

基于转录组测序的蓖麻毒素诱导巨噬细胞焦亡中氧化应激相关基因及环状RNA表达谱分析

卢楠¹, 董明鑫², 于磊¹, 孙成彪², 王燕³, 许娜^{1,4}, 刘文森^{1,2}, 葛淑敏¹

(1. 长春理工大学生命科学技术学院生物检测与材料团队实验室, 吉林 长春 130012; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所病原微生物生物安全全国重点实验室 吉林省人兽共患病预防控制重点实验室, 吉林 长春 130122; 3. 吉林大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室, 吉林 长春 130021; 4. 吉林医药学院, 吉林 吉林 132000)

[摘要] **目的:** 利用转录组测序及生物信息学技术, 分析鉴定蓖麻毒素(RT)诱导小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)焦亡中与氧化应激相关的基因和环状RNA(circRNA)表达谱, 并初步分析其潜在功能。**方法:** 使用RT处理单核巨噬细胞(RAW264.7细胞)构建细胞焦亡模型, 分为对照组、 $40\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT组和 $80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT组。采用透射电镜观察各组RAW264.7细胞形态表现, Western blotting法检测各组细胞中细胞焦亡通路中蛋白表达水平, 选择 $80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT进行后续实验, 利用转录组测序技术(RNA-Seq)获得对照组和RT组RAW264.7细胞中circRNA表达谱及mRNA表达谱, 并进行生物信息学分析。**结果:** 与对照组比较, 40 和 $80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT组细胞均发生形态改变, 细胞呈现出明显焦亡样形态改变, 表现为濒死细胞出现明显肿胀, 质膜上出现特征性的大气泡。与对照组比较, 40 和 $80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT组中消皮素DN端结构域(GSDMD-N)蛋白表达水平升高($P<0.05$), 与 $40\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT组比较, $80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT组细胞中GSDMD-N蛋白表达水平升高($P<0.05$), 故后续实验RT浓度选取 $80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。共鉴定出差异表达信使RNA(mRNA)2930个, 差异表达circRNA24个。构建的circRNA-微小RNA(miRNA)-mRNA竞争性内源RNA(ceRNA)调控网络由7个circRNAs、12个miRNA和13个mRNA组成。基因本体论(GO)功能富集分析, 在生物过程(BP)中差异表达基因所调节的功能主要有免疫反应和氧化应激反应等; 在细胞组分(CC)中差异表达基因主要定位于质膜外侧和细胞前缘; 在分子功能(MF)中主要参与转运体跨膜活性和激素受体结合等。京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析, 差异表达基因主要富集于Toll样受体信号通路、叉头框蛋白O(FoxO)信号通路和核因子 κB (NF- κB)信号通路。蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络, 通过CytoHubba筛选出基质金属蛋白酶9(MMP9)、超氧化物歧化酶2(SOD2)和鸡肉瘤病毒基因(Src)等前10位连接度最高的Hub基因。**结论:** RT处理后RAW264.7细胞中氧化应激相关基因和circRNA表达谱发生变化, 筛选得到的差异表达circRNA和mRNA可能作为潜在靶点通过氧化应激途径调控RT诱导的RAW264.7细胞焦亡。

[关键词] 蓖麻毒素; 细胞焦亡; 氧化应激; 环状RNA; 竞争性内源RNA

[中图分类号] R392.1 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-08-19 **[录用日期]** 2024-10-24

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(20240303082NC)

[作者简介] 卢楠(2000—), 男, 浙江省绍兴市人, 在读硕士研究生, 主要从事生物毒素机制方面的研究。

[通信作者] 葛淑敏, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: geshumin2013@163.com);

刘文森, 研究员, 硕士研究生导师(E-mail: liuws85952@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Transcriptome sequencing-based expression profiling of oxidative stress-related genes and circRNAs in ricin toxin-induced macrophage pyroptosis

LU Nan^{1,2}, DONG Mingxin¹, YU Lei², SUN Chengbiao¹, WANG Yan², XU Na³, LIU Wensen^{1,4},
GE Shumin^{1,2}

(1. Laboratory of Biological Testing and Materials Team, School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130012, China; 2. National Key Laboratory of Pathogenic Microorganism Biosafety, Jilin Key Laboratory of Prevention and Control of Veterinary and Human Diseases, Changchun Institute of Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130122, China; 3. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Jilin University, Changchun Jilin, 130021; 4. Jilin Medical College, Jilin 132000, China)

ABSTRACT Objective: To analyze and identify the expression profiles of oxidative stress-related genes and circular RNAs (circRNAs) in ricin toxin (RT)-induced pyroptosis of mouse mononuclear macrophages (RAW264.7) using transcriptome sequencing and bioinformatics technology, and to preliminarily analyze their potential functions. **Methods:** The macrophages (RAW264.7 cells) were treated with RT to establish a cell pyroptosis model and divided into control group, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT group, and 80 ng/mL RT group. Transmission electron microscope (TEM) was used to observe the morphology of the RAW264.7 cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of the pyroptosis pathway-related proteins in the cells in various groups; 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT was selected for subsequent experiments. Transcriptome sequencing (RNA-Seq) was performed to obtain the circRNA and mRNA expression profiles in the RAW264.7 cells in control group and RT-treated group, followed by bioinformatics analysis. **Results:** Compared with control group, the cells in 40 and 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT groups underwent morphological changes; the cells in RT groups showed obvious pyroptosis-like morphological changes, characterized by significant swelling of dying cells and the appearance of characteristic large bubbles on the plasma membrane. Compared with control group, the expression level of gasdermin DN-terminal fragment (GSDMD-N) protein in 40 and 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT groups was increased ($P<0.05$); compared with 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT group, the expression level of GSDMD-N protein in the cells in 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT group was increased ($P<0.05$); therefore, the subsequent experiments used the RT concentration of 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A total of 2930 differentially expressed messenger RNAs (mRNAs) and 24 differentially expressed circRNAs were identified. The constructed circRNA-microRNA (miRNA)-mRNA competing endogenous RNA (ceRNA) regulatory network consisted of 7 circRNAs, 12 miRNAs and 13 mRNAs. Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis showed that in biological process (BP), the functions regulated by differentially expressed genes mainly included immune response and oxidative stress response; in cellular component (CC), differentially expressed genes were mainly localized to the external side of plasma membrane and cell leading edge; in molecular function (MF), they were mainly involved in transporter transmembrane activity and hormone receptor binding. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis showed that differentially expressed genes were mainly enriched in Toll-like receptor signaling pathway, Forkhead box O (FoxO) signaling pathway and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signaling pathway. In the protein-protein interaction (PPI) network, the top 10 hub genes with the highest connectivity were screened by CytoHubba, including matrix metalloproteinase 9 (MMP9), superoxide dismutase 2 (SOD2), and v-src sarcoma viral

oncogene homolog (*Src*). **Conclusion:** The expression profiles of oxidative stress-related genes and circRNAs in RAW264.7 cells are altered after RT treatment. The screened differentially expressed circRNAs and mRNAs may serve as potential targets to regulate RT-induced pyroptosis in RAW264.7 cells through oxidative stress pathways.

