

用^[8]。丹参活血祛瘀,凉血消痈,具有抑制血小板聚集、抗凝和促纤溶的作用,还可抑制 VSMC 的增殖及 DNA 的合成,对 CAD 介入治疗术后康复具有重要意义^[9]。实验研究证实黄芪、丹参联合应用对“血瘀”大鼠血液流变学各项指标改善更为显著^[2]。金银花清热解毒,现代研究证实可不同程度减轻新生内膜厚度及管腔狭窄程度,丹皮清热凉血,活血祛瘀,可抑制血管平滑肌增殖。四药配伍使内皮健康修复以达到益气活血凉血生肌之效,进而改善其生活质量,提示益气活血凉血生肌方药可作为冠心病患者 PCI 术后气虚血瘀证的基础方药。

参考文献

- 1 许晶晶. 心血管疾病的心脏康复[J]. 中国循环杂志, 2013,28(8):635-637
- 2 杨明,舒婵娟,胡业彬. 益气活血解毒汤治疗气虚血瘀型心绞痛的临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014,12(1):1-2
- 3 刘同想,孔素平,廖忠友,等. 西雅图心绞痛调查表对冠心病患者机体功能及生活质量的评估研究[J]. 中国行为医学科学,1997,

- 6(2):127-129
- 4 吕映华,何迎春,杨娟,等. 冠心病心绞痛(气虚血瘀证)症状疗效评分量表的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008,13(7):786-791
- 5 Wijesundera HC, Tomlinson G, Norris CM, et al. Predicting EQ-5D utility scores from the Seattle Angina Questionnaire in coronary artery disease: a mapping algorithm using a Bayesian framework[J]. Med Decis Making, 2011,31(3):481-493
- 6 周红霞,余小林,王发省,等. 两种量表评价冠心病介入术后患者生存质量的比较[J]. 中国慢性病预防与控制, 2013,21(3):282-284
- 7 农一兵,林谦. 凉血生肌中药对冠状动脉介入术后再狭窄及心血管事件的干预作用[J]. 中华中医药杂志,2008,23(2):160-164
- 8 戎寅宗. 观察黄芪保心汤结合西药治疗冠心病临床疗效[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2014(2):86-87
- 9 刘长江,李宏伟,宁佳,等. 丹参多酚酸治疗冠心病不稳定型心绞痛疗效及对血脂和炎症因子的影响研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2014,23(13):1394-1396

(收稿日期:2014-07-30)

(修回日期:2014-10-10)

小鼠胚胎成纤维细胞内质网应激反应中的长链非编码 RNA 表达谱及生物信息学研究

全弘扬 樊倩倩 王 林

摘要 目的 探究内质网应激反应也称为未折叠蛋白效应(unfolded protein response, UPR)激活后小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)的长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)表达谱。**方法** 分离 13 天的小鼠胚胎获得并培养 MEFs,采用内质网应激反应诱导剂衣霉素(tunicamycin)处理细胞 16h 后发生 UPR;以未处理的 MEFs 作为阴性对照,采用基因芯片技术检测 lncRNA 表达谱,实时荧光定量 PCR(real-time PCR)验证 lncRNA 芯片结果并进行生物信息学分析。**结果** 与未使用衣霉素处理的 MEFs 相比,衣霉素处理的 MEFs 有 411 个 lncRNAs 表达量出现显著上调,790 个 lncRNAs 出现显著下调;实时荧光定量 PCR 验证部分 lncRNAs 表达结果与芯片一致;高级生物信息学分析分析了显著变化的 lncRNAs 并提示它们可能参与了细胞内许多生物学过程的调控。**结论** lncRNA 表达谱及生物信息学分析提示 lncRNA 在 UPR 激活后的细胞功能中可能发挥重要作用。

关键词 长链非编码 RNA 内质网应激反应 基因芯片 生物信息学

中图分类号 R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.017

Expression Profile and Bioinformatics Studies of Long Noncoding RNA in Mouse Embryonic Fibroblasts under Endoplasmic Reticulum Stress. *Quan Hongyang, Fan Qianqian, Wang Lin. Department of Physiology, Institute of Basic Medical Science, CAMS & PUMC, Beijing 100005, China*

Abstract Objective To explore the potential significance of long noncoding RNA (lncRNA) expressed in endoplasmic reticulum stress response also known as unfolded protein response (UPR). **Methods** Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were isolated from 13 day mouse embryo, cultured and treated with tunicamycin for 16 hours to induce UPR. The untreated MEFs were used as negative control.

