

网络出版时间: 2023-12-28 15:36:03 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20231227.0759.020>

LncRNA XR_378418 对肝星状细胞 生物学行为及转录组学影响

张 雪¹ 陈 森¹ 汪小莉¹ 周秋梅²

摘要 目的 探究长链非编码 RNA (LncRNA) XR_378418 在肝星状细胞 JS-1 生物学行为中的作用,并基于转录组测序探索 LncRNA XR_378418 参与肝纤维化发生的潜在分子机制。方法 构建重组质粒 pcDNA-LncRNA XR_378418 和 pcDNA-NC 分别转染 JS-1 细胞;通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 以及划痕实验分别检测 LncRNA XR_378418 的表达水平、JS-1 细胞增殖和迁移情况;通过高通量测序分析 LncRNA XR_378418 对 JS-1 细胞转录组学的影响。结果 RT-qPCR 结果显示,过表达组中的 LncRNA XR_378418 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$);CCK-8 和划痕结果显示,LncRNA XR_378418 表达增加后,JS-1 细胞增殖和迁移能力增强;高通量测序结果显示,共挑选出 248 个差异基因,其中上调的基因有 127 个、下调的基因有 117 个;基因本体论 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 功能富集分析结果显示,LncRNA XR_378418 过表达改变了 JS-1 细胞部分基因的转录能力,参与调控细胞黏附、细胞自噬、 Ca^{2+} 信号传导等功能。结论 LncRNA XR_378418 可促进 JS-1 细胞增殖和迁移,影响 JS-1 细胞中细胞黏附、钙离子信号转导等相关基因的表达。

关键词 长链非编码 RNA; 肝纤维化; 肝星状细胞; 高通量测序

中图分类号 R 575

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0127-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.020

肝纤维化 (liver fibrosis, LF) 以细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白的过度沉积导致组织瘢痕形成为主要病理特征^[1]。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的激活是肝纤维化疾病进程中的关键环节,多种细胞因子如转化生长因子 (trans-

forming growthfactor, TGF) β 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) α , 可促进 HSC 过度活化和增殖,从而导致肝组织中 ECM 过度生成,肝实质细胞不断减少,进而发展为肝纤维化^[2-4]。LF 发病过程较为复杂,具体机制尚不明确。因此,探索 LF 的发病机制和寻找其治疗靶点至关重要。

LncRNA 是一种长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA。研究^[5]表明,LncRNA 参与 LF 发生发展过程中的关键生物学过程,可作为诊断和治疗肝纤维化的靶点和生物标志物。课题组前期通过生物信息学分析发现,LncRNA XR_378418 与肝纤维化高度相关^[6]。为进一步阐释 LncRNA XR_378418 在肝纤维化发生中的作用,该实验通过构建 LncRNA XR_378418 的过表达质粒,研究 LncRNA XR_378418 对 HSC JS-1 增殖及迁移的影响,并通过高通量测序分析 LncRNA XR_378418 对 JS-1 细胞转录组的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 小鼠 JS-1 细胞株购自湖南丰晖生物科技有限公司 (批号: CL0417); 高糖 DMEM 培养基购自江苏凯基生物技术股份有限公司 (货号: KGM12800-500); 胎牛血清购自新西兰纽泽鲁姆有限公司 (FBS-S500); MEM (货号: 2407805) 和 Lipo-fectamine3000 转染试剂 (货号: L3000008) 购自美国 ThermoFisher 公司; RNA 快速提取试剂盒购自上海奕杉生物科技有限公司 (货号: RN001); NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒 (货号: E047-01A) 和 NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒 (货号: E096-01A) 购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司; 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8 assay, CCK-8) 试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司 (货号: BB-4202-01); 重组质粒 pcDNA-LncRNA XR_378418、pcDNA-NC 购自合肥源恩生物技术有限公司 (货号: C64357); 倒置显微镜购自日本奥林巴斯有限公司 (型号: CKX53); 酶标仪购自深圳雷杜生命科学股份有限公司 (型号: RT6100); 荧光定量 PCR 仪购自美国应用生物

2023-10-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82004139)

作者单位: ¹安徽中医药大学药学院, 合肥 230012

²安徽中医药大学第一附属医院临床研究实验中心, 合肥 230031

作者简介: 张 雪, 女, 硕士研究生;

