

LncRNA PCED1B-AS1 调控 NLRP3 促进巨噬细胞清除结核分枝杆菌的机制研究

谢玉瑾, 宋雪云, 马永春

[摘要] **目的** 研究长链非编码 RNA PCED1B-AS1 调控核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLR family pyrin domain containing 3, NLRP3) 对巨噬细胞清除结核分枝杆菌和分泌炎症因子的影响。**方法** 在巨噬细胞 RAW264.7 中转染 pcDNA-PCED1B-AS1, 并用结核分枝杆菌感染, qRT-PCR 方法检测 PCED1B-AS1 和 TNF- α 、IL-6 mRNA 水平, 用菌落形成实验检测巨噬细胞对结核分枝杆菌的清除作用, Western blot 方法检测细胞中 NLRP3 蛋白表达水平。将 NLRP3 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和 pcDNA-PCED1B-AS1 共转染到巨噬细胞中, 用结核分枝杆菌感染, 同样检测细胞中 TNF- α 、IL-6 mRNA 水平和菌落量。**结果** 结核分枝杆菌感染后的巨噬细胞中 PCED1B-AS1 水平降低, TNF- α 、IL-6 mRNA 水平升高。转染 pcDNA-PCED1B-AS1 后的巨噬细胞经过结核分枝杆菌感染以后, 细胞中 PCED1B-AS1、TNF- α 、IL-6 mRNA 水平升高, 形成的菌落量减少, 细胞中 NLRP3 蛋白表达水平升高。NLRP3 siRNA 可以逆转过表达 PCED1B-AS1 对结核分枝杆菌感染的巨噬细胞中 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达和菌落量形成的影响。**结论** 上调 PCED1B-AS1 促进巨噬细胞清除结核分枝杆菌, 诱导细胞表达 TNF- α 、IL-6 mRNA 的机制与上调 NLRP3 表达有关。

[关键词] PCED1B-AS1; 巨噬细胞; 结核分枝杆菌; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3

[中国图书资料分类号] R378.911; R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2021)03-0237-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2021.03.009

Study on mechanism of lncRNA PCED1B-AS1 regulating NLRP3 to promote clearance of *Mycobacterium tuberculosis* by macrophages

XIE Yu-jin*, SONG Xue-yun, MA Yong-chun

Sixth Department of Respiratory Medicine, the Fourth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810001, China

*Corresponding author, E-mail: xgi896@163.com

[Abstract] **Objective** To study the effect of long-non-coding RNA (lncRNA) PCED1B-AS1 regulating NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) on the clearance of *Mycobacterium tuberculosis* and secretion of inflammatory factors by macrophages. **Methods** pcDNA-PCED1B-AS1 was transfected into RAW264.7 macrophages to infect *Mycobacterium tuberculosis*. The levels of PCED1B-AS1, TNF- α and IL-6 mRNA were detected by qRT-PCR method, and the elimination of *Mycobacterium tuberculosis* was detected by colony formation assay, the expression level of NLRP3 protein in cells was detected by Western blot. NLRP3 siRNA and pcDNA-PCED1B-AS1 were co-transfected into macrophages and infected with *Mycobacterium tuberculosis*. The levels of TNF- α , IL-6 mRNA and the amount of colonies in the cells were also detected. **Results** The levels of PCED1B-AS1 in macrophages after infection with *Mycobacterium tuberculosis* decreased, and the levels of TNF- α and IL-6 mRNA increased. After the macrophages transfected with pcDNA-PCED1B-AS1 were infected with *Mycobacterium tuberculosis*, the levels of PCED1B-AS1 in the cells increased, the levels of TNF- α and IL-6 mRNA increased, the number of colonies formed decreased, and the NLRP3 protein expression level in the cells increased. NLRP3 siRNA could reverse the effect of overexpression of PCED1B-AS1 on the expression of TNF- α , IL-6 mRNA and the amount of colony formation in macrophages infected by *Mycobacterium tuberculosis*. **Conclusions** Up-regulation of PCED1B-AS1 promotes macrophage clearance of *Mycobacterium tuberculosis* and induces the expression of TNF- α and IL-6 mRNA. The mechanism is related to the up-regulation of NLRP3 expression.