KEYWORDS Ricin toxin; Pyroptosis; Oxidative stress; Circular RNA; Competing endogenous RNA

细胞焦亡是一种由 gasdermin 蛋白家族介导的促炎性细胞死亡方式。研究^[1-2]显示:氧化应激状态与细胞焦亡的发生密切相关,氧化应激是机体内氧化剂产生和抗氧化之间的失衡状态,最终导致细胞功能障碍和组织损伤。氧化应激可以通过多种途径诱导细胞焦亡。近年来,转录组测序技术为研究人员揭示各种生物学过程提供了有力工具,一些环状 RNA (circRNA, circRNA) 在细胞焦亡过程中发挥重要作用。circRNA 主要作为分子海绵,通过结合微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与多种细胞信号通路,发挥生物调节作用。circRNA 与细胞焦亡的发生发展密切相关。ZHANG 等^[3]发现:环状 RNA NEIL3/微小 RNA-1184/PIF1 解旋酶信号轴通过诱导 DNA 损伤并触发 AIM2 炎性小体激活途径细胞焦亡,LI 等^[4]揭示 circBbs9 通过海绵 miR-30e-5p 在 PM2.5 诱导核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体激活和细胞炎症反应中发挥促炎作用。由于氧化应激机制与 circRNA 参与调控的机制复杂, circRNA 在细胞焦亡中的表达水平和参与焦亡发展进程的分子机制仍需进一步探讨。蓖麻毒素 (ricin toxin, RT) 是一种剧毒植物毒素,属于 II 型核糖体失活蛋白^[5],已有研究^[6]显示:RT 的细胞毒性与内源性细胞凋亡有关。RT 对 28S rRNA 的脱嘌呤作用能够激活细胞蛋白激酶途径 (stress-activated protein kinase pathways, SAPKs), 导致大量炎症因子和趋化因子的分泌,引起的过度炎症反应可使机体损伤进一步加剧^[7]。目前关于 RT 与细胞焦亡的研究较少,且主要集中在机体损伤和引发炎症反应等方面,尚未检索到基于 circRNA 水平探讨 RT 诱导细胞焦亡的研究。本课题组前期研究^[8]显示:RT 可诱导巨噬细胞产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 进而介导细胞焦亡,细胞焦亡程度受 ROS 水平调控,提示氧化应激可能是 RT 诱导细胞焦亡的重要环节。因此,寻找参与该过程的关键生物标志物,具有进一步研究的价值。本研究采用转录组测序技术,筛选 RT 诱导小鼠单

核巨噬细胞 RAW264.7 细胞焦亡中差异表达 circRNA 和信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 构建氧化应激相关的竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 网络,并探讨其生物学功能及相关通路,为 RT 中毒的预防和救治寻找潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 RAW264.7 细胞和蓖麻毒素由中国农业科学院长春兽医研究所惠赠。RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购自美国 Gibco 公司,青-链霉素混合液 (北京索莱宝公司), BCA 法蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,鼠抗 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (美国 Proteintech 公司),鼠抗消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), mirVanaTM miRNA 分离试剂盒和增强型化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司), RNA Nano 6000 试剂盒 (上海优宁维生物科技股份有限公司)。垂直电泳槽 (型号: 1658004, 美国 Bio-Rad 公司), 转膜仪 (型号: Power Blotter, 美国 Thermo Fisher 公司), 高端凝胶成像系统 (美国 Alpha Innotech 公司), 透射电镜 (型号: HT7800, 日本日立公司), NanoVue Plus 紫外分光光度计 (美国通用电气公司), Illumina 测序仪 (型号: HiSeq 2500, 美国 Illumina 公司)。

1.2 细胞培养和焦亡模型建立 37℃ 水浴中复苏 RAW264.7 细胞,使用 10% FBS RPMI 1640 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞汇合度为 80%~90% 时进行分组,分为对照组和不同浓度 RT 组,不同浓度 RT 组使用 RT (40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 4 h 建立细胞焦亡模型,并在电镜下观察细胞形态表现。

1.3 Western blotting 法检测各组细胞中细胞焦亡蛋白表达水平 将细胞按 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔细胞培养板 (每孔 2 mL), 将细胞分为对照

组、40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT 组和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT 组,加药处理 4 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下磷酸盐缓冲液(phosphated buffer saline, PBS)洗涤 2 次,加入放射免疫沉淀分析(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)缓冲液(每孔 100 μL)和苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)(每孔 1 μL)冰上裂解 30 min 后收集,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 后取上清,BCA 法蛋白进行浓度定量,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 使蛋白变性,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)及转膜。使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST 溶液洗涤聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜 5 次,二抗室温孵育 1 h, PBST 溶液洗涤 3 次后进行 ECL 显影。抗体溶液使用 PBST 溶液稀释, GSDMD 1:1 000, β -actin 1:5 000。以 β -actin 作为内参蛋白,采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。相对丰度=(目标蛋白灰度值-背景灰度值)/(内参蛋白灰度值-背景灰度值)。

1.4 总 RNA 提取和转录组测序 采用 mirVanaTM miRNA 分离试剂盒提取各组细胞总 RNA。NanoVue Plus 紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度;RNA Nano 6000 试剂盒评估 RNA 的完整性, RNA 完整性数 ≥ 7 的样本用于后续分析。根据试剂盒说明书使用 TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold 构建文库,构建好的 RNA 文库用 Agilent 2100 生物分析仪质检合格后,采用 Illumina 测序仪进行测序。转录组测序由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

1.5 生物信息学分析 利用 DESeq 软件对各组样本 circRNA 和 mRNA 数目进行标准化处理(采用 BaseMean 值来估算表达量),计算差异倍数(fold change, FC),并采用负二项分布检验的方式对 reads 数进行差异显著性检验,根据 $|\log_2\text{FC}|>1$ 及差异显著性检验结果($P<0.05$)来筛选差异表达 circRNA 和 mRNA。将 3 个数据库 circBase、CIRCpedia v2 和 circAtlas 进行整合,使用 CIRI2 软件预测 circRNA,对预测得到的 circRNA 与数据库进行比较和注释,查找目标 circRNA 信息。基于数据库中的注释信息,预测 circRNA 序列。利用 miRanda 软件预测 circRNA-miRNA 相互作用。在基因本体论(Gene Ontology, GO)数据库中搜索“氧化应激(Oxidative Stress)”([\[geneontology.org/\]\(http://geneontology.org/\)\),并以“mus”为筛选条件,进一步筛选出氧化应激相关 mRNA。基于 TargetScan、miRTarBase 和 miRDB 数据库进行 miRNA-mRNA 相互作用预测。预测得到的 mRNA 与测序数据中差异表达 mRNA 经过筛选后,重叠的 mRNA 被认为是氧化应激相关的候选 mRNA。将预测得到的 circRNA-miRNA 相互作用对和 miRNA-mRNA 相互作用对进行整合,构建 circRNA-miRNA-mRNA 相互作用网络。使用 Cytoscape 软件绘制 circRNA-miRNA-mRNA 相互作用网络。对上述 ceRNA 网络中的 circRNA、mRNA 进行 GO 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书\(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG\)信号通路富集分析,利用 R 软件中的 limma 软件包,以 \$|\log_2\text{FC}|>1\$ 和 \$P<0.05\$ 为阈值进行 GO 功能富集分析及 KEGG 信号通路富集分析并将结果可视化。基于已鉴定的差异表达 mRNA,使用 STRING 数据库构建蛋白-蛋白相互作用\(protein-protein interaction, PPI\)网络。使用 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络,并通过 Cytohubba 应用程序从 PPI 网络中筛选 hub 基因模块。](http://</p></div><div data-bbox=)

