

蒋先训,张凯,张鹰. *circTLK1* 通过 *miR-26a-5p*/*YES1* 轴减轻小鼠心肌缺血/再灌注损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (8): 86-94.

Jiang XX, Zhang K, Zhang Y. *circTLK1* attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice via the *miR-26a-5p*/*YES1* axis [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 86-94.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.012

# *circTLK1* 通过 *miR-26a-5p*/*YES1* 轴减轻小鼠心肌缺血/再灌注损伤

蒋先训,张 凯,张 鹰\*

(南华大学衡阳医学院附属第二医院,重症医学科,湖南 衡阳 421000)

**【摘要】 目的** 探讨环状 RNA 凌乱样激酶 1 (*circTLK1*) 在心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 中的作用和潜在机制。**方法** 48 只 C57BL/6 小鼠分为假手术组 (Sham 组)、MIRI 组、sh-NC 组、sh-*circTLK1* 组、sh-*circTLK1*+antagomir-NC 组、sh-*circTLK1*+antagomir-*miR-26a-5p* 组,每组 8 只;采用结扎左冠状动脉前降支 (LAD) 建立 MIRI 小鼠模型。超声心动图检测小鼠左心室射血分数 (EF)、左心室缩短分数 (FS)、左心室舒张末期内径 (LVEDD) 和收缩末期内径 (LVESD) 以评估心脏功能,ELISA 检测血清乳酸脱氢酶 (LDH)、心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 水平,苏木精-伊红 (HE) 染色检测心肌组织病理学变化,TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡,实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和蛋白质印迹 (Western blot) 检测心肌组织中 *circTLK1*、*miR-26a-5p*、*YES1* mRNA 和蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验、RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP) 验证 *circTLK1*/*YES1* 和 *miR-26a-5p* 之间的相互作用。**结果** 与 Sham 组相比,MIRI 组小鼠 EF、FS、心肌组织 *miR-26a-5p* 水平显著降低,LVEDD、LVESD、血清 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平、心肌细胞凋亡率、心肌组织 *circTLK1*、*YES1* mRNA 和蛋白水平显著升高 (均  $P<0.05$ ),心肌细胞排列紊乱,细胞间质有炎性细胞浸润;*circTLK1* 敲低可显著上调 *miR-26a-5p*,抑制 *YES1* 表达,改善上述指标变化 (均  $P<0.05$ ),减轻心肌损伤;抑制 *miR-26a-5p* 可通过上调 *YES1*,显著减弱 *circTLK1* 敲低对 MIRI 的保护作用。双荧光素酶报告基因实验和 RIP 证实了 *circTLK1* 和 *miR-26a-5p* 之间的直接相互作用,*YES1* 是 *miR-26a-5p* 的靶标。**结论** 敲低 *circTLK1* 可能通过调节 *miR-26a-5p*/*YES1* 轴在 MIRI 中发挥保护作用,*circTLK1* 可能是 MIRI 的潜在治疗靶点。

**【关键词】** 心肌缺血再灌注损伤;环状 RNA 凌乱样激酶 1;*miR-26a-5p*;YES 原癌基因 1;细胞凋亡

**【中图分类号】** R-33      **【文献标识码】** A      **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 08-0086-09

## *circTLK1* attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice via the *miR-26a-5p*/*YES1* axis

JIANG Xianxun, ZHANG Kai, ZHANG Ying\*

(Department of Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, Univevrsity of South China, Hengyang 421000, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the role and underlying mechanism of circular RNA tousled-like kinase 1 (*circTLK1*) in myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI). **Methods** Forty-eight C57BL/6 mice were divided into a

**【基金项目】** 湖南省卫生健康委科研项目 (202213014836);衡阳市科技计划项目 (hyzdjxh202103);湖南省自然科学基金部门联合基金项目 (2023JJ60356)。

**【作者简介】** 蒋先训 (1984—),男,硕士,主治医师,研究方向:心脏重症的基础研究。E-mail:hnsyxwz1@126.com

**【通信作者】** 张鹰 (1987—),男,硕士,主治医师,研究方向:重症心脏。E-mail:zhangy20052005@126.com

sham operation group (Sham), MIRI group, sh-NC group, sh-circTLK1 group, sh-circTLK1+antagomir-NC group, and sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p group with eight mice per group. The MIRI mouse model was established by ligation of the left anterior descending coronary artery. Left ventricular ejection fraction, left ventricular fractional shortening, left ventricular end-diastolic diameter, and end-systolic diameter were measured by echocardiography to assess cardiac functions. Serum levels of lactate dehydrogenase, cardiac troponin I and creatine kinase isoenzyme were measured by ELISA. Histopathological changes of myocardial tissue were assessed by hematoxylin-eosin staining. Cardiomyocyte apoptosis was detected by TUNEL staining. mRNA and protein expression of *circTLK1*, *miR-26a-5p*, and *YES1* in myocardial tissue were measured by real-time quantitative PCR and Western blot. An interaction between *circTLK1/YES1* and *miR-26a-5p* was verified by dual luciferase reporter assays and RNA-binding protein immunoprecipitation. **Results** Compared with the findings in the Sham group, the ejection fraction, fractional shortening, and the level of myocardial tissue *miR-26a-5p* in the MIRI group were significantly decreased, the left ventricular end-diastolic diameter, end-systolic diameter, activities of serum lactate dehydrogenase and creatine kinase isoenzyme, the level of cardiac troponin I, myocardial cell apoptosis rate, and mRNA and protein levels of *circTLK1* and *YES1* in myocardial tissue were significantly increased (all  $P < 0.05$ ). Moreover, cardiomyocytes were disordered, and inflammatory cell infiltration was observed among interstitial cells. *circTLK1* knockdown significantly upregulated *miR-26a-5p* expression, inhibited *YES1* expression, improved the changes in the above indicators (all  $P < 0.05$ ), and reduced myocardial injury. Inhibition of *miR-26a-5p* significantly attenuated the protective effect of *circTLK1* knockdown against MIRI by upregulating *YES1* expression. Dual luciferase reporter assays and RNA-binding protein immunoprecipitation confirmed the direct interaction between *circTLK1* and *miR-26a-5p*, and *YES1* was a target of *miR-26a-5p*. **Conclusions** Knockdown of *circTLK1* may exert a protective effect against MIRI by regulating the *miR-26a-5p/YES1* axis, and *circTLK1* may be a potential therapeutic target for MIRI.