[Key words] PCED1B-AS1; macrophages; *Mycobacterium tuberculosis*; NLR family pyrin domain containing 3

结核病是一种由单一传染源引起的传染性疾病, 严重威胁人类生命健康^[1]。结核分枝杆菌属于革兰阳性菌, 主要侵犯肺脏, 引发肺结核病。结核分枝杆菌主要在巨噬细胞内寄生, 当人体免疫力较强时, 巨噬细胞可以杀灭细胞内寄生的病原菌, 而当人体免疫力较弱时, 巨噬细胞免疫反应能力降低, 病原菌在巨噬细胞内长期存在^[2]。长链非编码 RNA (long-non-coding RNA, lncRNA) 在

人体免疫反应、炎症反应、细胞运动、新陈代谢等过程中发挥作用, 是近些年生命科学领域研究中的重点和热点^[3]。研究发现, lncRNA 和结核病发生有关, 参与巨噬细胞清除结核分枝杆菌过程, 可能是疾病治疗的分子靶标^[4]。lncRNA PCED1B-AS1 是在结核病患者中表达下调的调节因子, 影响巨噬细胞凋亡, 可能是结核病进展中的抑制因子^[5], 目前尚未明确其在巨噬细胞清除结核分枝杆菌以及分泌炎症因子中的作用。本研究以巨噬细胞 RAW264.7 作为研究对象, 探讨 PCED1B-AS1 在巨噬细胞清除结核分枝杆菌以及分泌炎症因子中的作用和可能机制, 旨在为分子靶向治疗结核

[基金项目] 青海省重点研发与转化计划项目 (17110013106445)

[作者单位] 810001 西宁, 青海省第四人民医院呼吸六科 (谢玉瑾), 呼吸四科 (宋雪云); 810099, 西宁市第一人民医院重症医学科 (马永春)

[通信作者] 谢玉瑾, E-mail: xgi896@163.com

病提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 巨噬细胞 RAW264.7 购自南京科佰生物科技有限公司; 结核分枝杆菌 H37Rv 购自美国 ATCC; pcDNA-PCED1B-AS1、pcDNA 均由云舟生物科技(广州)有限公司构建; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLR family pyrin domain containing 3, NLRP3) 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、siRNA control 由汉恒生物科技(上海)有限公司构建; NLRP3 抗体购自美国 Abcam; 引物由南京金斯瑞生物技术股份有限公司合成。

1.2 细胞感染模型构建 巨噬细胞于含有 1% 双抗、10% 胎牛血清的 RPMI1640 中培养, 培养温度 37 °C, 培养箱中含有 5% 的 CO₂, 细胞密度超过 90% 以后, 进行细胞传代。感染结核分枝杆菌的巨噬细胞应为处于对数生长期的细胞, 把细胞接种到 24 孔板内, 以 H37Rv 感染巨噬细胞(感染复数为 5), 继续培养 4 h 以后, 添加 PBS 溶液将细胞洗涤, 然后添加新鲜的细胞培养液继续培养。把没有感染 H37Rv 的巨噬细胞命名为 Control 组, 将感染 H37Rv 以后的巨噬细胞设置为 Control+H37Rv 组。收集 Control 组、Control+H37Rv 组细胞培养 48 h, 用于 1.3 中检测。

