DOI:10.16016/j.1000-5404.202101010

长链非编码 RNA RP11-288L9.1 在系统性红斑狼疮中的作用及其机制研究

赵承磊,赵兴旺,郭俊恺,王 娟,张 敏,张 恋,游 弋 400038 陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院皮肤科

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA(long non-conding RNA,lncRNA)RP11-288L9.1 在系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)中的作用及机制。**方法** 通过转录组测序方法(RNA-seq)筛选获得 SLE 患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMCs)中差异表达的 lncRNAs,采用实时定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)技术验证 8 例 SLE 患者和 8 例健康对照 PBMCs 中差异表达的 lncRNA 的表达水平。运用荧光原位杂交 FISH 技术检测 RP11-288L9.1 的细胞定位;设计并构建 RP11-288L9.1 敲低和过表达重组慢病毒,转染构建 RP11-288L9.1 敲低和过表达模型,采用 qRT-PCR 验证其转染效率。分别采用 CCK-8 和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测慢病毒转染后巨噬细胞的增殖和凋亡能力,qRT-PCR 检测敲低和高表达 RP11-288L9.1 后,巨噬细胞相关炎症细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10、TGF-β1 的表达。**结果** 通过转录组数据发现 6 个差异表达的 lncRNA($P<0.05$)。qRT-PCR 验证 RP11-288L9.1 表达显著上调($P<0.01$)。RP11-288L9.1 定位在巨噬细胞胞浆中。过表达 RP11-288L9.1 可促进巨噬细胞的凋亡并抑制增殖($P<0.05$),相关炎症因子 IL-1β、IL-6 表达显著上升,IL-4、IL-10、TGF-β1 表达显著下降($P<0.001$);敲低 RP11-288L9.1 可促进巨噬细胞的增殖并抑制凋亡($P<0.05$),相关炎症因子 IL-1β、IL-6 表达显著下降($P<0.01$),IL-4、IL-10、TGF-β1 表达显著上升($P<0.01$)。**结论** RP11-288L9.1 在 SLE 患者 PBMCs 中高表达,并在巨噬细胞中通过影响炎症细胞因子的合成来调控免疫反应,这可能是 SLE 发病机制之一。

[关键词] 系统性红斑狼疮;长链非编码 RNA;RP11-288L9.1;巨噬细胞
[中图法分类号] R392.13; R392.32; R593.24 [文献标志码] A

Role of long non-coding RNA RP11-288L9.1 in systemic lupus erythematosus and underlying mechanism

ZHAO Chenglei, ZHAO Xingwang, GUO Junkai, WANG Juan, ZHANG Min, ZHANG Lian, YOU Yi Department of Dermatology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of long non-coding RNA (lncRNA) RP11-288L9.1 in systemic lupus erythematosus (SLE) and its potential mechanism. **Methods** Transcriptome sequencing (RNA-seq) was used to screen the differentially expressed lncRNAs in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of SLE patients, and the expression levels of these lncRNAs in 8 pairs of SLE patients and healthy controls were further verified by qRT-PCR. The knockdown as well as over-expression models of RP11-288L9.1 were constructed respectively by transfecting recombinant lentivirus into macrophages, and the transfection efficiency was determined subsequently. The subcellular distribution of RP11-288L9.1 was detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. Moreover, CCK-8 assay and Annexin V-FITC apoptosis detection kit were applied to examine the proliferation and apoptosis of macrophages in both models, and qRT-PCR was conducted to detect the expression of macrophage-related inflammatory cytokines, IL-1β, IL-6, IL-4, IL-10 and TGF-β1 after the transfection. **Results** Six differentially expressed lncRNAs

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673058);重庆市基础科学与前沿技术研究一般项目(cstc2017jcyjAX0251)
[通信作者] 游 弋,E-mail:youyi_cq@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

were found ($P<0.05$), in which RP11-288L9.1 was significantly up-regulated ($P<0.01$), and mainly located in the cytoplasm of macrophages. The over-expression of RP11-288L9.1 promoted the apoptosis and inhibited the proliferation of macrophages ($P<0.05$), increasing the levels of IL-1β and IL-6, and decreasing those of IL-4, IL-10 and TGF-β1 ($P<0.01$). In contrast, the knockdown of RP11-288L9.1 significantly induced the proliferation of macrophages and inhibited the apoptosis ($P<0.05$), with lowered levels of IL-1β and IL-6 and elevated IL-4, IL-10 and TGF-β1 ($P<0.01$). **Conclusion** RP11-288L9.1 is highly expressed in the PBMCs of SLE patients, and regulates immune response in macrophages by affecting the synthesis of inflammatory cytokines, which may contribute to the occurrence of SLE.