周秋梅, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhouqiumei.2008@163.com;

汪小莉, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangxiaoli@ahcm.edu.cn

系统公司(型号: Light Cycler480 II)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 JS-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 青链霉素的高糖 DMEM 培养基中,将其置于 37 ℃、5% CO₂ 无菌培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 将 JS-1 细胞分为阴性对照组(pcDNA-NC)和过表达 LncRNA XR_378418 组(LncRNA XR_378418),预先将细胞按每孔 1×10^6 接种于 6 孔细胞培养板中,以确保进行转染时细胞融合率达到 70% 左右。根据 LipofectamineTM3000 说明书,分别将 pcDNA-NC 和 pcDNA-LncRNA XR_378418 质粒转染入 JS-1 细胞。转染 48 h 后,通过倒置荧光显微镜进行观察。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测 LncRNA XR_378418 的表达差异 按 1.2.2 项方法进行分组转染,48 h 后根据 RNA-quick purification kit 试剂盒提取细胞 RNA,紫外分光光度计测定浓度,根据 NovoScript® Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 说明书,配置逆转录体系进行逆转录反应合成 cDNA。以 cDNA 为模板根据 NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒进行聚合酶链扩增反应。引物序列: LncRNA XR_378418 引物(F: 5'-ACCAACCTGACAAGCCAAATAGA-3'; R: 5'-CAGGAAAGCCGATACTGGGAC-3'); β -actin 引物(F: 5'-CAAGAGAGGTATCCTGACCCT-3'; R: 5'-TGATCTGGGTCATCTTTTCAC-3')。

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖能力 将处于对数生长期的细胞铺至 96 孔板中,每孔加入 100 μ l 细胞悬液,每组设置 6 个复孔。放于 CO₂ 培养箱中培养,待细胞融合至 70% 左右时进行质粒转染。处理 24、48、72、96 h 后,按每孔 10% 的比例加入 CCK-8 试剂,锡纸包裹避光处理,继续孵育 2 h 后取出,酶标仪于 450 nm 处检测吸光度(absorbance, A)值。

1.2.5 划痕实验检测细胞迁移能力 首先在 6 孔板背面画横线,每孔 3 条线,每条线均匀且平行,间隔 0.5 cm。将细胞悬液按每孔 2 ml 铺于 6 孔培养板,当细胞达到 70% 左右时,用无菌枪头在孔板中划痕画线, PBS 清洗漂浮的细胞(3 次),按 1.2.2 项进行转染。分别在划痕后 0、12、24 h 于显微镜下观察各组细胞水平迁移情况。

1.2.6 高通量测序 使用 RNA-quick purification kit 试剂盒提取对照组(pcDNA-NC)和过表达组(pcDNA-LncRNA XR_378418)的总 RNA,将 RNA 样

本送至深圳华大基因科技有限公司进行高通量测序分析。

1.2.7 差异表达基因功能分析 筛选过表达组(pcDNA-LncRNA XR_378418)与对照组(pcDNA-NC)差异表达的基因,筛选条件为 $|\log_2 FC| > 1$ 、 $P < 0.05$ 。采用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)功能注释对差异表达的基因进行基因本体论(gene ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,所有数值均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