The lncRNA expression profile was examined by a customized lncRNA array. The results of array assay were validated by real-time PCR and further analyzed by bioinformatics. **Results** There were 411 lncRNAs, whose expression was significantly up-regulated in MEFs treated with tunicamycin as compared with the controls, while 790 lncRNAs were significantly down-regulated. A number of significantly altered lncRNAs were validated by real-time PCR. A further bioinformatics analysis of lncRNA profile suggested that many could be involved in multiple cellular pathways. **Conclusion** Our lncRNA expression profile and bioinformatics studies strongly suggest that many lncRNAs can be regulated in the cells under UPR and could also in turn regulate UPR and other cellular processes.

Key words Long noncoding RNA; Endoplasmic reticulum stress response; Microarray; Bioinformatics

内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress response)也称为未折叠蛋白效应(unfolded protein response, UPR)。当细胞遭受过酸、低氧、缺糖等刺激时,会导致未折叠蛋白或者错误折叠蛋白在内质网腔内积聚,引起UPR^[1]。研究表明,哺乳动物细胞中内质网应激反应激活后将通过IRE1(inositol requiring enzyme 1)、ATF6(activating transcription factor 6)以及PERK(PKR-like ER kinase; PKR, double-stranded RNA activated protein kinase)3个膜蛋白进行跨膜信号转导并调控相关基因表达^[2]。IRE1激活后会进一步剪接X-盒结合蛋白(X-box binding protein, XBP-1)的mRNA产生比正常情况下小26bp的mRNA,同时指示分子BiP的mRNA表达也有明显增加^[3,4]。已有大量研究发现,细胞的内质网应激反应与心血管疾病、神经退行性疾病、糖尿病等代谢疾病以及各类肿瘤的发生、发展有着密切联系^[5-8]。

目前,长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)被定义为含有>200个核苷酸且不编码蛋白质的转录本RNA。lncRNA是很多类型非编码RNA的总称,包括增强子RNA,核仁小RNA,基因间的转录本RNA,反义链RNA以及与编码基因有重叠部分的转录本RNA。近来,大量研究发现部分lncRNA的表达具有时空特异性,且在不同的哺乳动物生理、病理过程中发挥重要的调节作用^[9]。但lncRNA在内质网应激反应转导通路中的调节作用和机制还鲜有报道。本研究通过建立内质网应激的小鼠细胞模型,采用芯片技术检测lncRNA表达谱,通过实时定量PCR验证部分芯片结果,以及相关lncRNA生物信息学分析,为探索lncRNA参与UPR信号转导相关过程提供基础。

对象与方法

1. 研究对象:清洁级C57BL/6J小鼠,10周龄,体质量24~28g(购于北京维通利华实验动物技术有限公司);检测用芯片为OEbiotech Mouse lncRNA Microarray(欧易公司);NIH 3T3细胞(购于北京协和医学院细胞中心)。

