

本文引用: 梁静, 陈汉仁, 蒋静子, 等. lncRNA-BC200 调控 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞 PC12 炎症因子表达和细胞凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(5): 403-409.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-05-0403-07

· 实验研究 ·

lncRNA-BC200 调控 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞 PC12 炎症因子表达和细胞凋亡

梁静¹, 陈汉仁², 蒋静子¹, 毛敏芸¹, 彭天婵¹

(1. 桂林医学院附属医院神经内科, 广西桂林市 541001; 2. 桂林医学院, 广西桂林市 541000)

[关键词] 阿尔茨海默病; lncRNA-BC200; 细胞凋亡; 炎症因子

[摘要] 目的 探讨 lncRNA-BC200 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞炎症和细胞凋亡的影响及可能机制。方法 将神经细胞 PC12 分为正常对照组(细胞常规培养)和 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 组(分别用 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 干预细胞 24 h), 流式细胞术检测细胞凋亡, qRT-PCR 法检测细胞中 lncRNA-BC200 表达。将 PC12 细胞分为正常对照组、 $A\beta_{25-35}$ 组(用 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 干预 PC12 细胞 24 h)、si-NC+ $A\beta_{25-35}$ 组(用 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 干预转染 si-NC 的 PC12 细胞 24 h)、si-lncRNA-BC200+ $A\beta_{25-35}$ 组(用 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 干预转染 si-lncRNA-BC200 的 PC12 细胞 24 h)和 TNF- α +si-lncRNA-BC200+ $A\beta_{25-35}$ 组[用 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 共同干预转染 si-lncRNA-BC200 的 PC12 细胞 24 h], 流式细胞术检测细胞凋亡, 酶联免疫吸附法检测细胞培养上清液中 TNF- α 、白细胞介素 6(IL-6)和 γ 干扰素(IFN- γ)表达, Western blot 检测细胞中 cleaved-Caspase-3、p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达。结果 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 组 PC12 细胞凋亡率和 lncRNA-BC200 表达均高于正常对照组。 $A\beta_{25-35}$ 组细胞中 cleaved-Caspase-3、p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达, 以及 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平均高于正常对照组。si-lncRNA-BC200+ $A\beta_{25-35}$ 组 PC12 细胞凋亡率和细胞中 cleaved-Caspase-3、p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达及 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平均低于 $A\beta_{25-35}$ 组。TNF- α +si-lncRNA-BC200+ $A\beta_{25-35}$ 组 PC12 细胞凋亡率和细胞中 cleaved-Caspase-3、p-p65 和 p-I κ B α 蛋白表达及 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平均高于 si-lncRNA-BC200+ $A\beta_{25-35}$ 组。结论 敲减 lncRNA-BC200 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活减少 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞 PC12 分泌炎症因子及细胞凋亡。

[中图分类号] R363;R7

[文献标识码] A

lncRNA-BC200 regulating the expression of inflammatory factor and apoptosis of neuronal cell PC12 induced by $A\beta_{25-35}$

LIANG Jing¹, CHEN Hanren², JIANG Jingzi¹, MAO Minyun¹, PENG Tianchan¹

(1. Neurology Department, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China; 2. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541000, China)

[KEY WORDS] Alzheimer's disease; lncRNA-BC200; cell apoptosis; inflammatory factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of lncRNA-BC200 on the inflammation and apoptosis of nerve cells induced by $A\beta_{25-35}$ and its possible mechanism. **Methods** The nerve cells PC12 were divided into NC group (conventional cell culture) and 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ groups (cells were treated with 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ for 24 h), and then cell apoptosis was detected by flow cytometry. qRT-PCR method was used to detect the expression of lncRNA-BC200 in cells. The PC12 cells were divided into NC group (cells were routinely cultured), $A\beta_{25-35}$ group (PC12 cells were intervened with 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ for 24 h), si-NC+ $A\beta_{25-35}$ group (PC12 cells were transfected with si-NC and then intervened with 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ for 24 h), si-lncRNA-BC200+ $A\beta_{25-35}$ group (PC12 cells were transfected with si-lncRNA-BC200 and then intervened with 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ for 24 h) and TNF- α +si-lncRNA-BC200+ $A\beta_{25-35}$ group (PC12 cells were transfected with si-lncRNA-BC200 and then co-intervened with 20 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ and 20 $\mu\text{g/L}$ tumor necrosis factor (TNF- α) for 24 h). Flow cytometry was used to detect cell proliferation activity and apoptosis, ELISA was used to

[收稿日期] 2021-09-16

[修回日期] 2021-11-30

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2015GXNSFBA139135)

