· 短篇论著 ·

siRNA 干扰 lncRNA ANRIL 表达对经脂多糖诱导的结肠上皮细胞的影响及作用机制

陈 君 姜淑贤

【摘要】 目的 观察小干扰 RNA(siRNA)干扰长链非编码 INK4 基因座的反义 RNA(lncRNA ANRIL)表达对经脂多糖(LPS)诱导的结肠上皮细胞(FHC)的影响。方法 将 FHC 细胞随机分为 4 组:空白组(未作处理),模型组(LPS),对照组(LPS + siRNA-NC 转染)和 siRNA-ANRIL 组(LPS + siRNA-ANRIL 转染)。用经 LPS 诱导 FHC 细胞模拟 UC 样改变。观察干扰 lncRNA ANRIL 表达对经 LPS 诱导的 FHC 细胞活力、细胞凋亡的影响,并探究其与 Toll 样受体 4(TLR4)表达的关系。结果 与空白组比较,模型组 FHC 细胞吸光度(OD)值降低,凋亡率、lncRNA ANRIL mRNA、TLR4 mRNA 和 TLR4 水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,siRNA-ANRIL 组细胞 OD 值升高,凋亡率、lncRNA ANRIL mRNA、TLR4 mRNA、TLR4 水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 抑制 lncRNA ANRIL 表达可对经 LPS 诱导的 FHC 细胞起到一定保护作用,增强细胞活力并抑制其凋亡,其机制可能与调控 TLR4 有关。

【关键词】 溃疡性结肠炎;小干扰 RNA;lncRNA ANRIL;脂多糖;Toll 样受体 4
DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2020.04.016

溃疡性结肠炎(UC)是一种以黏膜炎性反应为主要病理特征的慢性非特异性结肠炎性疾病[1]。近年来调查结果显示,中国的 UC 发病率呈上升趋势,且患者以青壮年为主[2-4]。UC 严重影响了患者的生存质量,也给社会造成沉重的医疗经济负担[5]。UC 患者长链非编码 INK4 基因座的反义 RNA(lncRNA ANRIL)表达明显增多,是 UC 患者可能的生物学标志物[6]。UC 患者炎性因子 Toll 样受体 4(TLR4)的表达量明显增多[7]。推测 lncRNA ANRIL 可能通过在 UC 中调控 TLR4 发挥作用。本实验以经脂多糖(LPS)诱导的结肠上皮细胞 FHC 为研究模型,通过观察 lncRNA ANRIL 对 FHC 细胞凋亡及对炎性因子 TLR4 的影响,探讨其在 UC 中的具体作用,以期为 UC 的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养、分组及干预

首先配制细胞培养液,在 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)中加入 2.5%胎牛血清。将胎儿结肠上皮细胞 FHC(上海冠异生物公司)在 37 ℃、5% CO_2、100%湿度培养箱中进行培养。每 2~3 d 更换 1 次培养液,5~6 d 传代 1 次。将 FHC 细胞随机分为 4 组:空白组、模型组、对照组和 siRNA-ANRIL 组。空白组不予处理,模型组、对照组和 siRNA-ANRIL 组用 8 μg/mL LPS 24 h 诱导 FHC 细胞模拟 UC 样改变,检测细胞活力和炎性因子水平来判断 UC 细胞模型是否造模成功[8]。当 FHC 细胞汇合度大约达到 50%时,对照组和 siRNA-ANRIL 组分别转染 siRNA-NC 及 siRNA-ANRIL[9],经过 6 h 后,将培养液换成含 10%血清的 DMEM 培养基,培养 48 h 后,进行下一步实验。

1.2 MTT 法检测细胞活力

将 FHC 细胞接种于 96 孔板中,进行转染,48 h 后,舍弃培养液,每孔加入 20 μL 终浓度为 0.5 mg/mL的 MTT,37 ℃继续培养 4 h 后,舍弃上清液,每孔加入 150 μL 的二甲基亚砜(DMSO),通过震荡使紫色结晶物充分溶解,使用酶标仪(Thermo Scientific MultiSkan Go)于 560 nm 波长处测吸光度(OD)值[10]。

作者单位:265700 龙口市人民医院消化内科

1.3　流式细胞术检测细胞凋亡率

首先将 FHC 细胞接种于 6 孔板中，培养后进行转染。48 h 后，用无乙二胺四乙酸（EDTA）胰酶消化细胞，将细胞收集到离心管中，1 000 g 离心 3 min后，吸出上清液。再加入 1 mL 预冷的磷酸盐缓冲液（PBS），重悬细胞，并转移至 1.5 mL 离心管中，离心，吸出上清液。加入 195 μL 结合液，重悬细胞，再加入 5 μL Annexin V-FITC 轻轻混匀，最后加入 10 μL PI 染液轻轻混匀，室温避光孵育 15 min[11]。

