

不同细胞因子对人小胶质细胞中 LncRNA BISPR 表达影响

张杰¹ 王栋泽³ 张晓雨¹ 王影影^{1,2} 龚明玉^{1*}

1 承德医学院生物化学教研室 2 河北省神经损伤与修复重点实验室 3 山东第一医科大学

DOI:10.12238/bmtr.v6i3.7510

[摘要] 目的:探讨lncRNA BISPR在经不同干扰素及炎症因子处理后的人小胶质细胞HMC3中的表达变化。方法:RT-qPCR检测经IFN- γ (10 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml)、IFN- α 2b(50 ng/ml)分别处理0、0.5、1、2、12、24h后的人小胶质细胞HMC3中lncRNA BISPR的表达水平,探讨BISPR对不同干扰素及炎症因子的应答情况。结果:BISPR表达均在IFN- γ 、TNF- α 、IFN- α 2b处理24h后显著升高($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$)。结论:BISPR在HMC3中可被IFN- γ 、TNF- α 、IFN- α 2b诱导表达,可能是小胶质细胞异常激活的关键靶点,参与了慢性神经退行性疾病的发生和发展。

[关键词] lncRNA BISPR; 人小胶质细胞HMC3; 炎症

中图分类号: Q244 文献标识码: A

Effects of different interferons and inflammatory factors on the expression of LncRNA BISPR in human microglia

Jie Zhang¹ Dongze Wang³ Xiaoyu Zhang¹ Yingying Wang^{1,2} Mingyu Gong^{1*}

1 Department of Biochemistry, Chengde Medical University

2 Hebei Key Laboratory of Nerve Injury and Repair 3 Shandong First Medical University, Jinan

[Abstract] Objective: To investigate the expression changes of lncRNA BISPR in human microglia HMC3 treated with different interferon and inflammatory factors. Methods: RT-qPCR was used to detect the expression level of lncRNA BISPR in human microglia HMC3 treated with IFN- γ (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) and IFN- α 2b(50 ng/ml) for 0, 0.5, 1, 2, 12, 24h, respectively, and to explore the response of BISPR to different interferons and inflammatory factors. Results: BISPR expression increased significantly after 24h treatment with IFN- γ , TNF- α and IFN- α 2b($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$). Conclusion: BISPR can be induced by IFN- γ , TNF- α and IFN- α 2b in HMC3, which may be the key target of abnormal activation of microglia and participate in the occurrence and development of chronic neurodegenerative diseases.

[Key words] lncRNA BISPR; microglia HMC3; inflammation

引言

小胶质细胞是中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)内常驻的免疫细胞,具有支持、营养、保护和修复神经等重要功能。正常情况下,小胶质细胞的存在有助于维持组织的稳态,但其过度活化则会损害周围的健康神经组织,导致炎症的产生,最终引起神经元的渐进性丧失^[1]。这种不受控制的炎症反应可能会引发各种神经退行性疾病,包括阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)等,并且小胶质细胞的异常激活还可能会影响抑郁症的发生和发展^{[2][3]}。因此,通过研究小胶质细胞来阐明其介导并调控相关慢性炎症的作用机制对临床中延缓慢性神经退行性疾病的进展具有重大意义。

长链非编码RNA(Long non-coding RNA, lncRNA)是长度大于200个核苷酸的非编码RNA。有研究表明,lncRNA主要与mRNA、

DNA、蛋白质和miRNA相互作用,进而以调控多种信号通路和分子成分的方式在表观遗传、转录、转录后、翻译和翻译后水平上调节基因表达,在包括AD和PD在内的神经退行性疾病的发病机制中发挥重要作用^{[4][5]}。lncRNA BISPR原名lncRNA BST2,因其位于骨髓基质细胞抗原2(BST2)基因附近且受IFN刺激正调节BST2的表达而更名为lncRNA BISPR^[6]。BST2蛋白通过控制病毒颗粒的释放或诱导宿主细胞凋亡参与抑制RNA病毒的复制,而充当BST2基因转录增强子的lncRNA BISPR可作为抗病毒lncRNA间接参与抗病毒反应的过程^[7]。另有相关实验证明,BISPR在甲状腺乳头状癌(TPC)组织中过度表达,敲低BISPR会抑制TPC细胞的增殖和侵袭性,进而使肿瘤形成率降低^[8]。虽然lncRNA BISPR可能参与了抗病毒反应,并且在一定程度上影响了肿瘤的发生和发展,但是其在慢性炎症方面的具体功能及作用机制仍未有

相关报道。本研究以小胶质细胞HMC3为研究对象,旨在探讨lncRNA BISPR在经不同干扰素及炎症因子处理后的小胶质细胞中的表达变化,为揭示lncRNA BISPR在小胶质细胞中参与慢性炎症的调控机制,乃至为慢性神经退行性疾病的治疗提供新的启示。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及主要试剂

小胶质细胞HMC3、MEM(含NEAA)基础培养基和特级胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司);RNAiso Plus(日本Takara公司);荧光定量PCR试剂盒(山东思科捷生物技术有限公司);IFN- γ 、IFN- α 2b、TNF- α (美国Peprotech公司)。