1.6 统计学分析 采用 R 语言软件(版本号:4.3.1,网址:www.r-project.org/)和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。各组 RAW264.7 细胞中未经切割的 GSDMD 蛋白全长消皮素 D(gasdermin D full-length, GSDMD-FL)和消皮素 D N 端结构域(gasdermin D N-terminal fragment, GSDMD-N)蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 RAW264.7 细胞形态表现 与对照组比较,40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT 组细胞均发生形态改变,细胞呈现出明显焦亡样形态改变,表现为濒死细胞出现明显肿胀,质膜上出现特征性的大气泡。见图 1。

2.2 各组 RAW264.7 细胞中细胞焦亡蛋白表达水平 与对照组比较,40 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT 组中 GSDMD-N 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT 组比较,80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RT 组细胞中 GSDMD-N 蛋白表达水平升高($P<0.05$),故后续实验 RT 浓度选取 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见图 2。

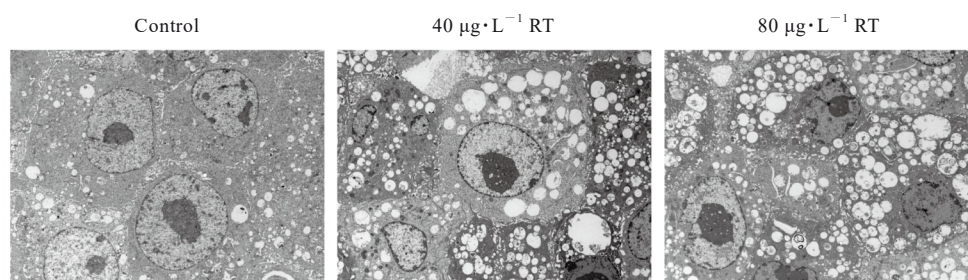
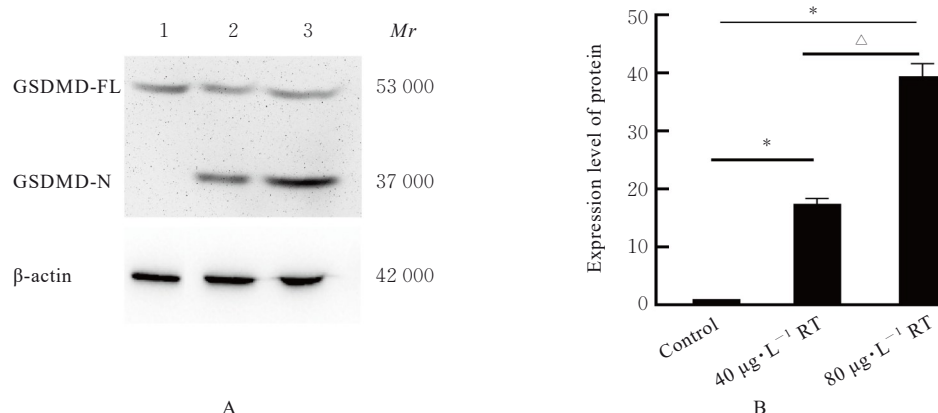


图1 透射电镜观察各组RAW264.7细胞形态表现(Bar=5 μm)

Fig. 1 Morphology of RAW264.7 cells in various groups observed by transmission electron microscope(Bar=5 μm)



A: Electrophoretogram (Lane 1: Control group; Lane 2: 40 μg·L⁻¹ RT group; Lane 3: 80 μg·L⁻¹ RT group); B: Histogram (**P* < 0.001 vs control group; Δ*P* < 0.001 vs 40 μg·L⁻¹ RT group).

图2 各组RAW264.7细胞中GSDMD蛋白表达

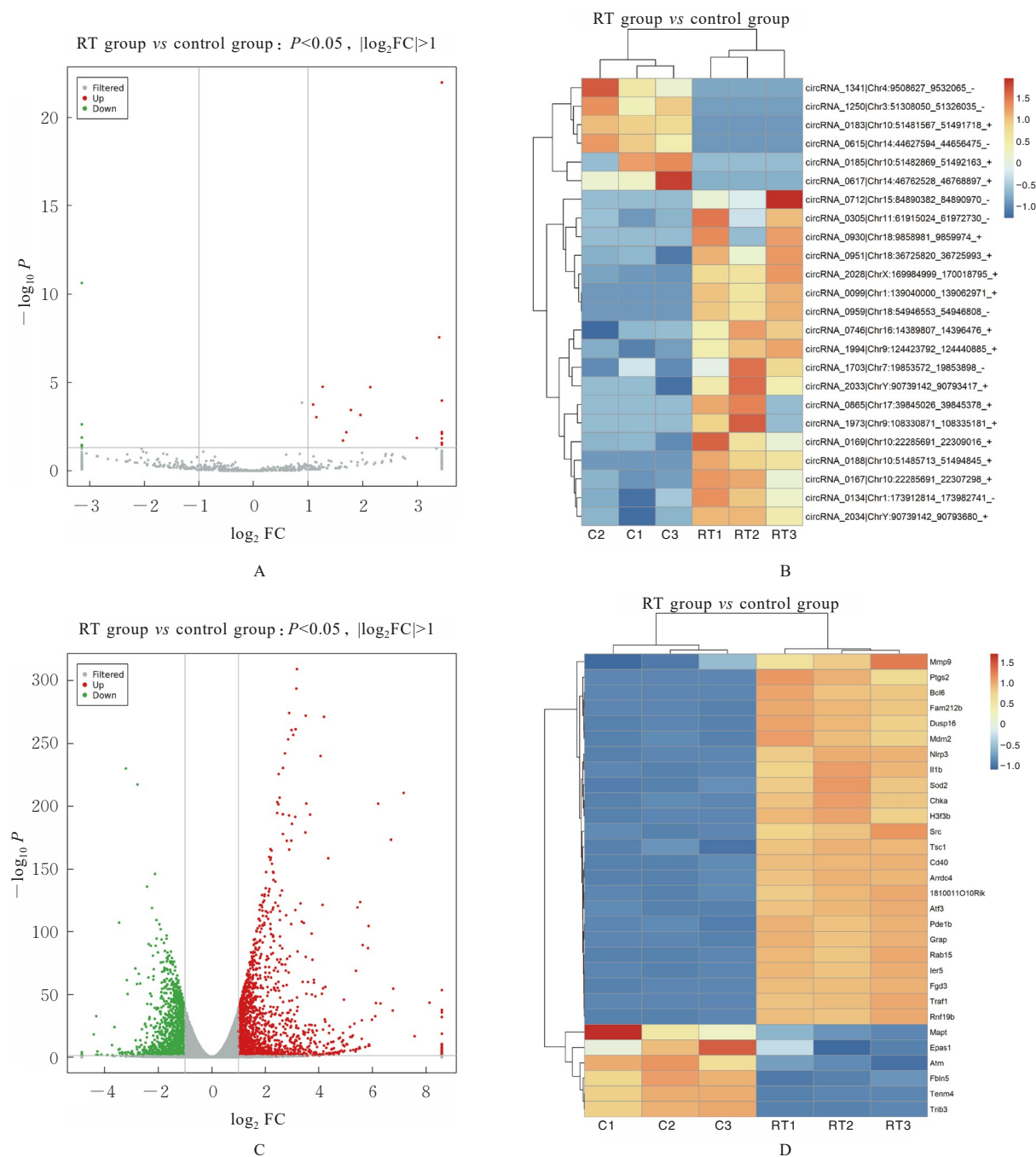
Fig. 2 Expression level of GSDMD protein in RAW264.7 cells in various groups