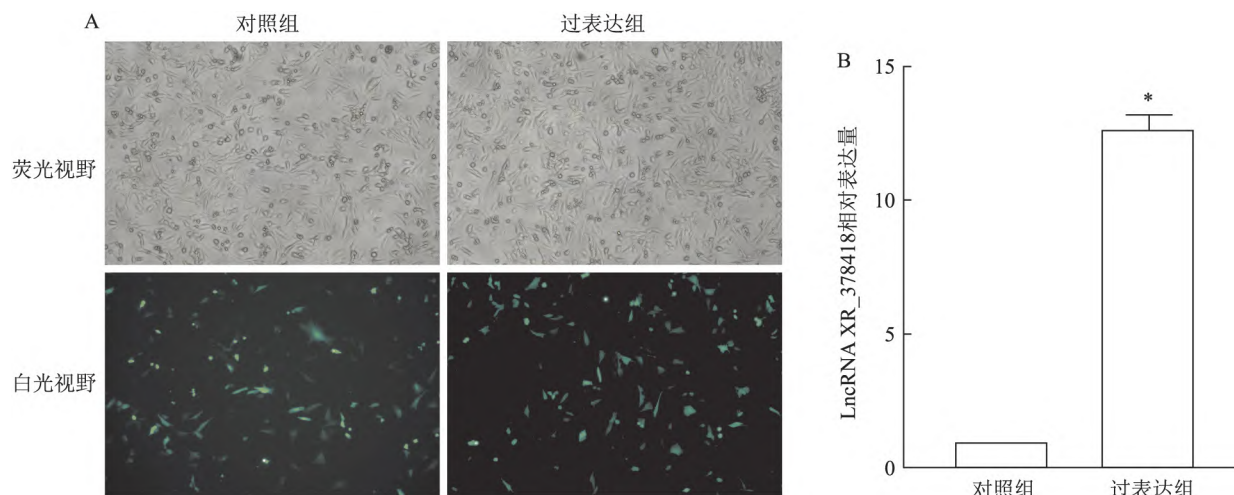
2 结果

2.1 重组质粒转染 JS-1 细胞 将携带绿色荧光的重组质粒 pcDNA-LncRNA XR_378418 和 pcDNA-NC 分别转染 JS-1 细胞培养 48 h,荧光显微镜下观察到阳性表达的绿色荧光,提示重组质粒在 JS-1 细胞中转染成功,见图 1A。RT-qPCR 结果:转染重组质粒 pcDNA-LncRNA XR_378418 后,JS-1 细胞中 LncRNA XR_378418 表达水平高于对照组($P < 0.05$),提示 pcDNA-LncRNA XR_378418 在 JS-1 细胞中成功表达。见图 1B。荧光显微镜观察和 RT-qPCR 结果说明实验成功构建了 LncRNA XR_378418 过表达质粒,并可在 JS-1 细胞中高表达。

2.2 过表达 LncRNA XR_378418 对 JS-1 细胞增殖和 α -SMA 表达的影响 通过 CCK-8 法检测 LncRNA XR_378418 对 JS-1 细胞增殖情况,结果显示,在 48 h 和 72 h 两个时间点,过表达组(pcDNA-LncRNA XR_378418)的吸光度值均高于对照组(pcDNA-NC)且差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2A,说明 LncRNA XR_378418 的过表达可促进 JS-1 细胞的增殖。对 JS-1 细胞中肝纤维化标志物 α -SMA 的相对表达量进行了检测,结果显示,过表达组中的 α -SMA 相对表达量较对照组增加($P < 0.05$)。见图 2B。

2.3 LncRNA XR_378418 对 JS-1 细胞迁移的影响

通过划痕实验检测 JS-1 细胞转染重组质粒后的迁移情况,见图 3。在划痕处理 24 h 内,两组细胞迁移能力相比较,过表达组的细胞迁移水平高于对照组($P < 0.05$),随时间延长,两组的迁移率也增加

图1 重组质粒在 JS-1 细胞中转染及表达情况($n=3$)

A: 荧光显微镜观察转染重组质粒后绿色荧光 $\times 200$; B: RT-qPCR 检测转染重组质粒后 JS-1 细胞中 LncRNA XR_378418 的相对表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$