[作者简介] 梁静, 硕士, 副主任医师, 研究方向为神经免疫及变性疾病, E-mail 为 ljianglw@163.com。

detect the expression of TNF- α , interleukin-6 (IL-6) and interferon- γ (IFN- γ) in the cell culture supernatant, and Western blot was used to detect the protein expression of cleaved-Caspase-3, p-p65 and p-I κ B α in the cells. **Results** The apoptosis rate of PC12 cells and the expression of lncRNA-BC200 were higher in 10, 20, 40 μ mol/L A β_{25-35} groups than NC group. The protein expression of cleaved-Caspase-3, p-p65 and p-I κ B α and the levels of TNF- α , IL-6 and IFN- γ in A β_{25-35} group cells were all higher than NC group. The apoptotic rate of PC12 cells, the protein expression of cleaved-Caspase-3, p-p65 and p-I κ B α , and the levels of TNF- α , IL-6 and IFN- γ were all lower in the si-lncRNA-BC200+A β_{25-35} group than A β_{25-35} group. The apoptotic rate of PC12 cells, the protein expression of cleaved-Caspase-3, p-p65 and p-I κ B α , and the levels of TNF- α , IL-6 and IFN- γ in the TNF- α +si-lncRNA-BC200+A β_{25-35} group were all higher than the si-lncRNA-BC200+A β_{25-35} group. **Conclusion** Knockdown of lncRNA-BC200 may inhibit A β_{25-35} -induced neuronal cell PC12 secretion of inflammatory factors and apoptosis by inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病, 其发病率随着人口老龄化的增加而增长, 给患者家庭及社会造成了沉重负担^[1]。AD 的病理特征主要表现为 β 淀粉样蛋白沉积形成老年斑、神经原纤维缠结及神经细胞缺失^[2]。目前, AD 的发病机制尚不明确, 研究认为炎症、氧化应激及神经细胞凋亡在 AD 的发生发展中起重要作用^[3]。lncRNA-BC200 是一种长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA), 参与多种疾病的发展进程。李晓峰等^[4] 研究显示, lncRNA-BC200 在 AD 患者外周血中表达明显升高, 且其表达与患者认知功能密切相关, 其诊断 AD 的受试者工作特征曲线下面积为 0.895, 灵敏度和特异度分别为 85.82% 和 88.83%, 检测血清 lncRNA-BC200 对临床 AD 的诊断具有重要意义。目前, lncRNA-BC200 是否参与调控神经细胞损伤还未知。本研究建立 β -淀粉样蛋白 25-35 片段 (β -amyloid peptide 25-35, A β_{25-35}) 诱导的神经细胞 PC12 损伤模型, 从细胞凋亡和炎症因子表达角度观察 lncRNA-BC200 对神经细胞损伤的影响, 以期 AD 的治疗提供分子靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

PC12 细胞系 (上海通派生物科技有限公司); 胎牛血清 (杭州四季青); DMEM 培养基、膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 细胞凋亡试剂盒、二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒和双荧光素酶活性检测试剂盒 (北京索莱宝); LipofectamineTM 2000 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); lncRNA-BC200 小干扰 RNA (si-lncRNA-BC200)、小干扰 RNA 阴性对照 (si-NC) 及引物序列 (上海生工); RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒和 PCR 试剂盒 (大

连宝生物); 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 试剂盒 (南京建成); 活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cleaved-Caspase-3)、磷酸化 p65 (p-p65)、磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白 (phosphorylated nuclear transcription factor kappa B inhibitor protein, p-I κ B α) 和 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (Abcam 公司)。

1.2 细胞培养和转染

复苏 PC12 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。培养箱条件: 温度 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 体积分数 5%、湿度 97%。于 6 孔板中接种对数期 PC12 细胞 (5.0×10^5 个/孔), 培养 24 h, 弃培养液, 用 LipofectamineTM 2000 脂质体法将 si-lncRNA-BC200、si-NC 转染至 PC12 细胞。转染 12 h 后, 实时定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测细胞中 lncRNA-BC200 表达验证转染效果, 并收集细胞用于后续实验。

1.3 细胞分组

PC12 细胞分为正常对照 (NC) 组和 A β_{25-35} 组, 正常对照组细胞用常规培养液培养, A β_{25-35} 组细胞分别用含 10、20、40 μ mol/L^[5] A β_{25-35} 的 DMEM 培养液干预 24 h。转染 si-lncRNA-BC200、si-NC 的细胞均用含 20 μ mol/L A β_{25-35} 的 DMEM 培养液干预 24 h, 并分别记为 si-lncRNA-BC200+A β_{25-35} 组、si-NC+A β_{25-35} 组。转染 si-lncRNA-BC200 的细胞用 20 μ mol/L A β_{25-35} 和 20 μ g/L TNF- α 共同干预 24 h, 记为 TNF- α +si-lncRNA-BC200+A β_{25-35} 组。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