[**Key words**] systemic lupus erythematosus; long non-coding RNA; RP11-288L9.1; macrophages

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81673058) and the Project of Basic Science and Frontier Technology Research of Chongqing (cstc2017jcyjAX0251). Corresponding author: YOU Yi, E-mail: youyi_cq@163.com

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是典型的慢性多系统、多脏器损害的自身免疫性疾病,以大量自身抗体及补体形成为特征,临床表现和严重程度各不相同,严重危害人类健康。狼疮性肾炎是 SLE 主要表现之一,也是导致发病率和病死率增高的主要因素[1]。SLE 的发病机制涉及遗传、激素、环境、表观遗传等因素,但其病因至今尚不完全清楚[2]。

长链非编码 RNA(long non-conding RNA,lncRNA)是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA[3-4]。研究表明 lncRNA 在表观遗传调控、基因表达剂量补偿效应、细胞周期和细胞分化调控等众多生物学事件中发挥着重要作用[5]。有研究报道,许多 lncRNA 与自身免疫介导的炎症性疾病的发病相关,例如 SLE、RA 等[6]。研究证实:一些 lncRNA 通过表观遗传调控,包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、微小 RNA 等参与 SLE 的发生和发展,并影响 SLE 治疗药物的作用[7-8]。然而 lnc RNA 在 SLE 中的具体作用机制仍未知。

本研究利用 RNA-seq 筛选在 SLE 患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMCs)中高水平表达的 lncRNA,筛选出表达上调最显著的 lncRNA,然后采用 qRT-PCR 技术验证。结果显示 RP11-288L9.1 水平与对照组相比显著上调。因此,针对 RP11-288L9.1 做进一步研究,探讨 RP11-288L9.1 与 SLE 炎症发生是否相关,以及其具体的潜在作用。进一步的研究发现 RP11-288L9.1 定位在巨噬细胞中,构建 RP11-288L9.1 敲低和过表达慢病毒,并检测转染后巨噬细胞炎症相关因子的表达,探讨 RP11-288L9.1 在 SLE 炎症中可能的作用,为治疗 SLE 提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究样本来自 2018 年 1 月至 2020 年 1 月本科确诊为 SLE 患者的外周血,分离血浆置于-80 ℃冰箱保存备用,8 例均为女性,年龄 24~51(38.9±10.2)岁,临床诊断符合 1997 年美国风湿协会修订的诊断标准,除外感染、肿瘤及其他结缔组织病。对照组来自门诊体检的 8 例女性健康志愿者,无免疫系统疾病和使用免疫抑制剂的病史,年龄 18~60 周岁。排除标准:男性,年龄>60 或<18 周岁;有高血压、糖尿病等全身综合性疾病;有其他免疫系统疾病或使用免疫抑制剂的病史;其他不适合本研究的患者。纳入的研究对象均知情同意,本研究通过本院伦理委员会审批(KY2020167)。

1.2 主要试剂

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自美国 ATCC 细胞资源库(ATCC® SC-6003),血浆 RNA 提取试剂 TRIzol 购自美国 Life 公司,糖原(glycogen G)购自碧云天公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天公司,CCK-8 试剂盒购自东仁公司,去基因组 DNA 反转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自 Bestar 公司。

1.3 PBMCs 及总 RNA 提取

提取患者 PBMCs 总 RNA 用于检测差异表达 lncRNA 的表达,提取慢病毒处理的巨噬细胞总 RNA 用于检测 RP11-288L9.1 上调、下调后炎症细胞因子的表达变化。将冻存的患者外周血置于冰上融化,12 000×g,4 ℃离心 10 min 以沉淀血浆中的血细胞。取 500 μL 血浆加入 1 mL TRIzol 裂解液,旋涡震荡数秒后静置 5 min;慢病毒处理的巨噬细胞,在 6 孔板中加入 1 mL TRIzol 裂解液,轻轻混匀,裂解 5 min,并将裂解液收集到 1.5 mL 离心管中。然后按 TaKaRa 公司用户手册提取总 RNA。

1.4 qRT-PCR 检测 lncRNA RP11-288L9.1 的表达

PBMCs 和细胞的总 RNA 按照 PrimerScript™ 说明书进行逆转录,-20 ℃保存 cDNA。设计 RP11-288L9.1 及相关炎症因子的引物并比对其特异性,交北京擎科生物公司合成(序列如表 1 所示)。以 cDNA 为模版,配 PCR 反应体系,体系为 20 μL,每个检测指标设置

3 个复孔,以 β-actin 为内参消除实验误差。PCR 程序如下所示:95 ℃预变性 3 min,95 ℃ 5 s,58 ℃ 34 s,72 ℃ 60 s,共 40 个循环,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析相关分子的相对表达量。

