

lncRNA Tmevpg1对小鼠自噬和JAK-STAT信号通路 关键信号分子表达水平的影响

王羨 王红霞 潘俊斐 方媛 郭乐 徐广贤*

(宁夏医科大学临床医学院医学检验系, 银川 750004)

摘要 该文主要研究lncRNA Tmevpg1对小鼠自噬和JAK-STAT信号通路关键信号分子等相关分子表达水平的影响。该研究利用生物信息学分析构建Tmevpg1、JAK-STAT信号通路及自噬互作调控网络;雷帕霉素(rapamycin, Rapa)和氯喹(chloroquine, CQ)构建小鼠自噬模型;通过细胞共培养技术构建Tmevpg1过表达与干扰细胞模型;qRT-PCR(quantitative real-time PCR)检测小鼠脾脏和细胞模型中Tmevpg1等相关分子的RNA水平, Western blot检测自噬相关蛋白、T-bet和JAK-STAT通路关键信号分子磷酸化蛋白表达水平。结果显示, Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet、STAT1和JAK1在自噬发生的一定时间点内显著上调($P < 0.001$);过表达Tmevpg1后ULK1表达上调($P < 0.05$), p62下调($P < 0.05$), IFN- γ 、T-bet、JAK1以及STAT1表达未发生明显改变, 而干扰Tmevpg1后IFN- γ 、T-bet、JAK1以及STAT1表达减少($P < 0.05$); Western blot结果显示小鼠自噬模型构建成功, T-bet、p-STAT1和p-JAK1表达趋势与mRNA水平一致;过表达Tmevpg1可上调ULK1和LC3-II, 下调p62, 同时干扰Tmevpg1后T-bet、p-JAK1和p-STAT1表达水平下降。该项研究结果表明, lncRNA Tmevpg1和JAK-STAT信号通路对细胞自噬发挥重要调控作用。

关键词 自噬; lncRNA; JAK-STAT信号通路

Effects of lncRNA Tmevpg1 on the Expression of Mouse Autophagy and Key Signaling Molecules in JAK-STAT Signaling Pathways

Wang Xian, Wang Hongxia, Pan Junfei, Fang Yuan, Guo Le, Xu Guangxian*

(Department of Clinical Laboratory Medicine, College of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract This study was performed to explore the effect of lncRNA Tmevpg1 on the expression levels of mouse autophagy and key signaling molecules in JAK-STAT signaling pathway. In this study, Tmevpg1, JAK-STAT signaling pathway and autophagy interaction regulatory network were constructed by bioinformatics analysis; The mouse autophagy model was constructed with rapamycin (Rapa) and chloroquine (CQ), and the cell model of Tmevpg1 overexpression and interference was constructed by cell co-culture technique. The relative expression of Tmevpg1 and other related molecules were detected by qRT-PCR in mouse spleen issues and cell model, and West-

收稿日期: 2019-01-30 接受日期: 2019-04-25

国家自然科学基金(批准号: 81860355)、宁夏科技创新领军人才(批准号: KJT2015020)、宁夏高等学校一流学科建设(宁夏医科大学国内一流建设学科临床医学资助项目(批准号: NXYLXK2017A05)和宁夏医科大学优势学科群建设科研项目(批准号: XY201723)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0951-4086310, E-mail: xuguangxian@nxmu.edu.cn

Received: January 30, 2019 Accepted: April 25, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81860355), Ningxia Science and Technology Innovation Leading Talent (Grant No.KJT2015020), Ningxia Higher Education School First-class Discipline Construction (Ningxia Medical University Domestic First-class Construction Discipline Clinical Medicine) Funded Project (Grant No.NXYLXK2017A05), and Ningxia Medical University Advantage Discipline Group Construction Research Project (Grant No.XY201723)

*Corresponding author. Tel: +86-951-4086310, E-mail: xuguangxian@nxmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-06-10 11:05:16 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190610.1105.002.html>

ern blot verified the expression of autophagy-associated proteins, T-bet and phosphorylated proteins in key signaling molecules of JAK-STAT pathways. The results showed that Tmevpg1, IFN- γ , T-bet, STAT1 and JAK1 were significantly up-regulated at a certain time point of autophagy ($P < 0.001$). After overexpression of Tmevpg1, ULK1 expression was up-regulated ($P < 0.05$), p62 was down-regulated ($P < 0.05$), IFN- γ , T-bet, JAK1 and STAT1 expression did not change significantly, but IFN- γ , T-bet, JAK1 and STAT1 expression were down-regulated after interference with Tmevpg1 ($P < 0.05$). Western blot results showed that the autophagy model of mice was successfully constructed, and the expression trends of T-bet, p-STAT1 and p-JAK1 were consistent with the level of mRNA. Overexpression of Tmevpg1 can up-regulate ULK1 and LC3-II and down-regulate p62. At the same time, the expression of T-bet, p-JAK1 and p-STAT1 decreased after interference with Tmevpg1. In conclusion, our research suggest that lncRNA Tmevpg1 and the JAK-STAT signaling pathway may play critical regulatory roles in autophagy.

Keywords Autophagy; lncRNA; JAK-STAT signaling pathway

自噬(autophagy, ATG)是一种广泛存在于真核细胞中高度保守的分解代谢机制,主要功能是降解受损或错误折叠的蛋白等,即吞噬细胞自身需要降解的胞质蛋白或细胞器,从而维持细胞内环境的稳态和实现细胞自身的更新^[1]。大量研究表明,自噬的调控异常可能与癌症^[2]、心血管疾病^[3-4]、炎症^[5]等疾病的发生发展相关。同时, lncRNA可通过调控细胞自噬过程,进而影响疾病的发生发展。因此,明确 lncRNA在自噬调控网络中的作用,对从分子层面研究疾病具有重要意义。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是指长度大于200个核苷酸,具有基因表达调节功能,且不能编码产生蛋白质的一类RNA^[6]。越来越多研究证明, lncRNA是细胞中关键的调节分子,在表观遗传水平、转录水平、转录后加工以及翻译水平等不同层面上参与基因表达的调控,并与一系列人类疾病的发生密切相关^[7-9]。近年来,随着对非编码RNA在细胞自噬中调控机制的深入研究,非编码RNA通过信号通路调控细胞自噬的作用逐渐被揭示。例如Chen等^[10]研究发现, lncRNA HOTAIRM1与急性早幼粒细胞白血病患者中的肿瘤蛋白PML-RARA关系密切, HOTAIRM1通过自噬通路调节骨髓细胞分化和细胞自噬,并降解肿瘤蛋白PML-RARA。

同时,目前研究发现,细胞因子和自噬密切相关^[11],一则细胞因子可以促进或抑制细胞自噬,如IFN- γ 、IL-2和IL-4^[12-13],二则自噬也可以调节细胞因子的分泌,如IL-1、IL-18。JAK/STAT信号通路是一条重要的细胞因子信号转导通路,主要由酪氨酸激酶相关受体(tyrosine kinase associated receptor)、酪

氨酸激酶JAK(janus kinase)和信号转导与转录激活因子STAT(signal transducer and activator of transcription)组成,参与介导细胞的增殖、凋亡、分化与炎症等过程^[14]。关于JAK/STAT信号通路对细胞自噬的介导调节作用目前已有研究,如JAK/STAT1信号通路和JAK/STAT3信号通路参与介导细胞自噬过程^[15]。

lncRNA Tmevpg1(又名NeST, Ifng-AS1)位于Ifng基因下游-45 Kb的反义链上。Tmevpg1在人和鼠的Th1细胞中表达,可通过激活T-bet,正向调控IFN- γ 的表达^[16]。本研究通过对miRanda、RNA22和String等生物信息学数据库进行分析,预测Tmevpg1、JAK-STAT信号通路关键信号分子与细胞自噬三者之间的相互调控作用,构建小鼠自噬模型, Tmevpg1过表达与干扰的细胞模型,分别采用qRT-PCR和Western blot检测小鼠自噬模型中脾脏与细胞模型中的Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet、JAK-STAT信号通路关键信号分子以及自噬相关蛋白的mRNA和蛋白表达水平。目前关于Tmevpg1只在免疫性疾病的方面有少数相关研究^[16],其在自噬调控过程中的作用机制尚未见报道,所以本研究可以为Tmevpg1对细胞自噬的精确调控机制的研究,提供理论基础和研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

