临床研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003788

circTRRAP敲低通过调节miR-323-3p/SMAD2轴在急性心肌梗死中的研究

熊 雁，唐艺加

（四川省医学科学院/四川省人民医院心血管内科/心血管病研究所，成都 610000）

【摘 要】**目的：**探讨circTRRAP在急性心肌梗死（acute myocardial infarction，AMI）中的特定作用。**方法：**心肌梗死模型由缺氧24 h诱导。使用双萤光素酶报告基因测定来测试circTRRAP、SMAD2和miR-323-3p之间的相互作用。通过转染si-circTRRAP，敲低与过表达microRNA-323-3p、过表达SMAD2后检测促炎细胞因子[白细胞介素-6（interkeukin-6，IL-6）与肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）]和氧化应激标志物[丙二醛（malondialdehyde，MDA）与超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）]以及细胞凋亡因子[Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）、B细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2），Cleaved Caspase-3]表达来研究其在心肌梗死细胞中作用。**结果：**在心肌梗死损伤模型中，circTRRAP与SMAD2水平明显升高超过50%，而miR-323-3p表达明显降低。circTRRAP的下调通过促进miR-323-3p表达导致SMAD2的表达减少。SMAD2与miR-323-3p呈负相关，但与circTRRAP表达呈正相关。circTRRAP与SMAD2的下调或miR-323-3p的上调可提高细胞活力与减少心肌细胞凋亡率。**结论：**circTRRAP的下调导致炎症的抑制，并通过miR-323-3p/SMAD2轴减轻AMI。

【关键词】环状RNA；基因调控；细胞凋亡；心肌梗死

【中图分类号】R541.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2024-09-28

Study of circTRRAP knockdown in acute myocardial infarction by regulating miR-323-3p/SMAD2 axis

Xiong Yan，*Tang Yijia*

（*Department of Cardiology*，*Institute of Cardiovascular Diseases*，*Sichuan Provincial People's Hospital*，*Sichuan Academy of Medical Sciences*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the specific role of circTRRAP in acute myocardial infarction（AMI）. ***Methods***：The method of hypoxia for 24 hours was used to induce the model of myocardial infarction，and the dual-luciferase reporter assay was used to investigate the interaction between circTRRAP，SMAD2，and miR-323-3p. After knockdown and overexpression of miR-323-3p and overexpression of SMAD2 through transfection with si-circTRRAP，the expression levels of proinflammatory cytokines［interkeukin-6（IL-6）and tumor necrosis factor-α（TNF-α）］，oxidative stress markers［malondialdehyde（MDA）and superoxide dismutase（SOD）］，and apoptotic factors［Bcl-2-associated X protein（Bax），B-cell lymphoma-2（Bcl-2），and cleaved caspase-3］were measured to investigate the role of circTRRAP，SMAD2，and miR-323-3p in myocardial infarction. ***Results***：In the model of myocardial infarction injury，the levels of circTRRAP and SMAD2 were significantly increased by more than 50%，whereas there was a significant reduction in the expression of miR-323-3p. The downregulation of circTRRAP led to a reduction in SMAD2 expression by promoting miR-323-3p expression. SMAD2 was negatively correlated with miR-323-3p，but it was positively correlated with the expression of circTRRAP. The downregulation of circTRRAP or SMAD2 or the upregulation of miR-323-3p could increase cell viability and reduce the apoptosis rate of cardiomyocytes. ***Conclusion***：Downregulation of circTRRAP can inhibit inflammation and alleviate AMI via the miR-323-3p/SMAD2 axis.

【**Key words**】circular RNA；gene regulation；cell apoptosis；myocardial infarction

作者介绍：熊 雁，Email：ufaklj@126.com，
研究方向：冠心病及缓慢性心律失常。

通信作者：唐艺加，Email：195483264@qq.com。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250305.0906.004
（2025-03-06）

急性心肌梗死（acute myocardial infarction，AMI）是一种常见而严重的心血管疾病。每年有数百万人因AMI而死亡或导致长期残疾[1-2]，是心脏病死亡的主要原因之一[3-4]。尽管早期发现和及时治疗可以明显改善患者的预后，但AMI导致心肌缺血仍然是全球人类发病和死亡的重要原因[5]。因此探索新的治疗途径与方法仍然至关重要。

环状RNA（circular RNA，circRNAs）作为在细胞中广泛存在的非编码RNA，常依赖于microRNAs（miRNAs）的“海绵状”功能调控基因，调控生命过程中的疾病发展[6-7]。例如，circ_0007059通过靶向microRNA-378和microRNA-383促进缺血期间心肌细胞的凋亡和炎症[8]。环状RNA微管肌动蛋白交联因子1（circular RNA microtubule actin crosslinking factor 1，circMACF1）和circ_0001206均是通过海绵化机制对AMI进行调控[9-10]。值得注意的是，敲低环状RNA转录结构域相关蛋白（circular RNA transcription domain-associated protein，circTRRAP）在心肌细胞中具有保护心脏功能[11]。但circTRRAP在缺氧诱导的心肌细胞中的作用仍需深入探究。

MiRNAs被认为是多种生物过程中的关键调节因子[12-13]。越来越多的证据表明，miRNAs参与调节人类心血管疾病的过程[14-16]。研究证明，microRNA-21对缺氧/复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）诱导的心肌梗死发挥保护作用[17]。同样，miR-378有效减轻缺血诱导的细胞凋亡，参与心肌梗死[18]。本研究验证miR-323-3p和环状RNA转录结构域相关蛋白（circular RNA transcription domain-associated protein，circTRRAP）之间的相互作用，对circTRRAP/miR-323-3p轴在调节AMI中的机制进行深入研究。

MiRNAs可以通过与靶信使RNA的3’UTR区相互作用来调节的基因表达[19]。SMAD家族成员2（SMAD family member 2，SMAD2）是miR-323-3p的在生物信息学数据库预测的靶位点之一，在TGF-β介导的细胞外信号转变为细胞核内的信号起着关键作用，与一系列生化进程相关，如细胞增殖和凋亡。Li Z等[20]报道了SMAD2/3的激活可以有效抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3（NOD-like receptor protein 3，NLRP3）的表达，调控AMI小鼠进展。

因此，本研究探讨circTRRAP与miR-323-3p、SMAD2之间的相互作用，以及circTRRAP1参与AMI的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

人心肌细胞AC16细胞购自美国细胞培养典藏中心（ATCC，美国）。细胞培养使用的DMEM购自ATCC（美国）。培养基中的10% FBS和1%青霉素/链霉素分别购自Gibco（美国）和Beyotime（上海，中国）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 AC16在含有10% FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中，并在37 ℃与5%CO_2培养箱（Thermo Fisher Scientific，Rockford，美国）中培养。为了建立缺氧模型，根据实验要求，分别对AC16细胞进行1% O_2、5% CO_2以及94% N_2培养处理24 h。常氧条件培养的细胞设置为空白组。