于 6 孔板中接种对数期 PC12 细胞及转染 si-lncRNA-BC200、si-NC 的 PC12 细胞 (1.0×10^5 个/孔), 按照上述分组处理。培养结束后, 收集各组细胞, 用预冷 PBS 清洗 2 次, 利用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测各组细胞凋亡。

1.5 Western blot 检测 cleaved-Caspase-3、p-p65 和 p-IκBα 蛋白表达

于 6 孔板中接种对数期 PC12 细胞及转染 si-lncRNA-BC200、si-NC 的 PC12 细胞 (1.0×10^5 个/孔),按照上述分组处理。培养结束后,收集各组细胞,用 RIPA 试剂提取细胞中总蛋白。经二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒测定蛋白含量后,行 10% SDS-PAGE 电泳。将分离蛋白转至 PVDF 膜,并用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。于 4 ℃ 冰箱中分别用 cleaved-Caspase-3(1:500)、p-p65(1:500)、p-IκBα(1:500) 和 β-actin(1:1000) 一抗孵育过夜,洗膜后,再于 37 ℃ 摇床中用山羊抗兔二抗(1:2000)孵育 1 h。加化学发光试剂,避光显影,曝光拍照,Image J 软件分析 cleaved-Caspase-3、p-p65、p-IκBα 相对 β-actin 的表达量。

1.6 qRT-PCR 检测 lncRNA-BC200 表达

于 6 孔板中接种对数期 PC12 细胞及转染 si-lncRNA-BC200、si-NC 的 PC12 细胞 (1.0×10^5 个/孔),按照上述分组处理。培养结束后,收集各组细胞,用 RNA 抽提试剂盒提取细胞中总 RNA,反转录为 cDNA 后,行 PCR 扩增。引物序列为:lncRNA-BC200 上游 5'-GCCTGTAATCCCAGCTCTCA-3',下游 5'-GTTGCTTTGAGGGAAGTTACGCT-3'; β-actin 上游 5'-AGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3',下游 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 lncRNA-BC200 相对 β-actin 的表达量。

1.7 酶联免疫吸附法检测细胞培养上清液中 TNF-α、IL-6 和 IFN-γ 表达水平

于 6 孔板中接种对数期 PC12 细胞及转染 si-lncRNA-BC200、si-NC 的 PC12 细胞 (1.0×10^5 个/孔),按照上述分组处理。培养结束后,收集各组细胞培养上清液,3500 r/min 离心 5 min。取上清,严格按照 TNF-α、IL-6 和 IFN-γ 试剂盒说明书,采用酶联免疫吸附法检测上清中 TNF-α、IL-6 和 IFN-γ 水平。

1.8 统计学分析

SPSS22.0 软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 Aβ₂₅₋₃₅ 对 PC12 细胞凋亡的影响

与正常对照组比较,10 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组、20 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组和 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$);与 10 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组比较,20 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组和 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$);与 20 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组比较,40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$;图 1)。

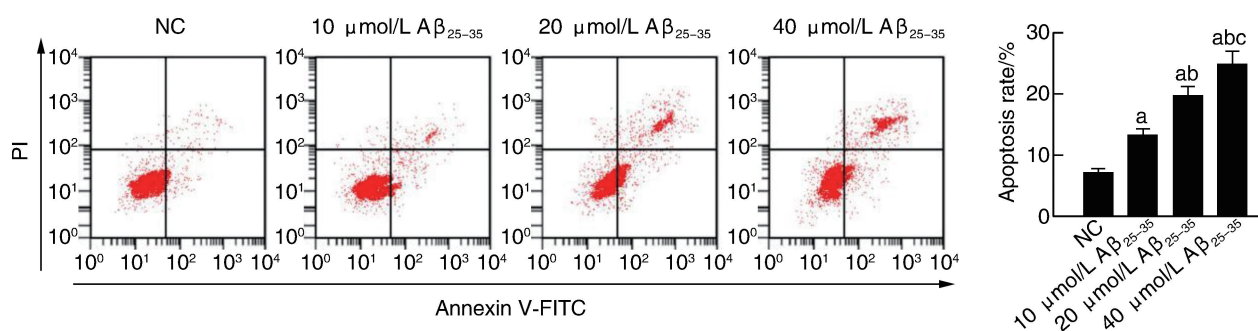


图 1. Aβ₂₅₋₃₅ 诱导 PC12 细胞凋亡 ($n=9$)

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 10 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组比较;c 为 $P < 0.05$,与 20 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组比较。

Figure 1. Effect of Aβ₂₅₋₃₅ on apoptosis of PC12 cells ($n=9$)

2.2 不同浓度 Aβ₂₅₋₃₅ 对 PC12 细胞中 lncRNA-BC200 表达的影响

与正常对照组比较,10 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组、20 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组和 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞中 lncRNA-BC200 的表达量均显著升高 ($P < 0.05$);