反转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit)购自TaKaRa公司; 2×SYBR GreenI Mix购自Life-technology公司; 氯喹磷酸盐(chloroquine, CQ)购自Sigma公司; 雷帕霉素(Rapa)购自Solarbio公司; 兔抗鼠p62、LC3B、p-STAT1、STAT1、p-JAK1、JAK1和ULK1抗体购自CST公司; 鼠抗鼠T-bet抗体购自Abcam; 鼠抗鼠GAPDH抗体、鼠

抗鼠Histone H3抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司;胎牛血清(FBS)购自BI公司;蛋白提取试剂盒、BCA蛋白质定量试剂盒购自凯基生物技术有限公司;引物由生工生物上海有限公司合成;PCR产物测序由金唯智生物技术有限公司完成;Tmevpg1过表达与干扰序列合成与慢病毒包装均由上海吉玛有限公司完成;Transwell小室购自Corning公司。

实验仪器包括:美国ABI Step One Plus Real-time PCR仪、Nanodrop 2000核苷酸分析仪、美国Bio-Rad电泳仪。

1.2 实验动物

实验中使用的老鼠为6~8周龄的雌性C57BL/6J小鼠,体重为18~22 g,SPF(specific pathogen free)级,购自宁夏医科大学动物实验中心,合格证编号SCXK(京)2016-0006。所有动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定,并已通过宁夏医科大学动物实验及实验动物伦理委员会审查批准。

1.3 生物信息学预测分析

利用 miRanda(<http://www.microRNA.Org>)、RNA22 (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>)和String (<https://string-db.org/>)数据库,完成Tmevpg1与JAK-STAT信号通路关键信号分子及与细胞自噬相互作用的网络调控分析。分析发现,Tmevpg1与IL-12RB1、TBX21、JAK2、TYK2和STAT1等均存在相互作用;同时发现,Tmevpg1可靶向调控RB1CC1,影响细胞自噬ULK1-ATG13-RB1CC1/FIP200-ATG101复合体。利用Cytoscape绘图工具对预测结果加以描述、绘制调控细胞自噬以及与JAK-STAT信号通路的网络。

1.4 引物的设计与合成

从NCBI数据库中查找Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet、ULK1、p62以及JAK-STAT信号通路关键信号分子JAK1和STAT1的序列,设计qRT-PCR检测引物,具体见表1;同时以GADPH作为内参基因。

1.5 Tmevpg1过表达与干扰序列的设计与合成

根据Tmevpg1的基因序列,通过基因合成法设计合成过表达序列和干扰序列;将合成好的序列构建至慢病毒载体中,包装成滴度为 10^8 TU/mL的Tmevpg1过表达与干扰慢病毒,即LV5-Tmevpg1和LV3-sh-Tmevpg1(以下简称为Tmevpg1和sh-Tmevpg1),相关基因合成与慢病毒包装均由上海吉玛有限公司完成。

1.6 小鼠自噬模型构建

将60只C57BL/6J雌性小鼠按随机数字表法分为3组,生理盐水对照组,雷帕霉素组和氯喹组,每组20只,根据处理时间点的不同分为4个小组,药物处理6 h、24 h、72 h和120 h,每个小组6只动物,用于qRT-PCR和Western blot。雷帕霉素以250 mg/mL的浓度溶于DMSO溶液中,待完全溶解后,再用缓冲液PBS稀释至最终浓度。雷帕霉素以0.5 mg/kg终浓度通过腹腔注射小鼠体内。氯喹磷酸盐用缓冲液PBS配制,以40 mg/kg终浓度通过腹腔注射小鼠体内。生理盐水对照组40 mg/kg浓度通过腹腔注射小鼠体内。在药物处理6 h、24 h、72 h和120 h这4个时间点内分别采用颈椎脱臼法处死小鼠,取各组小鼠脾脏分为两份,用于总RNA和蛋白质的提取。

1.7 细胞培养

将小鼠的TH1细胞和RAW264.7细胞复苏后分别加入含10%FBS和50 μ L双抗溶液的RPMI 1640培养基和DMEM培养基,置于5% CO₂、37 °C的细胞培养箱中培养。

1.8 Tmevpg1过表达与干扰细胞模型构建

将培养状态良好的小鼠TH1细胞制备成 2×10^5 个/mL的细胞悬液并将细胞接种到6孔板中;根据所接种的细胞数量和病毒的滴度,分别将适量的Tmevpg1和sh-Tmevpg1慢病毒原液加入到减血清的RPMI 1640培养基中,调整感染的MOI值使MOI=50;将原细胞培养液移去,加入病毒培养液,培养8 h后补充培养基至2 mL,继续培养;同时用LV5-NC和LV3-sh-NC建立对照,37 °C、5% CO₂的培养24 h;除去侵染的病毒液,加入2 mL加入含10% FBS的RPMI 1640培养基继续培养24 h。

1.9 细胞共培养

先将传至2~3代的RAW264.7细胞转移至6孔板中培养备用。再将已构建好的Tmevpg1过表达与干扰细胞模型转移至0.4 μ m Transwell小室的中用含10% FBS的RPMI 1640培养基培养12 h后,弃去细胞培养液,随后使其植入含有10% FBS新鲜的DMEM培养液且贴壁的RAW264.7细胞的6孔板中,进行共培养,置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养至特定时间后,收集TH1细胞和RAW264.7细胞。

1.10 总RNA的提取与cDNA合成

采用Trizol法分别提取各处理组不同时间点小鼠脾脏组织的总RNA以及共培养后TH1和RAW264.7细

表1 qRT-PCR检测引物
Table 1 Primers used for qRT-PCR

基因名 Name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>Tmevpg1</i>	Forward: CCT GAA AAT CAC CAT GCA CA Reverse: GTT TTC GGG ATG TCG TCA AA
<i>IFN-γ</i>	Forward: GAG GTC AAC AAC CCA CAG GT Reverse: GGG ACA ATC TCT TCC CCA CC
<i>T-bet</i>	Forward: GAT GTT TGT GGA TGT GGT CTT GG Reverse: GGA GTC TGG GTG GAC ATA TAA GC
<i>STAT1</i>	Forward: GCT GCC TAT GAT GTC TCG TTT Reverse: TGC TTT TCC GTA TGT TGT GCT
<i>JAK1</i>	Forward: CTC TCT GTC ACA ACC TCT TCG C Reverse: TTG GTA AAG TAG AAC CTC ATG CG
<i>ULK1</i>	Forward: AAG TTC GAG TTC TCT CGC AAG Reverse: CGA TGT TTT CGT GCT TTA GTT CC
<i>p62</i>	Forward: CCT CTG AGT CTC GGG AAT TTC A Reverse: GAC TTA CTG CAC GTT TGG GC
<i>GADPH</i>	Forward: GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG Reverse: CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG

胞的总RNA, 并进行RNA浓度和纯度的测定。使用Takara反转录试剂盒进行cDNA的合成。以cDNA为模板, 利用Tmevpg1、IFN-γ、T-bet、ULK1、p62、JAK1以及STAT1特异性上游引物和下游引物进行PCR反应。