1.2.2 细胞转染 由GenePharma（上海，中国）合成的circTRRAP的表达抑制载体（si-circTRRAP）及阴性对照siRNA（si-NC），SMAD2过表达质粒（pcDNA3.1-SMAD2）与空载体质粒（pcDNA3.1），miR-323-3p的模拟物（miR-323-3p-mimic）及其阴性对照（mimic-NC）、miR-323-3p抑制表达载体（miR-323-3p-inhibitor）和阴性对照（inhibitor-NC），在细胞当融合度达到60%~70%时，根据制造商Lipofectamine 3000（Invitrogen，美国）的说明，将上述寡核苷酸与质粒瞬时转染到AC16细胞中分别转入细胞中。转染6 h后更换培养液，48 h后进行缺氧处理。24 h后收集细胞并使用qRT-PCR或Western blot评估转染效率，并用后续实验。

1.2.3 核糖核酸酶R（ribonuclease，RNaseR）处理 使用核和细胞质RNA纯化试剂盒（Thermo Fisher scientific，Hampton，美国）提取总RNA。使用RNase R（Sigma，美国）37 ℃下消化总RNA 20 min。在70 ℃下灭活酶10 min，使用RT-qPCR检测circTRRAP和线性TRRAP的相对表达。

1.2.4 放线菌素D（ActD）实验 在指定的时间点（0、3、6、12 h），在AC16细胞全培养基中加入5 μg/mL ActD（Sigma，美国），收集细胞，提取总RNA。随后，使用RapidOut DNA试剂盒（Thermo Fisher scientific，Hampton，美国）去除基因组DNA反转录合成cDNA并进RT-qPCR检测目标RNA与内参RNA，并归一化为0 h的测量值。

1.2.5 qRT-PCR 通过qRT-PCR检测CircTRRAP，TRRAP，miR-323-3p与SMAD2在细胞中的表达。采用TRIzol™ Reagent（Sigema，美国）试剂盒提取细胞总RNA并纯化RNA。使用微量分光光度计（Thermo，美国）检测RNA纯度与浓度。随后按照试剂盒说明书使用miRNA反向transcription kit（TaKaRa）对mirRNA进行合成cDNA，使用PrimeScript™RT Reagent kit（TaKaRa，日本）合成mRNA和circRNA的cDNA。将合成的所有cDNA加入混匀的SYBR® Premix Ex Taq™（TAKARA，日本）里，随后使用ABI Prism 7300系统（Applied Biosystems，美国）进行qRT-PCR反应。反应条件为：预变性95 ℃，10 min；40 cycles：90 ℃，10 s；60 ℃，20 s；72 ℃，30 s通过$2^{-\Delta\Delta CT}$法分析基因相对表达，采用相对定量法，以U6作为miR-323-3p的内参，GAPDH作为circTRRAP、TRRAP与SMAD2的内参，检测基因的相对表达水平。引物序列见表1。

1.2.6 Western Blot 使用全蛋白提取试剂盒（Solarbio，北京，中国）提取心肌细胞总蛋白。使用BCA试剂盒（Thermo

Fisher Scientific，美国）对蛋白进行定量。配制 12% SDS-PAGE 分离胶与浓缩胶（Beyotime，上海，中国），使用上样缓冲液（Beyotime，上海，中国）调整蛋白浓度为 30 μg后进行上样。电泳仪（BIO-RAD，美国）电泳 80 V 40 min 等条带跑出浓缩胶后换成 120 V 2 h。使用PVDF膜（Beyotime，Shanghai，China）冰浴电转 200 mA 2 h。使用含 5% 脱脂奶粉的TBST（Beyotime，上海，中国）溶液封闭 1 h。将膜分别与一抗SMAD2（#ab40855，Abcam，英国）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax；#2272，Cell Signaling Technology，美国）、Cleaved Caspase-3（#9661，Cell Signaling Technology，美国）、B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2；#ab196495，Abcam，美国）、GADPH（#5174，Cell Signaling Technology，美国）进行结合，在4 ℃下孵育过夜。使用TBST洗膜3次。随后印迹膜与二抗IgG抗体室温孵育2 h。孵育结束后，TBST洗膜3次后使用ECL发光液（Beyotime，上海，中国）在化学发光成像仪（Image Quant LAS4000 mini，GE Healthcare，英国）中进行显影。Image J软件进行灰度分析。

表1 qPCR引物

项目	引物序列（5′~3′）
circTRRAP	正向：GCACATGCTAACCAACAGGC
	反向：GCCCGGAGGATTTGGCATC
TRRAP	正向：ATGATGCAAGAAGTTAGTGAAAA
	反向：GAAGATGTTCGTTGGTTGGTA
miR-323-3p	正向：GCGCACATTACACGGTCG
	反向：AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
SMAD2	正向：AAGCAGTGAAAAGTCTGGTG
	反向：GTTGTATCCCACTGATCTAT
GAPDH	正向：CAAATTCCATGGCACCGTCA
	反向：GATGGCATGGACTGTGGTCA
U6	正向：CTCGCTTCGGCAGCACA
	反向：AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.2.7 细胞活力测定 通过MTT法测定心肌细胞活力。将各组心肌细胞接种到96孔板中培养24 h。在每孔中加入10 μL MTT溶液（Vazyme，南京，中国），然后在37 ℃孵育4 h，吸去上清液，加入DMSO（100 μL，Sigma-Aldrich，美国），将微孔板放置摇床上，轻轻晃动10 h使晶体溶解。使用酶标仪在490 nm处测量吸光值（absorbance，A值）。细胞活力=（实验组A值-空白组A值）/（对照组A值-空白组A值）×100%。

1.2.8 流式细胞术检测 通过Fluorescein Isothiocyanate（FITC）Annexin V Apoptosis Detection Kit（BD Biosciences，美国）检测细胞凋亡率，收集培养基中的细胞，离心根据制造商的说明，预冷的PBS（Beyotime，上海，中国）洗涤细胞2次，细胞用500 μL的1×结合缓冲液中重悬，加入Annexin V-FITC和碘化丙啶（propidium iodide，PI）混匀，避光孵育15 min，BD FACSCanto Ⅱ流式细胞仪（BD Biosciences，CA，美国）上机检测。使用FlowJo软件（Tree Star，Ashland，OR，美国）分析数据。

1.2.9 ELISA检测 收集各组AC16细胞培养后的上清液，按照试剂盒说明书，使用人白细胞介素-6（interkeukin-6，IL-6）ELISA试剂盒和人肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）ELISA试剂盒（Sangon，上海，中国）分别检测来测定IL-6和TNF-α的浓度。

1.2.10 氧化测定 使用丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）检测对细胞内氧化损伤程度进行分析。根据MDA检测试剂盒（Sigma Aldrich，美国）和总活性氧检测试剂盒（Invitrogen，美国）的说明书分别检测MDA和SOD水平。

1.2.11 双萤光素酶报告基因检测 使用CircInteractom（https://circinteractome.nia.nih.gov）和Starbase（https://rnasysu.com/encori）预测miR-323-3p和circTRRAP、SMAD2的潜在结合位点。GenePharma（上海，中国）合成含有miR-323-3p结合位点的野生型（wild type）与突变型（mutant）circTRRAP片段以及wild-type和mutant SMAD2，并分别克隆至pmirGLO萤光素酶报告载体（Promega，Madison，WI，美国）中，完成野生型报告载体（circTRRAP-WT和SMAD2-WT）和突变型报告载体（circTRRAP-MUT和SMAD2-MUT）的构建。使用Lipofectamine®3000（Invitrogen，美国）将萤光素酶报告质粒共转染到含有miR-323-3p-mimic或阴性对照（mimic-NC）的AC16细胞中，在培养箱中（37 ℃、5%CO_2）中培养48 h。使用双萤光素酶报告基因检测系统（Promega Corporation，Madison，WI，美国）测定荧光素酶活性。荧光素酶活性用Synergy 2 Multidetector Microplate Reader（BioTek Instruments Inc，美国）检测。