与 10 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组比较,20 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组和 40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞中 lncRNA-BC200 的表达量均显著升高 ($P < 0.05$);与 20 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组比较,40 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞中 lncRNA-BC200 的表达量显著升高 ($P < 0.05$;图 2)。

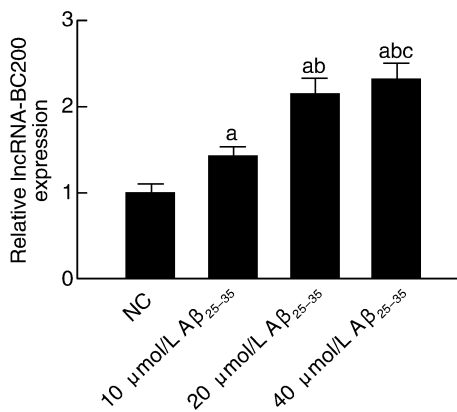


图 2. Aβ₂₅₋₃₅ 对 PC12 细胞中 lncRNA-BC200 表达的影响 (n=9)

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 10 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 20 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 组比较。

Figure 2. Effect of Aβ₂₅₋₃₅ on the expression of lncRNA-BC200 in PC12 cells (n=9)

2.3 敲减 lncRNA-BC200 降低 Aβ₂₅₋₃₅ 介导的 PC12 细胞凋亡和炎症反应

转染 si-lncRNA-BC200 的 PC12 细胞中 lncRNA-BC200 的表达量为 (0.12 ± 0.03) , 显著低于正常对照组或转染 si-NC 的 PC12 细胞 [(1.00 ± 0.10) 和 (0.98 ± 0.08) , $P < 0.05$], 说明转染 si-lncRNA-BC200 的 PC12 细胞中 lncRNA-BC200 被敲减。与正常对照组比较, Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞凋亡率和细胞中 cleaved-Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 细胞培养上清液中 TNF-α、IL-6 和 IFN-γ 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与 Aβ₂₅₋₃₅ 组比较, si-lncRNA-BC200 + Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞凋亡率和细胞中 cleaved-Caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 细胞培养上清液中 TNF-α、IL-6 和 IFN-γ 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 而 si-NC + Aβ₂₅₋₃₅ 组各检测指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 3 和表 1)。