1.11 Tmevpg1等相关分子表达量检测

采用实时荧光定量PCR对各模型小鼠脾脏中Tmevpg1、IFN-γ、T-bet、JAK1和STAT1以及细胞模型中Tmevpg1、IFN-γ、T-bet、JAK1、STAT1、ULK1和p62的表达水平进行测定。利用ABI Step-one Real-time PCR System处理, 反应的体系为: 10 μL 2×SYBR GreenIMix、2 μL cDNA、各1 μL PCR上下游引物(10 μmol/μL), RNase-free Water补充体系至20 μL; 经95 °C 5 min预变性, 95 °C 30 s, 53 °C(变性温度视各个分子引物 T_m 值而定)30 s, 72 °C 30 s, 40个循环扩增, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30个循环完成熔解曲线制作; 每组设置3个复孔, 采用相对定量法计算表达量并加以分析。

1.12 自噬相关分子和JAK-STAT通路相关分子磷酸化蛋白表达水平检测

利用蛋白提取试剂盒分别提取各处理组中小鼠脾脏和细胞模型中的蛋白质, BCA法测定蛋白质浓度, 利用Western blot检测ULK1、p62、LC3和JAK-STAT信号通路关键分子的蛋白表达情况。通过软件ImageJ分析条带灰度值后, 将目的条带与内参进行对比并以比值表示, 同时将正常对照作为

1(灰度分析)。

1.13 统计学处理

获得数据均利用SPSS 20.0统计学软件分析处理, 组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 检验水平 $\alpha=0.05$, 即 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tmevpg1调控JAK-STAT信号通路和细胞自噬网络

利用Cytoscape绘制网络互作图, 分析发现IFNG与JAK-STAT信号通路中的IL-12RB1、TBX21、JAK2、TYK2和STAT1等关键信号分子间均存在相互作用, 且Tmevpg1又可以促进IFNG的表达水平, 发挥正向调控作用(图1)。同时, Tmevpg1可靶向调控RB1CC1, 影响细胞自噬ULK1-ATG13-RB1CC1/FIP200-ATG101复合体, 调控细胞自噬(图2)。JAK-STAT通路通过介导多种细胞因子的作用, 及炎性细胞因子的信号传导过程, 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要生物学过程, 而ULK1、ATG5、ATG13、ATG16L1和mTOR等均为典型的调控细胞自噬的关键基因, 参与自噬的激活、自噬膜的延伸等过程。目前已有研究发现, 细胞自噬可不同程度地参与JAK-STAT信号通路介导的生物学过程, 例如JAK-STAT信号通路中JAK2/STAT3信号通路可诱导肝癌细胞的自噬^[17]。因此, 我们推测, Tmevpg1、JAK-STAT信号通路与自噬这三者之间存在相互调控的作用。

2.2 Tmevpg1、IFN- γ 及JAK-STAT信号通路关键分子的特异性扩增

从各处理组的小鼠脾脏组织中提取出的RNA经引物反转录成为cDNA, 利用Tmevpg1等相关分子的特异性引物进行PCR反应, 产物经2.5%琼脂糖凝胶电泳后的条带1-5依次为Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet、JAK1及STAT1(图3), 然后将扩增产物纯化后测序(图4), 表明Tmevpg1等相关分子的扩增具有特异性。

2.3 Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet以及JAK-STAT信号通路关键信号分子在小鼠自噬模型中的表达量检测

Rapa处理组, qRT-PCR检测发现, Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet、STAT1和JAK1的mRNA水平表达与时间密切相关, 即Rapa处理6 h、24 h、72 h后Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet、STAT1和JAK1的表达显著上调($P < 0.001$), 而在120 h后

则显著下调($P < 0.001$, 图5)。而CQ处理组的qRT-PCR检测结果与Rapa组则正好相反。说明Tmevpg1和JAK-STAT信号通路可能与自噬相关。

2.4 Tmevpg1过表达与干扰模型构建

利用qRT-PCR检测侵染的TH1细胞以验证Tmevpg1过表达和抑制效果(图6), 与正常对照组相比, Tmevpg1过表达组其表达含量显示升高($P < 0.05$), 而干扰组中的表达含量则显著下降($P < 0.05$), 表明Tmevpg1过表达与干扰模型构建成功, 可用于后续实验。

2.5 Tmevpg1过表达与干扰模型中IFN- γ 、T-bet、ULK1、p62、JAK1以及STAT1的相对表达量

将Tmevpg1过表达与干扰模型与RAW264.7细胞共培养, 通过qRT-PCR检测TH1细胞发现(图7), 与正常对照组相比, Tmevpg1过表达组中IFN- γ 、

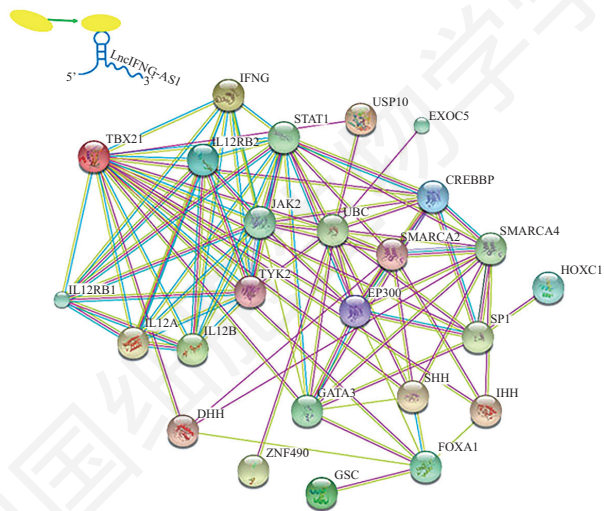


图1 Tmevpg1与JAK-STAT信号通路关键蛋白互作网络分析图

Fig.1 The network analysis diagram of interaction between Tmevpg1 and JAK-STAT signaling pathway key proteins

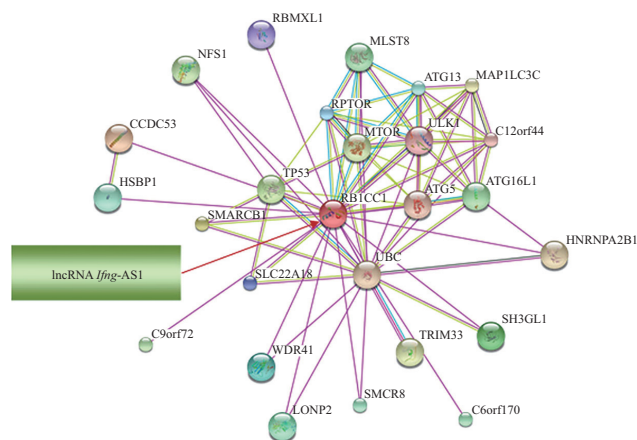
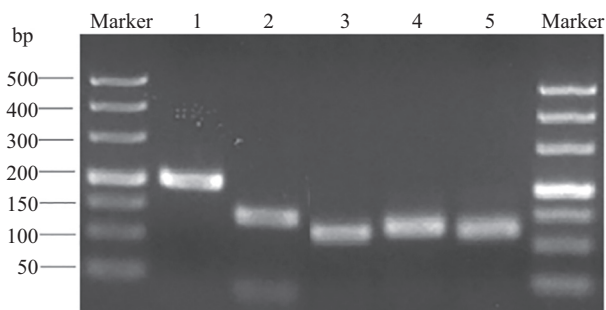