2.3 差异 circRNA 和 mRNA 表达谱 对 RT 组和对照组 RAW264.7 细胞中 circRNA 和 mRNA 进行差异表达分析, 共得到差异表达 circRNA 24 个。其中 18 个 circRNA 表达上调, 6 个 circRNA 表达下调; 差异表达 mRNA 2 930 个, 其中 1 714 个 mRNA 表达上调, 1 216 个 mRNA 表达下调。进一步根据差异表达情况绘制火山图 (图 3A 和 3C) 和聚类热图 (图 3B 和 3D)。

2.4 CeRNA 网络构建 利用 miRanda 软件进行 circRNA-miRNA 相互作用预测, 基于 3 个网络数据库 (miRDB、miRTarBase 和 TargetScan) 鉴定了 83 个 miRNA 靶向结合的 mRNA, 将其与从氧化应激数据库中检索到的 mRNA 以及测序得到的差异表达 mRNA 进行交叉验证, 共筛选得到 13 个 mRNA (图 4A)。将预测得到的 circRNA-miRNA 相互作用对和 miRNA-mRNA 相互作用对进行整合, 构建了一个基于 RT 诱导 RAW264.7 细胞焦亡的 ceRNA 网络 (包括 7 个 circRNA 节点、12 个 miRNA 节点和 13 个 mRNA 节点) (图 4B)。

2.5 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析 对差异表达 circRNA 的亲本基因和 mRNA 进行 GO 功能富集分析, 结果显示: 差异表达 circRNA 主要参与各种免疫过程, 包括细胞对生物刺激的反应、模式识别受体活性和 2 型免疫反应等 (图 5); mRNA 富集程度最高的为氧化应激反应、细胞对化学应激的反应和对活性氧的反应等 (图 6)。KEGG 信号通路富集分析结果显示: 差异表达 circRNA 主要参与脂质和动脉粥样硬化、鞘脂信号通路和百日咳等组织系统及人类疾病的相关通路 (图 7A 和 7B)。差异表达 mRNA 富集的通路包括叉头框蛋白 O (Forkhead box O, FoxO) 信号通路、核因子 κB (nuclear factor kappa-B, NF-κB) 信号通路和长寿调节途径等 (图 7C 和 7D)。

2.6 PPI 网络构建与核心基因筛选 通过 STRING 网站分析, 最终得到包含 13 个节点和 12 条边的 PPI 网络 (图 8A)。使用 Cytohubba 插件分析整个核心网络, 根据马修斯相关系数 (Matthews correlation coefficient, MCC) 算法筛选出 top 8 基



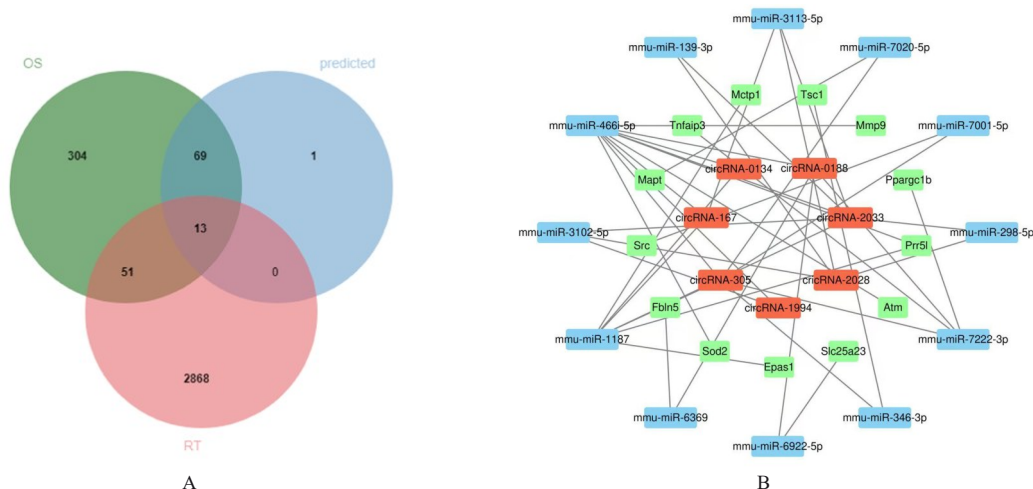
A: Volcano plot of circRNA; B: Heat maps of circRNA; C: Volcano plot of mRNA; D: Heat maps of mRNA.

图3 差异表达 circRNA 和 mRNA 分析火山图及聚类热图

Fig. 3 Volcano plots and heat maps of differentially expressed circRNA and mRNA

因并构建相互作用网络,得到结节性硬化症复合物1 (tuberous sclerosis complex 1, *Tsc1*)、超氧化物歧化酶2 (superoxide dismutase 2, *Sod2*)、肉瘤癌基因 (sarcoma rous cancer gene, *Src*)、基质金属蛋白酶9 (matrix metalloproteinase 9, *Mmp9*)、共济失调毛细血管扩张突变基因 (ataxia telangiectasia mutated, *Atm*)、纤维蛋白5 (fibulin 5,