表 1 实验所用引物

基因	序列	长度/bp
RP11	正向 5′-GGCGTGTCACCAGTTTAT-3′ 反向 5′-ATTGCTTACAGTCGGGAT-3′	223
AC096579	正向 5′-ACGGACCGAATCACTG-3′ 反向 5′-AACGCTCATTTCCATACAC-3′	159
NRIR-1	正向 5′-AGCCTGACGGACCGAATC-3′ 反向 5′-AACGCTCATTTCCATACACCA-3′	229
NRIR-2	正向 5′-GGACCGAATCACTGCC-3′ 反向 5′-TTCCCTTTCATCCACTTT-3′	209
XLOC-031958	正向 5′-AGAGCCTGACGGACCGAATC-3′ 反向 5′-GGGCCTGTGAAAGGTCTGGTA-3′	177
AL92874212-1	正向 5′-TACCCATAATCAGTAACCT-3′ 反向 5′-AAAGCACCGATCAACA-3′	251
AL92874212-2	正向 5′-CCTGACGGACCGAATC-3′ 反向 5′-TGTAGTTGCCCTGCTT-3′	169
IL-1β	正向 5′-TGATGTTCGTCCCTGTCC-3′ 反向 5′-CACGCAATAGTAATGTCCTG-3′	185
IL-4	正向 5′-TGGAGCAGGTGAAGAATG-3′ 反向 5′-AGCAGGAAGAACAGAGGG-3′	211
IL-6	正向 5′-AGTAGTGAGGAACAAGCCAGAG-3′ 反向 5′-TACATTTGCCGAAGAGCC-3′	262
IL-10	正向 5′-ACCAAGACCCAGACATCA-3′ 反向 5′-TTCACAGGGAAGAAATCG-3′	193
TGF-β1	正向 5′-ATCAACGCCCGCCACAAG-3′ 反向 5′-GGCCCACGGCAGGTAATT-3′	186
β-action	正向 5′-GGGGTGAAATGTGAGGCG-3′ 反向 5′-CTCGGTCTTCGTAGATTGCTTA-3′	169

1.5 小鼠单核巨噬细胞培养

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞在含 10%胎牛血清及 100 U/mL 青霉素、链霉素的 DMEM 高糖培养液中培养,培养条件为 5%CO_2、37 ℃,隔天换液并观察细胞的生长状况。待 RAW264.7 细胞生长至 70%~80%融合度时,弃去旧的细胞培养液,并用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 0.25%的胰蛋白酶,于倒置显微镜下观察细胞形态的变化,当细胞出现胞质回缩,胞体变圆,细胞间隙变大时,弃去消化液,立即加入含 10%血清的细胞培养液终止消化,用吸管吸取培养液,反复轻柔吹打贴壁的细胞使之脱落并悬浮,调整细胞至合适密度后接种于新的培养皿中,置于 5%CO_2、37 ℃培养箱中培养。

1.6 慢病毒包装及感染细胞

1.6.1 病毒包装 用于包装过表达、敲低 RP11-288L9.1 重组慢病毒的穿梭质粒和包装质粒(pGag/Pol、pRev、pVSV-G)由北京擎科生物科技有限公司构建,未插入目的片段的空白穿梭质粒作为对照组。293T 细胞(ATCC 细胞库)在 10 cm 培养皿中培养至 80%~90%融合度时,接种 15 cm 培养皿;加入 18 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液,混匀后 37 ℃、5%CO_2 培养过夜;在 1 支无菌的 5 mL 离心管中加入 1.5 mL 无血清 DMEM,按 1∶1的比例加入含目的序列的穿梭质粒和包装质粒(pGag/Pol、pRev、pVSV-G),混匀,取另 1 支无菌的 5 mL 离心管,加入 1.5 mL 无血清 DMEM,再加入 300 μL RNAi-Mate,混匀,室温放置 5 min 后,将两管混合,室温放置 20~25 min;除去 15 cm 培养皿中的培养液,加入 8 mL 无血清的 DMEM 培养液;将转染混合物逐滴加入 15 cm 培养皿中,轻轻地前后摇晃培养皿以混匀复合物,在 37 ℃、5%CO_2 培养箱中温育 4~6 h;吸弃转染液,加入 18 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液,37 ℃、5%CO_2 继续培养 72 h。利用超速离心(4 ℃,20 000 r/min,2 h)收集病毒;分装的病毒液贴上标签,-80 ℃ 冰箱保存。

1.6.2 感染巨噬细胞 将生长状态良好的巨噬细胞 RAW264.7(ATCC 细胞库)于 37 ℃、5%CO_2 培养箱培养。24 h 后更换 1 次培养液继续培养,待细胞汇合度达 80%左右传代培养,保持细胞良好的生长状态。处于对数生长期的细胞胰酶消化,完全培养基制成(3~5)×10^4/mL 细胞悬液,接种相应的细胞数到培养板中,继续培养保证感染时铺板量达到 15%~30%。按照预实验结果,更换感染培养基,加入最适病毒量进行感染。感染后 24 h,更换为常规培养基继续培养。感染后 72 h 左右,荧光显微镜观察报告基因(如 GFP)的表达情况。

1.7 荧光原位杂交(FISH)检测 RP11-288L9.1 的细胞定位

实验分为 3 组:过表达 RP11-288L9.1 组命名为 RP11-288L9.1 OE,敲低 RP11-288L9.1 组命名为 RP11-288L9.1 KD,对照组。细胞利用 4 %多聚甲醛固定,然后将载玻片用盐酸乙醇溶液浸洗 10 min,自来水充分清洗,待玻片晾干后,滴 1 滴 poly-l-lysine 溶液于玻片上,覆盖样品孔,室温放置 10~30 min;吸去多余的溶液,用无菌水冲洗表面数次。接种前至少室温干燥 1 h 或过夜晾干。透明与脱水:取适量固定后样品与载玻片上,放入 46 ℃孵箱中烘干 10 min;将样品浸入蛋白酶 K 缓冲液中,37 ℃ 20 min,然后浸入灭菌水中清洗 3 次,每次 1 min;再依次浸入 50%、80%、100%乙醇中脱水,每次 3 min,最后在室温晾干。杂交:加 9 μL 杂交缓冲液到载玻片的样品上,尽量让样

