

研究报告



LncRNA-GAS5 对 BCG 感染小鼠巨噬细胞后细胞坏死的调控作用

徐雅楠^{1,2} 于嘉霖^{1,2} 马臣杰^{1,2} 曾瑾^{1,2} 吴晓玲^{*1,2} 邓光存^{*1,2}

1 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室 宁夏 银川 750021

2 宁夏大学生命科学学院 宁夏 银川 750021

摘要:【背景】LncRNA-GAS5 是由 Gas5 基因编码的功能性 LncRNA 分子,对细胞极化、细胞凋亡、坏死和自噬等多种生物学过程具有重要的调控作用。【目的】探讨 LncRNA-GAS5 对卡介苗 (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 坏死的调控作用。【方法】构建 LncRNA-GAS5 的过表达及干扰载体,分别转染巨噬细胞 RAW264.7 后使用 BCG 感染,采用噻唑蓝比色法 (MTT) 检测细胞存活率,通过透射电镜观察细胞坏死形态,利用碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 单染法流式细胞仪检测细胞坏死率,通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法研究坏死相关调控因子 RIP1、RIP3 和 MLKL 的表达水平。【结果】BCG 感染巨噬细胞后, LncRNA-GAS5 表达水平显著上调;同时,采用 LncRNA-GAS5 过表达载体单独转染或结合 BCG 感染后,巨噬细胞存活率均下降且细胞坏死率显著增加。同时坏死关键调控因子 RIP1、RIP3 和 MLKL 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.001$),而 GAS5 干扰载体可有效抑制这一效果。【结论】LncRNA-GAS5 通过上调坏死相关因子 RIP1、RIP3 及 MLKL 的表达促进 BCG 感染巨噬细胞后诱导的细胞坏死,研究结果为进一步探讨 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染巨噬细胞后细胞坏死调控的分子机制奠定了基础。

关键词: LncRNA-GAS5, RAW264.7 细胞, 卡介苗, 细胞坏死

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31560322, 31760324, 31760326); Major Innovation Projects for Building First-class Universities in China's Western Region (ZKZD2017001); Leading Talents Cultivation Projects of Ningxia Science and Technology Innovation (KJT2017002); Graduate Innovation Project of Ningxia University (GIP2018043)

***Corresponding authors:** Tel: 86-951-2062812

E-mail: WU Xiao-Ling: nx_wuxiaol@163.com; DENG Guang-Cun: dgc@nxu.edu.cn

Received: 22-04-2018; **Accepted:** 24-06-2018; **Published online:** 18-07-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31560322, 31760324, 31760326); 西部一流学科建设重大创新项目(ZKZD2017001); 宁夏科技创新领军人才培养项目(KJT2017002); 宁夏大学研究生创新项目(GIP2018043)

***通信作者:** Tel: 0951-2062812;

E-mail: 吴晓玲: nx_wuxiaol@163.com; 邓光存: dgc@nxu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-22; **接受日期:** 2018-06-24; **网络首发日期:** 2018-07-18

Regulation of LncRNA-GAS5 on necrosis of macrophage induced by Bacillus Calmette-Guérin

XU Ya-Nan^{1,2} YU Jia-Lin^{1,2} MA Chen-Jie^{1,2} ZENG Jin^{1,2} WU Xiao-Ling^{*1,2}
DENG Guang-Cun^{*1,2}

1 Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western China, Yinchuan, Ningxia 750021, China

2 Life Science School, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China

Abstract: [Background] LncRNA-GAS5, a functional LncRNA that is encoded by Gas5 gene, plays an important role in the regulation of cell polarization, apoptosis, necrosis and autophagy. [Objective] To investigate the regulatory function of LncRNA-GAS5 on necrosis of macrophage RAW 264.7 induced by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) infection. [Methods] The overexpression plasmid and interference plasmid of LncRNA-GAS5 were constructed and transfected into macrophage RAW264.7. Furthermore, the both transfected macrophage were infected by BCG. The cell viability was detected by MTT assay. The morphological changes of necrosis were observed with transmission electron microscope and the necrosis rate was analyzed by flow cytometry. The expression of RIP1, RIP3 and MLKL in mRNA and protein level were determined by qRT-PCR and Western blot. [Results] The expression of LncRNA-GAS5 in macrophage RAW264.7 significantly increased after BCG infection. The cell viability decreased and cell necrosis rate increased significantly when macrophage was transfected with the LncRNA-GAS5 overexpression plasmid alone or combined with BCG infection. Meanwhile, the mRNA and protein expression levels of RIP1, RIP3 and MLKL were upregulated dramatically and this process can be inhibited by LncRNA-GAS5 interference plasmid. [Conclusion] LncRNA-GAS5 can promote necrosis of RAW264.7 infected with BCG by up-regulating necrosis associated factors such as RIP1, RIP3, and MLKL. The results lay foundation on further insight into the molecular mechanisms of macrophage necrosis induced by BCG infection.

Keywords: LncRNA-GAS5, RAW264.7, BCG, Cell necrosis

结核病(Tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌引发的重要的人畜共患呼吸道传染病。据世界卫生组织统计,2016 年全球约有 1.4 亿人感染结核病,致死率居传染病之首^[1]。尤其近年来,随着耐药结核及与人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)共感染患者增多,导致结核病疫情不断加剧^[2]。因此,探讨结核病预防及治疗的新手段与新方法已迫在眉睫。巨噬细胞与结核分枝杆菌相互作用过程十分复杂,当被结核分枝杆菌感染后,一方面巨噬细胞会启动自身的凋亡程序来清除胞内的结核分枝杆菌^[3];另一方面,结核分枝杆菌会通过多种方式逃避宿主的免疫应答,如抑制溶酶体与吞噬体的融合^[4]、MHC 分子的加工及阻止抗原呈递等抑制细胞凋亡,从而使 Mtb 在宿主体内存活^[5]。与此同时,随着结核分枝杆菌在细胞内不断