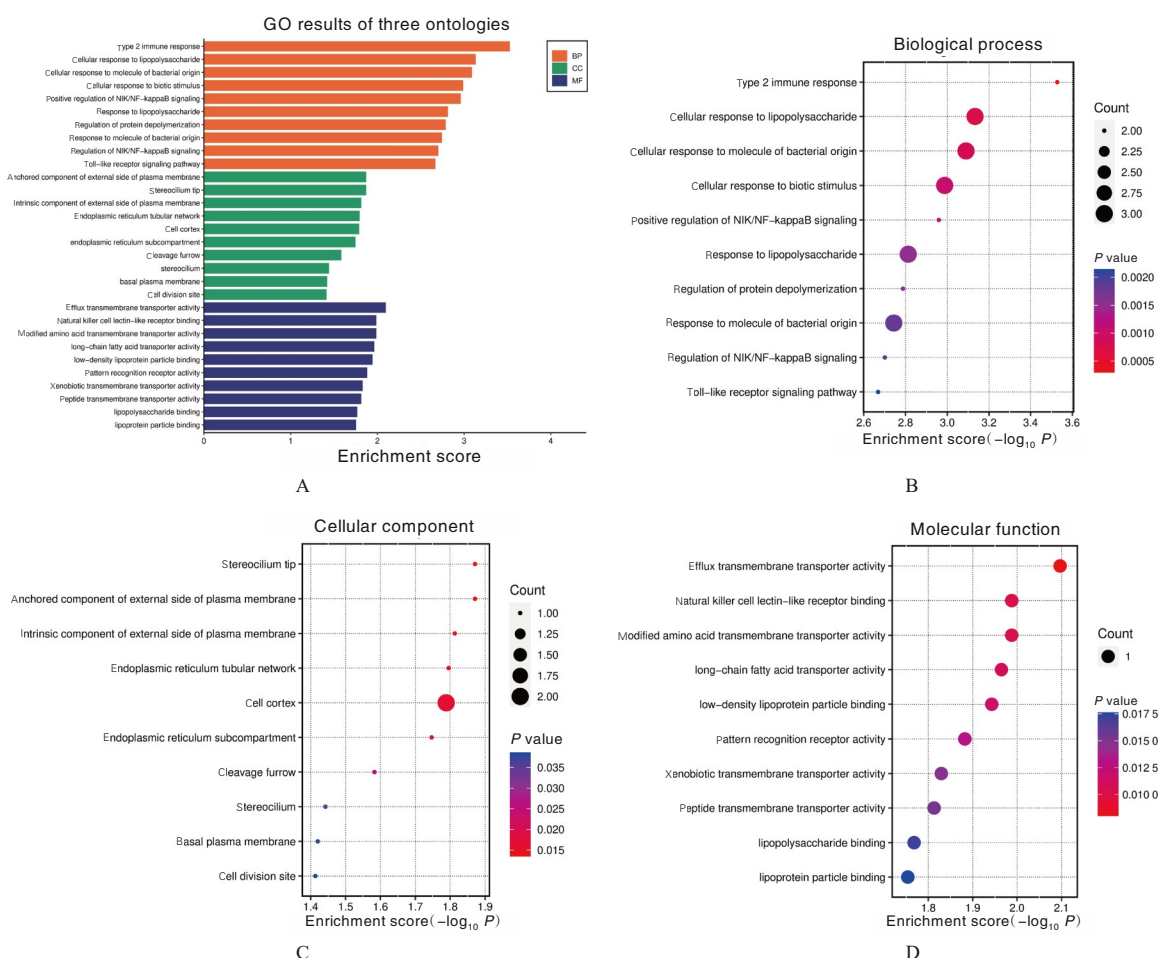
Fbln5)、内皮PAS结构域蛋白1 (endothelial PAS domain-containing protein 1, *Epas1*) 和微管相关蛋白 tau (microtubule-associated protein tau, *Mapt*) 基因即为所有氧化应激相关差异表达 mRNA 所构建的 PPI 网络核心节点,预示上述基因在 RT 诱导 RAW264.7 细胞焦亡中发挥关键作用。见图 8B 和表 1。



A: Venn diagram of mRNA; B: RT-induced oxygen in pyrodeath Chemical stress associated with circRNA-miRNA-mRNA in ceRNA network.

图4 靶基因预测和ceRNA网络构建

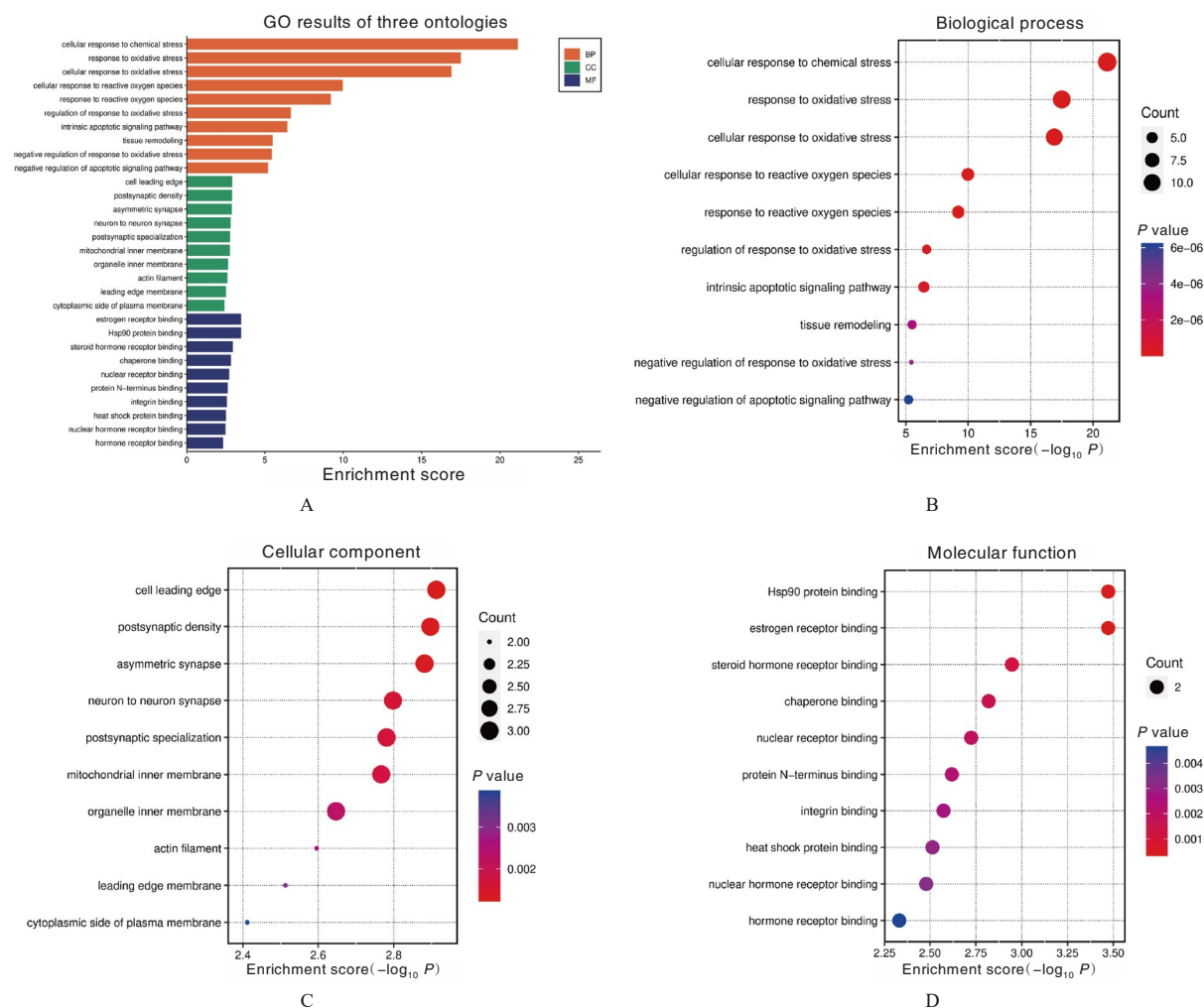
Fig. 4 Target gene prediction and ceRNA network construction



A: DE circRNA's GO pathway annotation; B: BP enrichment results of DE circRNA; C: CC enrichment results of differentially expressed circRNA; D: MF enrichment results of differentially expressed circRNA.