1.3 PCED1B-AS1、NLRP3 和 TNF- α 、IL-6 mRNA 水平检测 在细胞内添加 Trizol 试剂, 用移液枪反复吹打混合, 促进细胞充分裂解, 然后按照常规方法提取细胞总 RNA。将提取的 RNA 沉淀溶解在体积为 20 μ l 的 RNase-free 水中, 放在 -80 °C 的冰箱中保存备用。吸取 1 μ l 的 RNase-free 水将紫外分光光度计清洗, 然后吸取 1 μ l 的 RNA 用于检测 A260/A280 的比值, 比值在 1.8~2.0 之间表示纯度良好。cDNA 合成反应如下: 在 EP 管中添加 1 μ l 的 Oligo (dT)、1 μ g 的 RNA、1 μ l 的 Random primer, 最后加 ddH₂O 至总体积达到 13 μ l, 在普通 PCR 仪上设置 65 °C 反应 13 min, 置于冰上, 继续添加 1 μ l 的 dNTP、5 μ l 的 5 $\times$ RT Reaction Buffer、1 μ l 的 RNase inhibitor、1 μ l 的 M-MLV RTase, 加入 ddH₂O 至总体积为 25 μ l, 在普通 PCR 仪上设置 37 °C 条件结合 60 min, 85 °C 条件结合 5 s, 放在 -20 °C 中保存。PCR 的引物序列如下。PCED1B-AS1 上游: TCAAGCCAATCAGCTGACAC; 下游: AAACAAATGCCCTGCTTGAC。NLRP3 上游: CCCTGCATTTTGTGTTGTTG; 下游: CCTGCTTCTCACATGTCGTC。TNF- α 上游: ACGGCATGGATCTCAAAGAC; 下游:

GTGGGTGAGGAGCACGTAGT。IL-6 上游: ATGAACCTCCTTCTCCACAAGCGC; 下游: GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTGG。GAPDH (内参) 上游: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC; 下游: TGGTGAAGACGCCAGTGG。PCR 反应体系为: 2 μ l 的上游引物、2 μ l 的下游引物、10 μ l 的 2 $\times$ All-in-one qPCR mix、2 μ l 的 cDNA 模板、0.4 μ l 的 50 $\times$ ROX reference, 加入 ddH₂O 至总体积为 20 μ l, 在荧光定量 PCR 仪中, 设置预变性条件为 95 °C 10 min, 变性条件为 95 °C 10 s, 退火条件为 56 °C 20 s, 延伸条件为 72 °C 30 s, 一共进行 40 个循环。根据反应得到的 CT 值, 经 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因表达变化。

1.4 细胞转染 将巨噬细胞种植到 6 孔板内准备细胞转染。转染步骤如下: ①用 50 μ l 不含血清的 RPMI1640 把 4 μ g 质粒稀释, 混匀, 放在室温中结合 5 min; ②用 50 μ l 不含血清的 RPMI1640 把 5 μ l 的转染试剂 Lipofectamine 2000 稀释, 混匀, 放在室温中结合 5 min; ③将步骤①和②中的试剂混合, 在室温条件下孵育 20 min; ④收集步骤③中的混合物, 添加到 6 孔板内, 放在培养箱中继续培养 6 h。更换细胞培养液, 继续培养 12 h。将 pcDNA-PCED1B-AS1、pcDNA 转染巨噬细胞后, 用 H37Rv 感染(感染复数为 5), 设置为 PCED1B-AS1+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组, Control+H37Rv 组处理方法同 1.2。收集 Control+H37Rv、PCED1B-AS1+H37Rv、Vector+H37Rv 组细胞, 按照 1.3 中方法利用 qRT-PCR 检测 PCED1B-AS1 和 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平, 同时用于 1.5 和 1.6 中检测。

1.5 巨噬细胞清除结核分枝杆菌检测 巨噬细胞感染后继续培养 72 h, 收集细胞裂解物, 然后将裂解物种植在含有 10% OADC 的琼脂板上, 培养 24 d, 计数结核分枝杆菌菌落量。