增殖,促进肿瘤坏死因子 α (TNF α)分泌,进而诱导巨噬细胞发生坏死,使结核分枝杆菌大量扩散和繁殖,最终导致机体结核病的发生^[6]。因此,通过调控结核分枝杆菌感染后其宿主细胞命运将为结核病的预防及新药研制提供新思路^[7],由于结核病致病机制复杂,受到多种因素调控。在众多调控因素中,长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA)的调控作用近年来受到广泛关注。已有报道证实,LncRNAs 作为长度大于 200 个核苷酸且无编码蛋白功能的内源性 RNA 分子,在多种疾病的发生发展过程中发挥了重要的调控作用^[8-9]。其中,LncRNAs 对细胞坏死的调控成为研究热点,而研究较多的是 LncRNA-GAS5 (生长抑制特异性转录物5)分子。研究表明,LncRNA-GAS5 最初是从 NIH 3T3 细胞中分离出来的^[10],该基因能够

编码一种与淋巴瘤相关的染色体位点(1q25), 从而对肿瘤的发生发挥重要的调控作用。此外还发现 LncRNA-GAS5 参与调控细胞坏死进程^[11]。Li 等研究发现, 当采用 LPS 刺激 ATDC5 软骨细胞时可下调 LncRNA-GAS5 的表达, 而过表达 LncRNA-GAS5 则有效减轻 LPS 诱导的细胞坏死, 提示其能够缓解 LPS 诱导的细胞损伤^[12]。Isin 等对 LncRNA-GAS5 在动脉粥样硬化斑块发育过程中的研究发现, 高表达的 LncRNA-GAS5 能促进 THP-1 细胞发生坏死^[13]。以上研究表明, LncRNA-Gas5 在多种疾病的发生发展过程中对细胞的坏死具有重要的调控作用。而结核分枝杆菌感染巨噬细胞导致的细胞坏死对结核病的发生发展具有重要的影响。因此, 探讨 LncRNA-Gas5 在结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用过程中对巨噬细胞坏死的调控作用, 对于进一步揭示其相互作用机制具有重要的意义。

基于以上研究背景, 本试验拟通过构建 LncRNA-GAS5 过表达载体和干扰载体 GAS5i 处理小鼠肺泡巨噬细胞 RAW264.7, 并同时用卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin, BCG)感染。通过研究 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染后巨噬细胞坏死率及坏死相关指标的变化规律, 揭示 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染小鼠巨噬细胞坏死的调控作用, 以期有助于进一步揭示结核分枝杆菌与巨噬细胞的相互作用机制。

1 材料与方法

1.1 菌株与细胞系

牛分枝杆菌疫苗株卡介苗(BCG), 上海生物制品研究所有限公司。采用 Difco™ Middlebrook 7H10 培养基对 BCG 进行复苏, 静置于 37 °C 培养箱中培养,

对数期挑菌转接至 Difco™ Middlebrook 7H9 液体培养基中, 静置于 37 °C 培养箱中, 每月传代一次。小鼠肺泡巨噬细胞(RAW264.7), 购自中科院上海细胞研究所, 采用含体积分数 10% 类胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的高糖 DMEM 培养液于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养 RAW264.7, 每 1-2 d 传代 1 次。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 胎牛血清(FBS), 以色列 Biological Industries 公司; Difco™ Middlebrook 7H10 培养基、Difco™ Middlebrook 7H9 培养基, BD 公司; MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、AnnexinVFITC/PI 双染试剂盒, 南京凯基科技发展有限公司; Western blot 一抗, Proteintech 公司; HRP 化学发光试剂盒, 北京原业伯乐生物发展科技有限公司。

1.3 引物

使用 Primer Premier 6.0 软件设计引物序列, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表 1。

1.4 质粒载体的构建与转化

1.4.1 质粒载体的设计

根据 LncRNA-GAS5 全长序列构建其过表达载体 pCDNA3.1-gas5-GFP; 同时, 通过生物信息学分析在 LncRNA-GAS5 上预测了 Gas5-mus-218、Gas5-mus-496、Gas5-mus-1715 和 Gas-mus-2087 共 4 个干扰位点, 进而以 pGPU6/GFP/NEO 为骨架构建 Gas5-218 干扰载体。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The sequences for the specific primers used in real time PCR

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
β-actin	AF: TGAGAGG-GAAATCGTGCGTGACAT AR: ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	151
RIP1	AF: GGAAAGGAAACGAAGGGTC AR: ATAGGCGGTTTAGATTTCG	229
RIP3	AF: GGGAGATGGAAGACACGG AR: GGTGGTCTTGATGACGGA	146
MLKL	AF: TCTCCCAACATCCTGCGTAT AR: TCCCGAGTGGTGTAAACCTGTA	195

LncRNA-GAS5 的干扰序列如下:

Gas5-mus-218 (sh1): 5'-GGTAGGGACAACCTG
AGCTTGT-3';

Gas5-mus-496 (sh2): 5'-GCAACTCAACAGTG
CCTATGT-3';

Gas5-mus-1715 (sh3): 5'-GGTCAGTACAAAG
GGACATGC-3';

Gas5-mus-2087 (sh4): 5'-GCTACCATCAGTAC
TAAATGG-3'.

1.4.2 质粒载体的转化

RAW264.7 细胞以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板培养皿中, 分别取 A、B 两支 1.5 mL 的 EP 管加入 100 μ L 的 OPTI-MEM。向 A 管中加入 LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent 转染试剂 3.75 μ L, 向 B 管中加入质粒 5 μ g, 分别轻轻混匀室温静置 5 min, 混合两管静置 15 min。将混合物加入六孔板中, 混匀放入培养箱中。

1.5 荧光定量 PCR 检测

1.5.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

参照北京天根生化科技有限公司总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。以提取的 RNA 为模板, 根据全式金 TransStart One-Stept cDNA Synthesis SuperMix 说明书配制荧光定量反应体系 20 μ L (反应体系详见全式金公司 cDNA 合成试剂盒), 反应结束后将 cDNA 置于 -20°C 或 -80°C 保存。

1.5.2 荧光定量 PCR 反应

根据全式金 TransStart Tip Green qPCR SuperMix 说明书, 配制 20 μ L 荧光定量 PCR 反应体系: Green qPCR Super Mix (2 \times) 10 μ L, Forward primer (100 μ mol/L) 1 μ L, Reverse primer (100 μ mol/L): 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, 灭菌双蒸水 7 μ L。混合均匀后, 荧光定量具体反应条件详见全式金公司(北京)荧光定量 PCR 试剂盒说明书。PCR 反应条件: 94°C 30 s; 94°C 5 s; 58°C 30 s, 40 个循环。