1.2.12 RNA-pull down 将生物素标记的野生型miR-323-3p（Bio-miR-323-3p-WT）和突变的miR-323-3p（Bio-miR-323-3p -MUT）探针转染到正常细胞中，转染后收集并裂解细胞，将裂解物与封闭的链霉亲和素磁珠（Invitrogen，美国）在4 ℃中孵育4 h。随后珠洗涤5次，用TRIzol试剂（Sigma Aldrich，美国）提取和纯化RNA复合物。采用qRT-PCR检测目的基因水平。

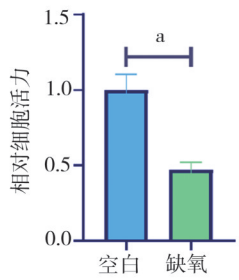
1.3 统计学方法

所有数据使用GraphPad Prism 8进行分析。计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，独立实验次数用n表示。所有实验均进行了至少3次生物学重复。Student's t-test用于比较2组之间的差异，采用单因素方差分析进行多重组比较。检验水准α=0.05。

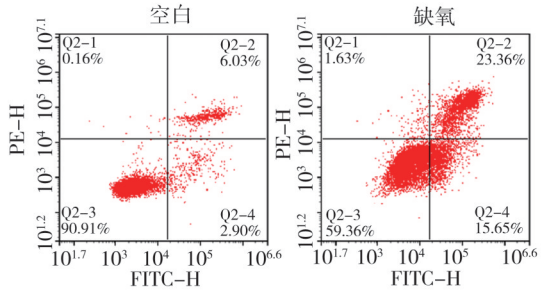
2 结 果

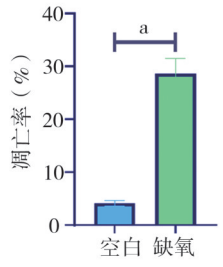
2.1 circTRRAP在缺氧诱导的心肌细胞中表达升高

相较于空白组，缺氧处理的模型组心肌细胞的细胞活力下降（图1A），细胞凋亡率上升（图1B），Bax表达下降、Bax与Cleaved Caspase-3上升（图1C），IL-6与TNF-α水平上升（图1D）、氧化应激因子ROS与MDA水平明显升高（图1E）（P<0.05）。以上结果表明AMI模型造模成功。RT-qPCR检测结果显示缺氧处理的模型组中的circTRRAP的相对表达水平升高（图1F）。RT-qPCR分析显示，circTRRAP对RNase R有抗性（图1G、H）。因此circTRRAP不是线性TRRAP。此外，circTRRAP对放线菌素D不敏感，半衰期超过12 h（图1I）。

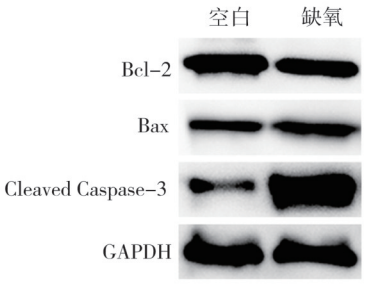


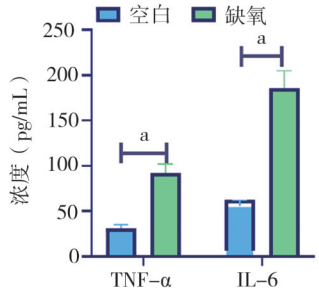
A. MTT法测定检测细胞活力



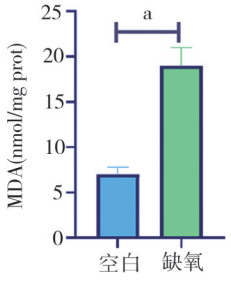


B. 流式细胞术检测细胞凋亡率

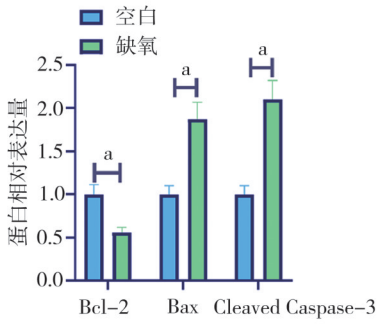




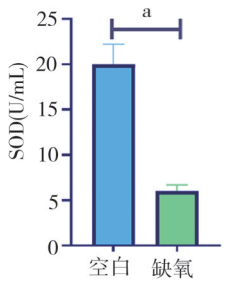
D. ELISA检测不同处理组中IL-6 、TNF-α水平

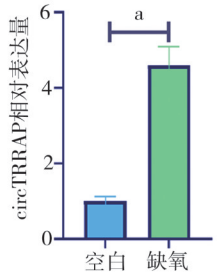


E.不同处理组中ROS与MDA水平

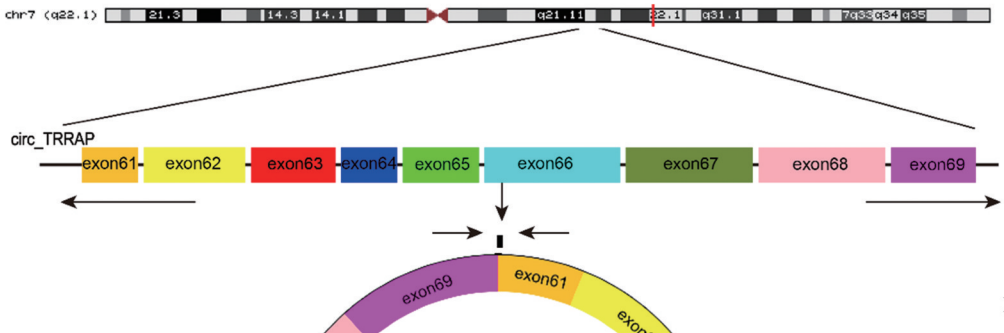


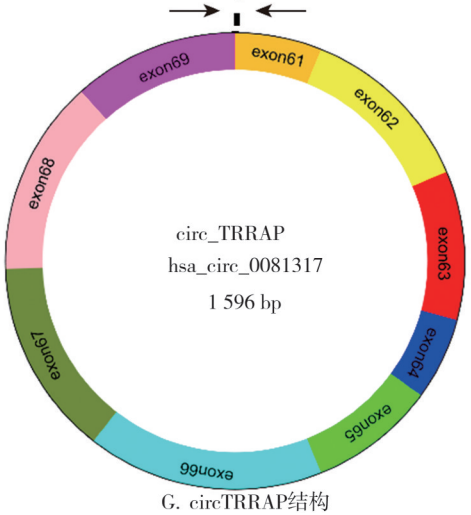
C. Western blot检测Bcl-2、Bax与Cleaved Caspase-3表达水平