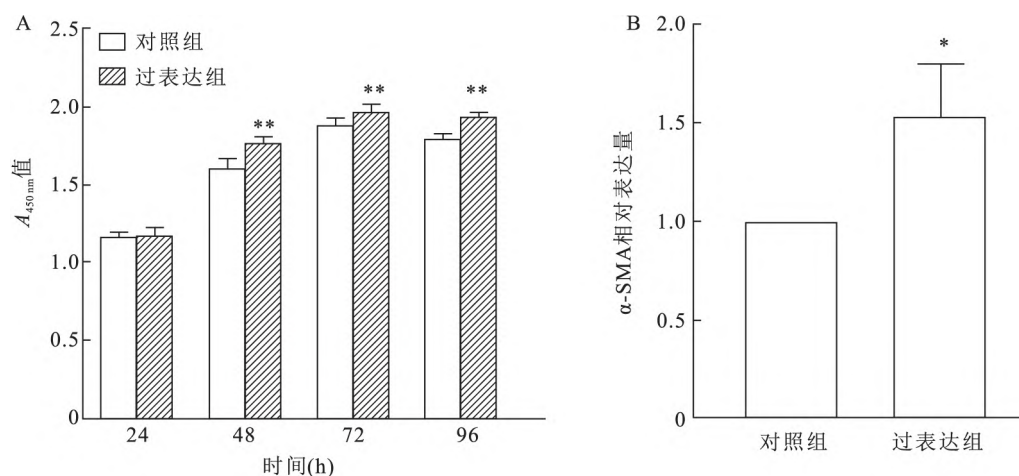


图2 过表达 LncRNA XR_378418 后促进 JS-1 细胞增殖和肝纤维化

A: CCK-8 法检测过表达 LncRNA XR_378418 对 JS-1 细胞的影响; B: RT-qPCR 检测过表达 LncRNA XR_37841 后肝纤维化标志物 α -SMA 的相对表达水平; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

($P < 0.05$)。以上结果说明 LncRNA XR_378418 的过表达可促进 JS-1 细胞的水平迁移。

2.4 高通量测序结果分析 对对照组和过表达组提取的 RNA 进行高通量测序分析,结果显示,对照组共计检测到 15 441 个基因,过表达组共计检测到 15 409 个基因,两组共同检测到的基因有 14 645 个(图 4A)。过表达组相较于对照组有 244 个基因有显著差异,其中表达上调的基因有 127 个,表达下调的基因有 117 个。见图 4。

2.5 差异表达基因的功能分析 对差异基因进行 GO 注释和 KEGG 通路富集分析,GO 注释显示,与对照组比较,过表达组差异基因涉及的生物过程

(BP) 主要包括细胞黏附、通过质膜黏附分子的同种细胞黏附、参与免疫反应的自然杀伤细胞激活等;细胞定位(CC)主要包括细胞自噬、突触复合体等;分子功能(MF)主要包括钙离子结合、蛋白质的异构化活性等(图 5A)。KEGG 通路富集分析显示,差异基因主要集中在钙离子信号转导通路、乙醇中毒、病毒致癌作用等信号通路,其中重要的通路主要为钙离子信号转导通路。见图 5。