1.6 噻唑蓝比色法(MTT)检测 RAW264.7 细胞存活率

根据南京凯基 MTT 试剂盒检测说明书, 将

RAW264.7 细胞于 96 孔板中进行培养(1×10^4 个), 置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱培养过夜。根据实验设计将对照组和实验组进行处理, 每个对照组和处理组设 5 个复孔进行培养。处理结束后使用酶标仪在 490 nm 波长处检测每孔的 OD_{490} 值。以对照组 OD_{490} 值调零, 细胞存活率=(每孔 OD_{490} 值-本底 OD_{490} 值)/对照组 OD_{490} 值 $\times 100\%$, 实验重复 3 次后取平均值进行统计分析。

1.7 BCG 感染 RAW264.7 后细胞内超微结构观察

RAW264.7 细胞以 5×10^5 个/mL 接种于六孔板培养皿中按试验设计处理 24 h 后收集各处理组细胞, 使用超薄切片机切片后用 H-7650 透射电镜进行细胞超微结构观察, 具体实验流程参照文献[14]报道。

1.8 流式细胞仪检测

RAW264.7 细胞以 5×10^5 个/mL 接种于六孔板培养皿中处理 24 h, 用 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒检测细胞坏死率。待测各组细胞经消化和 PBS 洗涤后 1 000 r/min 离心, 弃上清, 将细胞重悬于 400 μ L 1 \times Binding buffer 中, 各加入 5 μ L Propidium Iodide Staining Solution (PI), 室温避光抚育 15 min, 用流式细胞仪检测细胞坏死率, 细胞坏死率为 PI 阳性占总细胞数量的百分比。

1.9 Western blot 检测

RAW264.7 细胞以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板培养皿中处理 24 h, 使用南京凯基全蛋白提取试剂盒提取蛋白, 用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜后进行 Western blot 检测, 分别测定 RIP1、RIP3、MLKL 以及 β -actin 的蛋白表达水平。

1.10 统计学处理分析

所有数据均采用 GraphPad Prism7.0 软件中的 One Way ANOVA 进行统计学分析, 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示。

2 结果与分析

2.1 BCG 感染 RAW264.7 细胞后 LncRNA-GAS5 的表达水平

荧光定量 PCR 结果显示, 与对照组相比,

BCG 感染 RAW264.7 后 LncRNA-GAS5 的表达量在感染早期呈现上调趋势, 在感染 12 h 时细胞 LncRNA-GAS5 表达量最高, 之后趋于下降 ($P < 0.0001$), 但其表达量仍显著高于对照组 (图 1A) ($P < 0.05$)。由此可见, BCG 感染会导致 RAW264.7 细胞 LncRNA-GAS5 的表达量发生上调, 且在 12 h 时表达量最高。

2.2 LncRNA-GAS5 干扰表达载体/过表达载体的验证

利用脂质体转染方法, 将 LncRNA-GAS5 过表

达载体和干扰表达载体分别转染到小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中, 24 h 后通过荧光显微镜观察转染效果 (图 1B)。经 Real-time PCR 方法验证过表达载体和干扰载体工作效率。如图 1D 所示, 过表达载体能够显著上调 LncRNA-GAS5 的表达水平 ($P < 0.0001$)。4 个干扰载体中, 除 sh2 外其他 3 个载体均能显著下调 LncRNA-GAS5 的表达水平 ($P < 0.0001$), 其中 sh1 对 LncRNA-GAS5 的干扰效果最好 (图 1C), 因此后续实验均采用 Gas5-mus-218 (sh1) 干扰质粒进行。

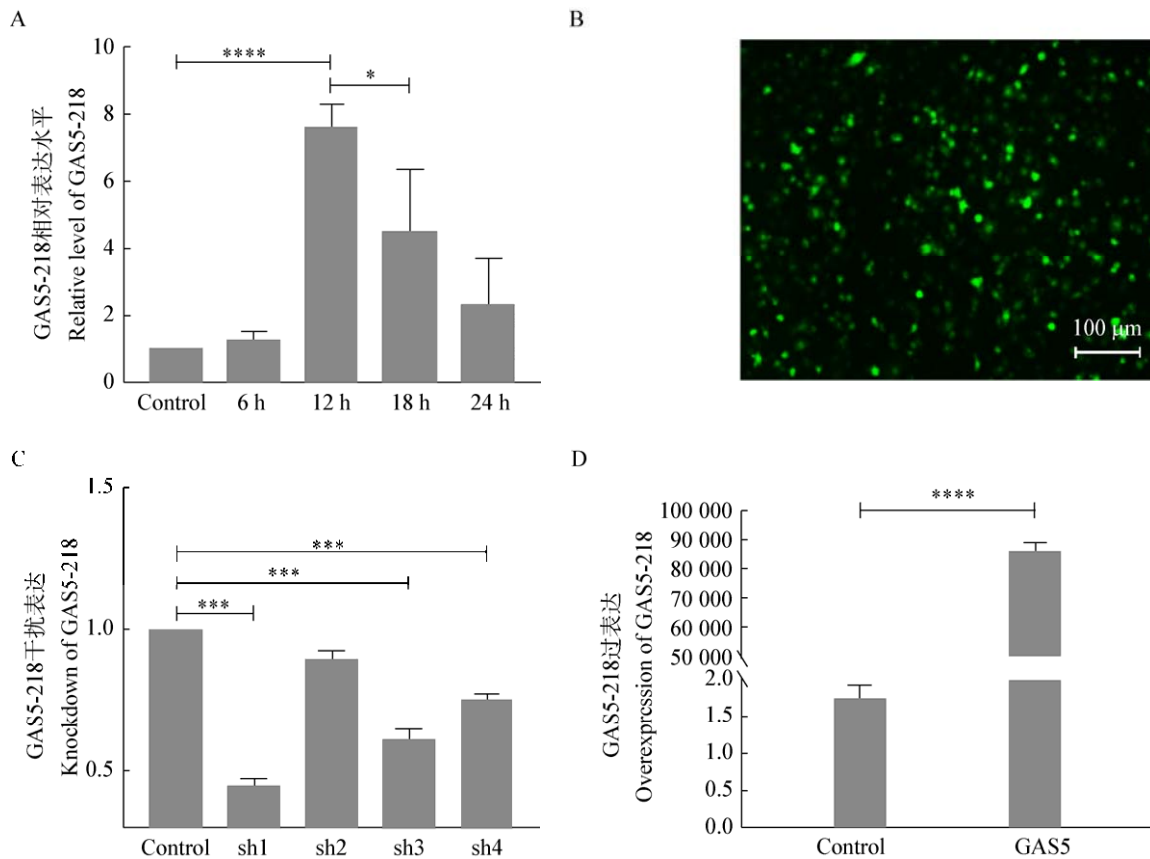


图 1 BCG 感染 RAW264.7 细胞后 LncRNA-GAS5 的表达

Figure 1 The expression of LncRNA-GAS5 in RAW264.7 cell with BCG infection

注: A: BCG 感染不同时间对巨噬细胞 RAW264.7 内 LncRNA-GAS5 表达量的影响; B: LncRNA-GAS5 转染效果图; C: LncRNA-GAS5 干扰质粒效果验证; D: LncRNA-GAS5 过表达质粒效果验证. *: $P < 0.05$, 差异显著; ***: $P < 0.001$, 差异极显著; ****: $P < 0.0001$, 差异极显著。