**[Keywords]** myocardial ischemia/reperfusion injury; circular RNA tousel-like kinase 1; *miR-26a-5p*; YES proto-oncogene 1; apoptosis

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

冠心病是一种严重危害人类健康的心血管疾病,是世界范围内致死和致残的主要原因之一<sup>[1-2]</sup>。再灌注治疗是目前挽救缺血心肌的有效方法,然而,心肌再灌注过程会进一步导致心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)<sup>[3-4]</sup>。最近,环状 RNA (circRNA) 已被证明可调节与 MIRI 进展相关分子途径,可作为新的治疗靶点<sup>[5-6]</sup>。研究显示,环状 RNA 凌乱样激酶 1 (circular RNA tousel-like kinase 1, *circTLK1*) 在 MIRI 小鼠模型中上调,可加剧 MIRI 进展,而沉默 *circTLK1* 可减轻受损的心脏功能并减少梗死面积<sup>[7]</sup>。但仍需进一步研究了解其潜在的调节机制。

据报道, circRNA 可作为 microRNA (miRNA) “海绵”来抑制 miRNA 的表达<sup>[8-9]</sup>。miR-26a-5p 已被证实可在 MIRI 中下调,上调其表达可保护心肌细胞免受因缺氧/复氧引起的损伤<sup>[10-11]</sup>。更重要的是,生物信息学分析显示 YES 原癌基因 1 (YES proto-oncogene 1, *YES1*) 是 *miR-26a-5p* 的靶基因,而 *YES1* 在 MIRI 后上调<sup>[12]</sup>。此外,StarBase 数据库预测显示, *miR-26a-5p* 和 *circTLK1* 序列之间存在互补性。研究也证实,敲低 *circTLK1* 可通过上调 *miR-26a-5p*,减轻脑缺血再灌注神经元损伤<sup>[13]</sup>。鉴于以

上研究,笔者推测 *circTLK1* 可能通过调节 *miR-26a-5p/YES1* 轴促进 MIRI 的病理进展。因此,本研究旨在阐明 *circTLK1* 在 MIRI 中的调控机制。

# 1 材料和方法

## 1.1 实验动物

从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购入 C57BL/6 小鼠 48 只 (SPF 级, 6~8 周龄, 雄性, 体重 20~30 g) [SCXK (湘) 2019-0004], 所有动物在南华大学附属第二医院 12 h/12 h 光照黑暗循环、温度 (22±2) °C, 湿度 (55~60)% 的标准条件下饲养 [SYXK (湘) 2020-0002]。实验程序均经南华大学附属第二医院实验动物护理和使用委员会批准 (SCU-AE-2022013), 符合 3R 原则。

## 1.2 主要试剂与仪器

靶向 *circTLK1* 的短发夹 RNA (sh-circTLK1)、阴性对照 shRNA (sh-NC)、miR-26a-5p 模拟物 (miR-26a-5p mimic)、模拟物阴性对照 (miR-NC)、miR-26a-5p 抑制剂 (antagomir-miR-26a-5p) 和抑制剂阴性对照 (antagomir-NC) 质粒由上海 GenePharma 公司设计和合成; 小鼠 LDH (ml002267)、CK-MB (ml037723) ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技

有限公司;cTnI (E-EL-M1805) ELISA 试剂盒购自上海博耀生物科技有限公司;HE 试剂盒 (G1120)、TUNEL 试剂盒 (T2190) 购自北京 Solarbio 公司;兔源一抗 YES1 (ab109265)、GAPDH (ab9484) 购自英国 Abcam 公司;Millipore Magna RIP™ RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP) 试剂盒 (17-700) 购自美国 EMD Millipore 公司。Vevo 2100 小动物超声成像仪 (加拿大 VisualSonics 公司);DM3000 光学显微镜 (德国 Leica 公司);7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司);Multiskan FC 酶标仪 (美国 Thermo 公司);PowerPace Basic 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司);E-Gel Imager 凝胶成像仪 (美国 Invitrogen 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组与处理

构建携带 sh-circTLK1、sh-NC、antagomir-miR-26a-5p 和 antagomir-NC 的腺相关病毒 AAV 载体颗粒。将 48 只小鼠分为 Sham 组、MIRI 组、sh-NC 组、sh-circTLK1 组、sh-circTLK1 + antagomir-NC 组、sh-circTLK1 + antagomir-miR-26a-5p 组,每组 8 只。sh-NC 组、sh-circTLK1 组小鼠连续 3 d 通过尾静脉注射携带 sh-NC 或 sh-circTLK1 的 AAV 载体颗粒 ( $2 \times 10^{12}$  个 AAV 载体颗粒/只),sh-circTLK1 + antagomir-NC 组、sh-circTLK1 + antagomir-miR-26a-5p 组小鼠在经尾静脉注射携带 sh-circTLK1 AAV 载体颗粒的同时,分别注入相应的携带 antagomir-NC、antagomir-miR-26a-5p 的 AAV 载体颗粒 ( $2 \times 10^{12}$  个 AAV 载体颗粒/只),Sham 组、MIRI 组小鼠尾静脉注射生理盐水。注射腺相关病毒 AAV 载体 5 d 后,对小鼠进行缺血再灌注手术,以建立 MIRI 模型。

#### 1.3.2 模型建立

采用结扎左冠状动脉前降支 (left anterior descending coronary artery, LAD) 构建 MIRI 模型<sup>[14]</sup>。戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠,暴露胸腔。接下来,用 6-0 丝线结扎 LAD,观察到左心室前壁变成苍白色、脉搏减弱,表明结扎成功,心肌出现缺血。缺血诱导 30 min 后,解开结扎线,恢复心肌血流。最后,缝合胸腔。假手术组 (Sham 组) 小鼠不结扎 LAD,其余与模型小鼠相同。

#### 1.3.3 超声心动图检测小鼠心功能

小鼠在再灌注后 48 h 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉,仰卧位固定,使用 Vevo 2100 超声系统进行经胸超声心动图检测小鼠的心脏功能。