1.6 Western blot 检测 NLRP3 蛋白表达 收集巨噬细胞感染 48 h 以后的 Control+H37Rv 组、PCED1B-AS1+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组细胞, 在细胞中添加 PBS 溶液将细胞反复洗涤 2 次, 最后加入 RIPA 裂解溶液, 放在冰上充分裂解 20 min, 以 4 °C, 1000 $\times$ g 离心 10 min, 将上清转移到新的 EP 管中, 经过 BCA 方法检测蛋白浓度以后, 在蛋白样品中添加 5 $\times$ Loading Buffer 充分混合, 用于 SDS-PAGE 电泳。将玻璃板清洗干净并组装, 制备 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 在加样孔内按照每个孔 40 μ g 蛋白添加样品。把电泳电压设置为 80 V, 观察溴酚蓝前端部分进入到分离胶以后, 将电泳仪的电压设置为 100 V, 等到溴酚蓝进入到玻璃板的底部以后, 关闭电源, 将凝胶取出。根据需要

NC 膜裁剪, 然后浸泡在转移缓冲液中备用。转膜的电压设置在 50 V, 转膜装置放在冰上进行, 转膜持续 40 min 之后, 将电源关闭。将 NC 膜浸泡在 5% 脱脂奶粉中, 把非特异性的结合位点封闭。然后将 NC 膜放在抗体孵育袋中, 然后添加按照 1:1000 稀释以后的 NLRP3 抗体孵育液, 在 4℃ 的环境中结合过夜。最后将 NC 膜置于 1:2000 稀释以后的二抗孵育液中, 在室温条件下结合 2 h。ECL 方法显色以后, 分析目的蛋白的表达水平。NLRP3 蛋白水平 = NLRP3 条带灰度值 ÷ GAPDH 灰度值。

1.7 NLRP3 siRNA 影响 PCED1B-AS1 的作用检测 在巨噬细胞中共转染 NLRP3 siRNA、pcDNA-PCED1B-AS1 和 siRNA Control、pcDNA-PCED1B-AS1, 然后用 H37Rv 感染 (感染复数为 5), 设置为 PCED1B-AS1+si-NLRP3+H37Rv 组和 PCED1B-AS1+si-NC+H37Rv 组, 按照 1.3、1.5、1.6 中方法检测细胞中 TNF-α、IL-6 mRNA 水平和细胞清除结核杆菌水平、NLRP3 蛋白表达水平。

1.8 统计学处理 实验重复 3 次, 每组设置 3 个复孔。用 SPSS 21.0 软件统计分析实验数据, 符合正态分布的定量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间的比较用 *t* 检验, 多组间的比较用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 H37Rv 感染对巨噬细胞中 PCED1B-AS1 和 TNF-α、IL-6 mRNA 表达影响 与 Control 组比较, Control+H37Rv 组巨噬细胞中 PCED1B-AS1 水平降低, TNF-α、IL-6 mRNA 水平升高 (*P* 均 < 0.05)。详见表 1。

表 1 Control 组和 Control+H37Rv 组中 PCED1B-AS1 和 TNF-α、IL-6 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of PCED1B-AS1, TNF-α and IL-6 mRNA levels in Control group and Control+H37Rv group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PCED1B-AS1	TNF-α mRNA	IL-6 mRNA
Control 组	9	1.00±0.15	1.00±0.11	1.00±0.12
Control+H37Rv 组	9	0.45±0.05	3.84±0.22	2.15±0.16
<i>t</i> 值		10.436	34.639	17.250
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

2.2 pcDNA-PCED1B-AS1 对 H37Rv 感染的巨噬细胞中 PCED1B-AS1 和 TNF-α、IL-6 mRNA 表达影响 pcDNA-PCED1B-AS1 转染后, PCED1B-AS1 表达水平升高。与 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组相比, PCED1B-AS1+H37Rv 组巨噬细胞中 TNF-α、IL-6 mRNA 水平明显升高, 差异均具有统计学意义 (*P* 均 < 0.05)。详见表 2。上调 PCED1B-AS1 促进 H37Rv 感染的巨噬细胞中 TNF-α、IL-6 mRNA 表达。