Note: A: The expression of LncRNA-GAS5 of RAW264.7 with BCG at different time; B: Transfection evaluation of LncRNA-GAS5; C: The effect of LncRNA-GAS5 interference plasmid on RAW264.7; D: The effect of LncRNA-GAS5 overexpression plasmid on RAW264.7. *: $P < 0.05$ mean significant difference; ***: $P < 0.001$ mean extremely significant difference; ****: $P < 0.0001$ mean extremely significant difference.

2.3 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染 RAW264.7 后细胞内超微结构观察

透射电镜观察结果(图 2A)表明, 未被感染细胞的结构完整, 细胞器超微结构正常; 而 GAS5 过表达处理后巨噬细胞出现大量空泡(图 2C), 这主要是由于巨噬细胞吞噬结核分枝杆菌后, 形成的吞噬泡, 这也是细胞坏死的特征之一^[15]。当 BCG 感染 RAW264.7 后, 细胞内出现多个空泡化线粒体, 胞质中可见杆状微生物, 细胞体积增大(图 2D); GAS5 干扰后细胞膜相对完整, 细胞器大小正常(图 2E); 如图 2F 所示, 过表达 GAS5 结合 BCG 感染后的巨噬细胞, 细胞膜完全崩解, 细胞出现明显空泡, 内容物溢出且溶酶体增多, 细胞呈坏死状态。由此可见, LncRNA-GAS5 能够加剧 BCG 感染后巨噬细胞的坏死进程。

2.4 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染 RAW264.7 后细胞存活率的影响

MTT 细胞存活率检测结果表明, 与对照组相比, BCG 感染后细胞存活率下降至 78.4%, 显著低于对照组($P<0.01$); GAS5 干扰后细胞存活率有所上升; 而过表达 GAS5 后细胞存活率仅为 64.2%,

显著低于 BCG 组($P<0.01$) (图 3H)。由此推断, BCG 感染巨噬细胞后 LncRNA-GAS5 具有促进细胞坏死的作用。

2.5 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染 RAW264.7 后细胞坏死率的影响

为了探究 LncRNA-GAS5 对被 BCG 感染的巨噬细胞坏死的影响, 采用双变量流式细胞仪 PI 染色处理对 6 个处理组细胞的坏死率进行检测, 由图 3 可知, 细胞分散在 4 个象限, 其中 PI 染色阳性细胞为左上和右上两个象限, 即为坏死细胞所占比例。将散点图的数据采用 GraphPad Prism7.0 软件绘制成柱形图后可以看出细胞的坏死率变化情况(图 3G), 如图 3B 所示, BCG 能够促进巨噬细胞发生坏死, 其坏死率达 54.2%; 而当 BCG 处理细胞结合 GAS5 干扰处理后, 细胞坏死率极显著低于 BCG 处理($P<0.000 1$) (图 3D), 这表明 BCG 诱导的细胞坏死可能是由于 GAS5 上调所致, 而过表达 GAS5 处理 BCG 感染的细胞坏死率显著高于 BCG 单独处理细胞, 达到 66.15% ($P<0.000 1$) (图 3F)。结果表明 LncRNA-GAS5 能够促进 BCG 感染的巨噬细胞发生坏死。

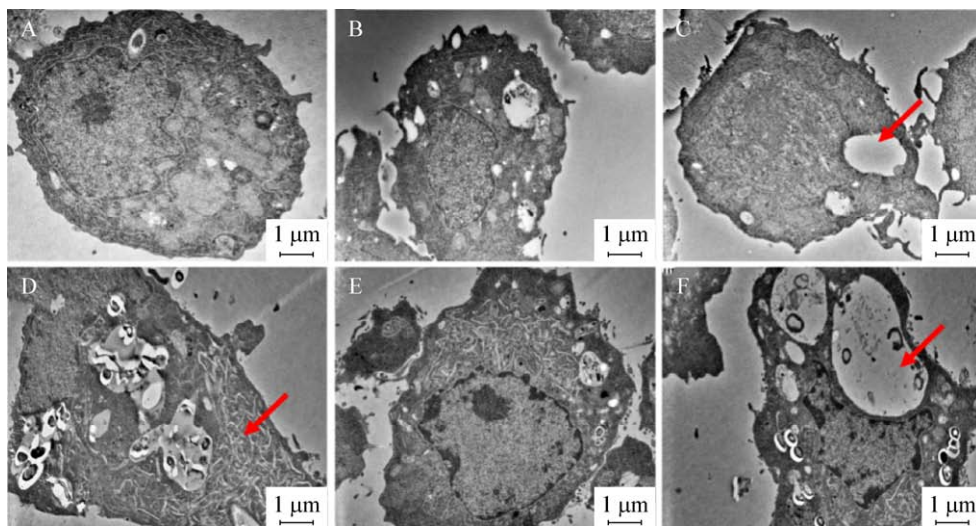


图 2 透射电子显微镜观察 BCG 感染巨噬细胞 RAW264.7 后细胞内超微结构

Figure 2 Observation of ultrastructure of RAW264.7 cells after BCG infection by transmission electron microscopy

注: A: 空白对照组; B: GAS5i处理组; C: GAS5过表达组; D: BCG处理组; E: GAS5i+BCG处理组; F: GAS5+BCG处理组。

Note: A: Control; B: GAS5i; C: GAS5; D: BCG; E: GAS5i+BCG; F: GAS5+BCG.

