

登革病毒模拟ADE效应中肝细胞lncRNA的差异表达

王效军, 黄洁, 梁慧琳, 徐秀娟* (广东医科大学公共卫生学院, 广东东莞 523808)

摘要: 目的 分析登革病毒(DENV)感染L-02细胞中长链非编码RNA(lncRNA)差异表达。方法 利用DENV1 NS1抗体和DENV2孵育后感染L-02细胞模拟抗体依赖性感染增强效应(ADE), 转录组测序(RNA-Seq)后分析lncRNA表达谱, 生物信息学探讨差异表达lncRNA潜在靶基因、miRNA前体预测并利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)验证差异表达结果。结果 在ADE中得到36个高表达和39个低表达lncRNA, 其中n344659潜在靶标基因(ID: 10236)具有miRNA前体处理功能; n344462为hsa-let-7a-1和hsa-let-7f-1前体, 分别具有肿瘤活性抑制因子作用和抑制Bcl-xL基因表达作用。RT-qPCR显示7个高表达和4个低表达lncRNA ($P < 0.05$)。结论 ADE中差异表达lncRNA可能具有重要生物学功能。

关键词: 登革病毒; 长链非编码RNA; 肝细胞

中图分类号: R183.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)03-0249-05

Differential expression of lncRNAs in hepatocyte injury by dengue virus-induced antibody dependent enhancement

WANG Xiao-jun, HUANG Jie, LIANG Hui-lin, XU Xiu-juan* (School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To analyze the differential expression of long non-coding RNA (lncRNA) in L-02 cells infected by dengue virus (DENV). Methods Antibody dependent enhancement (ADE) of L-02 cells was established by DENV2 and anti-DENV1 NS1 antibody. lncRNA expression profile was analyzed following transcriptome sequencing (RNA-Seq), and potential target genes and miRNA precursor prediction of differentially expressed lncRNAs were explored using bioinformatics. The differentially expressed lncRNAs were verified by real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR). Results There were 36 up-regulated and 39 down-regulated differentially expressed lncRNAs in ADE, of which the potential target gene (gene ID: 10236) of n344659 functioned as pre-miRNA processing; n344462 was the precursor of hsa-let-7a-1 and hsa-let-7f-1 that respectively suppressed tumor activity and Bcl-xL expression. RT-qPCR showed that 7 up-regulated and 4 down-regulated differentially expressed lncRNA ($P < 0.05$). Conclusion The differentially expressed lncRNA might have important biological functions in ADE.

Key words: Dengue virus; long non-coding RNA; hepatocyte

登革病毒(DENV)有4个血清型(DENV1-4)^[1], 肝细胞对各型DENV普遍易感, 不同血清型间具有一定的交叉免疫反应, 可发生抗体依赖的感染增强效应(ADE)^[2]。NS1是DENV中主要的非结构蛋白, NS1抗体与细胞表面的相应抗原相互作用并引起信号转导, 促进细胞激活增加病毒产量和释放, 有助于DENV的ADE发病机制的形成^[3]。长链非编码RNA

(lncRNA)作为新的调控分子具有表观遗传、转录及转录后调控等功能在病毒感染中发挥重要生物学调控功能^[4-5], DENV感染致肝细胞损伤中lncRNA的表达及可能的生物学作用尚不明确。本研究模拟建立体外DENV感染L-02细胞的ADE模型, 探讨DENV感染致ADE中lncRNA差异表达及可能的生物学作用, 为登革热的预防控制提供依据。

1 材料和方法

1.1 登革病毒液滴度测定

调整C6/36细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 每孔加入100 μ L悬液制备96孔板, DENV2病毒液(南方医科大学病原生物系惠赠)用RPMI-1640维持液(2%FBS)连

基金项目: 广东省医学科研基金项目(No.A2019084), 广东医科大学博士科研项目(No.B2019028)

收稿日期: 2020-10-27; 修订日期: 2021-02-20

作者简介: 王效军(1972-), 男, 博士, 副教授

通信作者: 徐秀娟, E-mail: xuxj1531@gdmu.edu.cn

续10倍稀释($10^{-1} \sim 10^{-8}$),用Reed-Muench方法^[6]计算病毒液的滴度(TCID₅₀)。

1.2 L-02细胞ADE模拟感染条件的筛选及样品制备

(1)RPMI-1640培养基(10%FBS,1%青链霉素混合液)37℃(5%CO₂)培养L-02细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,每孔加入1 mL悬液制备6孔板。