将 1.4-F Millar 导管插入小鼠颈动脉,然后插入左心室,检测左心室射血分数 (ejection fraction, EF)、左心室缩短分数 (fractional shortening, FS)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD) 和心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD)。

#### 1.3.4 ELISA 检测血清 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平

心功能检测完成后,小鼠摘眼球取血,4℃ 下 3000 r/min 离心 15 min,分离血清,-80℃ 保存。按照试剂盒说明测定小鼠血清中 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平。将 ELISA 试剂盒中的标准品稀释至不同浓度,使用标准品制作标准曲线。然后根据样品的吸光度和标准曲线确定 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平。

#### 1.3.5 HE 染色检测心肌组织病理学变化

取血完成后,处死小鼠,取出心脏,将部分心肌组织保存在-80℃ 冰箱;另一部分固定在 4% 多聚甲醛中 24 h,在石蜡中切成连续冠状切片 (4 μm);然后,将切片在二甲苯中脱蜡,在梯度乙醇中复水,并用苏木精染色 4 min 和伊红染色 2 min。在光学显微镜下观察心肌组织病理学变化,并通过显微镜数码相机拍摄图像。

#### 1.3.6 TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡

将心肌组织石蜡切片在二甲苯中脱蜡,用分级乙醇复水,然后在 37℃ 下用 100 mg/mL 蛋白酶 K 孵育 30 min,使用 3% 过氧化氢孵育 10 min。随后将这些切片与 TUNEL 反应混合物在 37℃ 下孵育 1 h,磷酸盐缓冲液清洗 3 次,细胞核用 DAPI 溶液染色 5 min。用 PBS 清洗 3 次后,在荧光显微镜下观察切片。凋亡率 = 凋亡细胞数 (绿色) / 细胞总数 (蓝色) × 100%。

#### 1.3.7 qRT-PCR 检测心肌组织中 circTLK1、miR-26a-5p 和 YES1 基因表达

TRIzol 试剂用于分离-80℃ 保存的部分心肌组织总 RNA,分光光度计检测 RNA 的浓度。使用 cDNA 合成试剂盒将 2 μg RNA 逆转录制备 cDNA,并进行扩增。以 GAPDH 和 U6 作为内参,通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法分别计算 miRNA 和 mRNA 的表达。表 1 为引物序列。

#### 1.3.8 蛋白质印迹 (Western blot) 分析心肌组织 YES1 蛋白表达

RIPA 裂解液提取心肌组织总蛋白,采用 SDS-

PAGE 分离等量总蛋白样品并转膜。将膜封闭后,与一抗(YES1(1:1000)、GAPDH(1:2000))在4℃下孵育过夜。将膜洗涤3次后,与抗兔 IgG (HRP)二抗(1:2000)在室温下孵育1 h。之后,使用增强化学发光试剂(enhanced chemiluminescent reagent,ECL)对膜上的免疫复合物进行可视化,并采用 Image J 软件分析灰度值,计算目的蛋白表达。

1.3.9 双荧光素酶报告基因检测

利用 StarBase 数据库预测 *miR-26a-5p* 与 *circTLK1* 或 *YES1* 之间的结合位点。使用 HEK 293 T 细胞系来检测 *miR-26a-5p* 与 *circTLK1* 或 *YES1* 之间的相互作用。分别合成含有 *miR-26a-5p* 结合位点的 *circTLK1* 和 *YES1* 3' 非翻译区(3' UTR)序列并亚克隆到 pGL4 荧光素酶报告载体中,然后构建 *circTLK1* 和 *YES1* 3' UTR 野生型(wild type, WT)和突变型(mutant, MUT)质粒(由 GenePharma 完成)。使用 Lipofectamine 3000 将构建的荧光素酶报告质粒(*circTLK1*-WT、*circTLK1*-MUT、*YES1*-WT 和 *YES1*-MUT)与 *miR-NC* 或 *miR-26a-5p* mimic 共转染 HEK 293 T 细胞 48 h。48 h 后,收集细胞测定荧光素酶活性。

1.3.10 RIP 分析

*circTLK1* 和 *miR-26a-5p* 之间的相互作用通过 RIP 分析。使用 RIP 试剂盒进行评估。简而言之,

将转染 *miR-NC* 或 *miR-26a-5p* mimic 的小鼠心肌细胞裂解,并与结合有 Ago2 抗体(10686-1-AP, Proteintech)或 IgG(Thermo Fisher Scientific)的磁珠在4℃下孵育4 h。IgG 用作对照。然后,通过 qRT-PCR 检测沉淀 RNA 中 *circTLK1* 的水平。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,计量资料用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。双荧光素酶活性和 RIP 分析比较采用 *t* 检验,小鼠心功能指标、血清 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平、心肌细胞凋亡率、心肌组织 *circTLK1*、*miR-26a-5p* 和 *YES1* 表达比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠心脏功能比较

与 Sham 组相比,MIRI 组小鼠 EF、FS 显著降低,LVEDD、LVESD 显著升高(均  $P < 0.05$ );与 MIRI 组、sh-NC 组相比,sh-*circTLK1* 组和 sh-*circTLK1* + antagomir-NC 组小鼠 EF、FS 显著升高,LVEDD、LVESD 显著降低(均  $P < 0.05$ );与 sh-*circTLK1* 组、sh-*circTLK1* + antagomir-NC 组相比,sh-*circTLK1* + antagomir-*miR-26a-5p* 组小鼠 EF、FS 显著降低,LVEDD、LVESD 显著升高(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因<br>Gene        | 正向引物(5'-3')<br>Forward primer | 反向引物(5'-3')<br>Reverse primer |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>circTLK1</i>   | CAGTCAATGGAGCAGAGAA           | CCATTCTTGTTGCCCTTTTG          |
| <i>miR-26a-5p</i> | GGATCCGCAGAACTCCAGAGAGAAGGA   | AAGCTTGCCTTTAGCAGAAAGGAGGTT   |
| <i>YES1</i>       | AGAACAAGTGGAGCGAGGATACA       | CATCAATTTCATGGAGGGATTCTG      |
| <i>GAPDH</i>      | TGAAGGTCGGAGTCAACGG           | TCCTGGAAGATGCTGATGGGA         |
| <i>U6</i>         | CTCGCTTCGGCAGCACAT            | TTTGGCTGTCATCCTTGCG           |