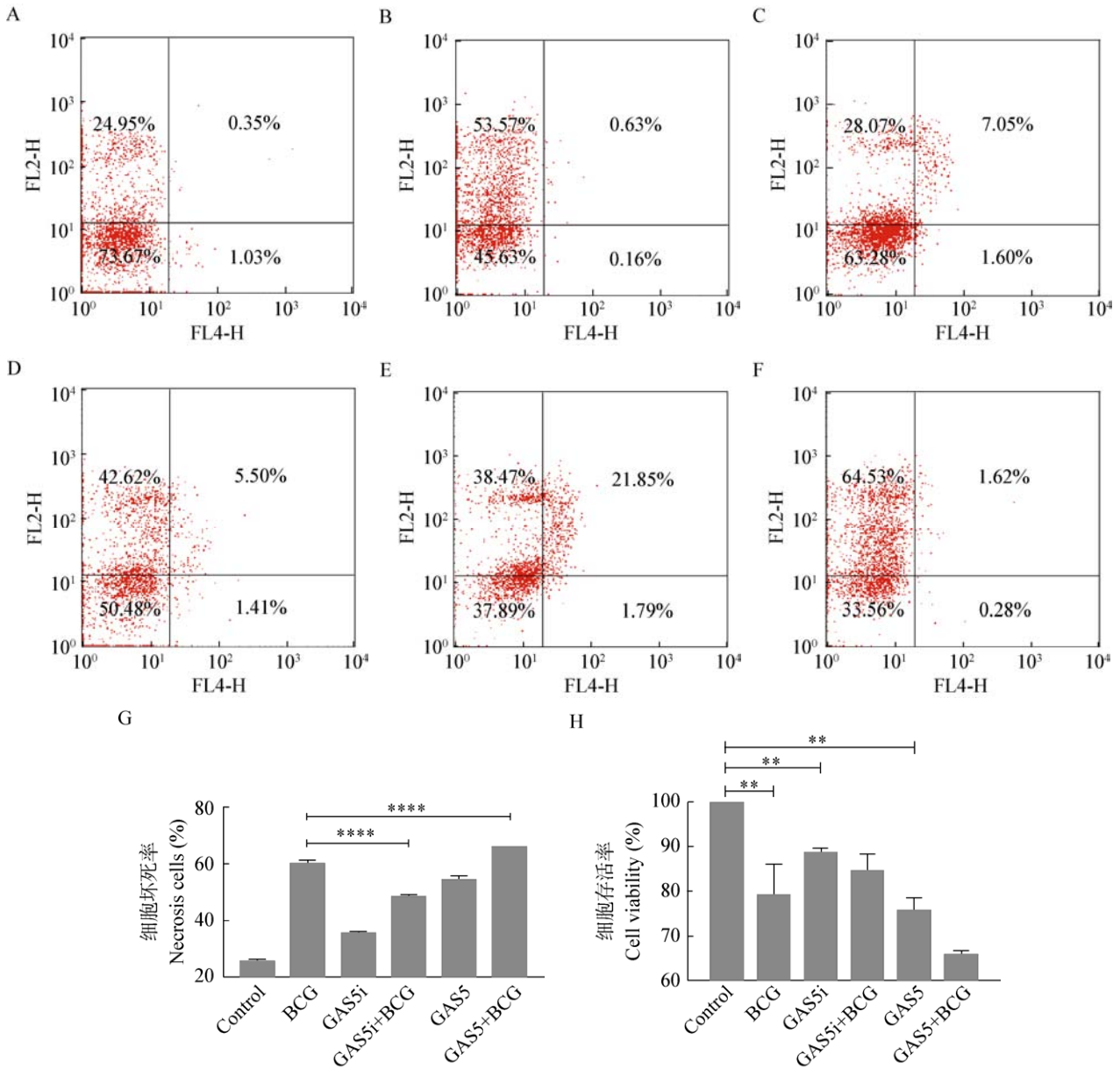


图3 LncRNA-GAS5对BCG感染巨噬细胞存活率的影响

Figure 3 Effects of LncRNA-GAS5 on the cell viability of RAW264.7 infected with BCG

注: A-F: 散点图; A: Control; B: BCG; C: GAS5i; D: GAS5i+BCG; E: GAS5; F: GAS5+BCG; G-H: 柱状图; G: 细胞坏死率; H: 细胞存活率. **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$.

Note: A-F: Scatter diagram; A: Control; B: BCG; C: GAS5i; D: GAS5i+BCG; E: GAS5; F: GAS5+BCG; G-H: Histogram; G: Necrosis cells; H: Cell viability. **: $P < 0.01$; ****: $P < 0.0001$.

2.6 LncRNA-GAS5对BCG感染后RAW264.7细胞坏死相关基因表达的调控作用

通过荧光定量PCR检测RIP1、RIP3及MLKL基因的mRNA转录水平,结果如图4所示。BCG感染RAW264.7细胞后,3种基因的mRNA转录水

平均发生上调;当干扰GAS5后RAW264.7这3种基因mRNA转录水平也发生下调;与此同时,过表达GAS5单独处理或是结合BCG处理RAW264.7细胞RIP1、RIP3及MLKL基因的mRNA转录水平均发生上调($P < 0.001$) (图4)。其中与预期不符的是

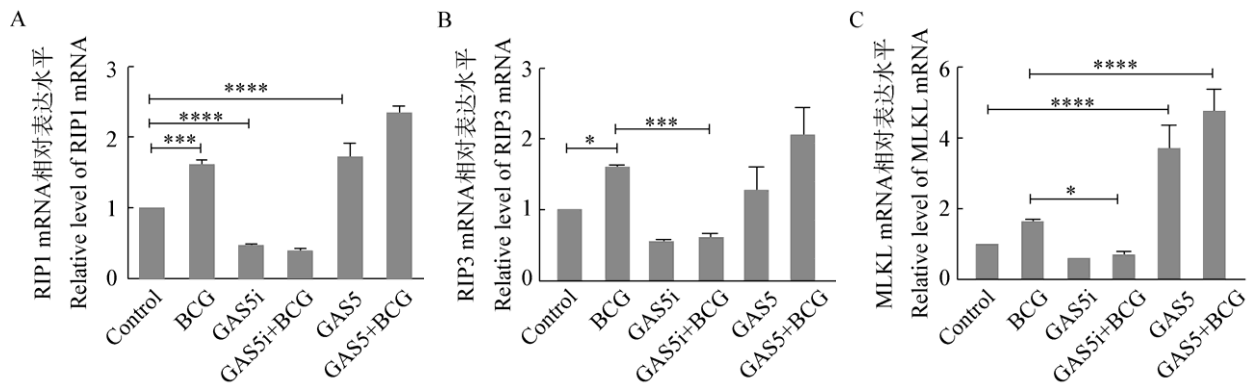


图 4 RIP1、RIP3 和 MLKL 在不同处理组中 mRNA 的表达量

Figure 4 The expression of RIP1, RIP3 and MLKL gene in different groups

注: A: RIP1 mRNA 表达量; B: RIP3 mRNA 表达量; C: MLKL mRNA 表达量. *: 差异显著 $P < 0.05$; ***: 差异极显著 $P < 0.001$; ****: 差异极显著 $P < 0.0001$.