图5 差异表达circRNA的GO功能富集分析

Fig. 5 Go functional enrichment analysis on differentially expressed circRNA



A: DE mRNA's GO pathway annotation; B: BP enrichment results of DE mRNA; C: CC enrichment results of DE mRNA; D: MF enrichment results of DE mRNA.

图6 差异表达mRNA的GO功能富集分析

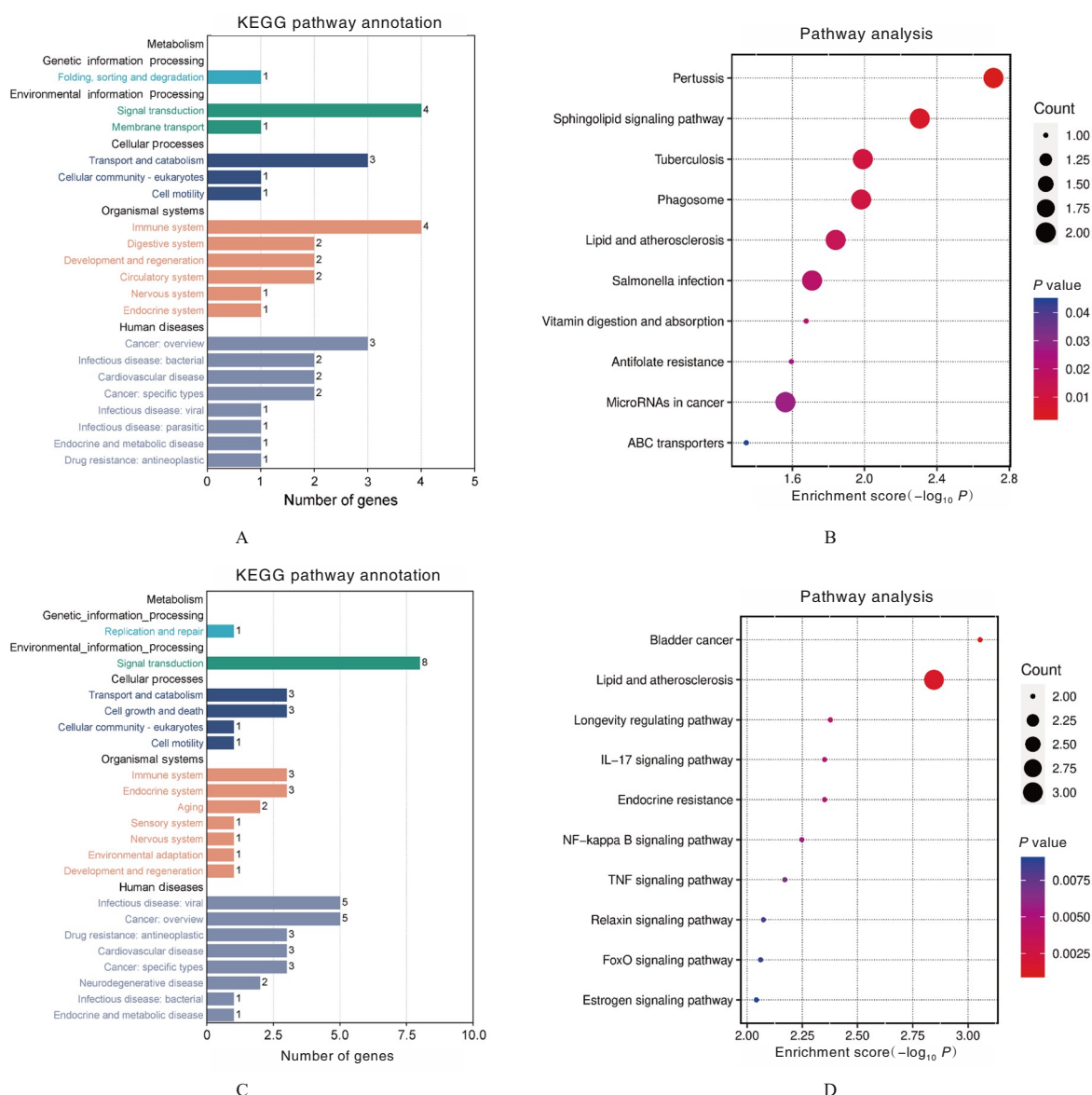
Fig. 6 Go functional enrichment analysis on differentially expressed mRNA

3 讨论

氧化应激是指机体内ROS产生与清除之间的失衡状态,可导致细胞分子结构和功能损伤。在炎症的发生发展过程中,氧化应激通过直接损伤细胞膜脂质、蛋白质和核酸,引起细胞功能障碍和死亡。氧化应激还能激活多种细胞内信号通路^[9],进而促进炎症细胞因子释放,加剧炎症反应。持续的氧化应激还可能导致细胞代谢紊乱和细胞死亡方式的转变,如促进细胞焦亡的发生。RT诱导巨噬细胞焦亡在一定程度上受氧化应激调控,其详细机制仍需进一步研究。本研究通过RT诱导RAW264.7细胞构建细胞焦亡模型,透射电镜观察到RT组细胞发生明显的焦亡样变化,GSDMD-N蛋白表达也显著上调,表明RT诱导RAW264.7细胞焦亡模型

构建成功。

研究^[10]显示:circRNA可以参与细胞焦亡的发生发展。环状结构赋予的circRNA的高度稳定性可能使其成为更理想的新型生物标志物和更合适的潜在治疗靶点,circRNA还可作为miRNA分子海绵,通过miRNA应答元件从而影响mRNA转录^[11]。本研究通过转录组测序获得RT诱导RAW264.7细胞焦亡中氧化应激相关基因和环状RNA的表达谱,构建circRNA-miRNA-mRNA的ceRNA网络,旨在阐明RT诱导细胞焦亡机制并寻找潜在的治疗靶点。本研究结果显示:2 034个circRNA中有24个差异表达的circRNA中,18个circRNA表达上调,6个circRNA表达下调;差异表达mRNA 2 930个,1 714个mRNA表达上调,1 216个mRNA表达下



A: Annotation of KEGG pathway for differentially expressed circRNA; B: KEGG enrichment results of differentially expressed circRNA; C: Annotation of KEGG pathway for differentially expressed mRNA; D: KEGG enrichment results of differentially expressed mRNA.