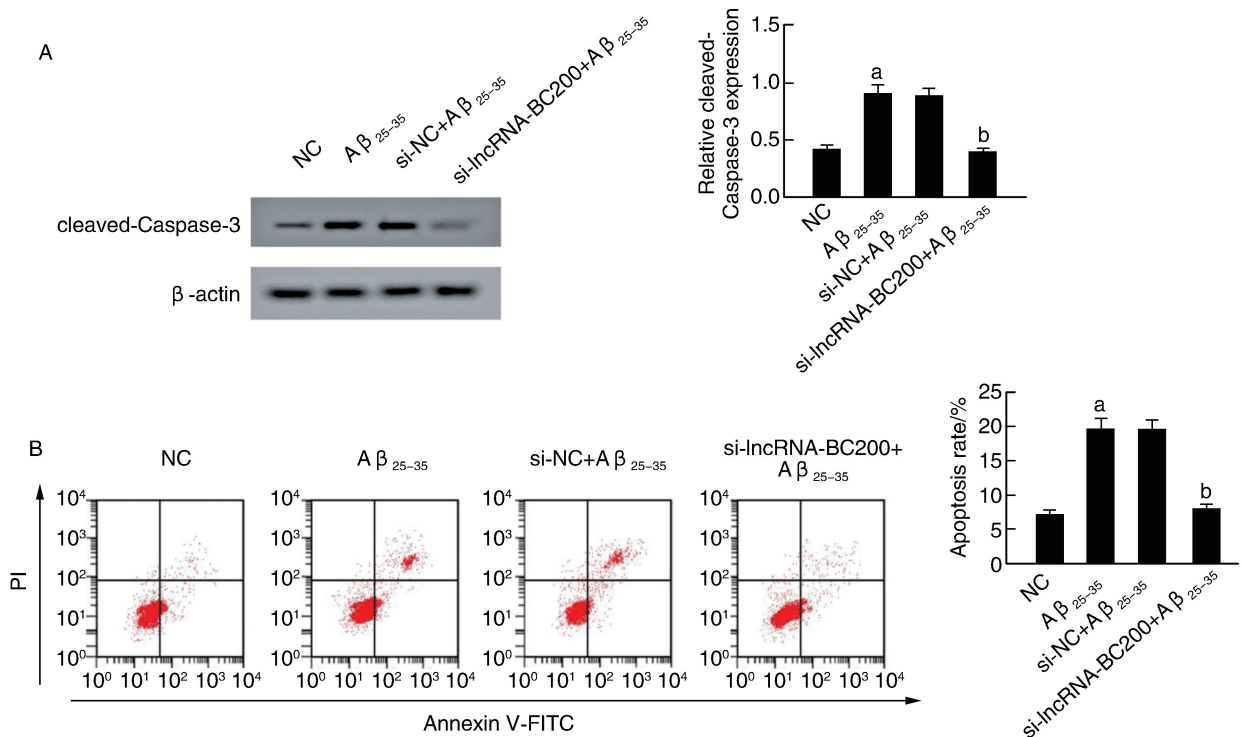


图 3. 敲减 lncRNA-BC200 对 Aβ₂₅₋₃₅ 介导的 PC12 细胞凋亡及 cleaved-Caspase-3 蛋白表达的影响 (n=9)

A 为 Western blot 检测 cleaved-Caspase-3 蛋白表达情况; B 为流式细胞术检测敲减 lncRNA-BC200 对 Aβ₂₅₋₃₅ 介导的 PC12 细胞凋亡的影响。

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Aβ₂₅₋₃₅ 组比较。

Figure 3. Effect of knocking down lncRNA-BC200 on the apoptosis and the protein expression of cleaved-Caspase-3 of PC12 cells mediated by Aβ₂₅₋₃₅ (n=9)

2.4 NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较, Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞中 p-

p65 和 p-IκBα 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与 Aβ₂₅₋₃₅ 组比较, si-lncRNA-BC200 + Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细

胞中 p-p65 和 p-IκBα 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 而 si-NC+Aβ₂₅₋₃₅ 组 p-p65 和 p-IκBα 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 4)。

2.5 NF-κB 信号通路激活剂 TNF-α 逆转敲减 lncRNA-BC200 对 Aβ₂₅₋₃₅ 介导的 PC12 细胞凋亡和炎症因子产生的影响

与 si-lncRNA-BC200+Aβ₂₅₋₃₅ 组比较, TNF-α+si-lncRNA-BC200+Aβ₂₅₋₃₅ 组 PC12 细胞中 p-p65 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率和细胞中 cleaved-Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 细胞培养上清液中 TNF-α、IL-6 和 IFN-γ 表达水平显著升高 ($P < 0.05$; 图 5 和表 2)。

表 1. 敲减 lncRNA-BC200 抑制 Aβ₂₅₋₃₅ 介导的 PC12 细胞炎症因子产生 (n=9)

Table 1. Knockdown of lncRNA-BC200 inhibits inflammation of PC12 cells mediated by Aβ₂₅₋₃₅ (n=9)

分组	TNF-α	IL-6	IFN-γ
正常对照组	71.02±6.47	25.44±1.62	19.12±1.51
Aβ ₂₅₋₃₅ 组	187.69±12.54 ^a	73.61±6.24 ^a	48.73±4.25 ^a
si-NC+Aβ ₂₅₋₃₅ 组	185.71±15.42	75.81±6.02	49.51±4.02
si-lncRNA-BC200 + Aβ ₂₅₋₃₅ 组	75.84±5.14 ^b	29.74±2.34 ^b	24.78±1.96 ^b

注: a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Aβ₂₅₋₃₅ 组比较。

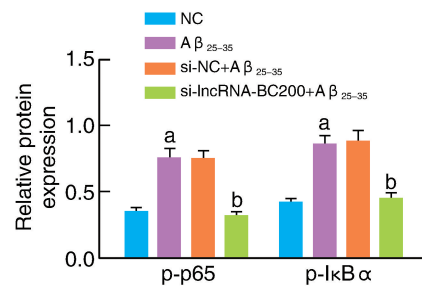
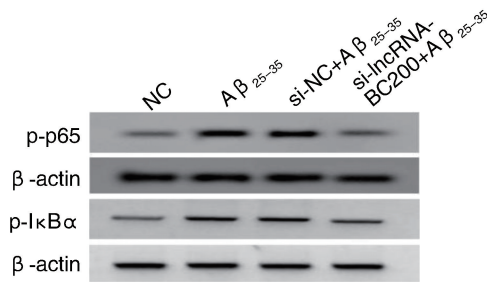


图 4. 敲减 lncRNA-BC200 抑制 Aβ₂₅₋₃₅ 介导的 PC12 细胞中 p-p65、p-IκBα 蛋白表达 (n=9)

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Aβ₂₅₋₃₅ 组比较。

Figure 4. Knockdown of lncRNA-BC200 inhibits the protein expression of p-p65 and p-IκBα in PC12 cells mediated by Aβ₂₅₋₃₅ (n=9)