表 2 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组及 PCED1B-AS1+H37Rv 组中 PCED1B-AS1 和 TNF-α、IL-6 mRNA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of PCED1B-AS1, TNF-α and IL-6 mRNA levels in Control+H37Rv group, Vector+H37Rv group and PCED1B-AS1+H37Rv group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PCED1B-AS1	TNF-α mRNA	IL-6 mRNA
Control+H37Rv 组	9	1.00±0.13	1.00±0.12	1.00±0.12
Vector+H37Rv 组	9	1.00±0.09	1.00±0.10	1.00±0.10
PCED1B-AS1+H37Rv 组	9	2.54±0.19*	3.11±0.25*	2.85±0.20*
<i>F</i> 值		349.336	461.092	478.300
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000

注: *. 与 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组相比, *P* 均 < 0.05

2.3 过表达 PCED1B-AS1 对巨噬细胞清除结核分枝杆菌的影响 与 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组相比, PCED1B-AS1+H37Rv 组巨噬细胞中结核分枝杆菌菌落量明显降低, 差异均具有统计学意义 (*P* 均 < 0.05)。详见表 3。过表达 PCED1B-AS1 促进巨噬细胞清除结核分枝杆菌。

表 3 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组及 PCED1B-AS1+H37Rv 组中结核分枝杆菌菌落量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* colonies in Control+H37Rv group, Vector+H37Rv group and PCED1B-AS1+H37Rv group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	菌落量 (×10 ⁵)(CFU)
Control+H37Rv 组	9	3.26±0.25
Vector+H37Rv 组	9	3.34±0.36
PCED1B-AS1+H37Rv 组	9	2.23±0.14*
<i>F</i> 值		48.877
<i>P</i> 值		0.000

注: *. 与 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组相比, *P* 均 < 0.05

2.4 过表达 PCED1B-AS1 对 H37Rv 感染的巨噬细胞中 NLRP3 蛋白表达影响 与 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组相比, PCED1B-AS1+H37Rv 组巨噬细胞中 NLRP3 蛋白水平明显升高, 差异均具有统计学意义 (*P* 均 < 0.05)。详见图 1 和表 4。过表达 PCED1B-AS1 促进 H37Rv 感染的巨噬细胞中 NLRP3 蛋白表达。

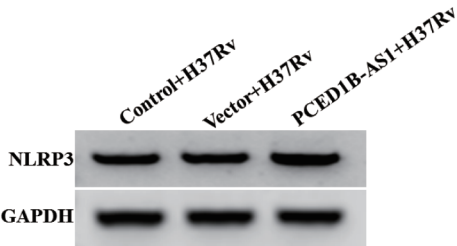


图 1 Western blot 检测 pcDNA-PCED1B-AS1 转染后经 H37Rv 感染的巨噬细胞中 NLRP3 蛋白表达变化
Figure 1 Change of NLRP3 protein expression in H37Rv-infected macrophages after pcDNA-PCED1B-AS1 transfection detected by Western blot detection

表 4 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组及 PCED1B-AS1+H37Rv 组中 NLRP3 mRNA 和蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of NLRP3 mRNA and protein expression levels in Control+H37Rv group, Vector+H37Rv group and PCED1B-AS1+H37Rv group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3 mRNA	NLRP3 蛋白
Control+H37Rv 组	9	1.00±0.10	0.45±0.04
Vector+H37Rv 组	9	0.97±0.09	0.47±0.06
PCED1B-AS1+H37Rv 组	9	3.23±0.03*	0.95±0.09*
F 值		2387.700	162.677
P 值		0.000	0.000