品全被覆盖在杂交缓冲液上加 1 μL 探针(终浓度 5 ng/μL);将载玻片水平放在有 2×SSC 的湿盒中,盖好盖子,然后一起放入 46 ℃孵育箱中,杂交 1.5 h;将冲洗缓冲液预热到 48 ℃备用。冲洗:杂交后,迅速小心用预热的冲洗液冲洗载玻片 1~2 次;然后快速将载玻片放入 48 ℃冲洗液中,放置 20 min 后,用灭菌水润洗载玻片 3 次,最后在空气中晾干。镜检与拍照:晾干后,滴 1 滴抗荧光衰弱剂,小心盖上盖玻片,使样品被抗荧光衰弱剂覆盖,排除气泡,吸去多余液体,然后用指甲油封边;及时进行镜检,在同视野下观察;Zeiss LSM 700 共聚焦激光扫描显微镜拍摄结果。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

把细胞培养液吸出至一合适离心管内,PBS 洗涤贴壁细胞 1 次,加入适量胰酶细胞消化液(可含有 EDTA)消化细胞。室温孵育至轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时,吸除胰酶细胞消化液。需避免胰酶的过度消化。把细胞轻轻吹打下来,转移到离心管内,1 000×*g* 离心 5 min,弃上清,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 50 000~100 000 重悬的细胞,1 000×*g* 离心 5 min,弃上清,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀。加入 10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀。室温(20~25 ℃)避光孵育 10~20 min,随后置于冰浴中。可以使用铝箔进行避光。利用流式细胞仪立即上机检测。

1.9 CCK-8 检测细胞增殖

在 96 孔板中配制 100 μL 的细胞悬液,将培养板放在 37 ℃、5%CO_2 培养箱中预培养 24 h;向培养板中加入 10 μL 不同浓度的待测物质;将培养板放在培养箱孵育;每孔轻轻加入 10 μL CCK-8 溶液。孵育 1~4 h 后,用酶标仪测定在 450 nm 处的光度值 *D*(450)。

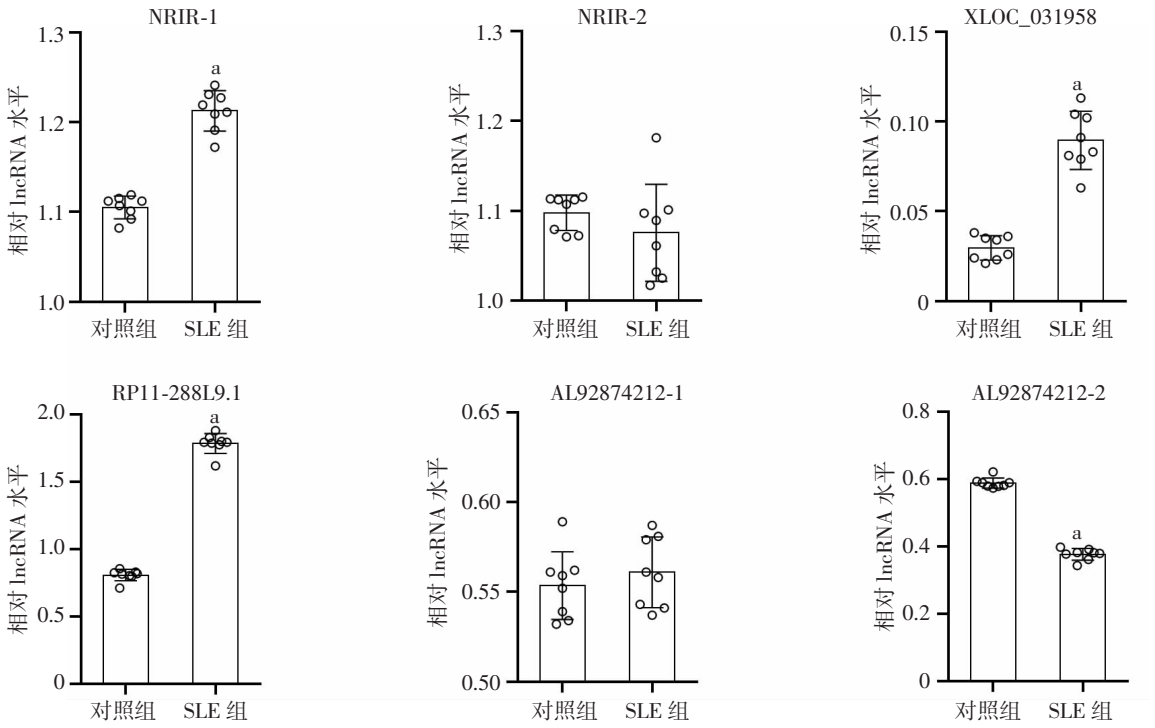
1.10 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件。细胞实验均重复 3 次。组间比较根据数据类型使用配对 *t* 检验。$P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 SLE 患者 PBMCs 中 lncRNA RP11-288L9.1 高表达