1.4　荧光定量 PCR 检测 ANRIL mRNA、TLR4 mRNA 含量

将 FHC 细胞接种于 6 孔板，培养后进行转染。48 h 后收集细胞，采用 TRIzol 试剂（日本 TaKaRa 公司）提取细胞中的总 RNA，随后用逆转录试剂盒（日本 TaKaRa 公司）对样品 RNA 进行逆转录，进一步对 cDNA 进行扩增。扩增条件是：95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 32 s，72 ℃延伸 30 s，共计 50 个循环反应。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量[11]。引物由上海吉玛公司设计，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

引物	序列
GAPDH	正向：5′-TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC-3′ 反向：5′-TGCTGAGTATGTCG TGGAGTC-3′
ANRIL	正向：5′-GCGGCGGTGGCAGTGTCTTAGC-3′ 反向：5′-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3′
TLR4	正向：5′-ATCCTTCGTCATTTATAGC-3′ 反向：5′-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3′
β-actin	正向：5′-GTGGCGGTGGTAGTGTCTTAGC-3′ 反向：5′-AATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3′

1.5　Western blot 检测细胞 TLR4 蛋白表达

将 FHC 细胞接种于 6 孔板，培养后进行转染。48 h 后收集细胞，加入细胞裂解液裂解细胞，低温离心，取上清液采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。配制 SDS-PAGE 凝胶，上样后，进行电泳、转膜、封闭。在 4 ℃条件下兔抗鼠 TLR4 多克隆抗体（1∶500，美国 Abcam 公司），过夜。在室温条件下孵育山羊抗兔二抗（1∶3 000，美国 Proteintech 公司）。使用 ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）成像，并用 Image J 进行半定量分析[12]。

1.6　统计学分析

应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析，计量资料均服从正态分布，结果以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间均数的比较采用单因素（one-way ANOVA）方差分析，组间两两比较采用 S-N-K 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组细胞活力比较

空白组、模型组、对照组和 siRNA-ANRIL 组 OD 值分别为 0.82 ± 0.07、0.59 ± 0.08、0.62 ± 0.05 和 0.74 ± 0.08，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与空白组比较，模型组 OD 值降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组比较，对照组 OD 值无显著变化，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与对照组比较，siRNA-ANRIL 组 OD 值显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。上述结果表明干扰 lncRNA ANRIL 表达可增强经 LPS 诱导的 FHC 细胞的活力。

2.2　各组细胞凋亡率比较

空白组、模型组、对照组和 siRNA-ANRIL 组细胞凋亡率分别为 0、(42.7 ± 3.6)%、(46.2 ± 4.2)% 和 (6.3 ± 0.4)%，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与空白组比较，模型组细胞凋亡率显著升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组比较，对照组细胞凋亡率无显著变化，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与对照组比较，siRNA-ANRIL 组细胞凋亡率降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 1。上述结果表明干扰 lncRNA ANRIL 表达可降低经 LPS 诱导的 FHC 细胞的凋亡率。

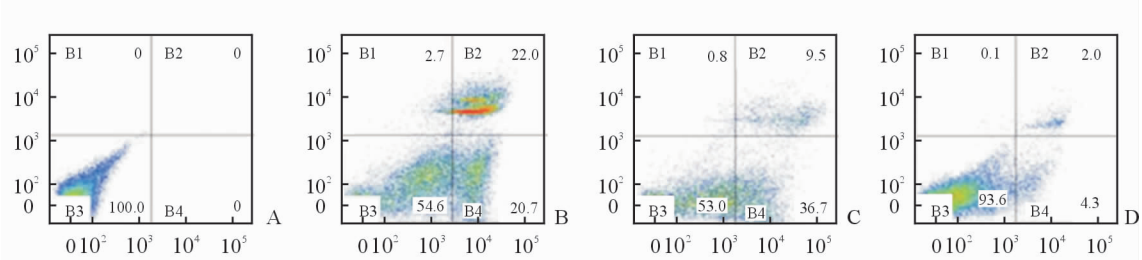


图 1　各组细胞凋亡率比较　流式细胞术 Annexin V-PI 染色　**A**　空白组　**B**　模型组　**C**　对照组　**D**　siRNA-ANRIL 组

