

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001488

3-O-C₁₂-HSL 阻碍 Mo-DCs 成熟过程中 lncRNA 表达谱的变化

李有强¹, 张云燕², 陈 茶¹, 徐建华¹, 罗燕芬¹, 肖 倩¹, 李 沫¹, 李启伟¹

(1. 广州中医药大学第二临床医学院检验医学部, 广州 501180;

2. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心口腔科, 广州 501180)

【摘要】目的:观察铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)分泌的信号分子 N-3-氧代十二烷酰-L-同型丝氨酸内酯(N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone, 3-O-C₁₂-HSL)阻碍单核细胞来源的树突细胞(monocytes derived-dendritic cells, Mo-DCs)成熟过程中长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)表达谱的变化情况。**方法:**采用免疫磁珠法分选人外周血 CD14+单核细胞,经重组人粒-单核细胞集落刺激因子和重组人白细胞介素-4 诱导分化为 Mo-DCs。不同因素处理 Mo-DCs,实验组加入终浓度 0.1 μg/mL 的 LPS 和终浓度为 40 μmol/L 的 3-O-C₁₂-HSL,对照组加入相应体积的含 0.1% DMSO 的 PBS,模型组加入终浓度 0.1 μg/mL 的 LPS。利用 lncRNA 芯片技术检测对照组、模型组和实验组间 lncRNA 表达谱的差异。对筛选数据进行分析处理,利用散点图分析 2 倍以上差异 lncRNA 在各处理因素间的总体变异情况,利用聚类分析研究表达差异 5 倍以上 lncRNA 的聚类情况。**结果:**与对照组和模型组相比较,实验组筛选出 2 倍以上表达差异的 lncRNA 为 1 386 条,其中上调表达的 548 条,下调表达的 838 条。筛选出具有 5 倍以上表达差异的 lncRNA 共 153 条,占 2 倍表达差异 lncRNA 的 11.04%,其中上调表达的 22 条,下调表达的 131 条。散点图发现 2 倍表达差异的 lncRNA 总体分布呈集中趋势,存在特征性改变。聚类分析发现 5 倍表达差异的 lncRNA 能根据处理因素进行有效的分层聚类。结合 GO 分析和 mRNA 通路分析,差异 lncRNA 的相关基因可富集至 PPAR 信号通路、钙信号通路和 NF-κB 信号通路中。**结论:**3-O-C₁₂-HSL 作用于 Mo-DCs 后,lncRNA 表达谱发生了特征性变化,表达差异的 lncRNA 可能参与了 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 Mo-DCs 成熟过程。

【关键词】N-3-氧代十二烷酰-L-同型丝氨酸内酯;单核细胞来源树突细胞;长链非编码 RNA**【中图分类号】**R737.14**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-07-06

Differential expression profile of long non-coding RNA in 3-O-C₁₂-HSL-inhibited Mo-DCs maturation

Li Youqiang¹, Zhang Yunyan², Chen Cha¹, Xu Jianhua¹, Luo Yanfen¹, Xiao Qian¹, Li Mo¹, Li Qiwei¹

(1. Department of Laboratory Medicine, The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine; 2. Department of Stomatology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University)

【Abstract】Objective: To analyze the expression profile variation of long non-coding RNA(lncRNA) in 3-O-C₁₂-HSL-inhibited Mo-DCs maturation. **Methods:** Human CD14+ monocytes were separated by immunomagnetic beads and induced by hIL-4 and hGM-CSF. Experimental group was stimulated with 40 μmol/L 3-O-C₁₂-HSL and 0.1 μg/mL LPS; control group was stimulated with 0.1% DMSO and model group was stimulated with 0.1 μg/mL LPS. lncRNA chip was used to analyze the differential expression among control