(2)鼠源抗DENV1 NS1抗体用RPMI-1640维持液(2%FBS)进行1:160稀释,并与DENV2病毒液(Moi=0.1、0.5、1.0)37℃孵育90 min,然后感染6孔板中L-02细胞模拟ADE效应;以RPMI-1640维持培养基(2%FBS)作为对照组,每组准备4份。

(3)染毒37℃(5%CO₂)培养48 h后,吸取上清,定量ELISA试剂盒测定谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)吸光度值(OD),利用标准品建立回归方程,用回归方程计算每个感染滴度的数值。感染滴度计算AST/ALT并依据如下标准判定^[7]:AST/ALT<1.0为轻度损伤,AST/ALT≈1.0为中度损伤,AST/ALT>1为重度损伤,AST/ALT>2为严重损伤。

(4)每个6孔板吸净培养上清后的细胞立即加入1 mL TRIzol试剂,反复吹吸,吸到另一个2 mL EP管中,ADE和对照组每个感染滴度的细胞样品各4份,选择AST/ALT比值最高的感染滴度,其中3份干冰送检,另一份-80℃保存备用。

1.3 RNA-Seq及差异表达判定

(1)由华大基因公司进行RNA的提取、合成cDNA第二链经过试剂盒纯化并建立测序文库,并用Illumina HiSeq™ 2 000进行测序。

(2)以FPKM值作为衡量转录本或基因表达水平的指标,ADE感染组与对照组比较,计算log₂ ratio(ratio=ADE/对照),取log₂ (ratio)≥1.5为高表达,log₂ (ratio)<1.5为低表达^[8]。

1.4 差异表达lncRNA潜在靶基因的功能注释和预测

使用TopHat2软件^[9]将对比较组差异表达的lncRNA映射到不同的参考基因组,如果lncRNA映射的位置在某个基因上游的启动子区域,则lncRNA可能在转录或者转录后水平对基因的表达进行调控^[10];如果lncRNA映射的位置在某个基因下游,则lncRNA可能参与其他调控作用^[11];采用RNAplex软件^[12],依据最小自由能预测lncRNA与正义链mRNA最佳碱基配对结合而调控基因沉默、转录及mRNA的稳定性,通过PubMed数据库搜索其功能。

1.5 差异表达lncRNA的miRNA前体预测

研究发现一部分lncRNA可做为miRNA前体,通过酶的剪切后形成miRNA行使相应的功能,特别是成熟的miRNA可以作用于多个位点,抑制翻译过程或导致基因沉默。利用miRPara软件^[13]或直接将lncRNA比对到miRBase数据库,对潜在的miRNA前体及其靶基因探讨。

1.6 RT-qPCR验证

用TRIzol试剂提取保存样品的总RNA,试剂盒逆转录成cDNA,合成lncRNA引物,在ABI7500定量PCR仪中应用SYBR Green法对差异表达的lncRNA进行实时定量PCR^[14]。扩增后的结果用ΔCt(循环临界值的差值)来评估每个组lncRNA的表达水平,计算方法为ΔCt=(lncRNA的平均Ct)-(β-actin的平均Ct),将ΔCt转换为 $2^{-\Delta Ct}$ 表示lncRNA的相对表达量^[15]。取均值计算,采用两样本t检验比较lncRNA在ADE组与对照组的相对表达量差异,并绘制柱状图。

1.7 主要数据库

(1)DAVID在线基因功能注释数据库,http://david.abcc.ncifcrf.gov/;(2)Gene Ontology数据库,http://geneontology.org/page/go-database;(3)KEGG数据库,http://www.kegg.jp/;(4)miRBase数据库,http://www.cuilab.cn/hmdd。

1.8 统计学处理

应用SPSS25.0统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

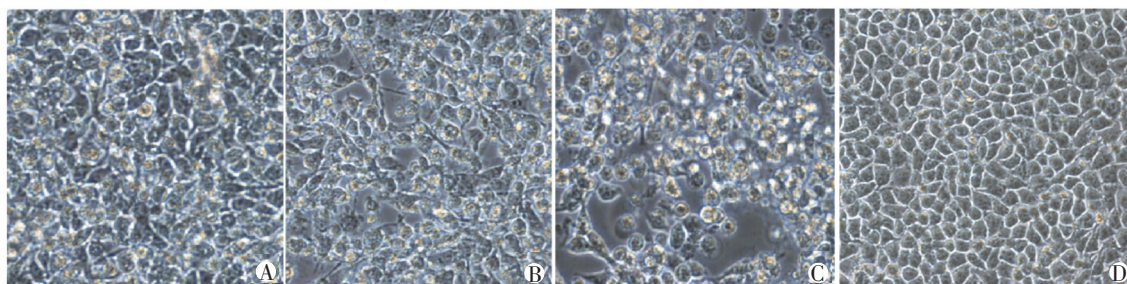
2.1 不同感染滴度L-02细胞病变及培养上清AST、ALT、AST/ALT比值