通过 RNA-seq 筛选获得 NRIR-1、NRIR-2、XLOC_031958、RP11-288L9.1、AL92874212-1、AL92874212-2 6 个差异表达的 lncRNA,进一步通过 qRT-PCR 验证在 SLE 患者和健康对照 PBMCs 中这 6 个 lncRNA 的表达。结果显示:SLE 患者 PBMCs 中 RP11-288L9.1 的表达较对照组显著上调($P<0.01$,图 1)。

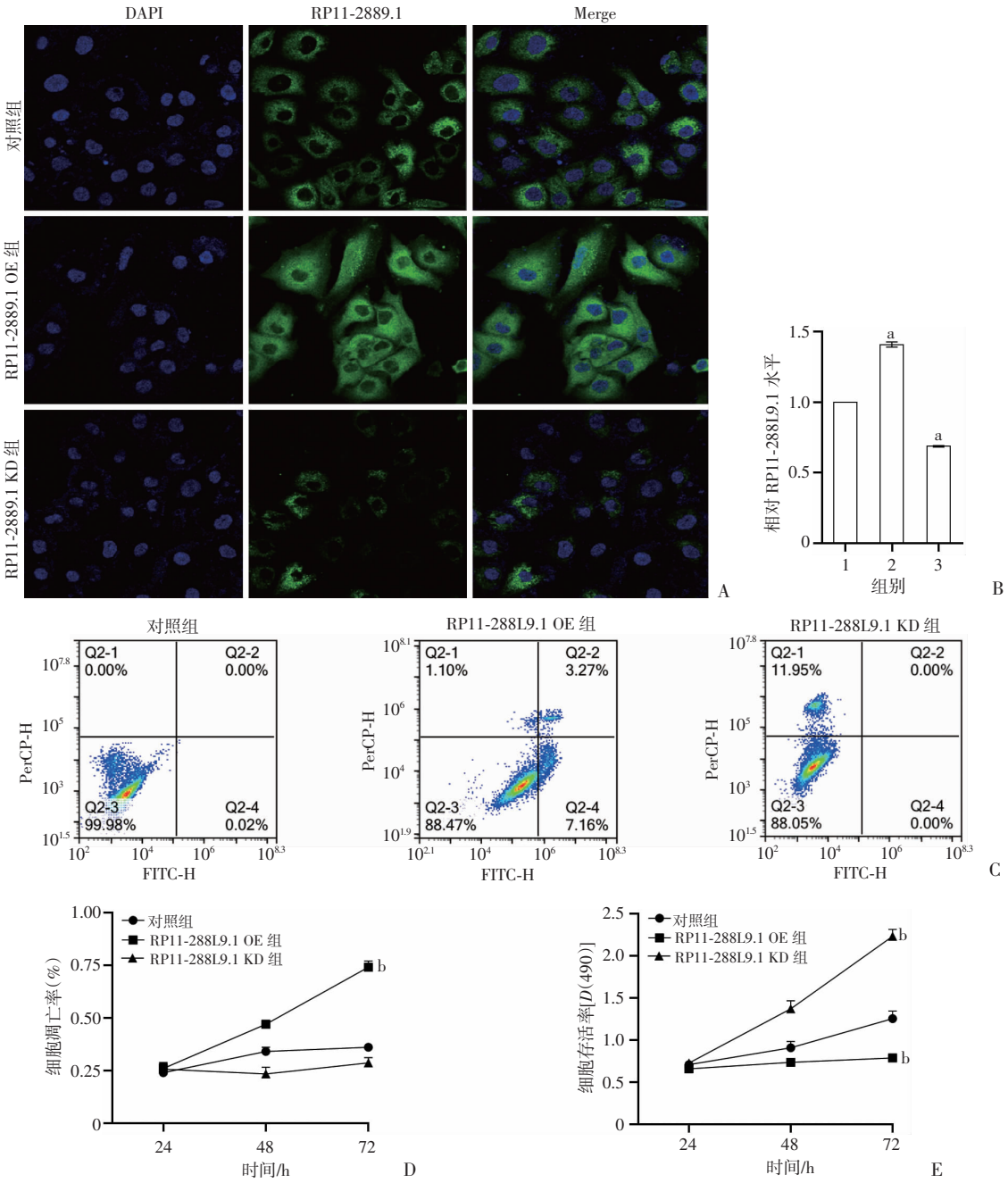


a:$P<0.01$,与对照组比较

图 1 qRT-PCR 验证 SLE 患者及健康对照 PBMCs 中差异表达的 lncRNA

2.2　RP11-288L9.1 过表达可抑制巨噬细胞的增殖

过表达和敲低 RP11-288L9.1 的慢病毒转染巨噬细胞后,采用 FISH 技术定位发现 RP11-288L9.1 位于巨噬细胞胞浆中,过表达组表达水平高于对照组,敲低组低于对照组(图 2A);qRT-PCR 检测转染后过表达组和敲低组 RP11-288L9.1 的表达,结果显示:与对照组比较,过表达组 RP11-288L9.1 的表达上升,敲低组 RP11-288L9.1 的表达降低($P<0.01$,图 2B);流式细胞仪检测细胞凋亡,结果显示:RP11-288L9.1 敲低组的巨噬细胞凋亡率低于对照组,过表达组的巨噬细胞凋亡率高于对照组(图 2C、D,$P<0.05$)。采用 CCK-8 检测细胞增殖,结果显示:敲低组巨噬细胞增殖水平高于对照组,过表达组巨噬细胞增殖水平低于对照组(图 2E,$P<0.05$)。上述实验结果表明 RP11-288L9.1 可以抑制巨噬细胞的增殖,促进巨噬细胞的凋亡。