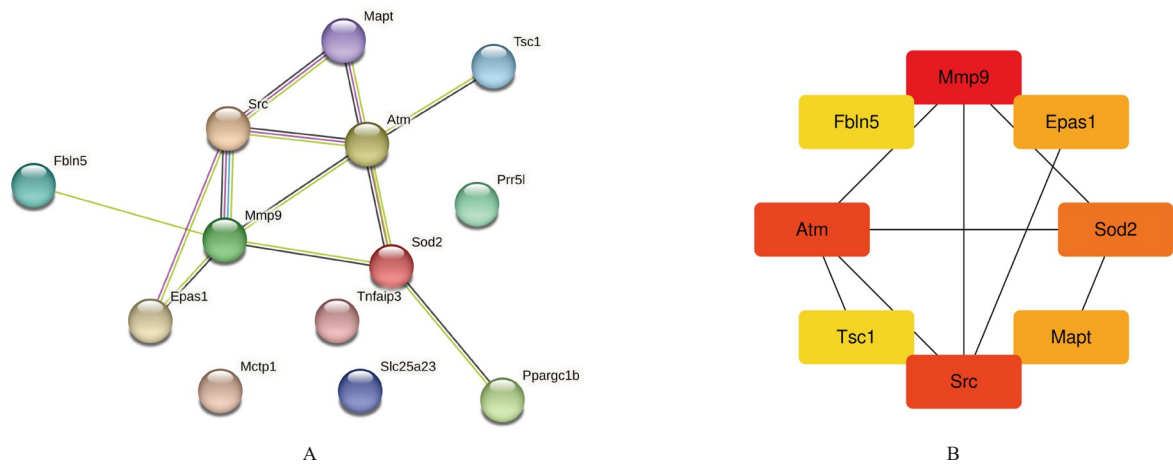
图7 差异表达基因的KEGG信号通路富集分析

Fig. 7 KEGG signaling pathway enrichment analysis on differentially expressed DEGs

调。本研究中山火图和聚类热图显示：与对照组比较，RT组细胞中 circRNA 和 mRNA 的表达水平有明显差异，呈聚类关系。通过测序结果和网络数据库构建出 39 个 RT 诱导 RAW264.7 细胞焦亡与氧化应激相关的 ceRNA 网络，包括 7 个 circRNA 节点、12 个 miRNA 节点和 13 个 mRNA 节点。circRNA_0305 (circAkap10) 参与的 ceRNA 网络最多，通过 6 个 miRNA (mmu-miR-1187、mmu-miR-346-3p、mmu-miR-466i-5p、mmu-miR-7001-5p、mmu-miR-7020-5p 和 mmu-miR-7222-3p)，调控 10 个靶基因

(*Mctp1*、*Prr5l*、*Epas1*、*Tsc1*、*Sod2*、*Mmp9*、*Atm*、*Src*、*Mapt* 和 *Tnfaip3* 基因) 的表达，提示 circRNA_0305 可能作为关键调节因子促进氧化应激反应，进而介导 RT 诱导的 RAW264.7 细胞焦亡。

本研究结果显示：差异表达的 circRNA 主要参与免疫过程，包括细胞对生物刺激的反应、模式识别受体活性和 2 型免疫反应等，而细胞焦亡正是受到外界微生物刺激时，由模式识别受体中炎症小体的活化而激活的^[12]，该结果进一步为 circRNA 可



A: PPI network of 13 DEGs; B: First 8 Hub genes of PPI network.

图8 PPI网络构建和Hub基因筛选

Fig. 8 Construction of PPI network and screening of Hub genes

表 1 Hub 基因基本信息

Tab. 1 Basic informations of Hub genes

Gene	Correlation description	Score
<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9	10
<i>Src</i>	Sarcoma	8
<i>Atm</i>	Ataxia telangiectasia mutated	8
<i>Sod2</i>	Superoxide-dismutase-2	8
<i>Mapt</i>	Microtubule-associated protein	4
<i>Epas1</i>	Endothelial PAS domain protein 1	4
<i>Tsc1</i>	Tuberous sclerosis	2
<i>Fbln5</i>	Fibulin-5	2

以参与细胞焦亡过程提供了证据。本研究中KEGG信号通路富集分析结果显示：差异表达circRNA主要参与组织系统和人类疾病的相关通路，如脂质代谢和动脉粥样硬化，表明上述circRNA可能在心血管疾病的发展中起作用。鞘脂信号通路的参与可能与神经系统功能和疾病有关，而百日咳相关通路的参与可能与呼吸道疾病存在关联。本研究中差异表达mRNA的GO功能富集分析结果显示：氧化应激反应是一个显著的生物学过程，该结果为本研究中氧化应激途径诱导细胞焦亡提供了佐证。差异表达mRNA富集的信号通路是调节细胞氧化应激反应的重要信号通路，表现在FoxO刺激编码位于不同亚细胞区室的抗氧化蛋白的基因转录，如线粒体中的锰型超氧化物歧化酶（manganese superoxide dismutase, Mn-SOD）^[13]。白细胞介素（interleukin-17, IL-17）信号通路是一种重要的促炎症细胞因子，

可以激活下游信号通路，促进炎症反应^[14]。上述信号通路与炎症、天然免疫反应和细胞凋亡等生物过程密切相关，在细胞中的作用涉及到多个信号通路的调控^[15]，包括代谢、免疫反应和细胞存活及衰老等多个方面。

人们普遍认为基因通常是通过相互作用来发挥功能的^[16]。因此，通过PPI网络分析ceRNA中mRNA的相互作用，使用MCC算法筛选出该PPI网络中排名前8位的Hub基因，即*Tsc1*、*Sod2*、*Src*、*Mmp9*、*Atm*、*Fbln5*、*Epas1*和*Mapt*基因。对PPI网络中的Hub基因进行文献检索后得到部分节点与炎症和氧化应激的发生发展密切相关。其中*Tsc1*可以与*Tsc2*形成复合体通过不同的信号通路来调控巨噬细胞的极化状态，从而调控巨噬细胞的内稳态，抑制巨噬细胞的炎症反应^[17]。*SOD2*是存在于线粒体基质的一种SOD，在机体氧化应激过程中发挥着重要的保护作用。研究^[18]显示：环状SOD2还可以竞争性地吸收miR-532-3p来激活硫氧还蛋白相互作用蛋白（thioredoxin interacting protein, TXNIP）/NLRP3炎症小体信号通路，促进非酒精性脂肪性肝病（non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD）中的细胞焦亡。*Src*是一种内源性的酪氨酸激酶，激活后的*Src*能增强受体功能，从而提高受体对胞外刺激的反应^[19]，同时*Src*家族激酶Lyn还能对NLRP3的酪氨酸磷酸化抑制NLRP3炎症小体的活性^[20]。*Mmp9*属于基质金属蛋白酶家族成员，能够降解细胞外基质^[21]，并参与细胞过程的调控、抑制炎症因子的分泌^[22]。

ATM在氧化应激条件下蛋白可被激活并调节机体氧化还原稳态的平衡^[23],共济失调毛细血管扩张突变基因(ataxia telangiectasia-mutated gene, ATM)还被证明是巨噬细胞发挥最佳NLRP3和NOD样受体C4(NLP family CARD domain-containing protein 4, NLRC4)炎症小体功能所必需的,因为其失活改变了ROS平衡并因此损害了炎症小体组装^[24]。Fbln5是一种由多种血管细胞分泌的糖蛋白^[25]已被确定为细胞外SOD的一种新的结合蛋白^[26], Fbln5能通过阻断纤连蛋白和 β 1整合素之间的相互作用来阻止活性氧的产生^[27]。EPAS1是一种转录因子,能够激活炎症介质肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)促进低氧炎症的发展^[28-29], EPAS1/TNF- α 轴是激活低氧炎症的关键信号通路^[30]。Mapt是一种固有无序态的蛋白^[31],可以通过线粒体的超极化引起氧化应激^[32]。由此推测, circRNA可能通过分子海绵 miRNA 调控上述靶点基因的表达,进而调控氧化应激诱导细胞焦亡。