培养48 h后在倒置显微镜下观察L-02细胞病变,如图1可见,其中Moi=0.1组细胞出现一定皱缩,折光度有增强;Moi=0.5组细胞有一些脱落;Moi=1.0组细胞脱落明显,皱缩和折光度增强;对照组细胞未出现明显病变。

根据回归方程计算得到每个感染滴度下的AST和ALT值,然后计算AST/ALT比值,如表1所示,L-02细胞在DENV2感染48 h后,感染滴度MOI为0.5时,AST/ALT比值最高为2.74,因此,以MOI为0.5,感染48 h为感染的最适条件,后续送检样品及RT-qPCR验证均以此为依据。

2.2 lncRNA差异表达谱

本研究根据log₂ (ratio)≥1.5为高表达,log₂ (ra-



A.Moi=0.1组; B.Moi=0.5组; C.Moi=1.0组; D. 对照组

图1 ADE感染L-02细胞状态(48 h,200倍)

tio)<1.5为低表达的筛选标准,ADE组中得到75个差异表达的lncRNA,其中36个高表达,39个低表达。而这75个差异表达的lncRNA又可分为46个已知lncRNA和29个未知lncRNA。

2.3 差异表达lncRNA潜在靶基因的注释和预测

对差异表达lncRNA(前10)可能位于某潜在的靶基因上、下游预测结果如表2所示:ADE中有2个lncRNA(XLOC023862,XLOC039796)位于某基因上游,2个lncRNA(n344659,XLOC017926)位于某基因下游。通过碱基互补配对及最小自由能预测差异表达未知lncRNA(前10)与mRNA是否存在互作关系,结果如表3所示:2个lncRNA(XLOC008997,XLOC029149)与mRNA(NM_002864,NM_032487)存在相互作用。对差异表达lncRNA调控的基因通过

表1 ADE模拟致肝细胞损伤中转氨酶检测结果

感染滴度	n	AST/(U/L)	ALT/(U/L)	AST/ALT
0.1	3	31.45±5.56 ^a	11.25±0.22 ^a	2.19
0.5	3	24.56±0.46	10.94±0.22 ^a	2.74
1.0	3	20.65±2.31	9.86±0.13	2.09

与1.0比较:^aP<0.05

表2 差异表达lncRNA(前10)与潜在靶基因上下游关系预测

lncRNA 编码	靶基因编码	距基因位置	与靶基因调控关系
n344659	10236	下游2千碱基	上调
XLOC023862	112942	上游2千碱基	下调
XLOC017926	146691	下游2千碱基	下调
XLOC039796	2222	上游2千碱基	下调

表3 差异表达lncRNA(前10)与靶mRNA相互作用预测

lncRNA 编码	靶mRNA 编码	自由能	与靶mRNA调控关系
XLOC008997	NM_002864(5858)	-191.33	上调
XLOC029149	NM_032487(84517)	-1376.90	上调

PubMed数据库搜索该基因的功能,检索到n344659潜在靶标为基因10236,其编码蛋白具有miRNA前提处理功能。

2.4 差异表达lncRNA的pre-miRNA预测

在miRBase数据库中,已知lncRNA(前10)预测pre-miRNA,结果如表4。其中n344462的预测结果中,hsa-let-7a-1为肿瘤活性抑制因子,而hsa-let-7f-1可抑制Bcl-xL基因的表达;未知lncRNA预测得到的pre-miRNA,由于尚无成熟的数据库,结果仅以碱基序列的形式表达,见表5。