3 讨论

LncRNA 是一类超过 200 个核苷酸的非编码 RNA。最新研究^[7]表明 LncRNA 被证实具有编码蛋

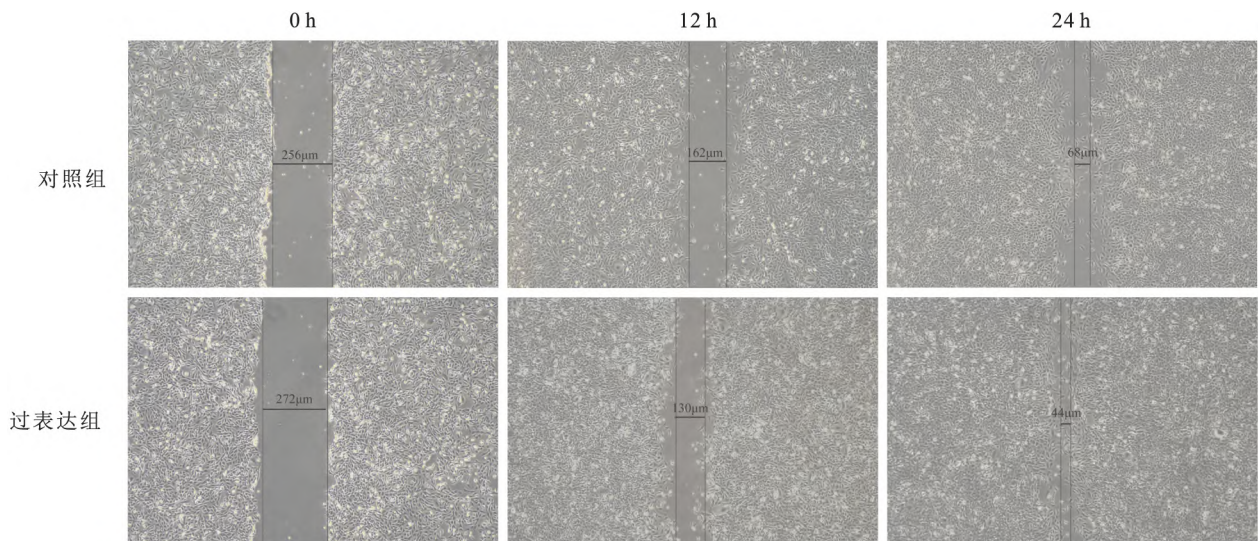


图3 过表达 LncRNA XR_378418 对 JS-1 细胞迁移的影响 ×50

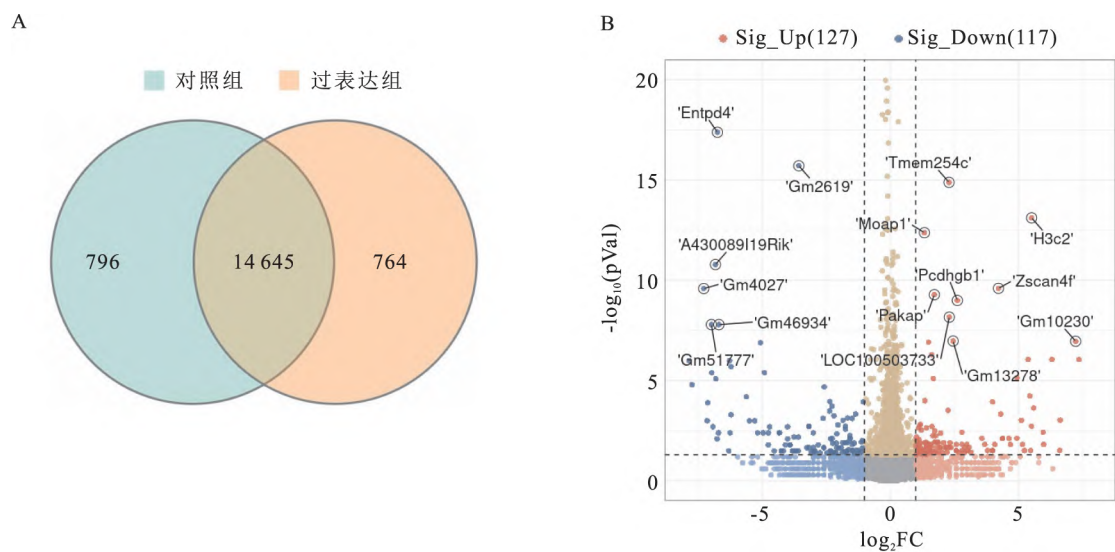


图4 高通量测序分析

A: 对照组和过表达组 RNA 测序总基因; B: 两组比较的差异基因火山图

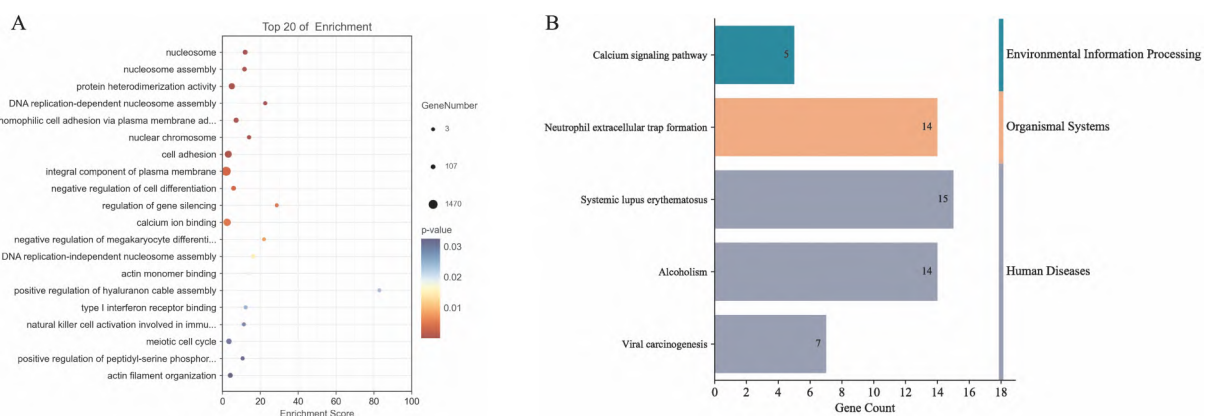


图5 GO-KEGG 富集分析结果

A: GO 富集散点图; B: KEGG 富集条形图

白质的功能,且有少部分 LncRNA 编码小肽被鉴定出来,并且已被发现可参与多种复杂的生物过程,包括染色质重组、基因转录和转录后调节。近年来,众多研究^[8]表明,LncRNA 已成为肝纤维化的重要调控因子并参与了肝纤维化的发展进程,包括炎症反应、HSCs 的激活、ECM 重塑和上皮间质转化(EMT)等。HSCs 是肝纤维化的一个主要细胞角色,激活的 HSC 有助于 ECM 成分的过度产生和沉积^[9]。TGF- β 是一种参与肝脏纤维化发病机制的关键细胞因子,在促进纤维化过程中发挥核心作用。Zhang et al^[10]证明了 Lnc-LFAR1 反向调控 Smad2/3 并促进其磷酸化,进而激活 TGF- β 信号通路,促进 HSC 的活化和肝纤维化的发生。

本课题组前期通过生物信息学分析发现 LncRNA XR_378418 与肝纤维化的发生密切相关^[5]。本研究构建 LncRNA XR_378418 过表达质粒,成功转染 HSC JS-1。CCK-8 和划痕实验表明,LncRNA XR_378418 过表达能够促进 HSC 增殖和迁移的影响。