1.2 细胞培养

HMC3细胞在含10%特级胎牛血清、1%青霉素-链霉素的MEM(含NEAA)完全培养基,温度为37℃、5%CO₂条件下进行培养。

1.3 细胞分组与处理

用终浓度为10 ng/ml的IFN- γ 和TNF- α 分别处理HMC3细胞0、0.5、1、2、12、24h,检测各时间点BISPR及IDO-1的表达;用终浓度为50ng/ml的IFN- α 2b处理HMC3细胞0、0.5、1、2、12、24h,检测各时间点BISPR及ISG-15的表达。

1.4 RT-qPCR检测

按上述实验方法处理细胞,按说明书使用RNAiso Plus试剂提取和纯化细胞总RNA,使用逆转录试剂盒在等量RNA中逆转录出cDNA,并按照SYBR-Green PCR试剂盒说明书在CFX Connect™ Real-Time System进行RT-qPCR测定操作,反应程序:94℃3min;94℃10s,60℃30s,40个循环。GAPDH作为内参基因,采用2^{- Δ} Ct法计算。RT-qPCR所涉及的全部引物序列见表1。

表1 人源RT-qPCR引物序列与产物长度

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	上游: GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	89
	下游: TCGCCCCACTTGATTTTGA	
BISPR	上游: GCATTTCAAAGGAGCCAA	176
	下游: AAAAAAGCAACGGAACAGG	
IDO-1	上游: GCCCTTCAAGTGTTCACCAA	84
	下游: CCAGCCAGACAAATATATGCGA	
ISG15	上游: AGGAATAACAAAGGCGCAG	116
	下游: GTCAGCCAGAACAGGTCGTC	

1.5 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0.2对数据进行分析并制图,各实验均重复3次或3次以上且实验数据均以 $\pm$ s表示。RT-qPCR数据采用单因素方差分析,以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 RT-qPCR检测经IFN- γ 处理不同时间后的HMC3中BISPR及IDO-1的表达水平

HMC3经IFN- γ (10 ng/mL)处理0、0.5、1、2、12、24h后,BISPR的表达呈现先升后降再升的趋势,在IFN- γ 处理24h后显著升高

(P<0.001);HMC3执行免疫抑制力的关键因子IDO-1则在IFN- γ 处理12h、24h后显著升高(P<0.05,P<0.001)(图1)。

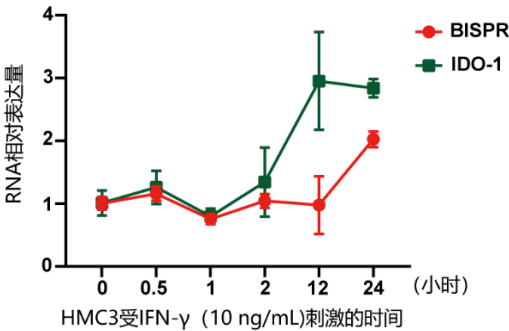


图1 BISPR、IDO-1在经IFN- γ 处理不同时间后的HMC3细胞中的表达水平

2.2 RT-qPCR检测经TNF- α 处理不同时间后的HMC3中BISPR及IDO-1的表达水平

HMC3经TNF- α (10ng/mL)处理0、0.5、1、2、12、24h后,BISPR的表达呈现先降后升的趋势,在TNF- α 处理24h后显著升高(P<0.001);HMC3执行免疫抑制力的关键因子IDO-1则在TNF- α 处理12h、24h后显著升高(P<0.01,P<0.01)(图2)。

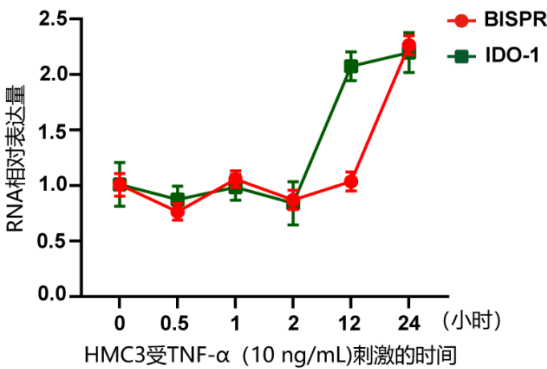


图2 BISPR、IDO-1在经TNF- α 处理不同时间后的HMC3细胞中的表达水平

2.3 RT-qPCR检测经IFN- α 2b处理不同时间后的HMC3中BISPR及ISG15的表达水平

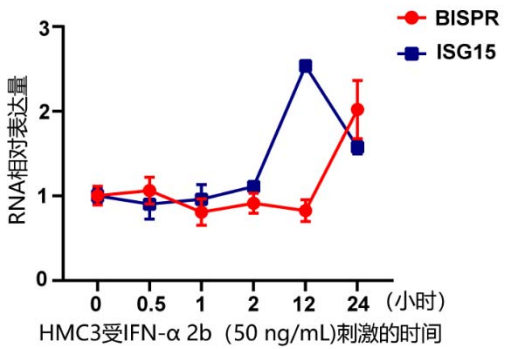


图3 BISPR、ISG15在经IFN- α 2b处理不同时间后的HMC3细胞中的表达水平

HMC3经IFN- α 2b(50 ng/mL)处理0、0.5、1、2、12、24h后,BISPR的表达也呈现先升后降再升的趋势,在IFN- α 2b处理24h后显著升高($P<0.01$);HMC3执行免疫抑制力的关键因子ISG15则在IFN- α 2b处理12h、24h后显著升高($P<0.01$, $P<0.05$)(图3)。