Note: A: The expression of RIP1 gene; B: The expression of RIP3 gene; C: The expression of MLKL gene. *: Significant difference, $P < 0.05$; ***: Extremely significant difference, $P < 0.001$; ****: Extremely significant difference, $P < 0.0001$.

干扰 GAS5 并加入 BCG 后, RIP1 的 mRNA 转录水平发生下调, 这可能是由于基因表达调控层次较多, 而转录水平的调控只是其中的一个环节, 还有转录后调控和翻译及翻译后调控等都对于最后蛋白的表达起到一定作用, 但整体趋势与预期基本一致。表明 LncRNA-GAS5 可显著上调 BCG 感染后巨噬细胞坏死相关基因 RIP1、RIP3 及 MLKL 的 mRNA 转录水平。

2.7 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染巨噬细胞后坏死相关蛋白的调控作用

为了进一步验证上述相关 mRNA 转录后蛋白表达水平, 进一步通过 Western blot 检测 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染后巨噬细胞的几种坏死相关蛋白。结果如图 5 所示, 干扰 GAS5 后, 坏死通路蛋白 RIP1、RIP3 及 p-MLKL/MLKL 蛋白水平均显著下调 ($P < 0.0001$); 而过表达 GAS5 后蛋白 RIP1、RIP3 及 p-MLKL/MLKL 的表达水平均明显上调。表明 LncRNA-GAS5 是通过上调 BCG 感染后巨噬细胞的 RIP1、RIP3 及 p-MLKL 的表达水平而诱发巨噬细胞坏死。

3 讨论与结论

结核分枝杆菌是一种典型的胞内致病菌, 可经呼吸道途径感染宿主肺部。当结核分枝杆菌侵染宿

主细胞时, 巨噬细胞通常会出现凋亡(I 型程序性细胞死亡)、自噬(II 型程序性细胞死亡)及坏死(III 型程序性细胞死亡) 3 种死亡方式^[16], 这 3 种死亡方式对结核病的发生发展具有至关重要的作用。由于结核分枝杆菌内 ESX-1 毒力基因的存在, 可以加速巨噬细胞募集形成结核性肉芽肿, 利用新招募的巨噬细胞吞噬已被感染的巨噬细胞, 形成新的细菌生长位置, 当细胞发生坏死时会促进 Mtb 在宿主体内的繁殖和扩散^[17]。因此, 肉芽肿的形成及如何调控结核分枝杆菌感染巨噬细胞的坏死对结核分枝杆菌的扩散及结核病的预防与治疗具有重要的意义^[18]。

随着转录组学的发展, 人们发现 LncRNAs 在许多疾病中对宿主细胞坏死都发挥着关键调控作用。绝大多数 DNA 转录产物为编码能力极低或无编码能力的非编码 RNA (Non-coding RNA), 在表观遗传学调控、转录调控、转录后调控等多个层面调控蛋白编码基因的表达^[19]。由于近年来 LncRNAs 在许多疾病中对宿主细胞坏死过程起关键调控作用, 因此, 本研究深入探讨了 LncRNA-GAS5 对 BCG 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 坏死的调控作用。研究表明, BCG 可上调巨噬细胞中 LncRNA-GAS5 的表达量, 这可能是 BCG 诱导细胞坏死的原因之