表 2 各组小鼠心脏功能比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Comparison of cardiac function of mice in each group

| 组别 Groups                                                                                                      | EF (%)                       | FS (%)                        | LVEDD (mm)                  | LVESD (mm)                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Sham 组 Sham group                                                                                              | 75.36±8.15                   | 41.55±4.62                    | 2.87±0.34                   | 2.06±0.25                   |
| MIRI 组 MIRI group                                                                                              | 54.21±6.08 <sup>*</sup>      | 26.38±3.19 <sup>*</sup>       | 5.62±0.61 <sup>*</sup>      | 4.11±0.43 <sup>*</sup>      |
| sh-NC 组 sh-NC group                                                                                            | 53.94±6.27 <sup>*</sup>      | 26.27±3.40 <sup>*</sup>       | 5.90±0.65 <sup>*</sup>      | 4.09±0.44 <sup>*</sup>      |
| sh- <i>circTLK1</i> 组<br>sh- <i>circTLK1</i> group                                                             | 68.18±7.35 <sup>#&amp;</sup> | 35.48±3.77 <sup>*#&amp;</sup> | 3.48±0.42 <sup>#&amp;</sup> | 2.61±0.35 <sup>#&amp;</sup> |
| sh- <i>circTLK1</i> +antagomir-NC 组<br>sh- <i>circTLK1</i> +antagomir-NC group                                 | 68.45±7.20 <sup>#&amp;</sup> | 35.90±3.82 <sup>*#&amp;</sup> | 3.37±0.40 <sup>#&amp;</sup> | 2.57±0.31 <sup>#&amp;</sup> |
| sh- <i>circTLK1</i> +antagomir- <i>miR-26a-5p</i> 组<br>sh- <i>circTLK1</i> +antagomir- <i>miR-26a-5p</i> group | 57.06±6.43 <sup>*Δ\$</sup>   | 28.57±3.31 <sup>*Δ\$</sup>    | 5.25±0.59 <sup>*Δ\$</sup>   | 3.84±0.42 <sup>*Δ\$</sup>   |

注:与 Sham 组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与 MIRI 组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 sh-NC 组相比, <sup>&</sup> $P < 0.05$ ;与 sh-*circTLK1* 组相比, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ;与 sh-*circTLK1* + antagomir-NC 组相比, <sup>\$</sup> $P < 0.05$ 。  
Note. Compared with Sham group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ . Compared with MIRI group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ . Compared with sh-NC group, <sup>&</sup> $P < 0.05$ . Compared with sh-*circTLK1* group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ . Compared with sh-*circTLK1*+antagomir-NC group, <sup>\$</sup> $P < 0.05$ .



2.2 各组小鼠血清心肌酶水平比较

与 Sham 组相比, MIRI 组 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平显著升高 ( $P<0.05$ ); 与 MIRI 组、sh-NC 组相比, sh-circTLK1 组和 sh-circTLK1+antagomir-NC 组 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平显著降低 ( $P<0.05$ ); 与 sh-circTLK1 组、sh-circTLK1+antagomir-NC 组相比, sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p 组 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平显著升高 ( $P<0.05$ )。见表 3。

2.3 各组小鼠心肌组织病理学变化

HE 染色显示, Sham 组小鼠心肌纤维排列有序, 无炎性细胞浸润, 而 MIRI 组和 sh-NC 组小鼠心肌细胞排列紊乱, 细胞间质有炎性细胞浸润; 与 MIRI 组、sh-NC 组相比, sh-circTLK1 组和 sh-circTLK1+

antagomir-NC 组心肌损伤明显改善, 可见少量炎性细胞浸润, 心肌细胞排列较为有序; 与 sh-circTLK1 组和 sh-circTLK1+antagomir-NC 组相比, sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p 组心肌损伤程度加重, 细胞排列紊乱, 炎性细胞浸润增加。见图 1。

2.4 各组小鼠心肌细胞凋亡比较

TUNEL 染色结果显示, 与 Sham 组相比, MIRI 组心肌细胞凋亡率显著升高 (均  $P<0.05$ ); 与 MIRI 组、sh-NC 组相比, sh-circTLK1 组和 sh-circTLK1+antagomir-NC 组心肌细胞凋亡率显著降低 (均  $P<0.05$ ); 与 sh-circTLK1 组、sh-circTLK1+antagomir-NC 组相比, sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p 组心肌细胞凋亡率显著升高 (均  $P<0.05$ )。见图 2, 表 4。

表 3 各组小鼠血清 LDH、CK-MB 活性和 cTnI 水平比较 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Comparison of serum LDH, CK-MB activity and cTnI levels of mice in each group

| 组别 Groups                                                                    | LDH (U/L)                       | CK-MB (U/L)                     | cTnI (ng/mL)                 |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Sham 组 Sham group                                                            | 486.75±63.10                    | 175.32±24.54                    | 1.43±0.20                    |
| MIRI 组 MIRI group                                                            | 1462.31±89.45 <sup>*</sup>      | 1241.50±83.03 <sup>*</sup>      | 5.26±0.64 <sup>*</sup>       |
| sh-NC 组 sh-NC group                                                          | 1507.42±95.36 <sup>*</sup>      | 1229.41±92.16 <sup>*</sup>      | 5.37±0.61 <sup>*</sup>       |
| sh-circTLK1 组<br>sh-circTLK1 group                                           | 814.60±90.52 <sup>*#&amp;</sup> | 452.70±65.58 <sup>*#&amp;</sup> | 2.62±0.35 <sup>*#&amp;</sup> |
| sh-circTLK1+antagomir-NC 组<br>sh-circTLK1+antagomir-NC group                 | 802.35±91.78 <sup>*#&amp;</sup> | 436.82±61.43 <sup>*#&amp;</sup> | 2.55±0.39 <sup>*#&amp;</sup> |
| sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p 组<br>sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p group | 1237.46±84.30 <sup>*#Δ\$</sup>  | 1071.29±78.05 <sup>*#Δ\$</sup>  | 4.74±0.52 <sup>*#Δ\$</sup>   |

注: 与 Sham 组相比, <sup>\*</sup> $P<0.05$ ; 与 MIRI 组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与 sh-NC 组相比, <sup>&</sup> $P<0.05$ ; 与 sh-circTLK1 组相比, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ ; 与 sh-circTLK1+antagomir-NC 组相比, <sup>\$</sup> $P<0.05$ 。  
Note. Compared with Sham group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ . Compared with MIRI group, <sup>#</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-NC group, <sup>&</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-circTLK1 group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-circTLK1+antagomir-NC group, <sup>\$</sup> $P<0.05$ .