A:利用 FISH 检测转染 72 h 后各组 RP11-288L9.1 的表达;B:利用 qPCR 检测转染后过表达组和敲低组 RP11-288L9.1 的表达　1:对照组;2:RP11-288L9.1 OE 组;3:RP11-288L9.1 KD 组;a:$P<0.01$,与对照组比较;C、D:转染后巨噬细胞凋亡率　b:$P<0.05$,与对照组比较;E:转染后巨噬细胞细胞活性　b:$P<0.05$,与对照组比较

图 2　过表达和敲低 RP11-288L9.1 对巨噬细胞凋亡率和细胞活性的影响

2.3 过表达和敲低 RP11-288L9.1 对巨噬细胞相关炎症细胞因子表达的影响

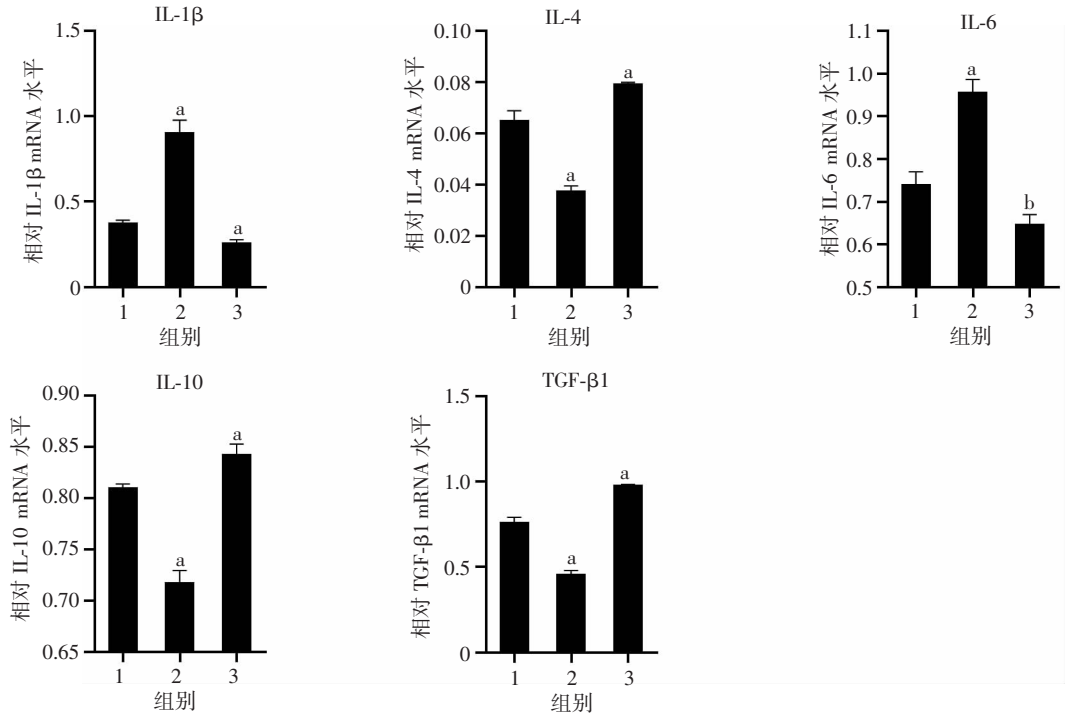
qRT-PCR 检测结果显示:在巨噬细胞中转染过表达和敲低 RP11-288L9.1 的慢病毒后,过表达目的 lncRNA 后的巨噬细胞中 IL-1β、IL-6 表达显著上升,IL-4、IL-10、TGF-β1 表达显著下降;敲低巨噬细胞中目的 lncRNA 后,IL-1β、IL-6 表达显著下降,IL-4、IL-10、TGF-β1 表达显著上升。表明 RP11-288L9.1 在巨噬细胞中可能影响了炎症细胞因子的合成来调控免疫反应(图 3)。

3 讨论

系统性红斑狼疮受到多种因素影响,其发病机制复杂多样。越来越多的证据表明 lncRNA 与 SLE 发病密切相关,在 SLE 临床诊断和治疗方面具有巨大的潜力。LI 等[9]分析 SLE 患者及健康对照组外周血 T 细胞中 lncRNA 的表达水平,检测到 1 935 种差异表达的 lncRNA,提示这些差异的 lncRNA 在 SLE 疾病发生及发展过程中发挥调节作用。大量研究表明 lncRNA 可以通过调节炎症细胞因子的产生进而影响机体免疫状态。CARPENTER 等[10]报道 lncRNACOX2 被定性为 TLR 配体诱导的动态调控基因,进而发挥促进和抑制炎症细胞因子表达的作用;一些 lncRNA 包括 THRIL[11]、Lnc13[12]被报道可调节髓系细胞的炎症细胞因子表达。