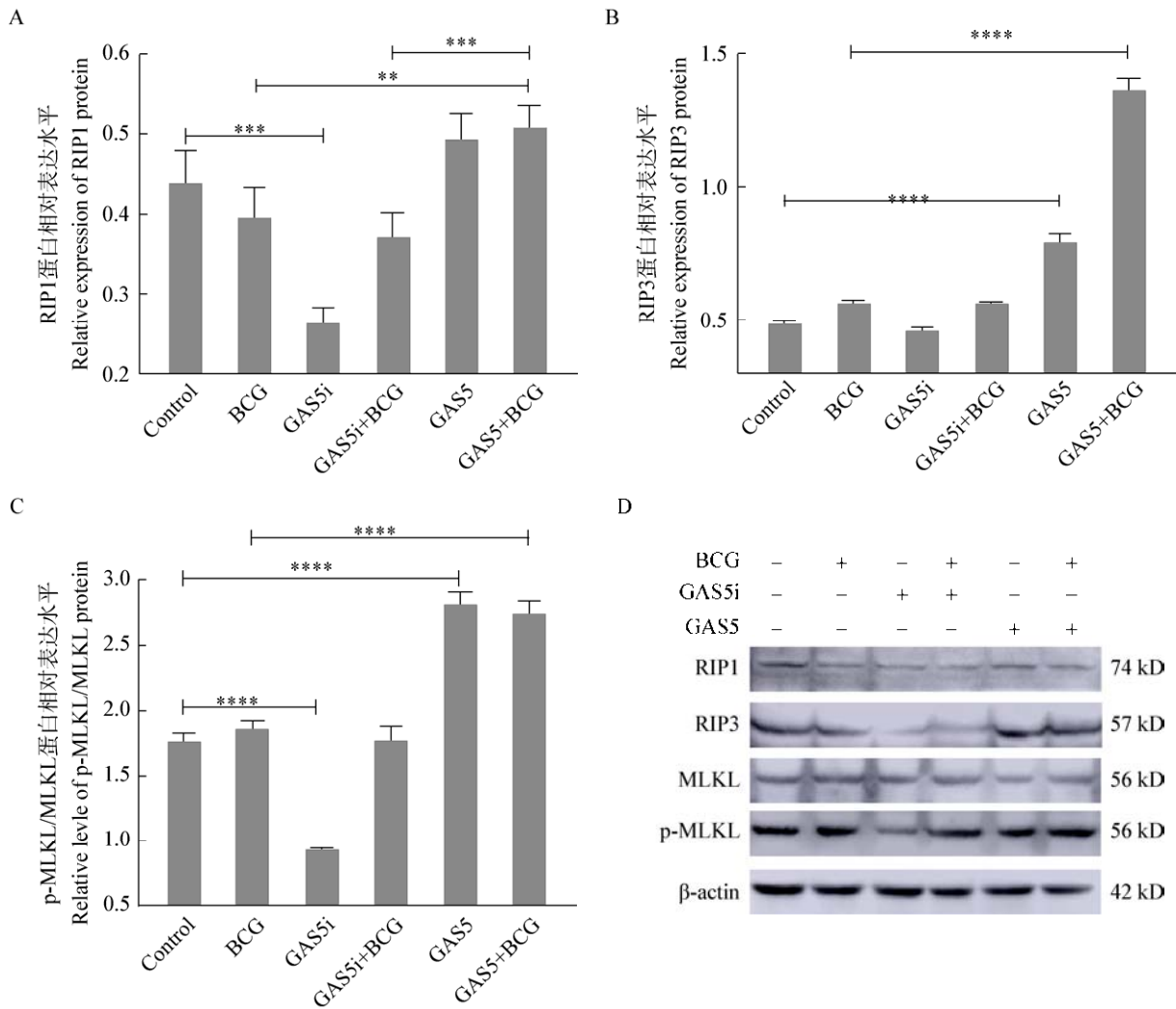


图5 Western blot 检测坏死相关蛋白的表达

Figure 5 The expression of necrosis related protein by Western blot

注: **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

Note: **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

一。进一步利用干扰和过表达 LncRNA-GAS5 载体,从细胞坏死率、细胞存活率及电镜显微结构观察等多方面验证了 LncRNA-GAS5 在 BCG 感染后巨噬细胞坏死的调控作用。如通过流式细胞仪检测发现干扰 LncRNA-GAS5 后细胞坏死率有所下降,反之过表达 LncRNA-GAS5 后细胞坏死率显著升高($P < 0.001$),这表明 LncRNA-GAS5 参与并调控了 BCG 感染巨噬细胞的坏死。前人研究表明 LncRNA-GAS5 对宿主细胞编程性死亡

(Programmed cell death, PCD)具有关键调控作用^[20],这与本实验结果基本一致。新近研究发现,过表达的 LncRNA-GAS5 能够显著降低 miR-21 的表达,进而调控心脏成纤维细胞的活化,成为研究心脏纤维化的新型治疗靶点^[21]。但是,也有 LncRNA 发挥相反的作用:如干扰 LncRNA-MALAT1 后可以显著改变磷酸化 p38MAPK 的水平,使得 MALAT1 诱导的细胞增殖被 p38MAPK 途径抑制剂或 p38siRNA 特异性阻断,对缓解糖尿病大鼠的视网

膜细胞坏死及炎症具有重要的调控作用,抑制 MALAT1 可能成为糖尿病相关病症潜在靶点^[22]; Lnc00176 仅在肝癌细胞(Hepatocellular carcinoma, HCC)中高表达,下调 HCC 中的 Lnc00176 后, Lnc00176 通过下调其靶 mRNA 破坏细胞周期并通过释放肿瘤抑制剂 miRNA 在 HCC 中诱导坏死^[23]。

结核分枝杆菌感染后巨噬细胞坏死的调控机制非常复杂。针对此问题本实验室前期研究发现, BCG 可以促进巨噬细胞发生坏死,并且经典 Wnt 信号的活化可以通过 ROS 介导的 PARP1-AIF 信号通路抑制 BCG 诱导的巨噬细胞发生坏死^[15],这为后续研究奠定了基础并提供了思路。除此之外, MLKL (混合谱系激酶结构域样)的磷酸化在 RIP1 (受体相互作用蛋白激酶 1)-RIP3 (受体相互作用蛋白激酶 3)介导的坏死途径中起到关键作用^[24]。RIP1 作为细胞凋亡与坏死之间的分子转换器,其过程在肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1)介导的信号传导方面的研究十分透彻^[25-26]。当 Caspase-8 活性被抑制时, RIP1 通过与 RIP 同型相互作用基序(RIP homotypic interaction motif, RHIM)介导的另一种激酶 RIPK3 相互作用,诱导 RIP3 的活化和磷酸化^[27-28]。MLKL 蛋白是一种拥有激酶结构域但无激酶功能的假激酶,作为 RIP3 的下游靶标^[29], MLKL 最终形成 RIP1/RIP3/MLKL 复合物并转移至质膜,最终导致细胞发生坏死^[30-31]。为了探索 RIP1、RIP3 和 MLKL 是否参与 LncRNA-GAS5 调控的细胞坏死,本研究通过 mRNA 水平及蛋白水平验证后发现,干扰 LncRNA-GAS5 后, RIP1、RIP3 及 MLKL 的 mRNA 水平及蛋白水平均发生下调,过表达后则显著上调($P < 0.0001$),这表明 LncRNA-GAS5 可能通过调控 RIP1 的表达量诱导 RIP3 产生,上调 3 种坏死相关蛋白的表达量,最终形成 RIP1/RIP3/MLKL 复合物,从而参与 BCG 诱导的细胞坏死过程。还有研究认为, LncRNA-GAS5 对细胞凋亡也具有重要的调控作用:如干扰 LncRNA-GAS5 能够减少用 oxLDL 处理的 THP-1 细胞的凋亡^[32];在 MMI 处理

的细胞中 LncRNA-GAS5 的表达量发生明显上调,从而抑制细胞发生凋亡^[33]。由于 LncRNA-GAS5 的功能多样性,其对细胞程序性死亡的作用机制尚不明确,还有待于进一步深入研究。探究 LncRNA-GAS5 对 BCG 感染小鼠巨噬细胞程序性死亡的调控作用将为揭示结核病的发病机制和结核病的治疗与预防提供新思路。