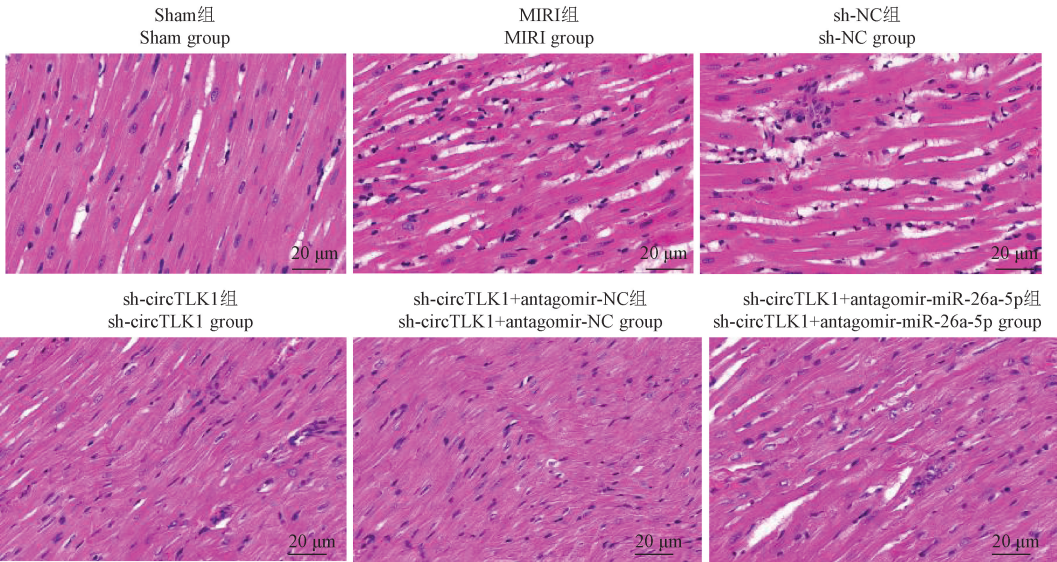


图 1 各组小鼠心肌组织 HE 染色

Figure 1 HE staining of myocardial tissue of mice in each group

表 4 各组小鼠心肌细胞凋亡率比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )  
Table 4 Comparison of apoptosis rate of cardiomyocytes of mice in each group

| 组别<br>Groups                                                                 | TUNEL 阳性细胞(%)<br>TUNEL positive cells |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Sham 组<br>Sham group                                                         | 3.18±0.50                             |
| MIRI 组<br>MIRI group                                                         | 14.25±1.47 <sup>*</sup>               |
| sh-NC 组<br>sh-NC group                                                       | 14.49±1.61 <sup>*</sup>               |
| sh-circTLK1 组<br>sh-circTLK1 group                                           | 6.83±0.72 <sup>*#&amp;</sup>          |
| sh-circTLK1+antagomir-NC 组<br>sh-circTLK1+antagomir-NC group                 | 6.70±0.85 <sup>*#&amp;</sup>          |
| sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p 组<br>sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p group | 12.56±1.34 <sup>*Δ\$</sup>            |

注:与 Sham 组相比, <sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 MIRI 组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 sh-NC 组相比, <sup>&</sup> $P<0.05$ ;与 sh-circTLK1 组相比, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ ;与 sh-circTLK1+antagomir-NC 组相比, <sup>\$</sup> $P<0.05$ 。  
Note. Compared with Sham group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ . Compared with MIRI group, <sup>#</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-NC group, <sup>&</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-circTLK1 group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-circTLK1+antagomir-NC group, <sup>\$</sup> $P<0.05$ .

2.5 各组小鼠心肌组织 *circTLK1*、*miR-26a-5p* 和 *YES1* 表达比较

与 Sham 组相比, MIRI 组心肌组织 *circTLK1*、*YES1* mRNA 和蛋白水平显著升高, *miR-26a-5p* 水平显著降低(均  $P<0.05$ );与 MIRI 组、sh-NC 组相比, sh-circTLK1 组和 sh-circTLK1+antagomir-NC 组 *circTLK1*、*YES1* mRNA 和蛋白水平显著降低, *miR-26a-5p* 水平显著升高(均  $P<0.05$ );与 sh-circTLK1 组、sh-circTLK1+antagomir-NC 组相比, sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p 组 *circTLK1*、*YES1* mRNA 和蛋白水平显著升高, *miR-26a-5p* 水平显著降低(均  $P<0.05$ )。见图 3,表 5。

2.6 *circTLK1* 通过海绵化 *miR-26a-5p* 促进 *YES1* 表达

StarBase 数据库预测显示 *miR-26a-5p* 与 *circTLK1*、*YES1* 具有互补的结合序列(图 4A 和 4B)。与转染 miR-NC 相比,转染 *miR-26a-5p* mimic 后,含有 *circTLK1*-WT 和 *YES1*-WT 质粒细胞的荧光素酶活性降低( $P<0.05$ ),含 *circTLK1*-MUT 和 *YES1*-