2.3 各组 ANRIL mRNA、TLR4 mRNA 水平比较

与空白组比较，模型组 ANRIL mRNA、TLR4 mRNA 水平升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组比较，对照组 ANRIL mRNA、TLR4 mRNA 水平无显著变化，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与对照组比较，siRNA-ANRIL 组 ANRIL mRNA、TLR4 mRNA 水平降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。上述结果表明干扰 lncRNA ANRIL 表达可降低经 LPS 诱导的 FHC TLR4 mRNA 水平。见表 2。

表 2 各组 ANRIL mRNA、TLR4 mRNA Ct 值比较

组别	ANRIL mRNA	TLR4 mRNA
空白组	0.52±0.07	0.47±0.05
模型组	0.79±0.08[a]	0.92±0.06[a]
对照组	0.74±0.05[a]	0.99±0.06[a]
siRNA-ANRIL 组	0.64±0.08[abc]	0.57±0.08[abc]

注：与空白组比较，[a]$P<0.05$；与模型组比较，[b]$P<0.05$；与对照组比较，[c]$P<0.05$

2.4 各组 TLR4 蛋白表达水平比较

空白组、模型组、对照组和 siRNA-ANRIL 组 TLR4 蛋白表达水平见图 2。经 Image J 半定量分析，结果分别为 0.26±0.05、0.98±0.06、0.89±0.12 和 0.36±0.04，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与空白组比较，模型组 TLR4 蛋白表达水平升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组比较，对照组 TLR4 蛋白表达水平无显著变化，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与对照组比较，siRNA-ANRIL 组 TLR4 蛋白表达水平降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。上述结果表明干扰 lncRNA ANRIL 表达可降低经 LPS 诱导的 FHC TLR4 蛋白表达水平。

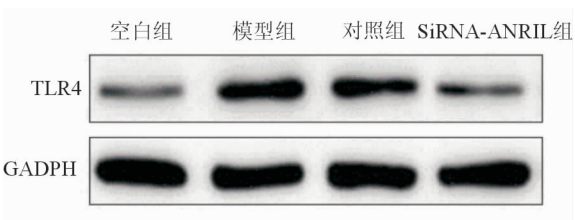


图 2 各组 TLR4 蛋白的电泳图

3 讨论

UC 发病机制尚未完全明确，多数学者认为其是环境、免疫和遗传共同作用的结果。近年来，UC 的发病率逐渐升高，严重影响人们的健康安全。随着病程的进展，UC 患者可能发生并发症，如中毒性巨结肠、结肠出血等，若不及时干预可能导致死亡。研究 UC 发病机制对于临床治疗具有积极的指导意义。

利用 LPS 诱导 FHC 细胞发生炎性损伤来构建体外 UC 模型，出现细胞活力显著减弱，炎性因子水平显著提高，即为体外 UC 细胞模型构建成功；siRNA-ANRIL 组 ANRIL mRNA 表达水平低于对照组，表明 siRNA 干扰 lncRNA ANRIL 表达成功。本研究结果显示 siRNA-ANRIL 组细胞 OD 值高于对照组，而细胞凋亡率低于对照组，表明干扰 lncRNA ANRIL 表达可有效抑制 LPS 对 FHC 细胞的损伤，增强细胞活力，降低细胞凋亡率。

TLR4 是 TLR 家族中较早被发现的一个成员，作为介导炎性反应的主体，普遍分布于多种免疫细胞的膜表面，具有识别炎性反应、应激、机体损伤等相关内源性配体的作用[13-14]。目前，已有许多研究证实 TLR4 参与了 UC 的发病及进展过程[15-17]。本实验结果显示，siRNA-ANRIL 组 TLR4 mRNA 和 TLR4 表达水平均低于对照组，表明干扰 lncRNA ANRIL 表达可降低 LPS 诱导的 FHC 细胞 TLR4 表达水平，进而发挥其保护作用。LncRNA ANRIL 的作用机制主要有两个方面：一方面 LncRNA ANRIL 可与多梳抑制复合物的核心亚基 EZH2 相互作用，介导组蛋白 H3K27 的三甲基化，沉默基因转录；另一方面 LncRNA ANRIL 也可与多梳抑制复合物相互作用，催化 H3K27 三甲基化，沉默靶基因表达[18]。LncRNA ANRIL 是否可通过与多梳抑制复合物相互作用来抑制 TLR4，有待后续进一步研究。

综上所述，siRNA 干扰 LncRNA ANRIL 表达可增强 FHC 细胞活力，降低凋亡率，并抑制炎性因子 TLR4 表达，从而起到保护细胞的作用，提示 LncRNA ANRIL 可作为一类新型的具有生物学功能的临床标志物，具有广阔的临床应用前景，对 UC 的发生、发展及治疗有重要作用。本实验有助于进一步认识 LncRNA ANRIL 在 UC 中的作用，有望为 UC 的治疗提供新的靶点，对后续的科研有进一步的指导意义。

参 考 文 献

1 Nath Neerukonda S, Egan NA, Patria J, et al. Comparison of exosomes purified via ultracentrifugation (UC) and total exosome isolation (TEI) reagent from the serum of marek's disease virus (MDV)-vaccinated and tumor-bearing chickens[J].