表4 已知lncRNA的pre-miRNA预测结果

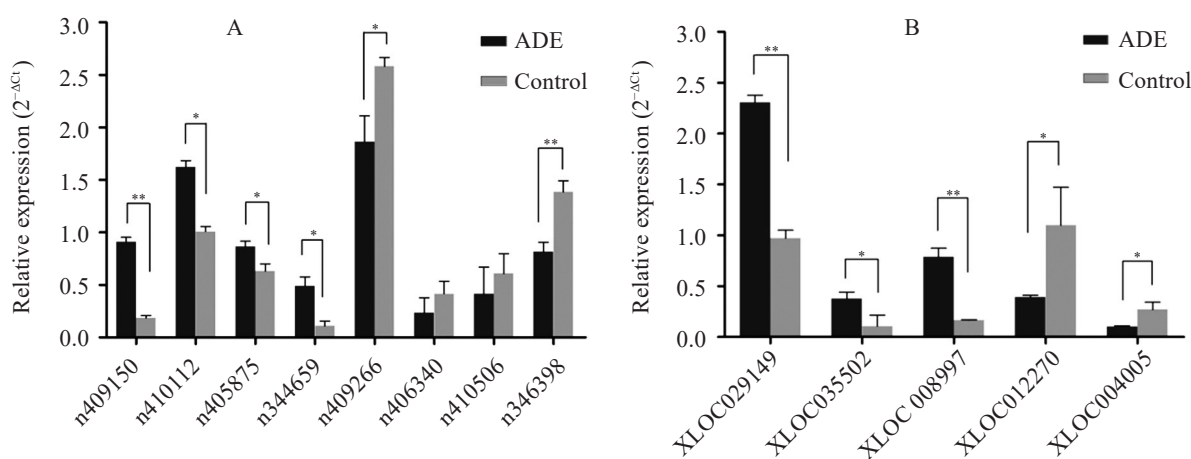
lncRNA 编码	预测 miRNA 编号	长度	q 值	调控类型
n346044	hsa-mir-5692b	87	5.0E-45	上调
n377197	hsa-mir-3687	61	1.0E-29	下调
n344462	hsa-let-7a-1	80	7.0E-41	上调
n344462	hsa-let-7f-1	87	5.0E-45	上调

表5 未知lncRNA的pre-miRNA预测结果

lncRNA 编码	预测 miRNA 的碱基序列	调控类型
XLOC035502	CUGUUCUUGUAGGAUUUCCAAGU	上调
XLOC035502	UGUUCUUGUAGGAUUUCCAAGU	上调
XLOC004005	GUGUCUGAGCAGUGGGGGGCA	下调
XLOC026990	UUUGUGUGUUGUGCACGAGUGU	下调
XLOC026990	UGUGUGUCCGUGUGUCCACAU	下调

2.5 差异表达lncRNA验证结果

在ADE与对照组中8个高表达lncRNA(4个已知,4个未知)和8个低表达lncRNA(4个已知,4个未知)中扩增出8个已知lncRNA,5个未知lncRNA。根据循环参数差值在两组间计算的相对表达量值 $2^{-\Delta Ct}$ 进行两样本t检验,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图2。



Y轴表示相对表达量(2^{-ΔCt}),黑色条图表示ADE模拟感染组的相对表达量,灰色条图表示对照组的相对表达量。表达量以x±s表示,*P<0.05,**P<0.01。A:已知 lncRNAs 表达情况,其中n409150、n410112、n405875和n344659为高表达;n409266、n406340、n410506和n346398为低表达B:未知 lncRNAs 表达情况,其中XLOC029149、XLOC035502和XLOC 008997为高表达;XLOC012270和XLOC004005为低表达

图2 ADE与对照组 lncRNA 差异表达(2^{-ΔCt})

3 讨论

LncRNA 参与宿主与病毒之间的相互作用及调控^[10],还可作为小RNA的前体发挥转录后调控作用^[16],影响细胞内及生物体发育过程中的信号传导^[17]。在感染性疾病中差异表达及作用机制受到愈来愈多的关注。本研究通过建立ADE模拟感染肝细胞,利用RNA-Seq及生物信息学方法,根据设定的差异表达阈值得到差异表达的 lncRNA。作为抗病毒感染和抗炎反应中的负调控因子^[18],宿主的 lncRNA 可参与病毒的复制以及调控宿主的先天免疫反应^[19]以及调控内源性 miRNA 的表达功能^[20]。本研究通过预测差异表达 lncRNA 潜在的靶基因和 miRNA 的前体,结果进一步证实了某些差异表达 lncRNA 具有重要的生物学功能,利用RT-qPCR扩增结果转换成的相对表达量在对比组间的数值关系与生物信息学分析的差异表达结果基本一致。本研究初次得到的差异表达 lncRNA 信息可为深入研究登革病毒感染引起肝细胞损伤机制提供一定科学依据。

参考文献:

- [1] UNO N, ROSS T M. Dengue virus and the host innate immune response[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1):167.
- [2] MASRINOUL P, OMOKOKO M D, PAMBUDI S, et al. Serotype-specific anti-dengue virus NS1 mouse antibodies cross-react with prM and are potentially involved in virus production[J]. Viral Immunology, 2013, 26(4):250-258.
- [3] JACOBS M G, ROBINSON P J, BLETCHLY C, et al. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-

phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction[J]. Faseb J, 2000, 14(11):1603-1610.