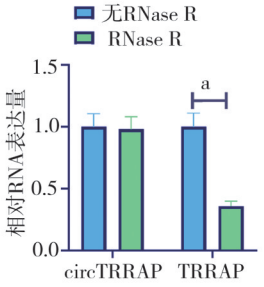


F. 通过RT-qPCR检测在处理组AC16细胞中circTRRAP水平

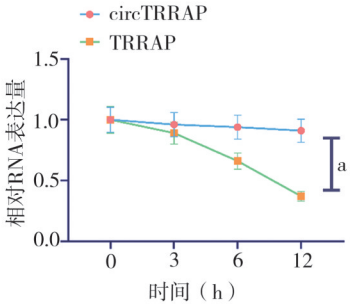




G. circTRRAP结构



H. RT-qPCR检测ActD在不同时间点中circTRRAP含量



I. 通过RT-qPCR检测RNase R处理后circTRRAP和线性TRRAP的基因表达

注：$\bar{x} \pm s$，n=3；a，P<0.05

图1　circTRRAP在缺氧诱导的心肌细胞中表达升高

2.2 沉默 circTRRAP 保护心肌细胞免受缺氧诱导的功能障碍

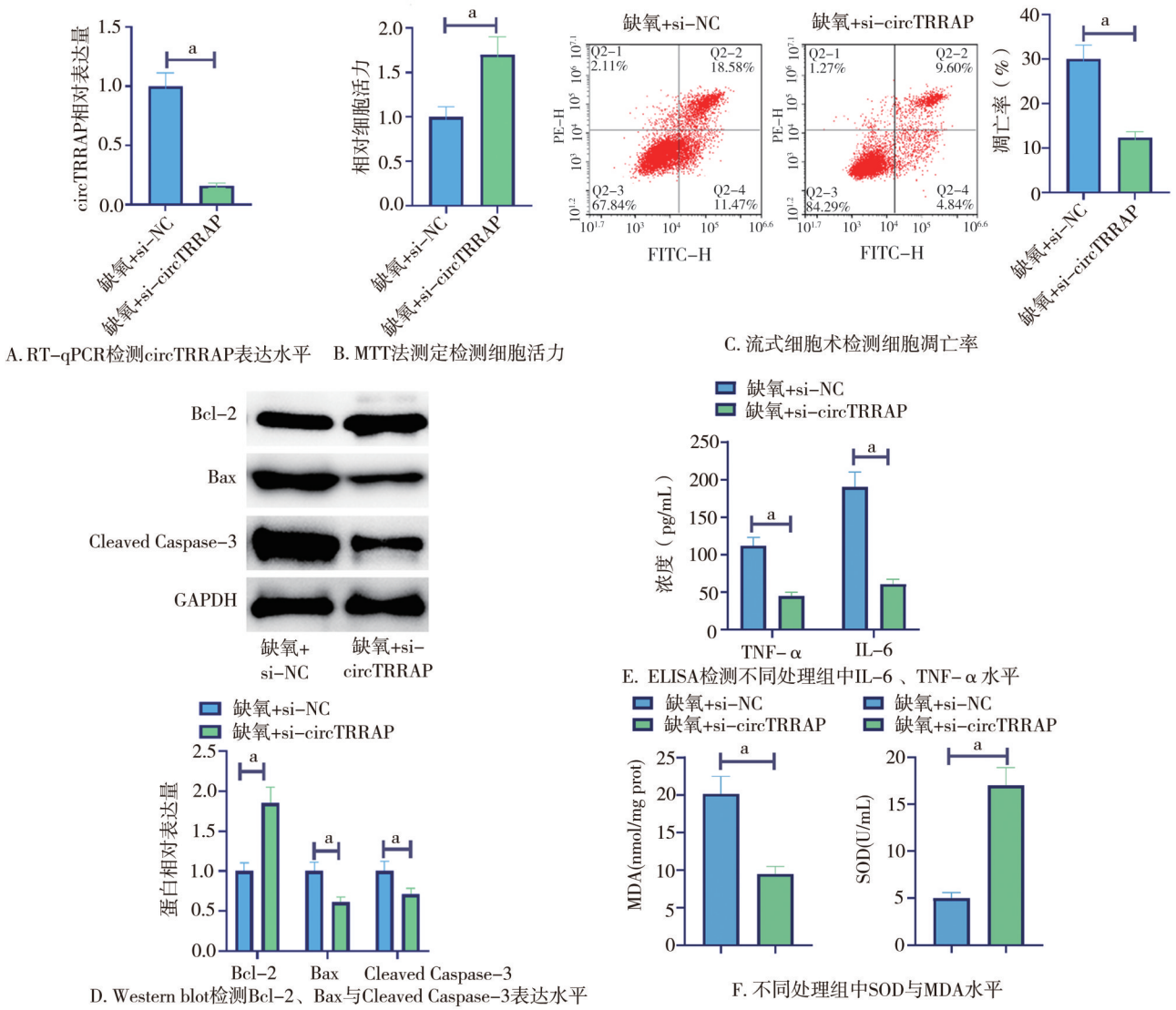
缺氧诱导的 circTRRAP 上调被 si-circTRRAP 减弱，表明 si-circTRRAP 转染效率明显（图 2A）。转染 si-circTRRAP 后，缺氧处理对细胞活力（图 2B）的抑制作用被抵消，还明显减少了缺氧诱导的细胞凋亡（图 2C）。Western blot 检测结果显示，与缺氧+si-NC 组相比，缺氧+si-circTRRAP 组 Bcl-2 表达上调，Cleaved caspase 3 和 Bax 表达下调（图 2D）。此外，si-circTRRAP 抑制缺氧处理引起的 AC16 细胞的炎症损伤（图 2E）。缺氧引起的氧化损伤使细胞内 MDA 水平升高，SOD 水平降低，但在 si-circTRRAP 转染后减轻了这些影响（图 2F）。

2.3 circTRRAP 与心肌细胞中的 miR-323-3p 直接相互作用

CircInteractome 显示了 circTRRAP 和 miR-323-3p 之间的结合位点（图 3A）。RT-qPCR 检测结果显示缺氧处理导致 AC16 细胞中的 miR-323-3p 的表达下降（图 3B）。共转染 miR-323-3p-mimic 和 circTRRAP MUT 时，荧光素酶活性明显下降，而 circTRRAP MUT 组的荧光素酶活性没有差异（图 3C）。同时，circTRRAP 和 miR-323-3p 之间靶向关系在 RNA pull-down 实验得到证实（图 3D）。将 si-circTRRAP 转入缺氧处理的细胞，RT-qPCR 结果显示 miR-323-3p 表达上调（图 3E）。

2.4 缺氧诱导的心肌细胞中沉默 circTRRAP 介导的保护作用被 miR-323-3p 的敲低逆转

转染 miR-323-3p-inhibitor 后，si-circTRRAP 对细胞活力的促进作用明显减弱（图 4A）。miR-323-3p 的敲低逆转了 si-circTRRAP 对细胞凋亡的抑制性调控（图 4B、C）。此外，miR-323-3p 的敲低逆转了 si-circTRRAP 介导的降低炎症细胞因子 IL-6、TNF-α 产生，还抑制氧化应激因子 SOD 的生成，提高 MDA 的水平（图 4D、E）。