注: *.与 Control+H37Rv 组、Vector+H37Rv 组相比, P 均 < 0.05

2.5 siRNA NLRP3 对过表达 PCED1B-AS1 影响巨噬细胞清除结核分枝杆菌以及表达 TNF- α 、IL-6 mRNA 的作用 与 PCED1B-AS1+si-NC+H37Rv 组比较, PCED1B-AS1+si-NLRP3+H37Rv 组巨噬细胞中 NLRP3 蛋白表达水平降低, NLRP3 mRNA、TNF- α 、IL-6 mRNA 水平降低, 细胞裂解物中结核分枝杆菌菌落量升高 (P 均 < 0.05), 见图 2 和表 5。siRNA NLRP3 减弱过表达的 PCED1B-AS1 巨噬细胞中 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平, 并且 siRNA NLRP3 可削弱过表达的 PCED1B-AS1 巨噬细胞清除结核分枝杆菌功能。

3 讨 论

结核病是一种十分常见的传染病, 其发生和结核分枝杆菌的感染有关^[6]。结核分枝杆菌诱发

结核病的过程较为复杂, 主要通过寄生在巨噬细胞内达到在体内长期存在的目的^[7]。当机体免疫力较强时, 巨噬细胞被活化, 分泌大量炎症因子, 促进免疫反应, 细胞凋亡增加, 结核分枝杆菌被清除^[8]。而当机体免疫力较低时, 巨噬细胞免疫反应水平下降, 结核分枝杆菌则长期且大量存在于巨噬细胞内^[9]。研究发现, 结核分枝杆菌促进巨噬细胞中炎症因子的表达, 这些炎症因子包括 TNF- α 、IL-6 等^[10]。本研究发现, 结核分枝杆菌感染的巨噬细胞中 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平升高, 这与上述的研究结果相符合, 说明结核分枝杆菌诱导巨噬细胞分泌炎症因子。

LncRNA 长度 > 200 nt, 在人体内的多种组织如脑、肝、肺、肾中均有表达, 并且对不同类型的细胞分化、衰老、氧化应激、炎症因子分泌等有调节作用^[11]。很多研究显示, lncRNA 在人类疾病中发挥作用, 如心肌病、关节炎、糖尿病等^[12-14]。近些年也有很多实验发现 lncRNA 与结核病的进展有关, 结核病患者体内有着与健康人差异较大的基因表达谱, 而且这些基因多数被证明与结核病的恶性进展有关^[15-16]。PCED1B-AS1 是近些年发现的调控因子, 参与肿瘤进展, 能够促进胶质瘤、胶质母细胞瘤细胞的恶性生物学行为^[17-18]。在结核病患者中发现 PCED1B-AS1 异常低表达, 敲除 PCED1B-AS1 可降低巨噬细胞凋亡水平, 增加细

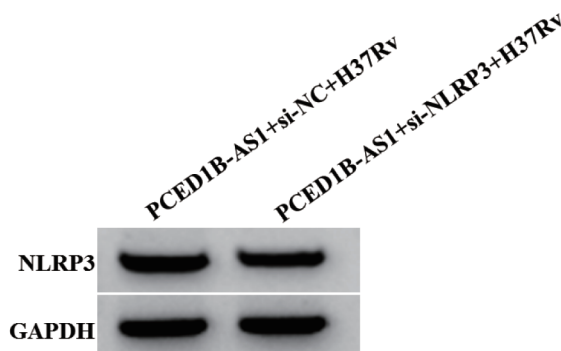


图 2 pcDNA-PCED1B-AS1 以及 NLRP3 siRNA 转染以后经 H37Rv 感染的巨噬细胞中 NLRP3 蛋白表达差异
Figure 2 Difference of NLRP3 protein expression levels after transfection with pcDNA-PCED1B-AS1 and NLRP3 siRNA in H37Rv-infected macrophages