- [4] KANDURI C. Long noncoding RNAs from genomic imprinting[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(1):102-111.
- [5] HU G, GONG A Y, WANG Y, et al. LincRNA-cox2 promotes late inflammatory gene transcription in macrophages through modulating SWI/SNF-mediated chromatin remodeling[J]. J Immunol, 2016, 196(6):2799-2808.
- [6] RAMAKRISHNAN M A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula[J]. World J Virol, 2016, 5(2):85-86.
- [7] 聂兴草, 方峰, 李红, 等. 巨细胞病毒嗜肝细胞性和肝细胞感染模型的建立[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2007, 36(5):571-573.
- [8] JUNG K H, DAS A, CHAI J C, et al. RNA sequencing reveals distinct mechanisms underlying BET inhibitor JQ1-mediated modulation of the LPS-induced activation of BV-2 microglial cells[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12:36.
- [9] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions[J]. Genome Biol, 2013, 14(4):R36.
- [10] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3):155-159.
- [11] CARNINCI P, KASUKAWA T, KATAYAMA S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome [J]. Science, 2005, 309(5740):1559-1563.
- [12] CARRIERI C, CIMATTI L, BIAGIOLI M, et al. Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through

(下转第258页)

- [13] GAO B, PENG C, YANG J, et al. Cone snails: A big store of conotoxins for novel drug discovery[J]. *Toxins*, 2017, 9(12):397.
- [14] OLIVEIRA K M, BINDA N S, MÁRIO S L, et al. Conotoxin MVIIA improves cell viability and antioxidant system after spinal cord injury in rats[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(10): e0204948.
- [15] NIKITA A, RICHARD L. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulators from cone snails[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(6):208.
- [16] TURNER M W, MARQUART L A, PHILLIPS P D, et al. Mutagenesis of α -conotoxins for enhancing activity and selectivity for nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Toxins*, 2019, 11(2):113.
- [17] CLARK R, FISCHER H, DEMPSTER L, et al. Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: stabilization of the α -conotoxin MII[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(39):13767-13772.
- [18] LOVELACE E S, ARMISHAW C J, COLGRAVE M L, et al. Cyclic MrIA: a stable and potent cyclic conotoxin with a novel topological fold that targets the norepinephrine transporter[J]. *J Med Chem*, 2006, 49(22):6561-6568.
- [19] GREEN B R, CATLIN P, ZHANG M M, et al. Conotoxins containing nonnatural backbone spacers: cladistic-based design, chemical synthesis, and improved analgesic activity[J]. *Chem Biol*, 2007, 14(4):399-407.
- [20] LIM S H, SUN Y, MADANAGOPAL T, et al. Enhanced skin permeation of anti-wrinkle peptides via molecular modification[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):1596.

~~~~~  
(上接第252页)

- an embedded SINEB2 repeat[J]. *Nature*, 2012, 491(7424): 454-457.
- [13] WU Y, WEI B, LIU H, et al. MiRPara: a SVM-based software tool for prediction of most probable microRNA coding regions in genome scale sequences[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1):107.
- [14] 彭丽娇, 李欣晓, 江丹贤. 等. 长链非编码RNA在鼻咽癌组织中的差异表达[J]. *广东医科大学学报*, 2019, 37(3): 240-245.
- [15] XIONG Y, CHEN S, LIU L, et al. Increased serum micro RNA-155 level associated with nonresponsiveness to hepatitis B vaccine[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(7):1089-1091.
- [16] CAI X, HAGEDORN C H, CULLEN B R. Human micro RNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs[J]. *RNA*, 2004, 10(12):1957-1966.
- [17] 夏天飞, 汤纳平, 邱云良, 等. 长链非编码RNA在药物性肝损伤大鼠肝脏中表达谱的变化[J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(7):897-901.
- [18] CARPENTER S, AIELLO D, ATIANAND M K, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. *Science*, 2013, 341(6147):789-792.
- [19] ZHANG Q, CHEN C Y, YEDAVALLI V S, et al. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression[J]. *MBio*, 2013, 4(1): e00596-12.
- [20] CAI X, CULLEN B R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor[J]. *RNA*, 2007, 13(3): 313-316.