综上所述,本研究利用转录组测序技术检测了RT诱导RAW264.7细胞焦亡中circRNA和mRNA表达谱的变化,筛选出了参与RT诱导巨噬细胞焦亡中Hub基因,上述circRNA可能通过ceRNA网络参与调控焦亡中氧化应激相关的8个Hub基因和炎症信号通路,进而介导RT诱导的RAW264.7细胞焦亡。本研究结果为RT诱导炎症机制提供了新的见解,为RT造成炎症损伤的后续治疗和预防提供了理论依据

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

卢楠和董明鑫参与选题、数据收集整理及论文撰写,于磊参与实验操作过程和统计学分析,孙成彪、王燕和许娜参与论文审阅,刘文森和葛淑敏参与论文撰写指导。

[参考文献]

- [1] 徐义峰,柯诗文,李可可,等.氧化应激和免疫浸润在特发性肺纤维化中的作用及中药防治研究[J].中国免疫学杂志,2024,40(10):2108-2115.
- [2] 于馨雅,申元英,郭乐.Nrf2/HO-1通路在氧化应激和炎性反应中的作用[J].医学研究杂志,2023,52(7):19-22.
- [3] ZHANG T, WU D M, LUO P W, et al. CircNEIL3 mediates pyroptosis to influence lung adenocarcinoma radiotherapy by upregulating PIF1 through miR-1184 inhibition[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(2): 167.
- [4] LI M Z, HUA Q H, SHAO Y T, et al. Circular RNA circBbs9 promotes PM_{2.5}-induced lung inflammation in mice *via* NLRP3 inflammasome activation[J]. Environ Int, 2020, 143: 105976.
- [5] 王俊虹,吴绘,魏茂提.BALB/c小鼠免疫重组蓖麻毒素B链蛋白的免疫机制研究[J].中国免疫学杂志,2016,32(12):1758-1760.
- [6] TESH V L. The induction of apoptosis by Shiga toxins and ricin[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2012, 357: 137-178.
- [7] IORDANOV M S, PRIBNOW D, MAGUN J L, et al. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(6): 3373-3381.
- [8] XU Y X, DONG M X, SUN C B, et al. Caspase-3/Gasdermin E-mediated pyroptosis contributes to Ricin toxin-induced inflammation [J]. Toxicol Lett, 2024, 396: 19-27.
- [9] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR S Y, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging [J]. Arch Toxicol, 2023, 97(10): 2499-2574.
- [10] WEN S, LI S L, LI L L, et al. circACTR2: a novel mechanism regulating high glucose-induced fibrosis in renal tubular cells *via* pyroptosis [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(3): 558-564.
- [11] POLISENO L, SALMENA L, ZHANG J W, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology[J]. Nature, 2010, 465(7301): 1033-1038.
- [12] LATZ E, XIAO T S, STUTZ A. Activation and regulation of the inflammasomes[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(6): 397-411.
- [13] KLOTZ L O. Redox regulation of FoxO activity: impact on micronutrient homeostasis[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 86: S13.
- [14] LIANG D, WANG Q L, ZHANG W B, et al. JAK/STAT in leukemia: a clinical update [J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 25.
- [15] WANG J J, FU D D, SENOUTHAI S, et al. Critical roles of PI3K/Akt/NF- κ B survival axis in angiotensin II-induced podocyte injury[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(6): 5134-5144.
- [16] LOU W Y, DING B S, WANG J N, et al. The

- involvement of the hsa_circ_0088494-miR-876-3p-CTNNB1/CCND1 axis in carcinogenesis and progression of papillary thyroid carcinoma[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 605940.
- [17] ZHU L N, YANG T, LI L J, et al. TSC1 controls macrophage polarization to prevent inflammatory disease[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4696.
- [18] CHEN F J, XING Y F, CHEN Z J, et al. Competitive adsorption of microRNA-532-3p by circular RNA SOD2 activates Thioredoxin Interacting Protein/NLR family pyrin domain containing 3 pathway and promotes pyroptosis of non-alcoholic fatty hepatocytes[J]. *Eur J Med Res*, 2024, 29(1): 250.
- [19] SLACK S, BATTAGLIA A, CIBERT-GOTON V, et al. EphrinB2 induces tyrosine phosphorylation of NR2B *via* Src-family kinases during inflammatory hyperalgesia[J]. *Neuroscience*, 2008, 156(1): 175-183.
- [20] TANG J, XIAO Y Z, LIN G X, et al. Tyrosine phosphorylation of NLRP3 by the Src family kinase Lyn suppresses the activity of the NLRP3 inflammasome[J]. *Sci Signal*, 2021, 14(706): eabe3410.
- [21] 张晓文, 张 婵, 张 迪, 等. 川楝素通过MMP9抑制肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(4): 793-798, 803.
- [22] 胡 佳, 张海霞, 苏婉露, 等. 间充质干细胞对2型糖尿病小鼠糖尿病肾病进展的影响及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(4): 383-393.
- [23] LI M X, LIN Y F, PALCHIK G A, et al. The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase is required for cellular resistance to oxidative stress independent of DNA double-strand break repair[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 76: 278-285.
- [24] ERTTMANN S F, HÄRTLOVA A, SLONIECKA M, et al. Loss of the DNA damage repair kinase ATM impairs inflammasome-dependent anti-bacterial innate immunity[J]. *Immunity*, 2016, 45(1): 106-118.
- [25] WILLIAMSON M R, SHUTTLEWORTH A, CANFIELD A E, et al. The role of endothelial cell attachment to elastic fibre molecules in the enhancement of monolayer formation and retention, and the inhibition of smooth muscle cell recruitment [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(35): 5307-5318.
- [26] NGUYEN A D, ITOH S, JENEY V, et al. Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase[J]. *Circ Res*, 2004, 95(11): 1067-1074.
- [27] SCHLUTERMAN M K, CHAPMAN S L, KORPANTY G, et al. Loss of fibulin-5 binding to beta1 integrins inhibits tumor growth by increasing the level of ROS[J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3(5/6): 333-342.
- [28] MAJMUNDAR A J, WONG W J, SIMON M C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 294-309.
- [29] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine[J]. *Cell*, 2012, 148(3): 399-408.
- [30] XUE X, RAMAKRISHNAN S, ANDERSON E, et al. Endothelial PAS domain protein 1 activates the inflammatory response in the intestinal epithelium to promote colitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(4): 831-841.
- [31] STRANG K H, GOLDE T E, GIASSEN B I. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration[J]. *Lab Investig*, 2019, 99(7): 912-928.
- [32] BRADFORD X, FERNANDES H J R, SNOWDEN S G. Changes in oxidised phospholipids in response to oxidative stress in *Microtubule-associated protein tau (MAPT)* mutant dopamine neurons [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(5): 508.