作者介绍: 李有强, Email: liyouqiang21@126.com,

研究方向: 病原微生物的感染与免疫机制。

通信作者: 陈 茶, Email: chenchacha906@163.com。

基金项目: 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81601736); 广东省科技计划资助项目(编号: 2013B021800241, 2014A020212267, 2014A020212274); 广东省自然科学基金资助项目(编号: 2015A030310291); 广东省医学科研基金资助项目(编号: B2014182); 广东省中医院转化医学专项(编号: YN2014ZHR201); 广州中医药大学优秀青年基金资助项目(编号: 2013KT1478)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180109.1122.042.html>
(2018-01-09)

group, model group and experimental group. Significant differential lncRNA ($P < 0.05$) was analyzed and scatter plot was used to study the variance in 2 times differential lncRNA. Clustering analysis was used to study the 5 times differential lncRNA. **Results:** Comparing with those of control group and model group, 1 386 lncRNA which have more than 2 times variation and significant differences by statistical analysis were selected out, including 548 up-regulated lncRNA and 838 down-regulated lncRNA. Meantime, 153 lncRNA accounting for 11.04% of all differential lncRNA had more than 5 times variation in difference groups. Characteristic change were displayed among 2 times

differential lncRNA in scatter plot analysis. The hierarchical clustering results displayed that 5 times lncRNA clustering efficient in different groups. According to GO analysis and mRNA pathway analysis, PPAR signaling pathway, calcium signaling pathway and NF- κ B signaling pathway were enriched with differential lncRNA associated genes. **Conclusion:** lncRNA displaying characteristic change may involve in 3-O-C₁₂-HSL-inhibited Mo-DCs maturation.

[Key words] long non coding RNA; N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone; monocytes derived-dendritic cells

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是常见的医院获得性病原菌^[1],调节宿主免疫细胞功能是PA免疫逃逸的重要途径。本课题组前期发现PA分泌的信号分子N-3-氧代十二烷酰-L-同型丝氨酸内酯(N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone, 3-O-C₁₂-HSL)可阻碍单核细胞来源的树突细胞(monocytes derived-dendritic cells, Mo-DCs)成熟,介导免疫逃逸^[2],但具体机制尚未完全明确。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可调控DCs的成熟与功能。DCs的成熟过程与众多基因的表达水平和细胞增殖分化密切相关^[3],而lncRNA可在基因转录及转录后水平调控基因表达水平,调节细胞的增殖与分化^[4]。因此,不难推测lncRNA可调控DCs的成熟与功能。为此,本研究探讨了3-O-C₁₂-HSL在阻碍Mo-DCs成熟过程中lncRNA表达谱的变化情况。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Trizol、PRIM 1640和胎牛血清均购自Life公司。人白细胞介素-4(human interleukin-4, hIL-4)和人粒单核细胞集落刺激因子(human granulocyte monocyte colony stimulating factor, hGM-CSF)购自Peprotech公司。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和3-O-C₁₂-HSL购自Sigma公司, FITC-CD14、FITC-CD1a购自eBioscience公司。抗人CD14磁珠购自BD公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人Mo-DCs的诱导和培养 取健康人外周血100 mL,密度梯度离心法获得单个核细胞,加入抗人CD14⁺免疫磁珠,孵育后上磁架分选CD14⁺单核细胞,流式细胞术鉴定后加入完全培养基,终浓度500 U/mL的hIL-4和500 U/mL的hGM-CSF。3 d后半量换液,5 d后收获不成熟Mo-DCs。

1.2.2 Mo-DCs的分组与处理 分为对照组、模型组和实验组3个组。对照组加入相应体积的含0.1% DMSO的PBS,模型组加入终浓度0.1 μ g/mL的LPS。实验组在加入终浓度0.1 μ g/mL的LPS后,加入终浓度为40 μ mol/L的3-O-C₁₂-

HSL。

1.2.3 样品总RNA抽提与检测 收获处理24 h后的Mo-DCs,酚氯仿抽提法提取细胞总RNA。分光光度法测定总RNA在230 nm、260 nm和280 nm的吸光度(absorbance, A)值,琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性。

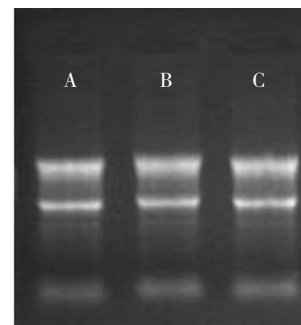
1.2.4 cDNA样品合成、标记和杂交 逆转录合成双链互补cDNA,选择Arraystar公司的lncRNA芯片,利用Arraystar RNA Flash Labeling试剂盒对双链互补DNA进行标记,标记后使用Agilent SureHyb进行排列杂交,然后清洗去除未结合探针。