表 5 PCED1B-AS1+si-NC+H37Rv 组和 PCED1B-AS1+si-NLRP3+H37Rv 组中 NLRP3 mRNA 和蛋白水平、TNF- α 、IL-6 mRNA 水平和结核分枝杆菌菌落量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of NLRP3 mRNA and protein expression levels, TNF- α , IL-6 mRNA levels and *Mycobacterium tuberculosis* colonies in PCED1B-AS1+si-NC+H37Rv group and PCED1B-AS1+si-NLRP3+H37Rv group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3 mRNA	NLRP3 蛋白	TNF- α mRNA	IL-6 mRNA	菌落量 ($\times 10^5$)(CFU)
PCED1B-AS1+si-NC+H37Rv 组	9	1.00±0.11	0.96±0.11	1.00±0.08	1.00±0.11	2.21±0.20
PCED1B-AS1+si-NLRP3+H37Rv 组	9	0.31±0.03	0.46±0.05	0.64±0.06	0.52±0.05	2.89±0.14
t 值		18.155	12.414	10.800	11.918	8.356
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

胞自噬,而上调 PCED1B-AS1 则有相反的作用,PCED1B-AS1 可能通过促进细胞凋亡发挥抗肺结核的作用^[5]。本研究发现结核分枝杆菌感染以后的巨噬细胞中 PCED1B-AS1 表达水平下降,并且上调 PCED1B-AS1 可加强巨噬细胞对结核分枝杆菌的清除作用,提高巨噬细胞中 TNF- α 、IL-6 mRNA 的表达水平,这证明 PCED1B-AS1 可能通过促进巨噬细胞免疫反应和清除结核分枝杆菌发挥抗结核作用。

进一步研究 PCED1B-AS1 的可能机制,发现上调 PCED1B-AS1 可促进巨噬细胞中 NLRP3 蛋白表达。NLRP3 是 NLR 蛋白家族成员,被激活后可促进 NLRP3 炎症小体作用发挥^[19-21]。NLRP3 在慢性阻塞性肺疾病、急性肺损伤、支气管哮喘等过程中发挥作用^[22-24]。在肺结核的研究中证实,结核分枝杆菌能够激活 NLRP3,诱导巨噬细胞抗结核的免疫反应^[25-27]。本研究发现,下调 NLRP3 可以逆转 PCED1B-AS1 对巨噬细胞分泌炎症因子和清除结核分枝杆菌的作用,提示 PCED1B-AS1 可能通过 NLRP3 参与巨噬细胞抗结核过程。

综上所述,上调 PCED1B-AS1 可促进巨噬细胞对结核分枝杆菌的清除,并且可以诱导巨噬细胞分泌炎症因子,机制可能与下调 NLRP3 有关,目前对 PCED1B-AS1 通过何种靶向机制最终影响 NLRP3 参与巨噬细胞抗结核分枝杆菌的调控机制尚不明确,将在后续的实验中进行探讨。本次实验为研究 PCED1B-AS1 在结核病发生中的作用和机制提供了参考,为靶向分子治疗结核病提供了可能思路。