A. RT-qPCR检测circTRRAP表达水平　B. MTT法测定检测细胞活力

C. 流式细胞术检测细胞凋亡率

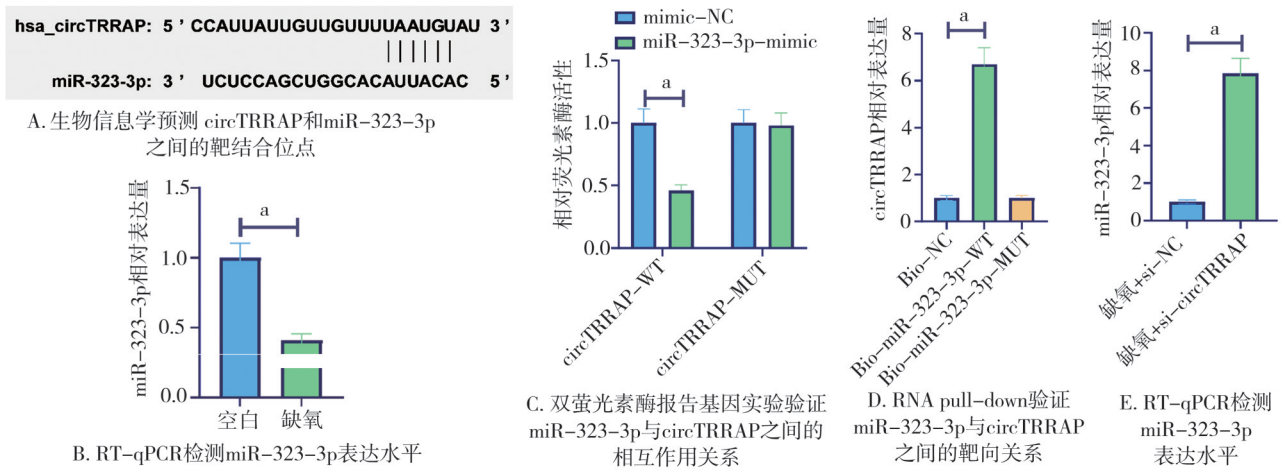
D. Western blot检测Bcl-2、Bax与Cleaved Caspase-3表达水平