1.2.5 图像采集和数据分析 芯片扫描仪Agilent DNA Microarray Scanner扫描芯片的荧光强度,然后将扫描图像输入Agilent Feature Extraction(v11.0.1.1)软件进行网格对齐与表达数据分析。通过分位数标准化以及Agilent GeneSpring GX(v12.1)软件将表达数据进行标准化,最后利用Agilent GeneSpring GX(v12.1)软件分析杂交结果,采用欧式距离法进行聚类分析中的距离度量。

2 结果

2.1 样品总RNA质检

琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,可以检测到清晰的28 S和18 S条带,28 S的亮度大约是18 S的2倍,说明RNA没有明显的降解。分光光度计检测总RNA的质量和 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 值 ≥ 1.8 ,在要求的1.8~2.1范围内,表明各组总RNA纯度良好,可以进行探针标记。图1为总RNA的琼脂糖凝胶电泳图,表1为总RNA的纯度和质量检测结果。



A:实验组总RNA;B:模型组总RNA;C:对照组总RNA

图1 总RNA的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

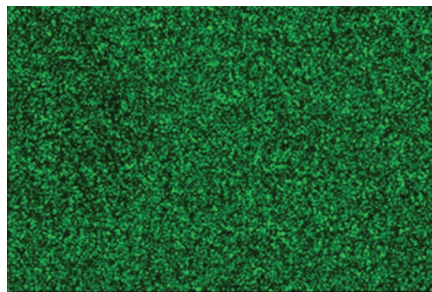
表 1 总 RNA 质量与纯度分析

Tab.1 Quality and purity of total RNA

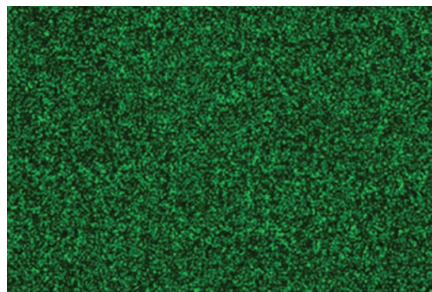
实验 分组	A _{260nm} /A _{280nm} 值	A _{260nm} /A _{230nm} 值	浓度 (ng/μL)	体积 (μL)	总质量 (ng)
对照组	1.87	1.92	338.46	10	3 384.60
模型组	1.84	1.81	291.92	10	2 919.20
实验组	1.80	1.81	276.91	10	2 769.10

2.2 芯片杂交结果

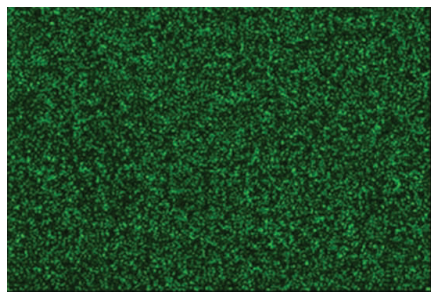
lncRNA 芯片技术筛选出 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 Mo-DCs 成熟过程中 2 倍以上表达差异的 lncRNA 有 1 386 条,其中上调表达的 548 条,下调表达的 838 条。筛选出具有 5 倍以上表达差异的 lncRNA 共 153 条,占有表达差异 lncRNA 的 11.04%,其中上调表达的 22 条,下调表达的 131 条,表明 3-O-C₁₂-HSL 处理因素下 lncRNA 的表达谱存在明显变化。图 2 为 lncRNA 表达芯片扫描图,表 2 为表达差异最为明显的 10 条 lncRNA。