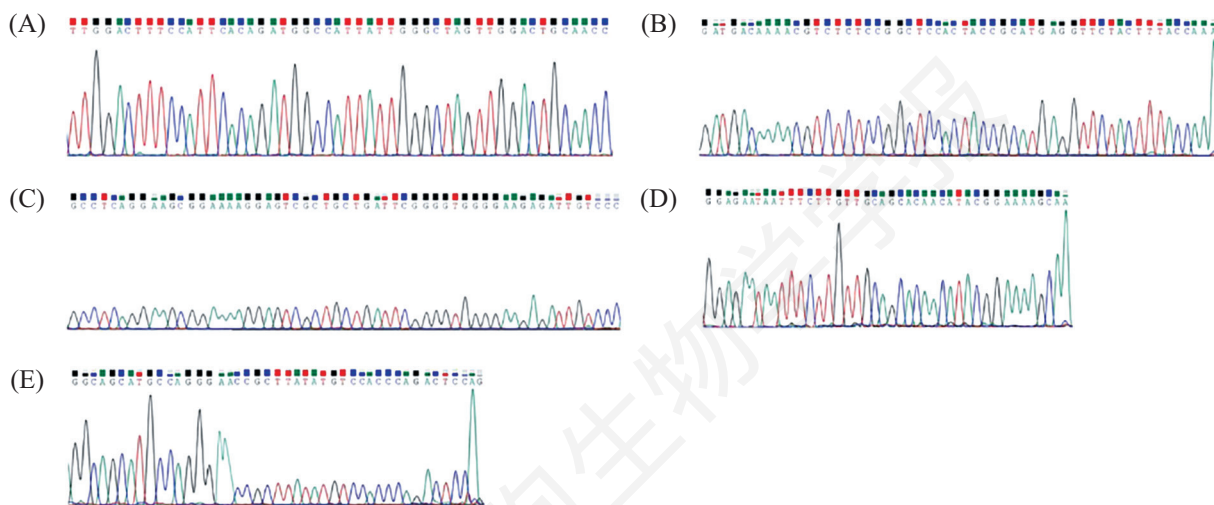
图2 Tmevpg1与细胞自噬互作网络调控分析图

Fig.2 The network analysis diagram of interaction between Tmevpg1 and cell autophagy



1: Tmevpg1; 2: IFN-γ; 3: STAT1; 4: JAK1; 5: T-bet.

图3 Tmevpg1、IFN-γ、T-bet、JAK1及STAT1扩增产物
Fig.3 Tmevpg1、IFN-γ、T-bet、JAK1 and STAT1 production of PCR



A: Tmevpg1; B: JAK1; C: IFN-γ; D: T-bet; E: STAT1.

图4 测序结果
Fig.4 The sequencing

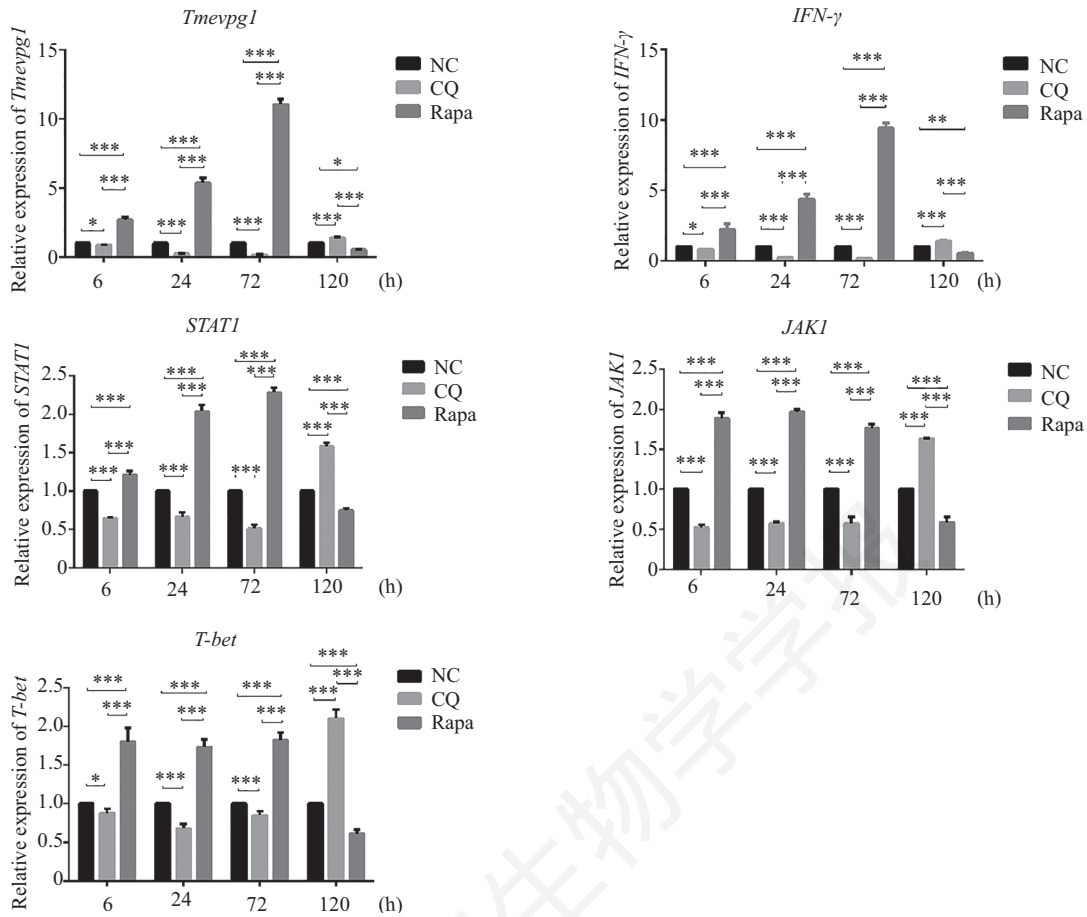
T-bet、*JAK1*以及*STAT1*的mRNA表达水平未发生显著改变, 而干扰组中则表达明显下调($P < 0.05$); 同时检测RAW264.7细胞发现(图8), 与正常对照组相比, *ULK1* mRNA水平在Tmevpg1过表达组中表达量上调($P < 0.05$), 干扰组中则表达明显下调($P < 0.05$), 而*p62* mRNA水平在过表达组中表达下调($P < 0.05$), 干扰组中则表达明显上调($P < 0.05$); 表明Tmevpg1可能通过与其他因子共同作用IFN-γ的基因转录进而影响JAK-STAT信号通路关键分子的激活, 同时Tmevpg1可能在自噬上游作用影响细胞自噬的发生。