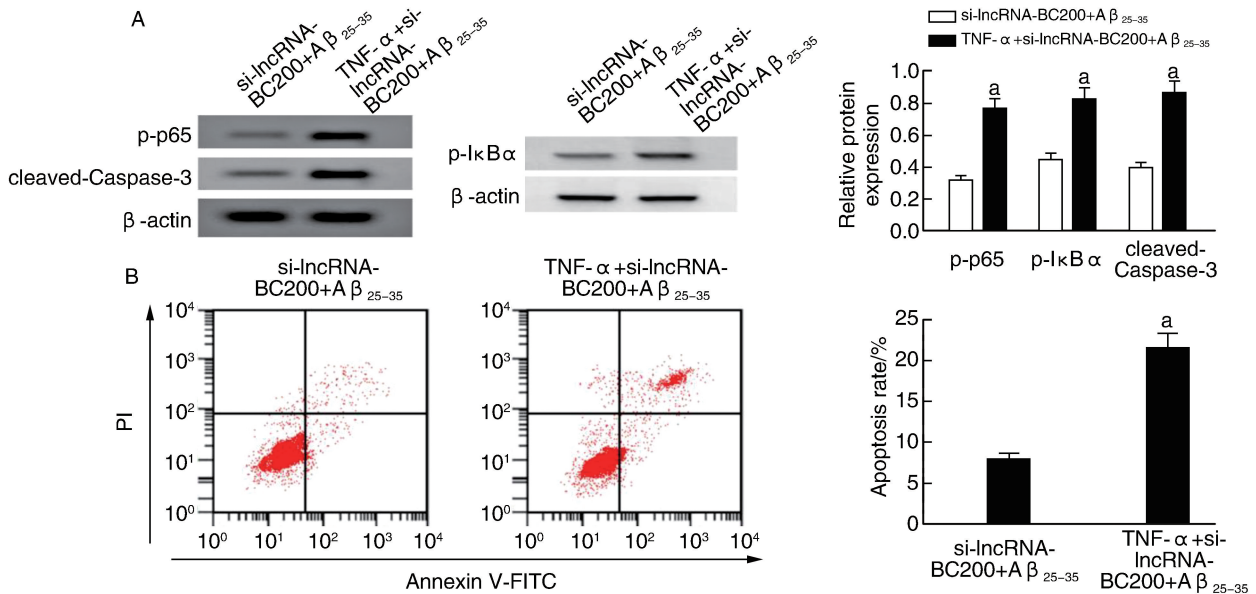


图 5. NF-κB 信号通路激活剂 TNF-α 逆转敲减 lncRNA-BC200 对 Aβ₂₅₋₃₅ 介导的 PC12 细胞凋亡及 cleaved-Caspase-3、p-p65、p-IκBα 蛋白表达的影响 (n=9)

A 为 Western blot 检测 cleaved-Caspase-3、p-p65、p-IκBα 蛋白表达情况; B 为流式细胞仪检测细胞凋亡。

a 为 $P < 0.05$, 与 si-lncRNA-BC200+Aβ₂₅₋₃₅ 组比较。

Figure 5. NF-κB signaling pathway activator TNF-α reverses the effect of knocking down lncRNA-BC200 on the apoptosis and protein expression of cleaved-Caspase-3, p-p65, p-IκBα in PC12 cells mediated by Aβ₂₅₋₃₅ (n=9)

表 2. NF- κ B 信号通路激活剂 TNF- α 逆转敲减 lncRNA-BC200 对 A β_{25-35} 介导的 PC12 细胞炎症因子生成的影响 ($n=9$)

Table 2. NF- κ B signaling pathway activator TNF- α reverses the effect of knocking down lncRNA-BC200 on inflammation of PC12 cells mediated by A β_{25-35} ($n=9$)

分组	单位:ng/L		
	TNF- α	IL-6	IFN- γ
si-lncRNA-BC200 + A β_{25-35} 组	75.84 \pm 5.14	29.74 \pm 2.34	24.78 \pm 1.96
TNF- α + si-lncRNA-BC200 + A β_{25-35} 组	173.22 \pm 13.15 ^a	71.54 \pm 5.86 ^a	45.61 \pm 3.98 ^a

注:a 为 $P < 0.05$, 与 si-lncRNA-BC200 + A β_{25-35} 组比较。

3 讨论

阿尔茨海默病 (AD) 是继肿瘤和心血管疾病之后影响人类生命健康的第三大类疾病,严重影响中老年人的生活质量^[6]。AD 主要表现为记忆能力减退和认知功能障碍,目前其发生发展的分子机制尚未明确。A β 是一种由淀粉样前体蛋白水解得到的片段,其沉积是 AD 的典型病理特征。A β 具有神经毒性,可诱导神经细胞凋亡和炎症反应,引起一系列病理变化,促进 AD 的发生和发展^[7]。Caspase-3 是 Caspase 级联反应的核心分子,其受到凋亡信号刺激被活化,生成 cleaved-Caspase-3,进一步剪切细胞内各种底物,诱导细胞凋亡^[8-9]。AD 患者体内 A β 可诱导 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 等大量炎症介质的产生,这些炎症因子还可诱导 A β 产生,相互促进,在脑内形成恶性循环,促进 AD 的发展进程^[10]。本研究结果显示,神经细胞 PC12 经 A β_{25-35} 干预后,细胞凋亡率及细胞中 cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显升高,且细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 表达水平明显升高,说明 A β_{25-35} 诱导 PC12 细胞产生了凋亡及炎性损伤,模型建立成功。