3 讨论

近些年来,人们对小胶质细胞及其导致的炎症在神经退行性疾病中的作用认识稳步增加,越来越多的证据表明,小胶质细胞的异常激活及分泌参与了阿尔茨海默病(AD)或帕金森病(PD)等慢性神经退行性疾病的发生及发展^{[9][10]}。

长链非编码RNA(lncRNA)是一种功能性的RNA分子,缺乏编码能力,但可以通过多种机制积极调节mRNA的表达和功能,有相关研究表明,lncRNAs在小胶质细胞中高度表达,是神经炎症的潜在介质^[11]。lncRNA BISPR作为lncRNAs中的一员,参与了多种疾病的发生和发展。如BISPR在子宫内膜不典型增生组织中的表达显著升高,BISPR的上调促进了子宫内膜癌的发生、发展^[12];BISPR表达上调会抑制miR-21-5p表达,从而促进TPC细胞的发育^[8];BISPR在原发性Sjögren综合征(PSS)患者体内异常表达,可能通过NF- κ B、JAK/STAT等信号通路参与PSS的发病机制^[13]。

本研究通过RT-qPCR检测经不同炎症因子和干扰素处理后,人小胶质细胞HMC3中BISPR的表达。结果显示,经IFN- γ 、TNF- α 、IFN- α 2b处理24h后,HMC3中BISPR表达均显著升高。综上所述,BISPR在HMC3中可被IFN- γ 、TNF- α 、IFN- α 2b诱导表达,并且没有表现出快速应答,不属于超早期基因,提示BISPR可能是小胶质细胞异常激活的关键靶点,与神经系统炎症密切相关,并参与了慢性神经退行性疾病的发生和发展。

[基金项目]

承德医学院高层次人才科研启动基金(项目编号:202107);河北省高等学校科学研究青年基金(项目编号:QN2023005)。

[参考文献]

- [1]Subhramanyam CS,Wang C,Hu Q,etal.Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 2019;94:112-120.
- [2]Singh D.Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*,2022;19(1):206.
- [3]Wang H, He Y, Sun Z, et al. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. *J Neuroinflammation*,2022;19(1):132.
- [4]Zhang X, Wang W, Zhu W, et al. Mechanisms and Functions

of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *Int J Mol Sci*,2019;20(22):5573.

[5]Sivagurunathan N, Ambatt ATS, Calivarathan L. Role of Long Non-coding RNAs in the Pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Curr Aging Sci*,2022;15(2):84-96.

[6]Barriocanal M, Carnero E, Segura V, et al. Long Non-Coding RNA BST2/BISPR is Induced by IFN and Regulates the Expression of the Antiviral Factor Tetherin. *Front Immunol*, 2015;5:655.

[7]Enguita FJ, Leitão AL, McDonald JT, et al. The interplay between lncRNAs, RNA-binding proteins and viral genome during SARS-CoV-2 infection reveals strong connections with regulatory events involved in RNA metabolism and immune response. *Theranostics*,2022;12(8):3946-3962.

[8]Zhang H, Cai Y, Zheng L, et al. lncRNA BISPR promotes the progression of thyroid papillary carcinoma by regulating miR-21-5p. *Int J Immunopathol Pharmacol*,2018;32:2058738418772652.

[9]Chou V, Pearse RV 2nd, Aylward AJ, et al. INPP5D regulates inflammasome activation in human microglia. *Nat Commun*,2023;14(1):7552.

[10]Schlotterose L, Pravdivtseva MS, Ellermann F, et al. Resveratrol Mitigates Metabolism in Human Microglia Cells. *Antioxidants (Basel)*,2023;12(6):1248.

[11]Yang R,Yang B,Liu W,etal.Emerging role of non-coding RNAs in neuroinflammation mediated by microglia and astrocytes. *J Neuroinflammation*,2023;20(1):173.

[12]Hao C, Lin S, Liu P, et al. Potential serum metabolites and long-chain noncoding RNA biomarkers for endometrial cancer tissue. *J Obstet Gynaecol Res*,2023;49(2):725-743.

[13]Peng Y,Luo X,Chen Y, et al. lncRNA and mRNA expression profile of peripheral blood mononuclear cells in primary Sjögren's syndrome patients. *Sci Rep*,2020;10(1):19629.

作者简介:

张杰(1997--),男,汉族,中国河北邯郸人,在读硕士,从事慢性神经退行性疾病研究。

通讯作者:

龚明玉(1973--),女,满族,中国河北承德人,医学博士,教授,从事神经系统疾病及肿瘤等疾病的致病基因及分子机制研究。