E. ELISA检测不同处理组中IL-6 、TNF-α 水平

F. 不同处理组中SOD与MDA水平

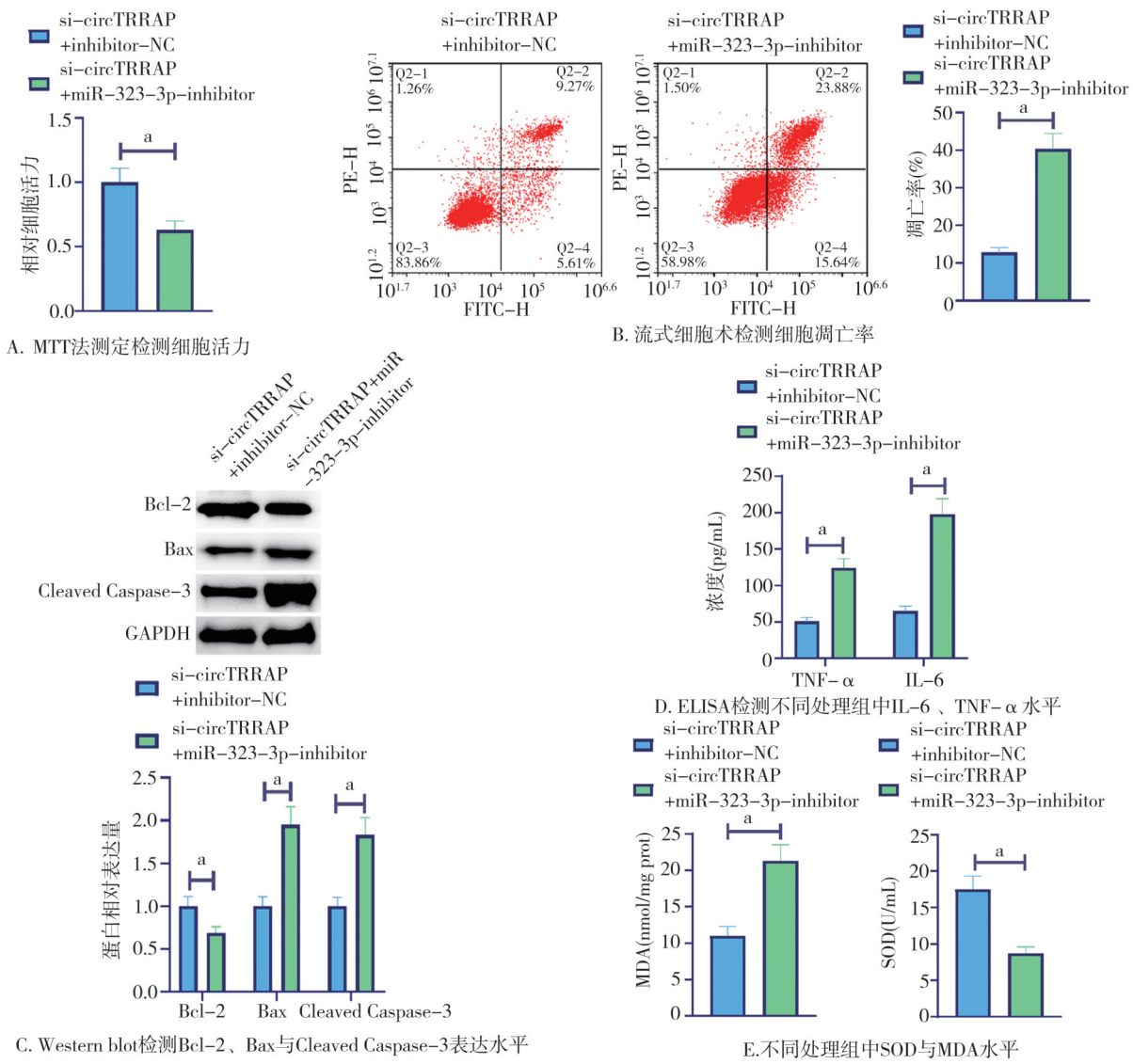
注：$\bar{x} \pm s$，n=3；a，P<0.05

图 2　沉默 circTRRAP 保护心肌细胞免受缺氧诱导的功能障碍



注：$\bar{x} \pm s$，n=3；a，P<0.05

图3　circTRRAP与心肌细胞中的miR-323-3p直接相互作用



注：$\bar{x} \pm s$，n=3；a，P<0.05

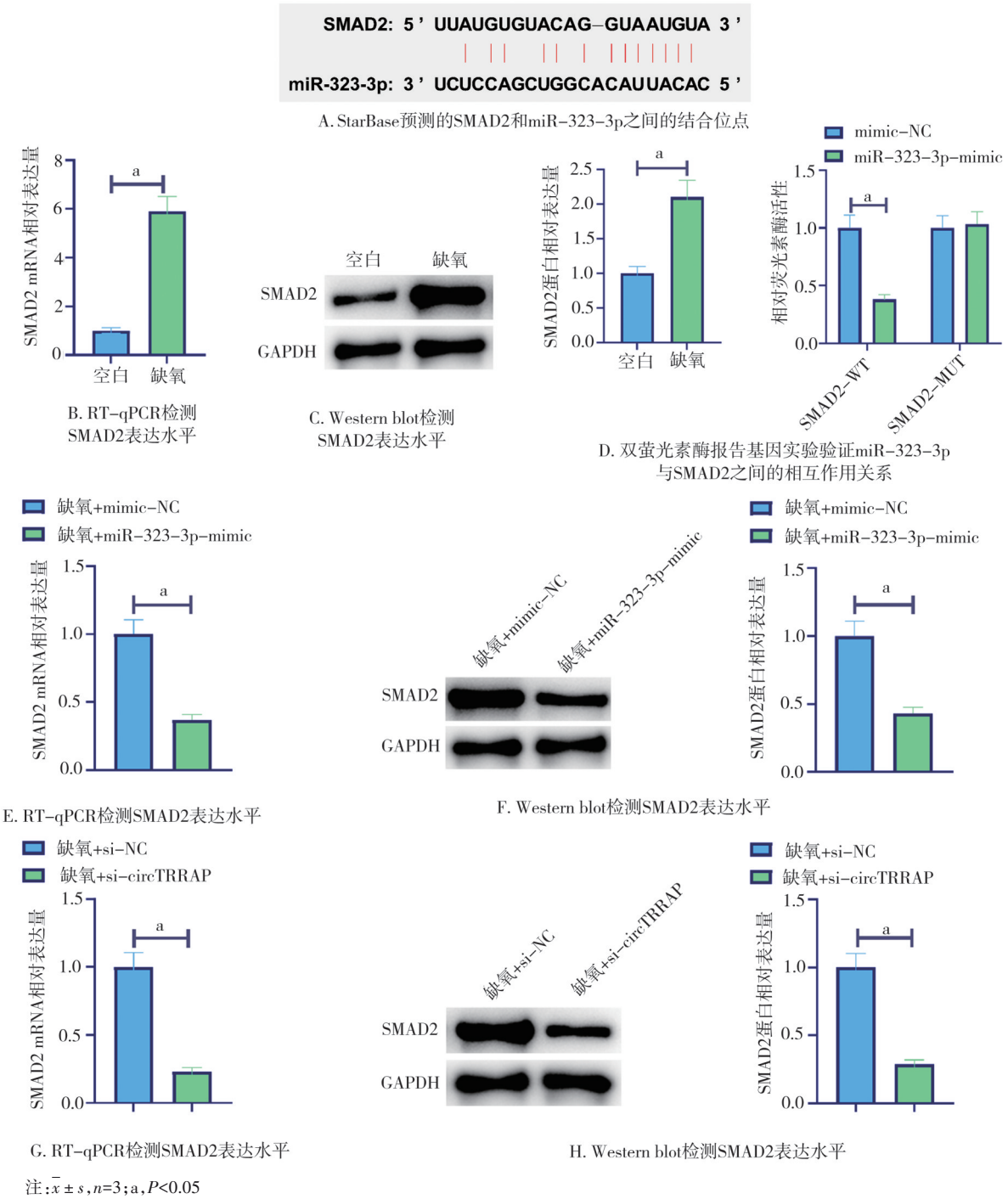
图4　缺氧诱导的心肌细胞中沉默circTRRAP介导的保护作用被miR-323-3p的敲低逆转

2.5 circTRRAP通过靶向miR-323-3p上调SMAD2的表达

SMAD2 3′UTR和miR-323-3p序列之间的互补位点在Starbase中显示（图5A）。与空白组相比，缺氧处理的AC16细胞中SMAD2的表达升高（图5B、C）。miR-323-3p过表达抑制SMAD2 -WT质粒的荧光素酶活性，但对SMAD2-MUT组没有影响（图5D）。MiR-323-3p-mimic明显抑制了SMAD2 mRNA和蛋白表达水平（图5E、F）。RT-qPCR与Western blot结果显示，si-circTRRAP下调了SMAD2的表达（图5G、H）。

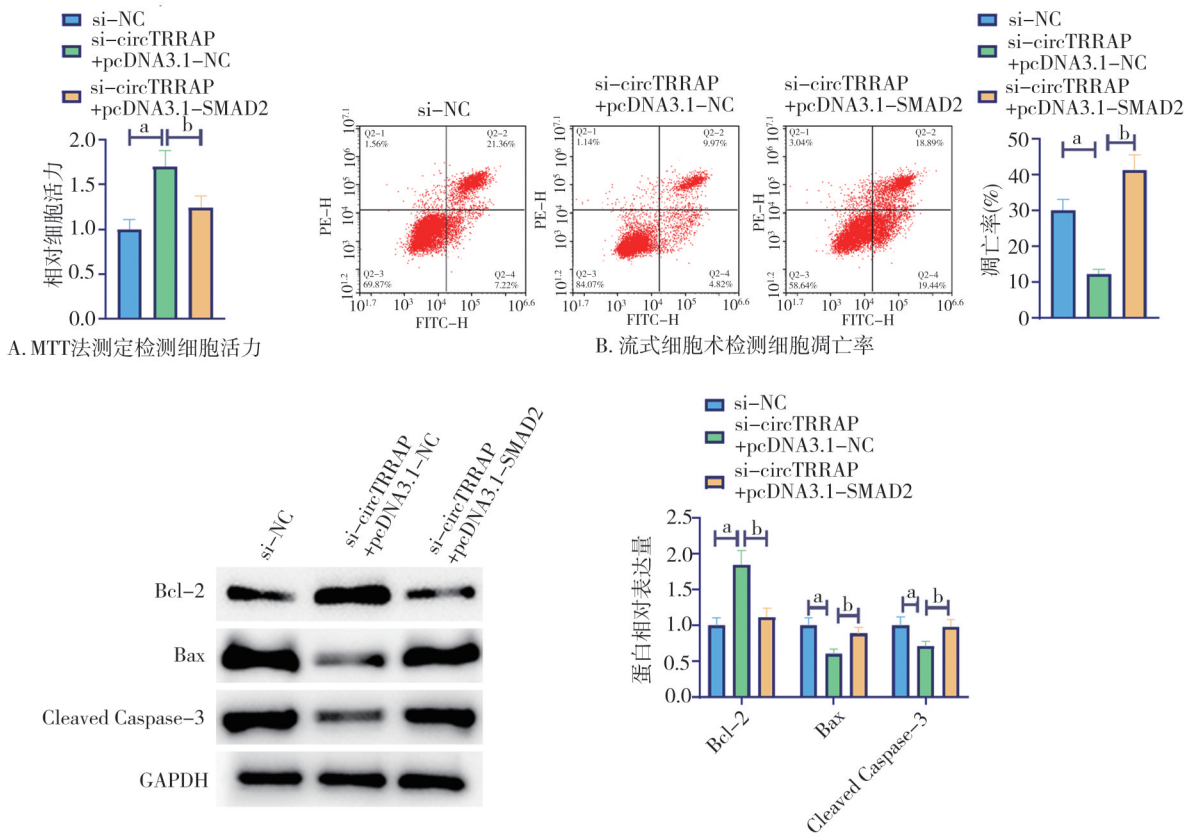
2.6 缺氧诱导心肌细胞中沉默circTRRAP介导的保护作用被SMAD过表达逆转

si-circTRRAP的转染促进了细胞活力，但SMAD2过表达后逆转了该作用（图6A）。流式细胞术和Western blot检测结果表明，SMAD2表达逆转了si-circTRRAP对细胞凋亡率和Cleaved caspase-3、Bax的抑制作用，并降低了Bcl-2的水平（图6B、C）。此外，SMAD2过表达不仅逆转了si-circTRRAP介导的降低IL-6、TNF-α产生，还促进了氧化应激水平（图6D、E）。