为了验证 lncRNA 与 SLE 发病的相关性,本研究首先通过 RNA-seq 筛选获得 SLE 患者 PBMCs 高水平表达的 lncRNA,筛选出 6 个差异表达较明显的 lncRNA,作为备选 lncRNA。然后采用 qRT-PCR 技术验证 8 例 SLE 患者和 8 例健康对照组 PBMCs 中差异表达 lncRNA 的表达,比较其差异表达,结果显示 RP11-288L9.1 水平上调显著,因此将 RP11-288L9.1 作为本研究的目的 lncRNA。

运用 RNA FISH 技术进行目的 lncRNA 的定位,发现其主要信号定位于巨噬细胞的胞浆。巨噬细胞在机体固有免疫和适应性免疫应答中发挥着关键的作用,是机体中免疫反应中重要的免疫细胞[13]。近年来,大量研究表明巨噬细胞在 SLE 发病机制中发挥重要的作用。SLE 常累及肾脏,Ⅵ型狼疮肾炎患者肾脏组织中巨噬细胞的高水平表达直接预示患者预后不良[14]。将狼疮模型鼠体内的巨噬细胞清除可显著缓解其肾炎及疾病活动度[15]。巨噬细胞在不同微环境信号刺激下,可改变其自身的形态和生理特征,极化成两类细胞,即经典活化型细胞(M1 型)和替代活化型细胞(M2 型)[16]。巨噬细胞极化的调控机制尚不完全清楚,越来越多的证据表明 lncRNA 在巨噬细胞极化转换



1:对照组;2:RP11-288L9.1 OE 组;3:RP11-288L9.1 KD 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 3 过表达和敲低 RP11-288L9.1 对炎症细胞因子表达的影响

中发挥重要作用。已有研究显示:心脏和凋亡相关lncRNA(cardiac and apoptosis-related lncRNA,Carlr)[17]、lncRNA A_30_P01020139[18]等lncRNA可以通过调控转录因子,进而改变巨噬细胞极化状态。以上研究结果均提示lncRNA可能通过调控巨噬细胞极化状态,同时抑制了巨噬细胞的增殖,并促进了巨噬细胞的凋亡,从而在SLE发病过程中具有重要作用。

为了进一步验证RP11-288L9.1对巨噬细胞的调控机制,本研究构建了lncRNA敲低和过表达慢病毒,并利用慢病毒转染的方法在巨噬细胞系中过表达和敲低RP11-288L9.1,通过荧光显微镜观察发现转染荧光阳性,为接下来的研究打下了良好的基础。

本研究通过检测转染后各巨噬细胞相关炎症细胞因子表达水平,结果显示:过表达RP11-288L9.1后的巨噬细胞中炎症细胞因子IL-1β、IL-6表达显著上升,IL-4、IL-10、TGF-β1表达显著下降;敲低RP11-288L9.1的巨噬细胞,IL-1β、IL-6表达显著下降,IL-4、IL-10、TGF-β1表达显著上升。巨噬细胞极化的状态不同,在免疫应答中发挥着不同的作用。极化的M1型巨噬细胞以分泌促炎因子为主,如IL-1β、IL-6等,具有强大的抗原提呈及吞噬能力,促进Th1免疫应答,发挥抗胞内病原菌和抗肿瘤的作用,同时在机体的免疫应答中发挥促炎作用[19]。M2型巨噬细胞分泌抗炎细胞因子如IL-4、IL-10、TGF-β1等,具有抗炎的免疫调控作用,并能促进组织修复和伤口愈合[13]。巨噬细胞的炎症反应主要通过NF-κB、STAT3等转录因子相关信号通路介导,其中NF-κB、ER/K12、ERK5、STAT3等多种转录因子在lncRNA调控作用下磷酸化后入核,继而影响细胞核内巨噬细胞相关炎症因子的转录[20]。有研究表明lncRNA-GAS5内质网应激途径的激活可调控巨噬细胞的增殖和凋亡[21],所以推测RP11-288L9.1也可能是通过NF-κB、STAT3等转录因子相关信号通路调节炎症因子的合成,并进一步调控内质网应激途径的激活来对巨噬细胞的增殖和凋亡产生影响,但是其具体机制仍需进一步的深入研究。

本研究结果提示RP11-288L9.1可能通过调控巨噬细胞的极化状态进而影响细胞因子的表达,可能通过促进Th1免疫应答,增强巨噬细胞抗原提呈及吞噬能力,促进机体炎症的进一步发展,这种作用方式可能是RP11-288L9.1在SLE发生和发展中的重要作用机制,为以后继续深入研究lncRNA在SLE发病中的作用提供了重要的方向。

机体免疫异常是SLE一个重要特征,巨噬细胞作为机体免疫的重要参与者,在炎症反应和宿主防御中均扮演重要角色,本研究结果表明:RP11-288L9.1可以通过调控巨噬细胞的极化状态进而影响了炎症细胞因子的表达,并通过增强巨噬细胞抗原提呈及吞噬能力,促进Th1免疫应答,导致机体炎症的进一步发展。这可能是SLE发生的机制之一。但RP11-288L9.1在SLE中发挥分子作用的具体机制、影响因素及临床诊断、治疗、预后等还有待进一步探索。

参考文献:

[1] KIRIAKIDOU M, CHING C L. Systemic lupus erythematosus[J]. Ann Intern Med, 2020,172(11):ITC81-ITC96. DOI:10.7326/AITC202006020.