2.6 Western blot检测小鼠脾脏中自噬相关分子和JAK-STAT信号通路关键信号分子的蛋白表达情况

2.6.1 Western blot检测LC3、p62和ULK1的蛋白表达情况

LC3、p62和ULK1作为自噬的代表性蛋白, 可作为衡量自噬发生的标准。经Image J扫描分

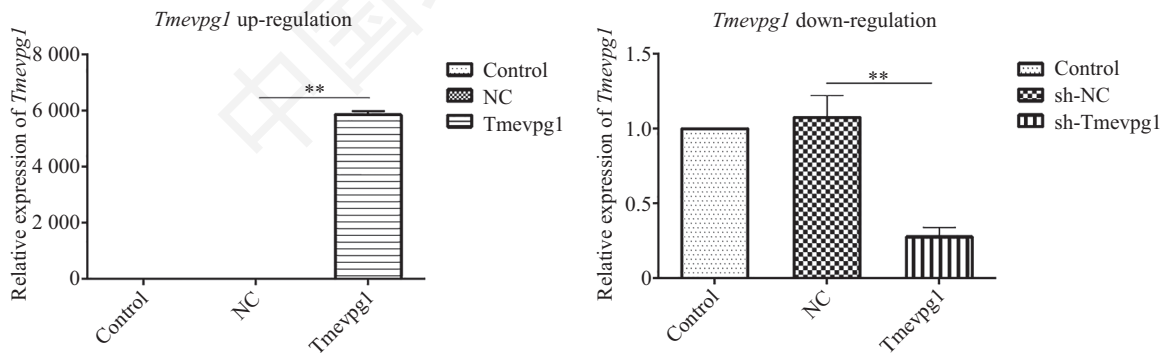
析条带的灰度, Rapa组LC3-II和ULK1蛋白的表达量在处理6 h后较正常对照组有所提高, 随着时间的延长, 两者的表达量也随着升高, 在处理的第3天达到表达量的高峰期(图9A), 在第5天表达量降低, 但较正常对照组仍有所升高(图9B和图9D); p62蛋白的表达量则在Rapa处理6 h后较正常对照组开始有所下降, 并随着处理进程的进行, 表达量逐渐降低, 24 h、72 h和120 h均较正常对照组有大量的降低(图9C)。CQ组LC3-II蛋白的表达趋势与Rapa组相一致, 而ULK1和p62蛋白则完全相反。经统计分析, LC3-II、ULK1和p62蛋白的表达量较正常对照组表达量的差异有统计学意义($P < 0.01$)。通过上述实验结果, 在小鼠自噬模型中, Rapa组自噬检测蛋白LC3-II和ULK1的表达量上调, 及自噬底物p62的表达量下调证实自噬的发生; 而CQ组LC3-II和p62的表达量上调, 以及ULK1的表达量减少则证实了自噬的抑制。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图5 Rapa和CQ处理后小鼠脾脏中*Tmevp1*、*IFN-γ*、*T-bet*、*STAT1*和*JAK1*的表达量

Fig.5 The relative expression of *Tmevp1*, *IFN-γ*, *T-bet*, *STAT1* and *JAK1* in mouse spleens treated with Rapa and CQ



** $P < 0.01$.

图6 qRT-PCR检测*Tmevp1*的过表达和干扰细胞模型中*Tmevp1*的相对表达量

Fig.6 Relative expression levels of *Tmevp1* in its overexpression and interference cells model

2.6.2 Western blot检测T-bet和JAK-STAT信号通路关键信号分子的磷酸化蛋白表达情况 通过Image J分析条带灰度, Rapa组T-bet、p-JAK1和p-STAT1蛋白的表达水平在处理6 h后较正常对照组有所上升, 随着作用时间的增加, 三者的表达水平也逐渐升高,

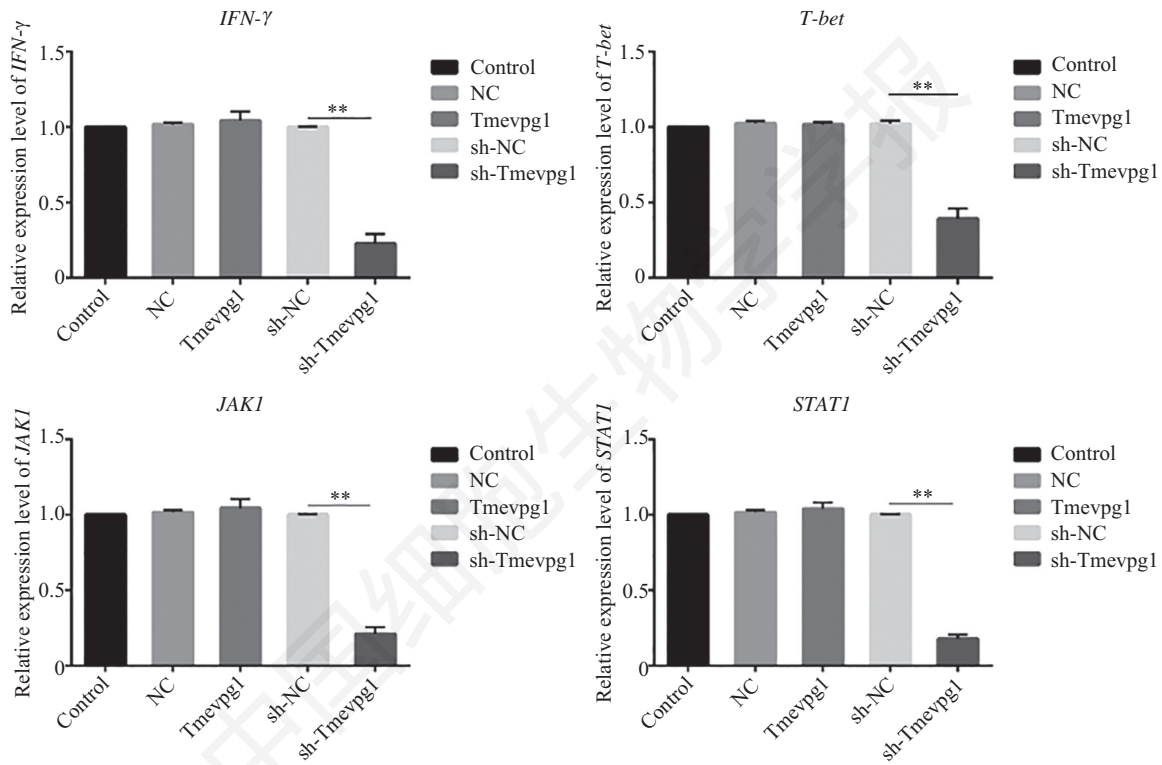
在处理第3天达到表达水平的高峰期(图10A、图10D和图10G), 但在第5天T-bet、p-JAK1和p-STAT1蛋白表达水平下调(图10B、图10E和图10H), 且较正常对照组有所降低(图10C、图10F和图10I); 而CQ组结果则与Rapa组完全相反。经统计分析T-bet、p-

JAK1和p-STAT1蛋白的表达水平较正常对照组表达水平的差异有统计学意义($P < 0.01$)。上述结果说明, 当自噬发生在一定时间内, 可能会促进JAK-STAT信号通路关键信号分子JAK1和STAT1发生磷酸化, 激活T-bet, 进而增加IFN- γ 表达, 并正反馈上调Tmevpg1的表达量。

2.7 Western blot检测Tmevpg1对自噬及JAK-STAT信号通路关键分子的影响

利用Western blot检测细胞共培养体系中RAW264.7细胞中的自噬关键蛋白LC3、ULK1和p62的表达情况,

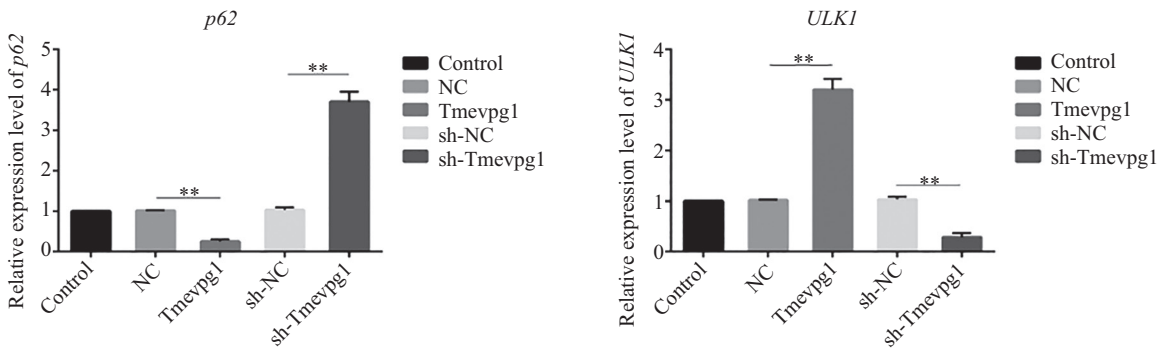
以及TH1细胞中的特异性转录因子T-bet、JAK-STAT信号通路关键信号分子JAK1和STAT1的磷酸化蛋白的表达情况, 以此来观察Tmevpg1对细胞自噬及JAK-STAT信号通路关键分子的影响。结果显示, 与空白对照Control组相比, Tmevpg1组ULK1和LC3-II的表达明显升高而p62显著减少, sh-Tmevpg1组ULK1和LC3-II表达显著下降, p62积累明显增多(图11); 两组结果呈明显相反的趋势, 说明lncRNA Tmevpg1对细胞自噬有促进作用; 而Tmevpg1组T-bet、p-JAK1和p-STAT1蛋白的表达水平较空白对照Control组相比无显著变



