促进 As 发展。

综上所述,circ-SKA3 在 As 患者颈动脉斑块、血浆外泌体、ox-LDL 处理的 HUVEC 和 As 模型小鼠的主动脉中过表达, circ-SKA3/miR-1303/TLR4 轴可促进体内外 As 发展。

[参考文献]

- [1] 赵银娇, 姚柳, 张栩, 等. Omega-3 多不饱和脂肪酸代谢产物的动脉粥样硬化拮抗机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(6): 461-467.
ZHAO Y J, YAO L, ZHANG X, et al. Atherosclerosis protection mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acid metabolites[J]. Chin J Arterioscler, 2020, 28(6): 461-467.
- [2] 丁芳芳, 杨燕, 刘立民, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的组织特异性功能与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(4): 357-363.
DING F F, YANG Y, LIU L M, et al. The tissue specific function of ATP-binding cassette transporter A1 and atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(4): 357-363.
- [3] LIN H H, HSIEH M C, WANG C P, et al. Anti-atherosclerotic effect of gossypetin on abnormal vascular smooth muscle cell proliferation and migration[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(9): 1357-1373.
- [4] ROBICHAUX W G 3rd, MEI F C, YANG W, et al. Epa1 (exchange protein directly activated by cAMP 1) upregulates LOX-1 (oxidized low-density lipoprotein receptor 1) to promote foam cell formation and atherosclerosis development[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(12): e322-e335.
- [5] ZHANG H, TANG W, WANG S, et al. Tetramethylpyrazine inhibits platelet adhesion and inflammatory response in vascular endothelial cells by inhibiting P38 MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. Inflammation, 2020, 43(1): 286-297.
- [6] WEN G, ZHOU T, GU W. The potential of using blood circular RNA as liquid biopsy biomarker for human diseases[J]. Protein Cell, 2021, 12(12): 911-946.
- [7] ZHOU R, MIAO S, XU J, et al. Circular RNA circ_0000020 promotes osteogenic differentiation to reduce osteoporosis via sponging microRNA miR-142-5p to up-regulate bone morphogenetic protein BMP2[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 3824-3836.
- [8] SHEN X, TANG J, JIANG R, et al. CircRILPL1 promotes muscle proliferation and differentiation via binding miR-145 to activate IGF1R/PI3K/AKT pathway[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2): 142-155.
- [9] XU T, LI Y, ZHU N, et al. circSKA3 acts as a sponge of miR-6796-5p to be associated with outcomes of ischemic stroke by regulating matrix metalloproteinase 9 expression[J]. Eur J Neurol, 2022, 29(2): 486-495.
- [10] LI B, CAI X, WANG Y, et al. Circ-SKA3 enhances doxorubicin toxicity in AC16 cells through miR-1303/TLR4 axis[J]. Int Heart J, 2021, 62(5): 1112-1123.
- [11] SACHINIDIS A. Cardiotoxicity and heart failure: lessons from human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and anti-cancer drugs[J]. Cells, 2020, 9(4): 1001-1014.
- [12] ZHENG Y, LV P, HUANG J, et al. GYY4137 exhibits anti-atherosclerosis effect in apolipoprotein E^{-/-} mice via PI3K/Akt and TLR4 signalling[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(7): 1231-1239.
- [13] LIU Z, MA Y, CUI Q, et al. Toll-like receptor 4 plays a key role in advanced glycation end products-induced MI macrophage polarization[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 531(4): 602-608.
- [14] CAI D, LIU H, WANG J, et al. Balasubramide derivative 3C attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice; role of AMPK-STAT1-STING signaling pathway[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(8): 12160-12178.
- [15] 荣季冬, 姜顺涛, 任微微. 空腹葡萄糖调节受损与 10 年动脉粥样硬化性心血管疾病风险的相关性研究[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(2): 180-184.
RONG J D, JIANG S T, REN W W. Association of impaired fasting glucose with 10-year atherosclerotic cardiovascular disease risk[J]. J Chongqing Med Univ, 2021, 46(2): 180-184.
- [16] WIŚNIEWSKA A, STACHOWICZ A, KUŚ K, et al. Inhibition of atherosclerosis and liver steatosis by agmatine in western diet-fed ApoE-knockout mice is associated with decrease in hepatic de novo lipogenesis and reduction in plasma triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10688-10700.
- [17] SILVIS M J M, DEMKES E J, FIOLET A T L, et al. Immunomodulation of the NLRP3 inflammasome in atherosclerosis, coronary artery disease, and acute myocardial infarction[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2021, 14(1): 23-34.
- [18] HOU C, LAN J, LIN Y, et al. Chronic remote ischaemic conditioning in patients with symptomatic intracranial atherosclerotic stenosis (the RICA trial): a multicentre, randomised, double-blind sham-controlled trial in China[J]. Lancet Neurol, 2022, 21(12): 1089-1098.
- [19] HUANG J G, TANG X, WANG J J, et al. A circular RNA, circUSP36, accelerates endothelial cell dysfunction in atherosclerosis by adsorbing miR-637 to enhance WNT4 expression[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 6759-6770.
- [20] ZHANG X, LU J, ZHANG Q, et al. CircRNA RSF1 regulated ox-LDL induced vascular endothelial cells proliferation, apoptosis and inflammation through modulating miR-135b-5p/HDAC1 axis in atherosclerosis[J]. Biol Res, 2021, 54(1): 11-23.
- [21] GABRIEL A F, COSTA M C, ENGUITA F J. Circular RNA-centered regulatory networks in the physiopathology of cardiovascular diseases[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 456-469.
- [22] FU Y, SUN C, LI Q, et al. Differential RNA expression profiles and competing endogenous RNA-associated regulatory networks during the progression of atherosclerosis[J]. Epigenomics, 2021, 13(2): 99-112.
- [23] SANGARAN P G, IBRAHIM Z A, CHIK Z, et al. LPS preconditioning attenuates apoptosis mechanism by inhibiting NF- κ B and Caspase-3 activity: TLR4 pre-activation in the signaling pathway of LPS-induced neuroprotection[J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(5): 2407-2422.
- [24] GAO J, WANG S, LIU S. The involvement of protein TNFSF18 in promoting p-STAT1 phosphorylation to induce coronary microcirculation disturbance in atherosclerotic mouse model[J]. Drug Dev Res, 2021, 82(1): 115-122.
- [25] WAN X, TIAN J, HAO P, et al. cGAS-STING pathway performance in the vulnerable atherosclerotic plaque[J]. Aging Dis, 2022, 13(6): 1606-1614.
- [26] WU H, WANG M, LI X, et al. The metaflammatory and immunometabolic role of macrophages and microglia in diabetic retinopathy[J]. Hum Cell, 2021, 34(6): 1617-1628.
- [27] FUKUDA D, PHAM P T, SATA M. Emerging roles of the innate immune system regulated by DNA sensors in the development of vascular and metabolic diseases[J]. J Atheroscler Thromb, 2022, 29(3): 297-307.
- [28] PHAM P T, FUKUDA D, NISHIMOTO S, et al. STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis; a link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases[J]. Eur Heart J, 2021, 42(42): 4336-4348.