REFERENCES

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016[R]. World Health Organization, 2016
- [2] Bionghi N, Padayatchi N, Master I, et al. Bedaquiline and linezolid for the operational treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in a high burden HIV setting (BLIX Study)[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2017, 195: A3090
- [3] Zhang JM, Ma CJ, Zhao N, et al. Necrostatin-1 modulate the apoptosis induced by BCG in a macrophage cell line RAW 264.7[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24(10): 1552-1559 (in Chinese)
张嘉美, 马臣杰, 赵宁, 等. Necrostatin-1 对 BCG 感染后小鼠巨噬细胞 RAW264.7 凋亡的调控[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(10): 1552-1559
- [4] Dallenga T, Repnik U, Corleis B, et al. *M. tuberculosis*-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages[J]. Cell Host & Microbe, 2017, 22(4): 519-530. e3
- [5] Shiloh MU. Mechanisms of mycobacterial transmission: how does *Mycobacterium tuberculosis* enter and escape from the human host[J]. Future Microbiology, 2016, 11(12): 1503-1506
- [6] Zhao X, Khan N, Gan H, et al. Bcl-x L mediates RIPK3-dependent necrosis in *M. tuberculosis*-infected macrophages[J]. Mucosal Immunology, 2017, 10(6): 1553-1568
- [7] Wu XL, Deng GC, Hao XJ, et al. A caspase-dependent pathway is involved in Wnt/ β -catenin signaling promoted apoptosis in *Bacillus Calmette-Guérin* infected RAW264.7 macrophages[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(3): 5045-5062
- [8] Atianand MK, Hu WQ, Satpathy AT, et al. A long noncoding RNA lincRNA-EPS acts as a transcriptional brake to restrain inflammation[J]. Cell, 2016, 165(7): 1672-1685
- [9] Kleaveland B, Shi CY, Stefano J, et al. A network of noncoding regulatory RNAs acts in the mammalian brain[J]. Cell, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.05.022
- [10] Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells[J]. Cell, 1988, 54(6): 787-793
- [11] Nakamura Y, Takahashi N, Kakegawa E, et al. The GAS5 (growth arrest-specific transcript 5) gene fuses to BCL6 as a result of t(1;3)(q25;q27) in a patient with B-cell lymphoma[J]. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2008, 182(2): 144-149
- [12] Li F, Sun JG, Huang SL, et al. LncRNA GAS5 overexpression reverses LPS-induced inflammatory injury and apoptosis through

- up-regulating KLF2 expression in ATDC5 chondrocytes[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 45(3): 1241-1251
- [13] Isin M, Ozgur E, Cetin G, et al. Investigation of circulating lncRNAs in B-cell neoplasms[J]. Clinica Chimica Acta, 2014, 431: 255-259
- [14] Zhao QY, Wang XD, Sun XJ, et al. Light and transmission electron microscopic observation on the structure of zebrafish (*Danio rerio*) gill[J]. Chinese Journal of Zoology, 2018, 53(1): 92-98 (in Chinese)
赵巧雅, 王新栋, 孙雪婧, 等. 斑马鱼鳃的光镜和透射电镜观察[J]. 动物学杂志, 2018, 53(1): 92-98
- [15] Wu XL, Deng GC, Li M, et al. Wnt/ β -Catenin signaling reduces *Bacillus Calmette-Guerin*-induced macrophage necrosis through a ROS-mediated PARP/AIF-dependent pathway[J]. BMC Immunology, 2015, 16(1): 16
- [16] Castillo EF, Dekonenko A, Arko-Mensah J, et al. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(46): E3168-E3176
- [17] Berghe TV, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(2): 135-147
- [18] Pagán AJ, Yang CT, Cameron J, et al. Myeloid growth factors promote resistance to mycobacterial infection by curtailing granuloma necrosis through macrophage replenishment[J]. Cell Host & Microbe, 2015, 18(1): 15-26
- [19] Han BW, Chen YQ. Non-codingRNAs in autophagy modulation[J]. Chemistry of life, 2014, 34(4): 434-441 (in Chinese)
韩博炜, 陈月琴. 非编码 RNA 与细胞自噬调控[J]. 生命的化学, 2014, 34(4): 434-441
- [20] Pickard MR, Williams GT. The hormone response element mimic sequence of GAS5 lncRNA is sufficient to induce apoptosis in breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 10104-10116
- [21] Tao H, Zhang JG, Qin RH, et al. LncRNA GAS5 controls cardiac fibroblast activation and fibrosis by targeting miR-21 via PTEN/MMP-2 signaling pathway[J]. Toxicology, 2017, 386: 11-18
- [22] Liu JY, Yao J, Li XM, et al. Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus[J]. Cell Death & Disease, 2014, 5(10): e1506
- [23] Tran DDH, Kessler C, Niehus SE, et al. Myc target gene, long intergenic noncoding RNA, Linc00176 in hepatocellular carcinoma regulates cell cycle and cell survival by titrating tumor suppressor microRNAs[J]. Oncogene, 2018, 37(1): 75-85
- [24] Zhang YY, Su SS, Zhao SB, et al. RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome[J]. Nature Communications, 2017, 8: 14329
- [25] Wallach D, Kang TB, Dillon CP, et al. Programmed necrosis in inflammation: toward identification of the effector molecules[J]. Science, 2016, 352(6281): aaf2154
- [26] Newton K, Manning G. Necroptosis and inflammation[J]. Annual Review of Biochemistry, 2016, 85: 743-763
- [27] Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis[J]. Science, 2009, 325(5938): 332-336
- [28] Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase[J]. Cell, 2012, 148(1/2): 213-227
- [29] Zhao XM, Chen Z, Zhao JB, et al. Hsp90 modulates the stability of MLKL and is required for TNF-induced necroptosis[J]. Cell Death & Disease, 2016, 7(2): e2089
- [30] Radonjic-Hoesli S, Wang XL, de Graauw E, et al. Adhesion-induced eosinophil cytolysis requires the receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3)-mixed lineage kinase-like (MLKL) signaling pathway, which is counterregulated by autophagy[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017, 140(6): 1632-1642
- [31] Wang HY, Sun LM, Su LJ, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3[J]. Molecular Cell, 2014, 54(1): 133-146
- [32] Chen L, Yang WJ, Guo YJ, et al. Exosomal lncRNA GAS5 regulates the apoptosis of macrophages and vascular endothelial cells in atherosclerosis[J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185406
- [33] Wang TH, Chan CW, Fang JY, et al. 2-O-Methylmagnolol upregulates the long non-coding RNA, GAS5 and enhances apoptosis in skin cancer cells[J]. Cell Death & Disease, 2017, 8(3): e2638