[2] DURCAN L, O'DWYER T, PETRI M. Management strategies and future directions for systemic lupuserythematosus in adults[J]. Lancet, 2019, 393(10188): 2332-2343. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)30237-5.

[3] YAO R W, WANG Y, CHEN L L. Cellular functions of long noncoding RNAs[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(5): 542-551. DOI:10.1038/s41556-019-0311-8.

[4] SUN Q, HAO Q, PRASANTH K V. Nuclear long noncoding RNAs: key regulators of gene expression[J]. Trends Genet, 2018, 34(2): 142-157. DOI: 10.1016/j.tig.2017.11.005.

[5] VERGADI E, VAPORIDI K, TSATSANIS C. Regulation of endotoxin tolerance and compensatory anti-inflammatory response syndrome by non-coding RNAs[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2705. DOI:10.3389/fimmu.2018.02705.

[6] WU Y, ZHANG F, MA J, *et al*. Association of large intergenic noncoding RNA expression with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus[J]. Arthr Res Ther, 2015,17(1):131. DOI: 10.1186/s13075-015-0632-3.

[7] WU G C, PAN H F, LENG R X,*et al*. Emerging role of long noncoding RNAs in autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2015, 14(9): 798-805. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.05.004.

[8] LONG H, YIN H, WANG L, *et al*. The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity[J]. J Autoimmun, 2016, 74: 118-138. DOI: 10.1016/j.jaut.2016.06.020.

[9] LI L J, ZHAO W, TAO S S,*et al*. Comprehensive long non-coding RNA expression profiling reveals their potential roles in systemic lupus erythematosus[J]. Cell Immunol, 2017,319:

17-27. DOI:10.1016/j.cellimm.2017.06.004.

[10] CARPENTER S, AIELLO D, ATIANAND M K, *et al*. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. Science, 2013, 341(6147): 789-792. DOI:10.1126/science.1240925.

[11] CASTELLANOS-RUBIO A, FERNANDEZ-JIMENEZ N, KRATCHMAROV R, *et al*. A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease[J]. Science, 2016, 352(6281): 91-95. DOI: 10.1126/science.aad0467.

[12] CHAN J, ATIANAND M, JIANG Z, *et al*. Cutting edge: a natural antisense transcript, AS-IL1α, controls inducible transcription of the proinflammatory cytokine IL-1α[J]. J Immunol, 2015, 195(4): 1359-1363. DOI: 10.4049/jimmunol.1500264.

[13] HUME D A. The many alternative faces of macrophage activation[J]. Front Immunol, 2015, 6: 370. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00370.

[14] CHEUNSUCHON B, INCHAROEN P, CHAWANASUNTORAPOJ R, *et al*. Glomerular macrophage is an indicator of early treatment response in diffuse proliferative lupus nephritis[J]. J Med Assoc Thai, 2013, 96(Suppl 2): S246-S251.

[15] CHALMERS S A, CHITU V, HERLITZ L C, *et al*. Macrophage depletion ameliorates nephritis induced by pathogenic antibodies[J]. J Autoimmun, 2015,57:42-52. DOI:10.1016/j.jaut.2014.11.007.

[16] YOON J, UM H N, JANG J, *et al*. Eosinophil activation by Toll-like receptor 4 ligands regulates macrophage polarization [J]. Front Cell Dev Biol, 2019,7:329. DOI:10.3389/fcell.2019.00329.

[17] CASTELLANOS-RUBIO A, KRATCHMAROV R, SEBASTIAN M, *et al*. Cytoplasmic form of carlr lncRNA facilitates inflammatory gene expression upon NF-κB activation[J]. J Immunol, 2017, 199(2): 581-588. DOI: 10.4049/jimmunol.1700023.

[18] CHEN X, DU J, ZHU Y, *et al*. Comprehensive analysis of lncRNA and mRNA expression profiles in macrophages activated by Actinidia eriantha polysaccharide[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 136: 980-993. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.091.

[19] LI H, JIANG T, LI M Q, *et al*. Transcriptional regulation of macrophages polarization by microRNAs [J]. Front Immunol, 2018, 9:1175. DOI:10.3389/fimmu.2018.01175.

[20] YIN L, DAI Q, JIANG P, *et al*. Manganese exposure facilitates microglial JAK2-STAT3 signaling and consequent secretion of TNF-α and IL-1β to promote neuronal death [J]. Neurotoxicology, 2018, 64:195-203. DOI: 10.1016/j.neuro.2017.04.001.

[21] 徐雅楠,于嘉霖,马臣杰,等. Lnc RNA-GAS5 对 BCG 感染小鼠巨噬细胞后细胞坏死的调控作用[J]. 微生物学通报,2019,46(4):858-868. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.180317.

XU Y N, YU J L, MA C J, *et al*. Regulation of LncRNA-GAS5 on necrosis of macrophage induced by Bacillus Calmette-Guérin[J]. Microbio China, 2019, 46(4): 858-868. DOI:10.13344/j.microbiol.china.180317. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.180317.

(**收稿**:2021-01-03;**修回**:2021-02-05)

(编辑 邓强庭)