注：$\bar{x} \pm s$，n=3；a，P<0.05

图5 circTRRAP通过靶向miR-323-3p上调SMAD2的表达



A. MTT法测定检测细胞活力

B. 流式细胞术检测细胞凋亡率

C.Western blot检测Bcl-2、Bax与Cleaved Caspase-3表达水平

D. ELISA检测不同处理组中IL-6、TNF-α水平

E. 不同处理组中SOD与MDA水平

注：数据表示为$\bar{x} \pm s$（n=3）；a，与si-NC组比较，P<0.05；b，与si-circTRRAP+pcDNA3.1-NC组比较，P<0.05

图6　缺氧诱导心肌细胞中沉默circTRRAP介导的保护作用被SMAD2过表达逆转

3　讨　论

环状RNA可能在心肌梗死治疗中具有潜在的应用价值。环状RNA治疗心肌梗死的原理是通过调节基因表达来促进心肌细胞的再生和修复[21-24]。研究表明，某些环状RNA具有调控细胞增殖、凋亡和分化等生物学过程的能力。通过适当选择和设计环状RNA，可以靶向调控与心肌梗死相关的信号通路和靶点，从而促进心肌细胞的再生和修复[25-26]。

环状RNA转化/转录域相关蛋白（circTRRAP）起源于TRRAP基因。对3例AMI患者进行的circRNA微阵列分析显示与正常对照组相比，circTRRAP在AMI患者血液样本中表达量相对较高[27]。

同样研究显示I/R或缺氧处理会提高circTRRAP的丰度，相反沉默circTRRAP可减轻心肌细胞的损伤[11,28]。本研究通过将AC16细胞在缺氧环境下培养24 h来建立心肌缺氧模型。在缺模型组中，心肌细胞的活力下降，凋亡、氧化应激和炎症反应标志物明显增多。同时缺氧心肌细胞内circTRRAP明显上升，这与先前的研究结果相符合。证实本实验缺氧AMI模型成功，表明circTRRAP可能促进心肌梗死与凋亡。为了探究circTRRAP在缺氧细胞中异常上升的生物学意义，本研究通过si-circTRRAP转染敲低circTRRAP的表达，实验结果表明si-circTRRAP，缓解了缺氧介导的AC16细胞发生的功能障碍，降低心肌细胞的凋亡。circTRRAP的沉默导致心肌细胞暴露于缺氧后增殖的促进。细胞凋亡和炎症是AMI过程的关键病理。当circTRRAP水平降低时，缺氧诱导的炎症反应和氧化应激受到阻碍。这些结果说明缺氧诱导的心肌细胞功能障碍是由circTRRAP的高表达引起的。

为了进一步探究circTRRAP在AMI的作用机制，本课题组专注于circTRRAP在缺氧心肌细胞中功能背后的circRNA/miRNA/mRNA轴。本研究使用生物信息学数据库starBase和CircInteractome预测了circTRRAP的下游miRNA靶基因。miR-323-3p被确认为circTRRAP的下游靶位点之一。值得注意的是，miR-323-3p参与了心肌缺血诱导的细胞氧化应激和细胞凋亡的调控。研究还表明miR-323a-3p是Friedreich共济失调患者心肌病诊断和急性冠脉综合征存在的候选标志物[29-30]。本研究发现circTRRAP对miR-323-3p产生海绵效应，诱导miR-323-3p水平发生负向变化。在缺氧细胞模型中si-circTRRAP介导的保护作用被miR-323-3p的沉默所逆转，这表明circTRRAP通过上调miR-323-3p抑制心肌细胞缺氧诱导的损伤。在这项研究中，SMAD2还通过萤光素酶测定和功能获得性研究被验证为心肌细胞中的新miR-323-3p靶点。因此，可以推测SMAD2在AMI期间circTRRAP介导的心肌细胞凋亡中也起作用。

MiR-323-3p已被证明可抑制SMAD2和SMAD3的表达，从而导致TGF-β信号传导失活。MiR-323-3p/TGF-β信号级联反应是AMI进展进展的重要调节因子[31]。在以往的研究中，SMAD3信号转导在调节心肌梗死后心肌细胞、成纤维细胞和巨噬细胞功能方面发挥重要作用，并在梗死修复中更具优势[32]。相比之下，SMAD2激活在心脏修复中可能具有更微妙和有限的影响。Huang SB等[33]的研究认为肌成纤维细胞特异性SMAD2丢失与梗死后收缩功能的适度和短暂改善有关，而不影响死亡率、瘢痕组织或长期结果。Jiang JJ等[34]的研究中也发现AMI大鼠模型中SMAD2的磷酸化明显增加。为验证推测，共转染si-circTRRAP和pcDNA3.1-SMAD2进一步分析。本研究表明circTRRAP通过海绵化miR-323-3p正向调节AC16细胞中SMAD2的水平，过表达SMAD2明显逆转沉默circTRRAP对AMI心肌细胞的保护作用，进而促进AMI诱导的凋亡、炎症和氧化应激。本研究的结果证实了以往研究对SMAD2的观点，在MI中SMAD2被明显激活，短期内控制SMAD2的表达对MI进展有明显的影响。

目前的研究中存在一些局限性。本研究仅使用一种人心肌细胞系进行体外实验，没有体内关于AMI大鼠或小鼠模型的数据。因此，需要更多的体外研究来支持本研究发现的结果。环状RNA治疗心肌梗死是一个前沿的研究领域，具有很大的潜力，但仍需要更多的科学研究和临床实践来证明其在心肌梗死治疗中的应用前景。然而，目前关于环状RNA治疗心肌梗死的研究还处于早期阶段，尚需进一步的实验室研究和临床试验来验证其安全性和有效性。综上，本研究发现circTRRAP能够通过与miR-323-3p结合来调节SMAD2，下调circTRRAP的表达可以海绵miR-323-3p结合来下调SMAD2，进而减少心肌细胞发生炎症与损伤，为AMI的干预提供了理论依据与靶向治疗提供了新思路。

参 考 文 献

[1] 韦亚忠，薛晓梅，何 斌. 活性氧介导心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 上海交通大学学报（医学版），2021，41（6）：826-829.
Wei YZ，Xue XM，He B. Research progress in myocardial ischemia-reperfusion injury mediated by mitochondrial reactive oxygen species[J]. J Shanghai Jiao Tong Univ Med Sci，2021，41（6）：826-829.

[2] Gong FF，Vaitenas I，Chris Malaisrie S，et al. Mechanical complications of acute myocardial infarction：a review[J]. JAMA Cardiol，2021，6（3）：341-349.