** $P < 0.01$.

图7 Tmevpg1过表达与干扰模型中IFN- γ 、T-bet、JAK1和STAT1的相对表达量

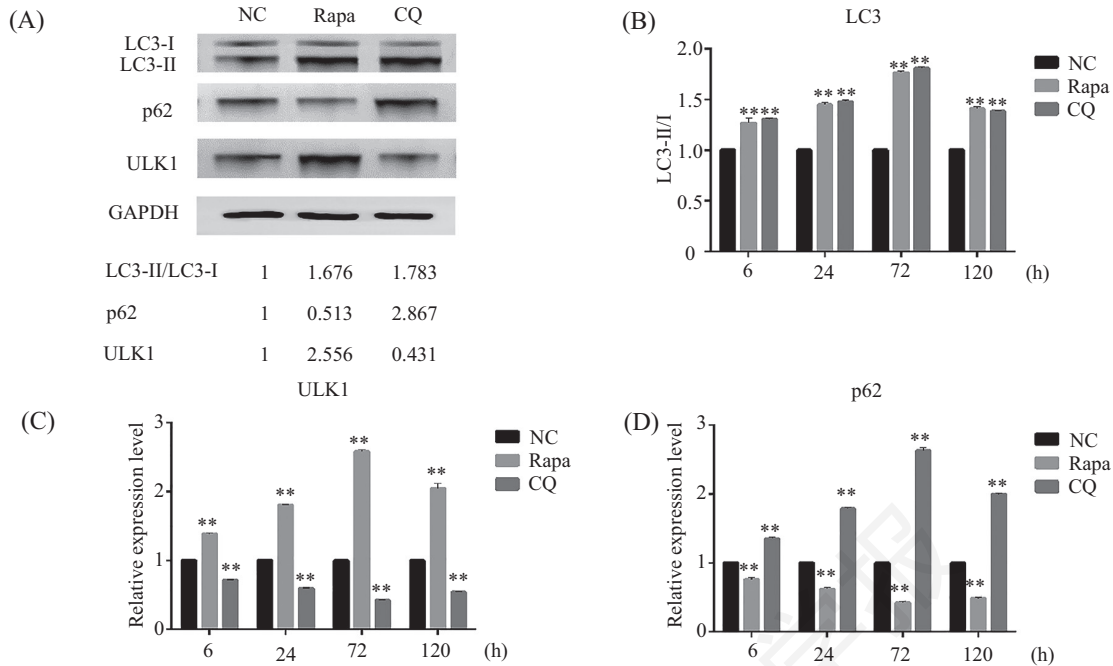
Fig.7 Relative expression levels of IFN- γ , T-bet, JAK1 and STAT1 in Tmevpg1 overexpression and interference models



** $P < 0.01$.

图8 Tmevpg1过表达与干扰模型中p62和ULK1的相对表达量

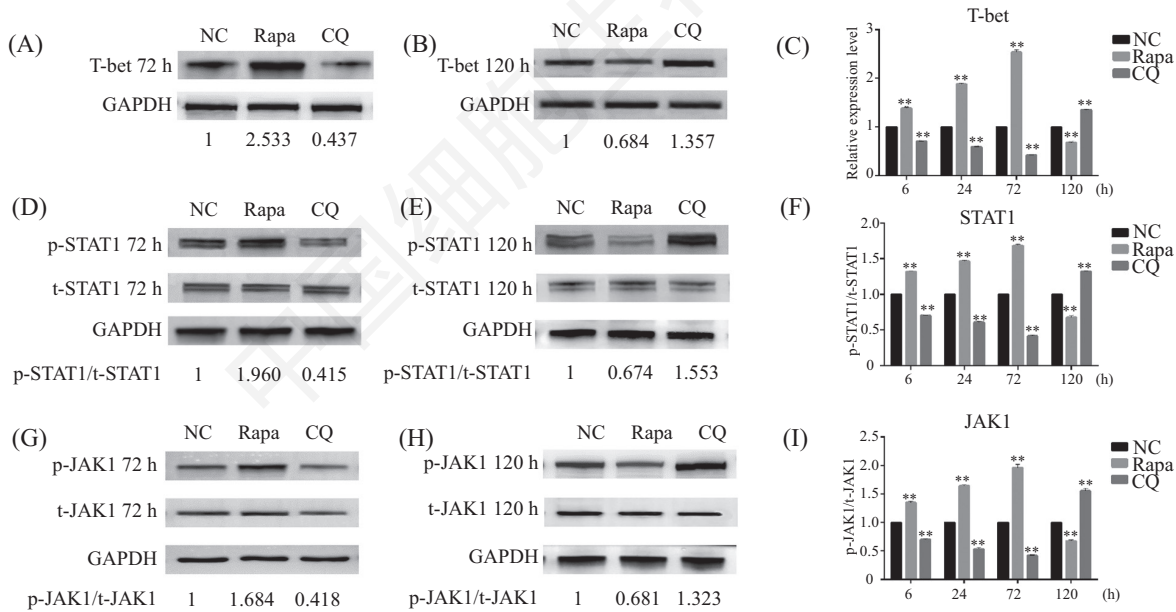
Fig.8 Relative expression levels of p62 and ULK1 in Tmevpg1 overexpression and interference models



A: LC3、p62和ULK1蛋白检测条带; B: LC3蛋白检测量化; C: ULK1蛋白检测量化; D: p62蛋白检测量化。 ** $P < 0.01$, 与 NC 相比较。
 A: LC3, p62 and ULK1 detection bands; B: LC3 detection quantification; C: ULK1 detection quantification; D: p62 detection quantification. ** $P < 0.01$ vs NC.

图9 Western blot检测Rapa和CQ处理72 h后LC3、p62和ULK1的蛋白表达水平

Fig.9 Western blot for detection of protein expression of LC3, p62 and ULK1 after 72 hours of Rapa and CQ treatment



A: Rapa和CQ处理72 h后T-bet蛋白检测条带; B: Rapa和CQ处理120 h后T-bet蛋白检测条带; C: T-bet蛋白检测量化; D: Rapa和CQ处理72 h后p-STAT1和t-STAT1蛋白检测条带; E: Rapa和CQ处理120 h后p-STAT1和t-STAT1蛋白检测条带; F: STAT1蛋白检测量化; G: Rapa和CQ处理72 h后p-JAK1和t-JAK1蛋白检测条带; H: Rapa和CQ处理120 h后p-JAK1和t-JAK1蛋白检测条带; I: JAK1蛋白检测量化。 ** $P < 0.01$, 与 NC 相比较。

A: T-bet protein detection bands after 72 hours of Rapa and CQ treatment; B: T-bet protein detection bands after 120 hours of Rapa and CQ treatment; C: T-bet protein detection quantification; D: p-STAT1 and t-STAT1 protein detection bands after 72 hours of Rapa and CQ treatment; E: p-STAT1 and t-STAT1 protein detection bands after 120 hours of Rapa and CQ treatment; F: STAT1 protein detection quantification; G: p-JAK1 and t-JAK1 protein detection bands after 72 hours of Rapa and CQ treatment; H: p-JAK1 and t-JAK1 protein detection bands after 120 hours of Rapa and CQ treatment; I: JAK1 protein detection quantification. ** $P < 0.01$ vs NC.