lncRNA 在真核生物中广泛存在,参与调控细胞凋亡、炎症反应和氧化应激等生理或病理过程,在 AD 的发生发展中起重要作用^[11-13]。Yi 等^[14] 研究显示,lncRNA MEG3 在 AD 大鼠脑组织中表达下调,上调 lncRNA MEG3 通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路改善 AD 大鼠学习和记忆功能,并抑制海马神经细胞凋亡、氧化应激损伤和炎症损伤。Ma 等^[15] 研究显示,过表达

lncRNA MALAT1 可抑制 AD 模型神经细胞凋亡,促进神经突触生长,并降低 IL-6 和 TNF- α 表达, lncRNA MALAT1 对 AD 的发生发展起抑制作用。

lncRNA-BC200 作为一种 lncRNA,在多种疾病中起调控作用。目前,对 lncRNA-BC200 的研究多集中在肿瘤方面。研究显示,lncRNA-BC200 在肝癌、非小细胞肺癌和食管鳞癌等肿瘤中表达上调,发挥癌基因作用促进肿瘤细胞的恶性表型,进而促进肿瘤的发展进程^[16-18]。王瑶等^[19] 研究显示,AD 患者血清中 lncRNA-BC200 表达高于血管性痴呆患者和健康体检者,且血清 lncRNA-BC200 水平与 AD 病程相关,血清 lncRNA-BC200 可用于鉴别 AD 和血管性痴呆,有可能成为 AD 诊断的生物标志物。本研究主要观察了 lncRNA-BC200 对 AD 细胞模型 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞炎症因子表达及细胞凋亡的影响,结果显示,A β_{25-35} 促进 PC12 细胞中 lncRNA-BC200 的表达,敲减 lncRNA-BC200 可抑制 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞分泌 TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 炎症因子,并减少神经细胞凋亡,这提示 lncRNA-BC200 有可能成为 AD 治疗的分子靶点。

核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 是由 5 种亚单位构成的同源或异源二聚体蛋白质,典型的 NF- κ B 是 p50 和 p65 异源二聚体 (p50/p65) 形式。NF- κ B 被激活后,进入细胞核,诱导产生 TNF- α 、IL-6 等一系列炎症因子,诱发炎性损伤^[20-21]。NF- κ B 信号通路的激活参与 AD 的发展进程,抑制其激活对 AD 的治疗具有积极意义。研究显示,黄芩苷可通过抑制 NOD 样受体家族含 Pysin 结构域 3 (NLR family pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体和 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/NF- κ B 信号通路的激活来抑制小胶质细胞诱导的神经炎症,具有治疗 AD 的潜在价值^[22]; miR-107 可通过抑制 NF- κ B 信号通路改善 AD 小鼠空间记忆功能,并减少神经细胞凋亡,为 AD 的治疗提供分子靶点^[23]。本研究结果显示,PC12 细胞经 A β_{25-35} 诱导后,细胞中 p-p65 蛋白表达量增加,提示 AD 中 NF- κ B 信号通路处于激活状态;敲减 lncRNA-BC200 降低了 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞中 p-p65 蛋白表达量,说明敲减 lncRNA-BC200 可抑制 NF- κ B 信号通路的激活,而 NF- κ B 信号通路激活剂 TNF- α 降低了敲减 lncRNA-BC200 对 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞中 p-p65 蛋白表达的抑制作用,进一步提示敲减 lncRNA-BC200 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活来阻碍 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞分泌炎症因子及细胞凋亡。

综上,敲减 lncRNA-BC200 可抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞 PC12 分泌炎症因子及细胞凋亡,其作用机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路的激活有关,lncRNA-BC200 有可能成为 AD 治疗的分子靶点。

[参考文献]