【参考文献】

- [1] Osada-Oka M, Goda N, Saiga H, et al. Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Int Immunol, 2019, 31(12):781-793.
- [2] Castro-Garza J, Luévano-Martínez ML, Villarreal-Treviño L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* promotes genomic instability in macrophages [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2018, 113(3):161-166.
- [3] Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs [J]. Cell, 2018, 172(3):393-407.
- [4] Huang S, Huang Z, Luo Q, et al. The expression of lncRNA NEAT1 in human tuberculosis and its antituberculosis effect [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018:9529072. DOI: 10.1155/2018/9529072.
- [5] Li M, Cui J, Niu W, et al. Long non-coding PCED1B-AS1 regulates macrophage apoptosis and autophagy by sponging miR-155 in active tuberculosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(3):803-809.
- [6] Padhi A, Pattnaik K, Biswas M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* LprE suppresses TLR2-dependent cathelicidin and autophagy expression to enhance bacterial survival in macrophages [J]. J Immunol, 2019, 203(10):2665-2678.
- [7] Augenreich J, Haanappel E, Ferré G, et al. The conical shape of DIM lipids promotes *Mycobacterium tuberculosis* infection of macrophages [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(51):25649-25658.
- [8] Ma J, Chen XL, Sun Q. MicroRNA-579 upregulation mediates death of human macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 518(2):219-226.
- [9] Ji DX, Yamashiro LH, Chen KJ, et al. Type I interferon-driven susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by IL-1RA [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(12):2128-2135.
- [10] Li WT, Zhang Q. MicroRNA-708-5p regulates mycobacterial vitality and the secretion of inflammatory factors in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages by targeting TLR4 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(18):8028-8038.
- [11] Zhu J, Zhang X, Gao W, et al. lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in lumbar intervertebral disc degeneration [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4):3160-3174.
- [12] Hao K, Lei W, Wu H, et al. LncRNA-Safe contributes to cardiac fibrosis through Safe-Sfrp2-HuR complex in mouse myocardial infarction [J]. Theranostics, 2019, 9(24):7282-7297.
- [13] Shui X, Chen S, Lin J, et al. Knockdown of lncRNA NEAT1 inhibits Th17/CD4⁺ T cell differentiation through reducing the STAT3 protein level [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12):22477-22484.
- [14] Zhang H. Mechanism associated with aberrant lncRNA MEG3 expression in gestational diabetes mellitus [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(5):3699-3706.
- [15] 厉虹淼, 陈双双, 包训迪, 等. 肺结核患者外周血中链非编码 RNA MALAT1、NEAT1 和 NEAT2 的表达研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2020, 24(2):155-159.
- [16] 黄自坤, 姚芳苒, 罗清, 等. 长链非编码 RNA 肺腺癌转移相关转录本 1 在结核感染中的表达及意义 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(11):824-830.
- [17] Yang J, Yu D, Liu X, et al. LncRNA PCED1B-AS1 activates the proliferation and restricts the apoptosis of glioma through cooperating with miR-194-5p/PCED1B axis [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2):1823-1833.
- [18] Yao Z, Zhang Q, Guo F, et al. Long noncoding RNA PCED1B-AS1 promotes the warburg effect and tumorigenesis by upregulating HIF-1 α in glioblastoma [J]. Cell Transplant, 2020, 29:963689720906777. DOI: 10.1177/0963689720906777.
- [19] Marchetti C. The NLRP3 inflammasome as a pharmacological target [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, 74(4):285-296.
- [20] Cao Z, Wang Y, Long Z, et al. Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2019, 51(11):1087-1095.
- [21] Tourkochristou E, Aggeletopoulou I, Konstantakis C, et al. Role of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel diseases [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(33):4796-4804.
- [22] Wang H, Lv C, Wang S, et al. NLRP3 inflammasome involves in the acute exacerbation of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Inflammation, 2018, 41(4):1321-1333.
- [23] Zhang Y, Li X, Grailer JJ, et al. Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. J Pineal Res, 2016, 60(4):405-414.
- [24] 李江, 颜延凤. 定喘汤对哮喘模型小鼠肺组织炎症因子及 NLRP3 炎症小体的影响 [J]. 光明中医, 2020, 35(13):1992-1995.
- [25] Lou J, Wang Y, Zhang Z, et al. MiR-20b inhibits *Mycobacterium tuberculosis* induced inflammation in the lung of mice through targeting NLRP3 [J]. Exp Cell Res, 2017, 358(2):120-128.
- [26] 张蕊. 结核杆菌 ESAT-6 和 CFP-10 对巨噬细胞 NLRP3 炎症小体形成的影响及相关机制研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [27] Beckwith KS, Beckwith MS, Ullmann S, et al. Plasma membrane damage causes NLRP3 activation and pyroptosis during *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Nat Commun, 2020, 11(1):2270-2280.

(2021-02-02 收稿 2021-05-27 修回)

(本文编辑 赵雅琳)