A. 对照组



B. 模型组



C. 实验组

图 2 lncRNA 表达芯片扫描图

Fig.2 Scanner of the lncRNA expression chip

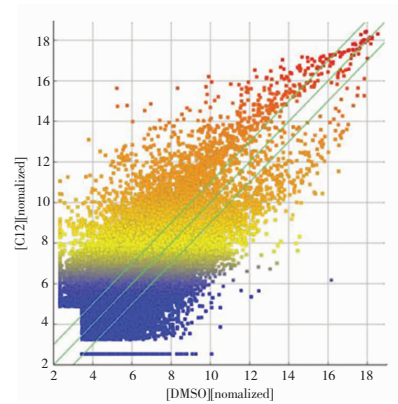
表 2 表达差异最为明显的 10 条 lncRNA

Tab.2 The most obvious differences in the expression of the 10 lncRNA

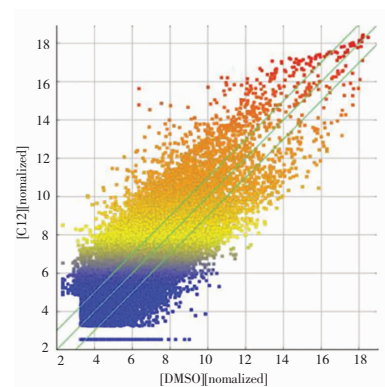
lncRNA 名称	变化倍数		变化 方式	长度 (bp)	定位
	实验组/ 模型组	对照组/ 模型组			
ENST00000418134	30.39	5.81	上调	650	chr6
NR_027779	28.66	11.72	上调	1877	chr22
ENST00000577750	26.97	10.99	上调	681	chr17
ENST00000578023	16.53	7.35	上调	681	chr17
ENST00000433770	16.10	22.28	上调	347	chr10
ENST00000497961	0.04	0.19	下调	562	chrX
ENST00000556964	0.03	0.15	下调	3 034	chr14
ENST00000565297	0.03	0.02	下调	2 994	chr8
ENST00000569655	0.02	0.07	下调	1 151	chr17
NR_038863	0.01	0.03	下调	2 764	chr6

2.3 表达差异 lncRNA 的散点图分析

散点图分析表达差异 2 倍以上的 lncRNA 变化情况,结果发现表达差异的 lncRNA 总体分布呈集中趋势,存在特征性改变,结果如图 3 所示。



A. 实验组相对于对照组的 lncRNA 散点图



B. 实验组相对于模型组的 lncRNA 散点图

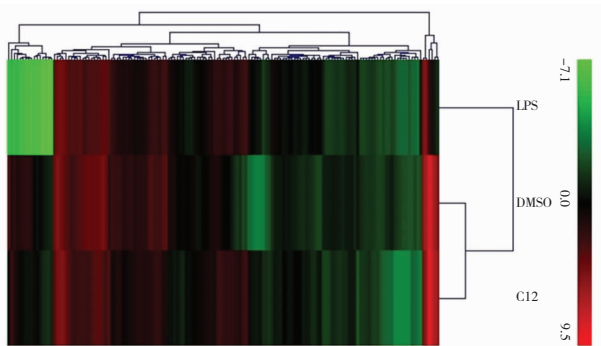
图中上下绿线分别表示表达上调和下调 2 倍的 lncRNA

图 3 差异 lncRNA 的散点图

Fig.3 Scatter plot of differential lncRNA

2.4 表达差异 lncRNA 的聚类分析

聚类分析不同处理因素间表达差异 5 倍以上的 lncRNA 和相关的基因表达,发现基于表达差异的 lncRNA 能根据处理因素进行有效的分层聚类,结果如图 4 所示。结合 GO 分析和 mRNA 的通路分析,差异 lncRNA 的相关基因可富集至 PPAR 通路、钙通路和 NF- κ B 信号通路中。



图中红色代表高表达,黑色代表中等表达,绿色代表低表达
第 1 行为对照组,第 2 行为模型组,第 3 行为实验组

图 4 5 倍以上表达差异 lncRNA 的分层聚类图

Fig.4 Hierarchical clustering graph with 5 times lncRNA

3 讨论

3-O-C₁₂-HSL 是 PA 密度感应系统分泌的一种信号分子,可调节 PA 的耐药、毒力因子的表达和宿主免疫功能,在 PA 的致病和耐药过程中均发挥重要作用^[5]。陆续有研究表明 3-O-C₁₂-HSL 可调节人体多种免疫细胞功能,如淋巴细胞^[6]和中性粒细胞^[7]。我们前期研究也发现 3-O-C₁₂-HSL 可阻碍 Mo-DCs 成熟,与 PA 介导的免疫逃逸有关^[2],但 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 Mo-DCs 成熟的具体分子机制尚在探索阶段。