- [1] KE S, YANG Z, YANG F, et al. Long noncoding RNA NEAT1 aggravates $A\beta$ -induced neuronal damage by targeting miR-107 in alzheimer's disease[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(7): 640-650.
- [2] WANG Q, GE X, ZHANG J, et al. Effect of lncRNA WT1-AS regulating WT1 on oxidative stress injury and apoptosis of neurons in Alzheimer's disease via inhibition of the miR-375/SIX4 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(23): 23974-23995.
- [3] LEE S, YOUNG K, JUN M. Major compounds of red ginseng oil attenuate $A\beta(25-35)$ -induced neuronal apoptosis and inflammation by modulating MAPK/NF- κ B pathway[J]. *Food Funct*, 2018, 9(8): 4122-4134.
- [4] 李晓峰, 张文瑛, 梁铁生. 老年痴呆症患者外周血中 lncRNA-BC200 和 lncRNA-17 A 水平及应用价值[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2019, 36(9): 790-793.
- [5] LIU J, ZUO X, HAN J, et al. MiR-9-5p inhibits mitochondrial damage and oxidative stress in AD cell models by targeting GSK-3 β [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(11): 2273-2280.
- [6] QU J, XIONG X, HUJIE G, et al. MicroRNA-132-3p alleviates neuron apoptosis and impairments of learning and memory abilities in Alzheimer's disease by downregulation of HNRNPU stabilized BACE1[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(21): 2309-2320.
- [7] HABAIKE A, YAKUFU M, CONG Y, et al. Neuroprotective effects of Fomes officinalis Ames polysaccharides on $A\beta(25-35)$ -induced cytotoxicity in PC12 cells through suppression of mitochondria-mediated apoptotic pathway[J]. *Cytotechnology*, 2020, 72(4): 539-549.
- [8] 雷敏, 吴丽荣, 刘英. 氯沙坦对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(3): 213-218.
- [9] LEI S, WU S, WANG G, et al. Pinorensin diglucoside attenuates neuroinflammation, apoptosis and oxidative stress in a mice model with Alzheimer's disease[J]. *Neuroreport*, 2021, 32(3): 259-267.
- [10] 梁春荣, 刘雨辉, 王叶冉, 等. 阿尔茨海默病患者外周血炎症因子水平与认知功能的相关性研究[J]. *解放军医学杂志*, 2014, 39(2): 133-137.
- [11] DONG L X, ZHANG Y Y, BAO H L, et al. LncRNA NEAT1 promotes Alzheimer's disease by down regulating micro-27a-3p[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(8): 8885-8896.
- [12] ZHANG Y Y, BAO H L, DONG L X, et al. Silenced lncRNA H19 and up-regulated microRNA-129 accelerates viability and re-strains apoptosis of PC12 cells induced by $A\beta(25-35)$ in a cellular model of Alzheimer's disease[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(1): 112-125.
- [13] WANG Q B, GE X M, ZHANG J, et al. Effect of lncRNA WT1-AS regulating WT1 on oxidative stress injury and apoptosis of neurons in Alzheimer's disease via inhibition of the miR-375/SIX4 axis[J]. *Aging(Albany NY)*, 2020, 12(23): 23974-23995
- [14] YI J P, CHEN B, YAO X X, et al. Upregulation of the lncRNA MEG3 improves cognitive impairment, alleviates neuronal damage, and inhibits activation of astrocytes in hippocampus tissues in Alzheimer's disease through inactivating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 18053-18065.
- [15] MA P, LI Y, ZHANG W, et al. Long non-coding RNA MALAT1 inhibits neuron apoptosis and neuroinflammation while stimulates neurite outgrowth and its correlation with miR-125b mediates PTGS2, CDK5 and FOXQ1 in Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2019, 16(7): 596-612.
- [16] TAN N, ZHU B, SHU H, et al. Effect of lncRNABC200 on proliferation and migration of liver cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(2): 461-470.
- [17] GAO B B, WANG S X. LncRNA BC200 regulates the cell proliferation and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via PI3K/AKT pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3): 1093-1101.
- [18] ZHAO R, CAO X, JIN S, et al. LncRNA BC200 promotes esophageal squamous cell cancer migration and invasion and can regulate ATF4 expression[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1392.
- [19] 王瑶, 杨超, 邓克廷, 等. 血清长链非编码 RNA BC200 水平在阿尔茨海默病诊疗中的应用价值[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(5): 589-593.
- [20] KONG F, SUN Y, SONG W, et al. miR-216a alleviates LPS-induced acute lung injury via regulating JAK2/STAT3 and NF- κ B signaling[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(1): 67-78.
- [21] 张政军, 郝钰, 万婷婷. 沙格列汀对 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤及 miR-590/TLR4/NF- κ B 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(11): 938-943.
- [22] JIN X, LIU M Y, ZHANG D F, et al. Baicalin mitigates cognitive impairment and protects neurons from microglia-mediated neuroinflammation via suppressing NLRP3 inflammasomes and TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(5): 575-590.
- [23] HU W, WEN L, CAO F, et al. Down-regulation of miR-107 worsen spatial memory by suppressing SYK expression and inactivating NF- κ B signaling pathway[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2019, 16(2): 135-145.

(此文编辑 许雪梅)