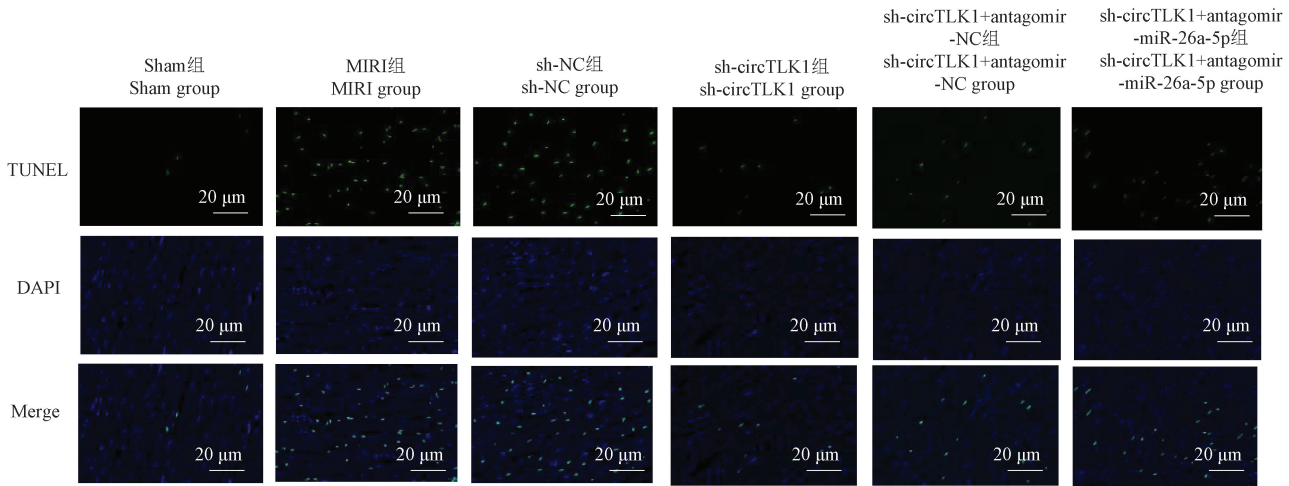


图 2 各组小鼠心肌组织 TUNEL 染色  
Figure 2 TUNEL staining of myocardial tissue of mice in each group

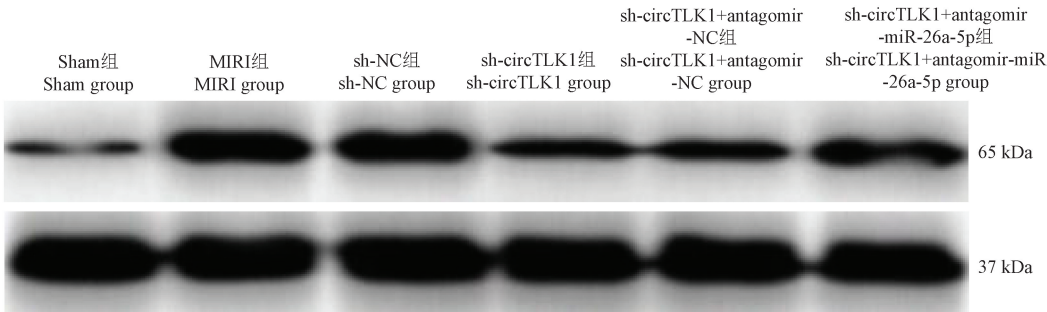


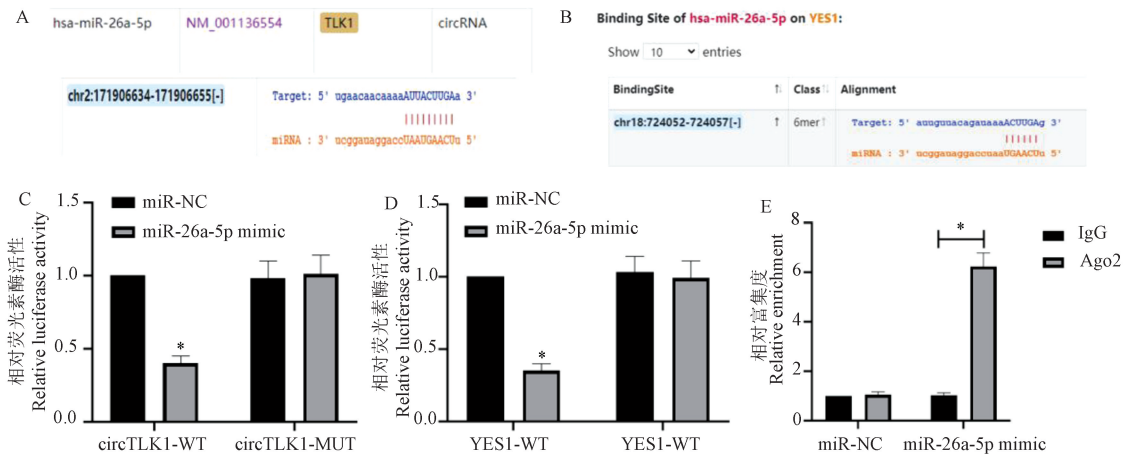
图 3 各组小鼠心肌组织 YES1 蛋白表达  
Figure 3 Expression of YES1 protein in myocardial tissue of mice in each group

表 5 各组小鼠心肌组织 *circTLK1*、*miR-26a-5p* 和 *YES1* 表达比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

| Table 5 | Comparison of expressions of <i>circTLK1</i> , <i>miR-26a-5p</i> and <i>YES1</i> in myocardial tissue of mice in each group |                             |                               |                               |                                    |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
|         | 组别 Groups                                                                                                                   | <i>circTLK1</i>             | <i>miR-26a-5p</i>             | <i>YES1</i> -mRNA             | <i>YES1</i> 蛋白 <i>YES1</i> protein |
|         | Sham 组<br>Sham group                                                                                                        | 1.00±0.00                   | 1.00±0.00                     | 1.00±0.00                     | 0.17±0.03                          |
|         | MIRI 组<br>MIRI group                                                                                                        | 2.46±0.33 *                 | 0.43±0.06 *                   | 4.25±0.56 *                   | 0.69±0.08 *                        |
|         | sh-NC 组<br>sh-NC group                                                                                                      | 2.57±0.35 *                 | 0.41±0.05 *                   | 4.34±0.50 *                   | 0.72±0.09 *                        |
|         | sh-circTLK1 组<br>sh-circTLK1 group                                                                                          | 1.38±0.20 <sup>#&amp;</sup> | 0.82±0.09 <sup>* #&amp;</sup> | 2.26±0.31 <sup>* #&amp;</sup> | 0.38±0.05 <sup>* #&amp;</sup>      |
|         | sh-circTLK1+antagomir-NC 组<br>sh-circTLK1+antagomir-NC group                                                                | 1.34±0.19 <sup>#&amp;</sup> | 0.85±0.10 <sup>* #&amp;</sup> | 2.19±0.28 <sup>* #&amp;</sup> | 0.37±0.06 <sup>* #&amp;</sup>      |
|         | sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p 组<br>sh-circTLK1+antagomir-miR-26a-5p group                                                | 2.25±0.30 <sup>* Δ §</sup>  | 0.59±0.07 <sup>* Δ §</sup>    | 3.87±0.45 <sup>* Δ §</sup>    | 0.61±0.07 <sup>* Δ §</sup>         |

注:与 Sham 组相比, <sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 MIRI 组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 sh-NC 组相比, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ ;与 sh-*circTLK1* 组相比, <sup>\$</sup> $P<0.05$ ;与 sh-*circTLK1*+antagomir-NC 组相比, <sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with Sham group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ . Compared with MIRI group, <sup>#</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-NC group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-*circTLK1* group, <sup>\$</sup> $P<0.05$ . Compared with sh-*circTLK1*+antagomir-NC group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ .



注:A: *circTLK1* 和 *miR-26a-5p* 之间互补结合位点预测结果;B: *YES1* 和 *miR-26a-5p* 之间互补结合位点预测结果;C:用于验证 *circTLK1* 和 *miR-26a-5p* 之间关系的双荧光素酶测定结果;D:用于验证 *YES1* 和 *miR-26a-5p* 之间关系的双荧光素酶测定结果;E: RIP 检测证实 *circTLK1* 与 *miR-26a-5p* 之间的直接结合。与 miR-NC 相比, <sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

图 4 *circTLK1* 通过海绵化 *miR-26a-5p* 促进 *YES1* 表达

Note. A, Prediction of complementary binding sites between *circTLK1* and *miR-26a-5p*. B, Prediction results of complementary binding sites between *YES1* and *miR-26a-5p*. C, Double luciferase determination results used to verify the relationship between *circTLK1* and *miR-26a-5p*. D, Double luciferase determination results used to verify the relationship between *YES1* and *miR-26a-5p*. E, RIP detection confirmed the direct binding between *circTLK1* and *miR-26a-5p*. Compared with miR-NC, <sup>\*</sup> $P<0.05$ .

Figure 4 *circTLK1* promotes *YES1* expression by sponging *miR-26a-5p*

MUT 质粒细胞的荧光素酶活性未受显著影响 ( $P>0.05$ ) (图 4C 和 4D)。RIP 结果显示,与抗 IgG 相比,抗 Ago2 中 *circTLK1* 的富集度更高 (图 4E)。

3 讨论

MIRI 可导致细胞死亡和心脏功能障碍<sup>[15]</sup>,保护心脏免受 MIRI 的有害影响是医生面临的治疗挑战<sup>[16]</sup>。因此,研究其病理生理机制,寻找有效的防治措施,对改善冠心病患者的预后具有重要意义

义<sup>[17]</sup>。本研究初步探讨了 *circTLK1* 对 MIRI 的调控机制,研究结果表明,在 MIRI 小鼠模型中,*circTLK1* 表达显著增强,而 *miR-26a-5p* 表达降低,*YES1* 表达增加,这与以往的研究结果一致。此外,*circTLK1* 的敲低上调了 *miR-26a-5p* 表达,降低了 *YES1* mRNA 和蛋白水平,改善了 MIRI 小鼠的心脏功能,减少了心肌细胞凋亡,减轻了心肌损伤。*miR-26a-5p* 是 *circTLK1* 的靶标,*YES1* 是 *miR-26a-5p* 的靶基因。抑制 *miR-26a-5p* 可通过上调 *YES1*,显著减弱 *circTLK1*



敲低对 MIRI 的保护作用。这些数据表明,敲低 *circTLK1* 可能通过调节 *miR-26a-5p/YES1* 轴在 MIRI 中发挥保护作用。

*circRNA* 是一类由 RNA 聚合酶 II 转录的共价闭合的单链非编码 RNA,具有靶向调控 *miRNA* 或信使 RNA(*mRNA*)的功能<sup>[18-19]</sup>。在本研究中,笔者确定了 *circTLK1*,一种在神经元中大量表达的 *circRNA*,据报道它会加剧缺血性中风后的神经元损伤<sup>[13]</sup>,并且在 MIRI 中表达上调<sup>[7]</sup>。如本研究结果所示,在 MIRI 小鼠中 *circTLK1* 的表达升高,而 *circTLK1* 的敲除对心肌细胞凋亡具有保护作用,并减轻了小鼠 MIRI。可见,*circTLK1* 是心肌缺血的启动子,参与 MIRI 的心肌细胞凋亡过程。*circRNA* 可以通过充当 *miRNA* 海绵来调节基因表达,参与 MIRI<sup>[20-21]</sup>。基于 *circRNA* 的 *circRNA/miRNA/mRNA* 交互网络有助于系统地了解 MIRI 的发生和发展。在 MIRI 小鼠中,*miR-26a-5p* 的表达下调。本研究结合生物信息学和 qRT-PCR 分析,初步推测 *circTLK1* 与 *miR-26a-5p* 有关系,然后进行双荧光素酶报告基因检测,证实 *circTLK1* 负调节 *miR-26a-5p* 的表达; RIP 进一步确定 *circTLK1/miR-26a-5p* 的直接结合。为了进一步验证 *circTLK1* 是否可以通过 *miR-26a-5p* 在 MIRI 中发挥作用,本研究在 *circTLK1* 敲低的基础上,采用 antagomir-*miR-26a-5p* 干预来下调 *miR-26a-5p*,结果显示 *miR-26a-5p* 的下调逆转了 *circTLK1* 敲低对 MIRI 损伤的保护作用;表明 *miR-26a-5p* 对 MIRI 具有潜在的保护作用,这与以往的研究结果一致。提示,*circTLK1* 可通过负调节 *miR-26a-5p* 表达参与 MIRI。