图10 Western blot检测小鼠自噬模型中T-bet和JAK-STAT信号通路关键信号分子的磷酸化蛋白表达水平

Fig.10 Western blot detects T-bet and phosphorylated protein of key signaling molecules in JAK-STAT signaling pathways expression at mouse autophagy model

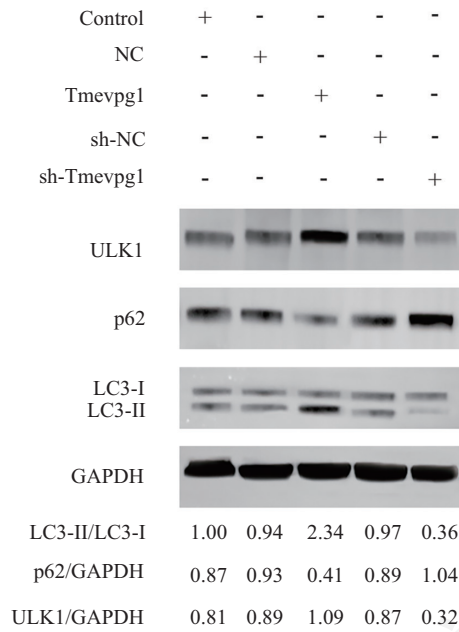


图11 Tmevpg1过表达与干扰模型中LC3、p62和ULK1的蛋白表达水平

Fig.11 Protein expression levels of LC3, p62 and ULK1 in Tmevpg1 overexpression and interference models

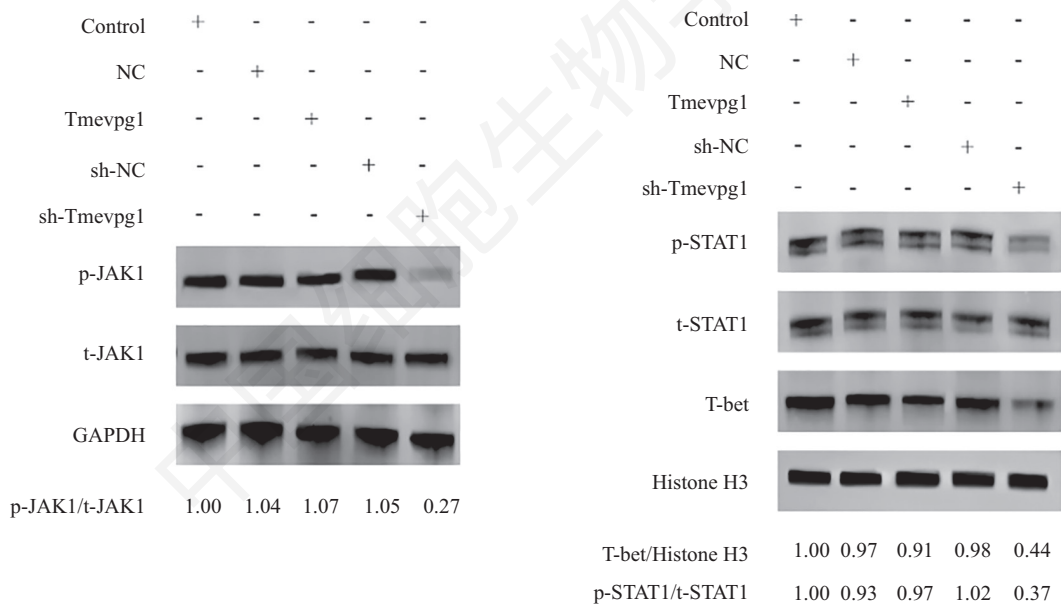


图12 Tmevpg1过表达与干扰模型中通路关键分子的蛋白表达水平

Fig.12 Protein expression levels of key molecules in pathways in Tmevpg1 overexpression and interference models

化, sh-Tmevpg1组中T-bet、p-JAK1和p-STAT1蛋白的表达水平则显著下降(图12)。表明Tmevpg1对JAK-STAT信号通路关键分子的活化作用可能是通过间接调控。

3 讨论

自噬(autophagy, ATG)是一种程序化的细胞内降解反应。细胞将胞质中需要降解的细胞器或蛋白

质包裹形成自噬体运送至溶酶体进行消化, 以满足细胞代谢需求、细胞自身的更新和细胞内环境的稳态^[18-23]。大量的研究显示, 肿瘤、感染、心血管病变等疾病都与细胞自噬异常有关^[24-27], 曾有研究发现, 在肌细胞中与自噬相关的蛋白缺陷, 会引发大量自噬溶酶泡的聚集从而引发心肌病^[28]; 另有文献报道, 感染人体的细菌、病毒可通过细胞自噬清除, 如结核分枝杆菌^[29]和EB病毒^[30]。综上所述, 细

胞自噬与机体的各种生理活动和疾病的发生发展息息相关,因而明确自噬调控的精确机制对于机体正常的生理活动和疾病的分子机制研究都具有重大的意义。

参与自噬调控的因素众多,涉及各种蛋白质、激素和信号通路等变化,而作为细胞中重要的信号转导途径,JAK-STAT通路对自噬也有调节作用,Guo等^[31]研究表明,肺腺癌上皮A549细胞中的STAT3受到抑制后,会诱导线粒体中产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),进而诱导细胞自噬并发生细胞周期停滞。与此同时,在自噬研究领域中发现,lncRNA可抑制miRNA与靶基因结合,进而抑制miRNA对靶基因的调控,通过转录后调控参与细胞自噬水平的调节;Wang^[32]等发现lncRNA APF(autophagy promoting factor)可以靶向miR-188-3p,调节ATG7的表达水平,进而调节心肌细胞自噬;另发现,lncRNA可通过直接作用自噬相关通路中的关键蛋白,调节细胞自噬水平。Chen等^[33]研究证实,lncRNA PTENP1可以通过抑制mTOR的磷酸化及自噬相关蛋白Bcl-2的表达水平上调自身的表达量,进而诱导肝癌细胞的自噬。由此可见,lncRNA在细胞自噬的调控过程以及各种由自噬失调引发的相关疾病的发病机制中都具有重要作用,因此绘制lncRNA对细胞自噬的精确调控网络,明确其具体的作用机制可为这类疾病的预防以及治疗提供新的研究思路。

本实验利用Rapa和CQ建立小鼠自噬模型,对不同处理条件下小鼠脾脏中Tmevpg1等相关分子定量检测发现7种分子的表达量均有显著性变化。Rapa处理组,Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet、STAT1和JAK1在一定时间点内呈显著上调;而CQ处理组,Tmevpg1、IFN- γ 、T-bet、STAT1和JAK1在一定时间点内呈显著下调。同时,检测自噬相关分子蛋白和JAK-STAT信号通路关键分子的磷酸化蛋白表达,发现T-bet、p-STAT1和p-JAK1的蛋白水平表达趋势与mRNA水平一致,而自噬相关分子蛋白在小鼠自噬模型中的表达趋势验证了小鼠自噬模型构建成功。结合前期生物信息学预测分析,我们推测,Tmevpg1和JAK-STAT信号通路可能影响自噬,在自噬发生的一定时间段内可能促进了JAK-STAT信号通路中JAK1和STAT1的磷酸化,激活T-bet,增加IFN- γ 表达,并正向反馈上调Tmevpg1的表达。随后再结合Tmevpg1