J Virol Methods, 2019, 263(6): 1-9.

2 Al-Bayati L, Nayeri FB, Merat S, et al. Longitudinal analyses of gut-associated bacterial microbiota in ulcerative colitis patients [J]. Arch Iran Med, 2018, 21(12): 578-584.

3 Qiu Y, Chen B, Li Y, et al. Risk factors and long-term outcome of disease extent progression in asian patients with ulcerative colitis: a retrospective cohort study[J]. BMC Gastroenterol, 2019, 19(1): 7-10.

4 Erden A, Kuru OD, Gursoy CA, et al. Backwash ileitis in ulcerative colitis: Are there MR enterographic features that distinguish it from Crohn disease[J]. Eur J Radiol, 2019, 110(1): 212-218.

5 Vleugels JLA, Rutter MD, Ragunath K, et al. Chromoendoscopy versus autofluorescence imaging for neoplasia detection in patients with longstanding ulcerative colitis (FIND-UC): an international, multicentre, randomised controlled trial [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(5): 305-316.

6 Zacharopoulou E, Gazouli M, Tzouvala M, et al. The contribution of long non-coding RNAs in inflammatory bowel diseases[J]. Dig Liver Dis, 2017, 49(10): 1067-1072.

7 Fernandes P, MacSharry J, Darby T, et al. Differential expression of key regulators of Toll-like receptors in ulcerative colitis and Crohn′s disease: a role for Tollip and peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. Clinical & Experimental Immunology, 2016, 183(3): 358-368.

8 Zhou F, Zhang GX, Rostami A, et al. Distinct role of IL-27 in immature and LPS-induced mature dendritic cell-mediated development of $CD4^+$ $CD127^+$ $3G11^+$ regulatory T cell subset [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2562.

9 Peng Y, Guo JJ, Liu YM, et al. MicroRNA-34A inhibits the growth, invasion and metastasis of gastric cancer by targeting PDGFR and MET expression[J]. Biosci Rep, 2014, 34(3): 17-24.

10 Sun X, Deng X, Cai W, et al. Icariin inhibits LPS-induced cell inflammatory response by promoting GRalpha nuclear translocation and upregulating GRalpha expression[J]. Life Sci, 2018, 195(2): 33-43.

11 Nematollahi MH, Torkzadeh-Mahanai M, Pardakhty A, et al. Ternary complex of plasmid DNA with NLS-Mu-Mu protein and cationic niosome for biocompatible and efficient gene delivery: a comparative study with protamine and lipofectamine[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(8): 1781-1791.

12 Guo X, Wang H, Li Y, et al. Transfection reagent lipofectamine triggers type I interferon signaling activation in macrophages[J]. Immunol Cell Biol, 2018, 4(6): 181-193.

13 彭峰, 邬珠, 陈晨. 肝枯杏氏细胞组织蛋白酶 B 调控脂多糖诱导败血症小鼠 TLR4 独立炎症通路的激活[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(12): 1465-1471.

14 Hu X, Jiang H, Jiang X. Downregulation of lncRNA ANRIL inhibits proliferation, induces apoptosis, and enhances radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells through regulating miR-125a[J]. Cancer Biol Ther, 2017, 18(5): 331-338.

15 钟宇, 郑学宝, 叶华, 等. 芍药汤对溃疡性结肠炎大鼠 TLR4/NF-κB 通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1450-1456.

16 闫曙光, 惠毅, 李倩, 等. 黄连-干姜提取物对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮 TLR4/NF-κB 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 70-75.

17 刘翔, 丁元伟, 林虹. 溃疡性结肠炎患者肠道不同病变部位 Toll 样受体 4 的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(18): 38-40.

18 Zhao B, Lu YL, Yang Y, et al. Overexpression of lncRNA ANRIL promoted the proliferation and migration of prostate cancer cells via regulating let-7a/TGF-beta1/ smad signaling pathway[J]. Cancer Biomark, 2018, 21(3): 613-620.

（收稿日期：2019-09-02）

（本文编辑：王雨婷）