此外,本研究对 *miR-26a-5p* 的潜在靶标进行了分析,发现 *miR-26a-5p* 与 *YES1 mRNA* 的 3' UTR 存在结合位点。双荧光素酶实验发现过表达 *miR-26a-5p* 降低了 *YES1-WT* 的荧光素酶活性。提示,*miR-26a-5p* 与 *YES1* 之间可能存在负靶向调控关系。*YES1* 是癌症中的一种可靶向癌基因<sup>[22-23]</sup>。研究显示,在 MIRI 后,*YES1* 表达上调,且靶向下调 *YES1* 可减少与 MIRI 相关的心肌梗死面积和心肌酶的增加,并可抑制线粒体凋亡相关蛋白的表达,减轻 MIRI<sup>[12]</sup>。与此一致,本研究结果显示敲除 *circTLK1* 后 *miR-26a-5p* 在 MIRI 小鼠中过度表达,并可通过抑制 *YES1* 显著减少心肌细胞凋亡和心肌组织损伤,而 *miR-26a-5p* 抑制剂升高了 *YES1* 的 mRNA 和蛋白水平。提示,*YES1* 参与了 *miR-26a-5p* 过表达

对 MIRI 的保护作用。

综上所述,敲低 *circTLK1* 可能通过调节 *miR-26a-5p/YES1* 轴在 MIRI 中发挥保护作用。本研究可能为 MIRI 提供新的生物标志物和治疗策略。在未来的研究中,将进一步深入研究 *circTLK1→miR-26a-5p→YES1* 通路在大鼠和更多其他哺乳动物中的作用,并结合细胞实验进行验证。

# 参考文献:

- [ 1 ] Reynolds HR, Shaw LJ, Min JK, et al. Outcomes in the ISCHEMIA trial based on coronary artery disease and ischemia severity [ J ]. Circulation, 2021, 144(13): 1024-1038.
- [ 2 ] Deng J. Advanced research on the regulated necrosis mechanism in myocardial ischemia-reperfusion injury [ J ]. Int J Cardiol, 2021, 334: 97-101.
- [ 3 ] Kakavand H, Aghakouchakzadeh M, Coons JC, et al. Pharmacologic prevention of myocardial ischemia-reperfusion injury in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention [ J ]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 77(4): 430-449.
- [ 4 ] 王静,洪炳哲,张习敬,等. PTS 预处理对大鼠心肌梗死再灌注损伤保护效果及机制研究 [ J ]. 实验动物科学, 2020, 37(1): 27-32.
- [ 5 ] Ye X, Hang Y, Lu Y, et al. CircRNA circ-NNT mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through activating pyroptosis by sponging miR-33a-5p and regulating USP46 expression [ J ]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 370.
- [ 6 ] Zhang J, Luo CJ, Xiong XQ, et al. miR-21-5p-expressing bone marrow mesenchymal stem cells alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the circRNA\_0031672/miR-21-5p/programmed cell death protein 4 pathway [ J ]. J Geriatr Cardiol, 2021, 18(12): 1029-1043.
- [ 7 ] Song YF, Zhao L, Wang BC, et al. The circular RNA TLK1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury via targeting miR-214/RIPK1 through TNF signaling pathway [ J ]. Free Radic Biol Med, 2020, 155: 69-80.
- [ 8 ] Alkan AH, Akgül B. Endogenous miRNA sponges [ J ]. Methods Mol Biol, 2022, 2257: 91-104.
- [ 9 ] Li M, Li C, Zheng H, et al. CircRNA\_0001795 sponges miRNA-339-5p to regulate yes-associated protein 1 expression and attenuate osteoporosis progression [ J ]. Bioengineered, 2022, 13(2): 2803-2815.
- [ 10 ] Jung SE, Kim SW, Jeong S, et al. microRNA-26a/b-5p promotes myocardial infarction-induced cell death by downregulating cytochrome c oxidase 5a [ J ]. Exp Mol Med, 2021, 53(9): 1332-1343.
- [ 11 ] Li J, Tong Y, Zhou Y, et al. LncRNA KCNQ1OT1 as a miR-26a-5p sponge regulates ATG12-mediated cardiomyocyte autophagy and aggravates myocardial infarction [ J ]. Int J Cardiol, 2021, 338: 14-23.



[12]

Yang S, Li H, Chen L. microRNA-140 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury through suppressing mitochondria-mediated apoptosis by targeting YES1 [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 3813–3821.

[13]

Wu R, Yun Q, Zhang J, et al. Knockdown of circular RNA tousel-like kinase 1 relieves ischemic stroke in middle cerebral artery occlusion mice and oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced N2a cell damage [J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 3434–3449.

[14]

Bai Q, Li Y, Song K, et al. Knockdown of XIST up-regulates 263294miR-340-5p to relieve myocardial ischaemia-reperfusion injury via inhibiting cyclin D1 [J]. ESC Heart Fail, 2022, 9(2): 1050–1060.

[15]

卢迎宏, 王丹, 井海云, 等. 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 23–30.

[16]

Ou D, Ni D, Li R, et al. Galectin-1 alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing the inflammation and apoptosis of cardiomyocytes [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(2): 143.

[17]

Liu X, Hua Y, Hu M, et al. Knockdown of long noncoding RNA Abhd11os attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis in cardiomyocytes [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2022, 79(2): 192–198.

[18]

Fu L, Zhang J, Lin Z, et al. CircularRNA circ\_0071269 knockdown protects against from diabetic cardiomyopathy injury by microRNA-145/gasdermin A axis [J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 2398–2411.

[19]

Liu X, Wang M, Li Q, et al. CircRNA ACAP2 induces myocardial apoptosis after myocardial infarction by sponging miR-29 [J]. Minerva Med, 2022, 113(1): 128–134.

[20]

Bai XF, Niu RZ, Liu J, et al. Roles of noncoding RNAs in the initiation and progression of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Epigenomics, 2021, 13(9): 715–743.

[21]

Chang H, Li ZB, Wu JY, et al. Circ-100338 induces angiogenesis after myocardial ischemia-reperfusion injury by sponging miR-200a-3p [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(11): 6323–6332.

[22]

Takeda T, Yamamoto H, Suzawa K, et al. YES1 activation induces acquired resistance to neratinib in HER2-amplified breast and lung cancers [J]. Cancer Sci, 2020, 111(3): 849–856.

[23]

Gao F, Jia L, Han J, et al. Circ-ZNF124 downregulation inhibits non-small cell lung cancer progression partly by inactivating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway via mediating the miR-498/YES1 axis [J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(3): 257–268.

[收稿日期]2022-12-08

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R      国际刊号 ISSN 1671-7856      邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与比较医学相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究进展、继续教育、设施设备、3R 等。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊、被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com>

期待您的来稿!