过表达和干扰表达的情况下自噬关键指标和JAK-STAT信号通路关键分子的变化,结果显示,过表达Tmevpg1后自噬水平显著升高,但JAK-STAT信号通路的关键分子却无显著改变,IFN- γ 也未见差异表达;而下调Tmevpg1的表达水平后,自噬水平也明显随之下降,同时JAK-STAT信号通路关键分子的表达水平也发生下调,IFN- γ 表达量减少。因此,我们可以明确,lncRNA Tmevpg1对细胞自噬具有正向调控作用且IFN- γ 是激活JAK-STAT信号通路的关键,但其中涉及的详细作用机制仍不清楚,只能通过后续的实验研究进一步完善其调控机制。本研究结论或将能为研究lncRNA参与细胞自噬的精细调控机制或某些相关疾病发生、发展的分子层面机制提供理论依据。

参考文献 (References)

- Morris S, Swanson MS, Lieberman A, Reed M, Yue Z, Lindell DM, *et al.* Autophagy-Mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses. *J Immunology* 2011; 187(8): 3953-61.
- Mearini E, Poli G, Cochetti G, Boni A, Egidi MG, Brancorsini S. Expression of urinary miRNAs targeting NLRs inflammasomes in bladder cancer. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 2665-73.
- Perrotta I, Aquila S. The role of oxidative stress and autophagy in atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 130315.
- Wang Y, Li Y, Li H, Song H, Zhai N, Lou L, *et al.* Brucella Dysregulates Monocytes and Inhibits Macrophage Polarization through LC3-Dependent Autophagy. *Front Immunol* 2017; 8: 691.
- Dong Q, Xing W, Fu F, Liu Z, Wang J, Liang X, *et al.* Tetrahydroxystilbene Glucoside Inhibits Excessive Autophagy and Improves Microvascular Endothelial Dysfunction in Prehypertensive Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Chin Med* 2016; 44(07): 1393-412.
- Du Y, Kong G, You X, Zhang S, Zhang T, Gao Y, *et al.* Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18. *J Biol Chem* 2012; 287(31): 26302-11.
- Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(3): 256-64.
- Yang L, Wang H, Shen Q, Feng L, Jin H. Long non-coding RNAs involved in autophagy regulation. *Cell Death Dis* 2017; 8(10): e3073.
- Haemmig S, Simion V, Yang D, Deng Y, Feinberg MW. Long noncoding RNAs in cardiovascular disease, diagnosis, and therapy. *Curr Opin Cardiol* 2017; 32(6): 1.
- Chen ZH, Wang WT, Huang W, Fang K, Sun YM, Liu SR, *et al.* The lncRNA HOTAIRM1 regulates the degradation of PML-RARA oncoprotein and myeloid cell differentiation by enhancing

- the autophagy pathway. *Cell Death Differ* 2017; 24(2): 212-24.
- 11 Harris J. Autophagy and cytokines. *Cytokine* 2011; 56(2): 140-44.
- 12 Hana S, Fey SB, Julie H, Fischer ER, Balinsky CA, Kotaro M, *et al.* Type I interferons induce autophagy in certain human cancer cell lines. *Autophagy* 2013; 9(5): 683-96.
- 13 Harris J, De Haro S, Master S, Keane J, Roberts E, Delgado M, *et al.* T helper 2 Cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 2007; 27(3): 505-17.
- 14 O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* 2015; 66: 311-28.
- 15 Rui K, Daolin T, Lotze MT, Zeh HJ. AGER/RAGE-mediated autophagy promotes pancreatic tumorigenesis and bioenergetics through the IL6-pSTAT3 pathway. *Autophagy* 2012; 8(6): 989-91.
- 16 Collier SP, Collins PL, Williams CL, Boothby MR, Aune TM. Cutting edge: influence of Tmevpg1, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of Ifng by Th1 cells. *J Immunol* 2012; 189(5): 2084-88.
- 17 李雷雷, 郭彬, 郭佳培, 吴景华. 肿瘤相关巨噬细胞通过JAK2/STAT3途径调控肝癌细胞凋亡的机制研究. *现代预防医学(Li Leilei, Guo Bin, Guo Jiapei, Wu Jinghua. Mechanisms of tumor-associated macrophages regulating apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via JAK2/STAT3 pathway. Modern Preventive Medicine)* 2017; 44(13): 2406-10.
- 18 Gottlieb R. Autophagy in health and disease. *Anticancer Res* 2015; 35(2): 72-8.
- 19 Peng H, Park JK, Lavker RM. Eyeing autophagy and macropinocytosis in the corneal/limbal epithelia. *Autophagy* 2017; 13(5): 1-3.
- 20 Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mitophagy: In sickness and in health. *Mol Cell Onco* 2016; 3(1): e1056332.
- 21 Hurley JH, Young LN. Mechanisms of autophagy initiation. *Annu Rev Biochem* 2017; 86(1): 225.
- 22 Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Cecconi F, Choi AM, *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *Embo J* 2017; 36(13): 1811.
- 23 White E, Mehnert JM, Chan CS. Autophagy, metabolism, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2017; 21(22): 5037.
- 24 Zheng Z, Xu PP, Wang L, Zhao HJ, Weng XQ, Zhong HJ, *et al.* MiR21 sensitized B-lymphoma cells to ABT-199 via ICOS/ICOSL-mediated interaction of Treg cells with endothelial cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36(1): 82.
- 25 Janji B, Berchem G, Chouaib S. Targeting autophagy in the tumor microenvironment: new challenges and opportunities for regulating tumor immunity. *Front Immunol* 2018; 9: 887.
- 26 Lee YJ, Jang BK. The Role of Autophagy in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2015; 16(11): 26629-43.
- 27 Wang Y, Ding WX, Li T. Cholesterol and bile acid-mediated regulation of autophagy in fatty liver diseases and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018; 1863(7): 726-33.
- 28 Hashem SI, Murphy AN, Divakaruni AS, Klos ML, Nelson BC, Gault EC, *et al.* Impaired mitophagy facilitates mitochondrial damage in Danon disease. *J Mol Cell Cardio* 2017; 108: 86.
- 29 Li M, Wang J, Fang Y, Gong S, Li M, Wu M, *et al.* microRNA-146a promotes mycobacterial survival in macrophages through suppressing nitric oxide production. *Sci Rep* 2016; 6: 23351.
- 30 罗小暖, 宋娟, 宋芹芹, 夏冬, 史冰田, 刘宓. 细胞自噬促进柯萨奇病毒B3复制的研究. *病毒学报(Luo Xiaonuan, Song Juan, Song Qinqin, Xia Dong, Shi Bingtian, Liu Mi. Study on the promotion of coxsackievirus B3 replication by autophagy. Chinese Journal of Virology)* 2019; 35(1): 1-5.
- 31 Guo J, Wu G, Bao J, Hao W, Lu J, Chen X. Cucurbitacin B induced ATM-mediated DNA damage causes G₂/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner. *PLoS One* 2014; 9(2): e88140.
- 32 Wang K, Liu CY, Zhou LY, Wang JX, Wang M, Zhao B, *et al.* APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by targeting miR-188-3p. *Nat Commun* 2015; 6: 6779.
- 33 Chen CL, Tseng YW, Wu JC, Chen GY, Lin KC, Hwang SM, *et al.* Suppression of hepatocellular carcinoma by baculovirus-mediated expression of long non-coding RNA PTENP1 and MicroRNA regulation. *Biomaterials* 2015; 44: 71-81.