Mo-DCs 的成熟状态和功能与众多基因的表达水平和细胞增殖分化密切相关,而 lncRNA 又可在基因的转录及转录后水平调控基因的表达,调节细胞的增殖和分化。因此,本研究检测了在 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 Mo-DCs 成熟过程中 lncRNA 的表达水平,共筛选出具有 2 倍以上表达差异的 lncRNA 共 1 386 条,其中上调表达的 548 条,下调表达的 838 条。具有 5 倍以上表达差异的 lncRNA 共 153 条,占所有表达差异 lncRNA 的 11.04%,其中上调表达的 22 条,下调表达的 131 条。表明实验组与模型组和对照组间 lncRNA 表达谱的差异存在统计学意义。在 3-O-C₁₂-HSL 处理的实验组,lncRNA 呈现出表达的上调和下调,提示这些表达变化的 lncRNA 参与 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 LPS 介导的 Mo-DCs 成熟过程。

lncRNA 是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,在真核细胞中普遍表达,lncRNA 本身并不编

码蛋白质,而是以 RNA 的形式在多种层面上调控基因的表达水平,在细胞增殖分化和细胞周期等众多生命活动中发挥重要作用^[8-9]。lncRNA 调控基因的表达所涉及的层面包括转录调控,翻译水平的调控和表观遗传调控,调控的方式包括染色体修饰、转录激活或干扰等^[10-11]。

lncRNA 在调控免疫细胞功能和分化方面发挥重要作用。芯片分析小鼠脾脏初始 T 细胞和记忆 CD8⁺ T 细胞 lncRNA 表达谱发现有 96 条 lncRNA 只在特定组织或细胞中表达,81 条在效应细胞活化过程中表达发生变化^[12],提示 lncRNA 在细胞分化和活化过程中均发挥枢纽作用。然而,目前只有小部分 lncRNA 的功能和作用机制得到证实,绝大多数 lncRNA 的功能和作用机制尚不完全清楚,为研究基因的表达调控机制提供了新的研究领域。通过 lncRNA 芯片技术,本研究发现 lncRNA 表达谱在 3-O-C₁₂-HSL 处理后存在特异性改变,提示 lncRNA 在 3-O-C₁₂-HSL 调节 Mo-DCs 成熟过程中发挥重要作用。同时,Wang 等^[13]用 LPS 处理 Mo-DCs 后,筛选表达差异的 lncRNA,发现 linc-DC 表达水平上调。本研究用 LPS 处理 Mo-DCs 后,通过 lncRNA 芯片筛选实验,也发现 linc-DC 表达水平上调(与对照组相比,上调 6.61 倍),提示本实验模型可靠。有意思的是,在添加 3-O-C₁₂-HSL 处理后,又可以下调 LPS 诱导的 linc-DC 表达水平,提示 3-O-C₁₂-HSL 可通过影响 linc-DC 表达水平调节 Mo-DCs 成熟,进一步证实 3-O-C₁₂-HSL 可通过 lncRNA 阻碍 Mo-DCs 成熟。

综上所述,通过筛选差异 lncRNA 和后期的数据分析,本研究发现 lncRNA 参与了 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 LPS 介导的 Mo-DCs 成熟过程,从而为进一步研究 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 Mo-DCs 成熟的具体分子机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Nathwani D,Raman G,Sulham K,et al. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections;a systematic review and meta-analysis[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*,2014,3(1):32.
- [2] Li Y,Zhou H,Zhang Y,et al. N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone promotes the induction of regulatory T-cells by preventing human dendritic cell maturation[J]. *Exp Biol Med(Maywood)*,2015,240(7):896-903.
- [3] Banchereau J,Briere F,Caux C,et al. Immunobiology of dendritic cells[J]. *Annu Rev Immunol*,2000,18(18):767-811.
- [4] Fatemi RP,Velmshesh D,Faghihi MA. De-repressing lncRNA-targeted genes to upregulate gene expression:focus on small molecule