[3] Reed GW，Rossi JE，Cannon CP. Acute myocardial infarction[J]. Lancet，2017，389（10065）：197-210.

[4] 张 磊，张 军. 急性心肌梗死PCI灌注前静脉应用β受体阻滞剂效果的研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志，2023，15（12）：1388-1390.
Zhang L，Zhang J. Research progress in efficacy of intravenous infusion of β-receptor blocker before PCI for acute myocardial infarction[J].

Chin J Evid Based Cardiovasc Med，2023，15(12)：1388-1390.

[5] 杨尚玉. 观察盐酸替罗非班联合心血管介入手术治疗急性心肌梗死疾病的效果[J]. 中国现代药物应用，2024，18(16)：11-14.
Yang SY. Observation on the effect of tirofiban hydrochloride combined with cardiovascular interventional surgery in the treatment of acute myocardial infarction[J]. Chin J Mod Drug Appl，2024，18(16)：11-14.

[6] Panda AC. Circular RNAs act as miRNA sponges[J]. Adv Exp Med Biol，2018，1087：67-79.

[7] Kristensen LS，Ebbesen KK，Sokol M，et al. Spatial expression analyses of the putative oncogene ciRS-7 in cancer reshape the microRNA sponge theory[J]. Nat Commun，2020，11(1)：4551.

[8] Ren K，Li BY，Jiang LQ，et al. circ_0023461 silencing protects cardiomyocytes from hypoxia-induced dysfunction through targeting miR-370-3p/PDE4D signaling[J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：8379962.

[9] Zhao B，Li GP，Peng JJ，et al. CircMACF1 attenuates acute myocardial infarction through miR-500b-5p-EMP1 axis[J]. J Cardiovasc Transl Res，2021，14(1)：161-172.

[10] Wang DM，Tian LM，Wang Y，et al. Circ_0001206 regulates miR-665/CRKL axis to alleviate hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury in myocardial infarction[J]. ESC Heart Fail，2022，9(2)：998-1007.

[11] Zhang Y，Li ZG，Wang J，et al. CircTRRAP knockdown has cardioprotective function in cardiomyocytes *via* the signal regulation of miR-370-3p/PAWR axis[J]. Cardiovasc Ther，2022，2022：7125602.

[12] Gebert LFR，MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals[J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2019，20(1)：21-37.

[13] Vishnoi A，Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases：an overview[J]. Methods Mol Biol，2017，1509：1-10.

[14] Çakmak HA，Demir M. MicroRNA and cardiovascular diseases[J]. Balkan Med J，2020，37(2)：60-71.

[15] Wojciechowska A，Braniewska A，Kozar-Kamińska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease[J]. Adv Clin Exp Med，2017，26(5)：865-874.

[16] Zhou SS，Jin JP，Wang JQ，et al. miRNAS in cardiovascular diseases：potential biomarkers，therapeutic targets and challenges[J]. Acta Pharmacol Sin，2018，39(7)：1073-1084.

[17] Huang ZQ，Wu SJ，Kong FQ，et al. MicroRNA-21 protects against cardiac hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive autophagy in H9c2 cells *via* the Akt/mTOR pathway[J]. J Cell Mol Med，2017，21(3)：467-474.

[18] Fang J，Song XW，Tian J，et al. Overexpression of microRNA-378 attenuates ischemia-induced apoptosis by inhibiting caspase-3 expression in cardiac myocytes[J]. Apoptosis，2012，17(4)：410-423.

[19] Diener C，Keller A，Meese E. The miRNA - target interactions：An underestimated intricacy[J]. Nucleic Acids Research，2024，52(4)：1544-1557.

[20] Li Z，Xu H，Liu X，et al. GDF11 inhibits cardiomyocyte pyroptosis and exerts cardioprotection in acute myocardial infarction mice by upregulation of transcription factor HOXA3[J]. Cell Death Dis，2020，11(10)：917.

[21] Caño-Carrillo S，Lozano-Velasco E，Castillo-Casas JM，et al. The role of ncRNAs in cardiac infarction and regeneration[J]. J Cardiovasc Dev Dis，2023，10(3)：123.

[22] Abbas N，Perbellini F，Thum T. Non-coding RNAs：emerging players in cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration[J]. Basic Res Cardiol，2020，115(5)：52.

[23] Yuan T，Krishnan J. Non-coding RNAs in cardiac regeneration[J]. Front Physiol，2021，12：650566.

[24] 胡林慧，潘 静，程 浩，等. 肝细胞癌中YARS1的表达及其对预后的影响[J]. Chin J Hepatol，2025，33(2)：151-158.
Hu LH，Pan J，Cheng H，et al. Expression of YARS1 in hepatocellular carcinoma and its impact on prognosis [J]. Chin J Hepatol，2025，33(2)：151-158.

[25] Dong XX，Dong XY，Gao F，et al. Non-coding RNAs in cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration：Dissecting their therapeutic values[J]. J Cell Mol Med，2021，25(5)：2315-2332.

[26] Braga L，Ali H，Secco I，et al. Non-coding RNA therapeutics for cardiac regeneration[J]. Cardiovasc Res，2021，117(3)：674-693.

[27] Yin LL，Tang YH，Jiang MH. Research on the circular RNA bioinformatics in patients with acute myocardial infarction[J]. J Clin Lab Anal，2021，35(2)：e23621.

[28] Liu JY，Dong WJ，Gao CM，et al. Salvianolic acid B protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury by mediating circTRRAP/miR-214-3p/SOX6 axis[J]. Int Heart J，2022，63(6)：1176-1186.

[29] Seco-Cervera M，González-Rodríguez D，Ibáñez-Cabellos JS，et al. Circulating miR-323-3p is a biomarker for cardiomyopathy and an indicator of phenotypic variability in Friedreich's *Ataxia* patients[J]. Sci Rep，2017，7(1)：5237.

[30] Pilbrow AP，Cordeddu L，Cameron VA，et al. Circulating miR-323-3p and miR-652：candidate markers for the presence and progression of acute coronary syndromes[J]. Int J Cardiol，2014，176(2)：375-385.

[31] Zhang JC，Lang Y，Guo LH，et al. MicroRNA-323a-3p promotes pressure overload-induced cardiac fibrosis by targeting TIMP3[J]. Cell Physiol Biochem，2018，50(6)：2176-2187.

[32] Hanna A，Frangogiannis NG. The role of the TGF-β superfamily in myocardial infarction[J]. Front Cardiovasc Med，2019，6：140.

[33] Huang SB，Chen BJ，Su Y，et al. Distinct roles of myofibroblast-specific Smad2 and Smad3 signaling in repair and remodeling of the infarcted heart[J]. J Mol Cell Cardiol，2019，132：84-97.

[34] Jiang JJ，Gu XP，Wang HF，et al. Resveratrol improves cardiac function and left ventricular fibrosis after myocardial infarction in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activity and the TGF-β1/SMAD2 signaling pathway[J]. PeerJ，2021，9：e11501.

（责任编辑：曾 玲）

本文引用格式：
熊 雁，唐艺加. circTRRAP敲低通过调节miR-323-3p/SMAD2轴在急性心肌梗死中的研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(4)：547-556.