高通量测序结果表明,LncRNA XR_378418 过表达可影响 JS-1 细胞的转录组。通过差异基因的功能富集分析,可能与细胞黏附、通过质膜黏附分子的同种细胞黏附、钙离子信号转导通路、核糖体组装、乙醇中毒、病毒致癌作用等相关。

细胞黏附分子是一类表达在多种细胞表面的膜糖蛋白,具有细胞识别、细胞活化和信号传导的功能,在肝纤维化中的作用越来越受到重视。其中黏附分子整合素是一类具有细胞黏附和信号传导受体功能的异二聚体糖蛋白^[11],介导 HSC 和 ECM 之间的相互识别和黏附。TGF- β 是一种促纤维化并调节静止 HSC 转化为活化 HSC 的细胞因子,在细胞表面通常以潜伏复合物(Latent TGF- β)形式存在。整合素可激活 TGF- β 复合物使其活化^[12],参与肝纤维化的进程。本研究在 JS-1 细胞中过表达 LncRNA XR_378418,结合差异基因的功能富集提示,LncRNA XR_378418 可能通过调控细胞黏附分子、信号通路上的靶点等途径影响肝纤维化的进程。

Ca^{2+} 作为第二信使几乎参与了细胞的所有生物功能,如细胞的生长、分化和代谢等。研究^[13]表明 Ca^{2+} 在肝纤维化发病机制中对 HSC 的活化起到重要作用。 Ca^{2+} 信号传导受损与内质网应激和自噬缺陷等诱发肝纤维化的原因密切相关。另有研究^[14]表明,Wnt/ Ca^{2+} 信号通路在 PDGF-BB 的诱导下被激活参与了人 HSC 的活化和增殖,导致肝纤维化的

发生。肝纤维化的发生往往伴随着炎症反应,可导致细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高。因此推测 LncRNA XR_378418 也可能调控 Ca^{2+} 信号通路中的分子互动或者 Ca^{2+} 浓度稳态来影响肝纤维化的发展。

综上所述,该研究表明 LncRNA XR_378418 可促进 HSC JS-1 的增殖和迁移,并影响该细胞转录组,提示 LncRNA XR_378418 可能在促进肝纤维化的发生发展发挥重要作用。后续可进一步研究 LncRNA XR_378418 对 JS-1 细胞作用的分子作用机制,为肝纤维化的治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Zhang J, Li Y, Liu Q, et al. Sirt6 alleviated liver fibrosis by deacetylating conserved lysine 54 on Smad2 in hepatic stellate cells [J]. *Hepatology*, 2021, 73(3): 1140–57.
- [2] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151–66.
- [3] Zhao S X, Li W C, Fu N, et al. CD14⁺ monocytes and CD163⁺ macrophages correlate with the severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 228.
- [4] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37–55.
- [5] 王锦坡, 黄月红, 陈运新, 等. LncRNA 锌指蛋白反义链 1 对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的作用 [J]. *福建医科大学学报*, 2023, 57(2): 96–102.
- [6] Jiang H, Wu F, Jiang N, et al. Reconstruction and analysis of competitive endogenous RNA network reveals regulatory role of long non-coding RNAs in hepatic fibrosis [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(5): 4091–100.
- [7] 严平, 周媛媛, 贾永超, 等. LncRNA 调控病原微生物致病作用的研究进展 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58(4): 65–9.
- [8] Ye J, Lin Y, Yu Y, et al. LncRNA NEAT1/microRNA-429-5p/SOCS2 axis regulates liver fibrosis in alcoholic steatohepatitis [J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 445.
- [9] 陈涤非, 揭磊, 黄启鸣, 等. 褪黑素调控自噬抑制肝星状细胞增殖的作用及机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(11): 1910–5.
- [10] Zhang K, Han X, Zhang Z, et al. The liver-enriched lnc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGF β and Notch pathways [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 144.
- [11] 梁家杰, 马岗, 吴江峰. 整合素及其相关 miRNA 在肝纤维化中作用的研究进展 [J]. *解剖学杂志*, 2021, 44(2): 152–5.
- [12] Fan W, Liu T, Chen W, et al. ECM1 prevents activation of transforming growth factor β , hepatic stellate cells, and fibrogenesis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(5): 1352–67. e13.
- [13] Jia Y, Yuan L, Xu T, et al. Herbal medicine gan-fu-kang down-

regulates Wnt/ Ca^{2+} signaling to attenuate liver fibrogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Med Rep* , 2016 , 13(6) : 4705 – 14.
[14] Shin H W , Park S Y , Lee K B , et al. Transcriptional profiling

and Wnt signaling activation in proliferation of human hepatic stellate cells induced by PDGF-BB [J]. *Korean J Hepatol* , 2009 , 15 (4) : 486 – 95.

Effect of LncRNA XR_378418 on the biological behavior and transcriptome of hepatic stellate cells

Zhang Xue¹ , Chen Sen¹ , Wang Xiaoli¹ , Zhou Qiumei²

(¹*Pharmacy Faculty , Anhui University of Chinese Medicine , Hefei 230012;*

²*Experimental Center of Clinical Research , The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine , Hefei 230031*)

Abstract Objective To explore the role of long non-coding RNA XR_378418 (LncRNA XR_378418) in the biological behavior of hepatic stellate cells line JS-1 and to probe the potential molecular mechanism of LncRNA XR_378418 involved in liver fibrosis based on transcriptome sequencing. **Methods** In this study ,the recombinant plasmid of pcDNA-LncRNA XR_378418 and control plasmid pcDNA-NC were constructed and transfected into JS-1 cells respectively. Then ,the expression level of LncRNA XR_378418 was analyzed by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) . The effect of overexpression of LncRNA XR_378418 on proliferation and migration of JS-1 cells were detected by cell counting kit-8 assay (CCK-8) and scratch assay , respectively. Finally , by high-throughput sequencing analysis , the effect of XR_378418 on the transcriptomics of JS-1 cells was analyzed. **Results** RT-qPCR results showed that the expression level of LncRNA XR_378418 in the overexpression group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$) . The results of CCK-8 and scratch experiment suggested that the proliferation and migration in the pcDNA-LncRNA XR_378418 group significantly increased. Furthermore , the high-throughput sequencing analysis showed that a total of 248 genes were screened by gene differential analysis , of which 127 were up-regulated , and 117 were down-regulated. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses revealed that LncRNA XR_378418 could regulate cell adhesion , autophagy and Ca^{2+} signaling , etc. **Conclusion** LncRNA XR_378418 promotes the proliferation and migration of JS-1 cells and affects the expression of genes related to cell adhesion and calcium signaling in JS-1 cells.

Key words long non-coding RNA; liver fibrosis; hepatic stellate cells; high-throughput sequencing