2. 方法:(1)细胞培养:MEF细胞使用DMEM细胞培养基,10%胎牛血清,1mmol/L丙酮酸钠,2mmol/L L-谷氨酰

胺,100units/ml青霉素,100μg/ml链霉素(均购于Gibco公司),于37℃,5%CO₂孵箱中培养,取对数生长期细胞(传至第4代)用于后续实验;NIH 3T3细胞使用DMEM细胞培养基,10%小牛血清。(2)小鼠胚胎成纤维细胞分离:将1只雄鼠与两只雌鼠合笼,并于次日早晨起观察阴栓,发现阴栓后13天颈椎脱臼处死孕鼠,用乙醇消毒孕鼠腹部,取出小鼠胚胎于37℃预热的PBS溶液清洗3次,去除胚胎的头、尾、四肢及内脏并用PBS清洗干净剩余组织,将组织剪碎成1mm×1mm×1mm以下的碎块,加入1ml 0.05%的胰酶(Hyclone公司)消化30min,每隔5min轻轻晃匀组织1次,将消化好的组织转入含有正常培养基的10cm培养皿中加入正常MEF细胞培养基培养^[10]。(3)细胞免疫荧光:取对数期细胞消化后种于放置了盖玻片的12孔细胞培养板(康宁公司)中,让细胞爬片过夜生长,用预热的PBS洗涤玻片,采用参考文献的方法操作免疫荧光实验^[11],用荧光显微镜(Olympus公司)观察结果。实验使用波形蛋白抗体(Cell Signaling Technology公司),二抗购于Invitrogen公司。(4)诱导细胞UPR:MEFs的正常培养基中加入5μg/ml的衣霉素(tunicamycin, Merck Millipore公司)于37℃,5%CO₂孵箱中培养细胞16h。检测相关指示分子的表达变化检测UPR的激活情况。(5)RNA提取及RT-PCR检测:使用Trizol(Invitrogen公司)提取细胞总RNA(具体操作按照产品说明书)。使用TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(全式金公司)进行反转录合成cDNA。XBP-1的上游引物:5'-AGGCAACAGTGTCTCAGAGTCC-3',下游引物:5'-GAACCAGGAGTTAAGAACACG-3',未剪接时产物为185bp,剪接时产物为159bp。PCR条件:95℃,1min;95℃,30s;52℃,30s;72℃,30s,40个循环;72℃,7min。(6)芯片检测差异表达的lncRNA:用1ml Trizol处理1个10cm培养皿的MEFs,保存处理以后的细胞悬液于1.5ml离心管中,送交上海欧易生物医学科技有限公司采用OEbiotech Mouse lncRNA Microarray(欧易公司)检测lncRNA表达谱。(7)实时荧光定量PCR验证芯片结果:提取MEFs的总RNA,并使用随机引物反转录合成cDNA。在ABI Step One Plus荧光定量PCR仪上运行实时荧光定量PCR,每个样本3个复孔。所使用引物序列由Primer5设计(天一辉远公司合成),具体引物序见表1。(8)生物信息学分析:芯片表达数据聚类分析:MeV;lncRNA靶基因预测分析:对于每一个差异表达的lncRNA计算得到与之共表达的编码基因,进而通过编码基因的功能注释预测lncRNA的功能^[12]。

表 1 检测 cDNA 的 real-time PCR 引物序列

引物基因	上游引物	下游引物	实时荧光定量 PCR 引物序列(5'→3')
18s rRNA	上游引物		GTAACCGTTGAACCCATT
	下游引物		CCATCCAATCGGTACTAGCG
BiP	上游引物		CAGAGTGGACTTGAAAAAT
	下游引物		AAAATTAGACCACTGTAAA
FR091011	上游引物		AGGACTAGAGTAAGCAGGAGA
	下游引物		TTCACGGCTGTGGGTTGA
FR224363	上游引物		AAGGTTCCGAACACTCT
	下游引物		GACCAAATGGCAACTACTA
FR357954	上游引物		CAGGACGGCTTCTTGGG
	下游引物		TACTGCATTTTCAGGTCTTTGT
n416306	上游引物		CAGTAGACAAAGGCATCA
	下游引物		AAGAATAAACTAGGTGGG

结 果

1. MEFs 提取后检测成纤维细胞含量:本研究通过经典的小鼠胚胎成纤维细胞提取方法,提取了增殖活性较好的胚胎成纤维细胞。由实验结果可见,MEFs 与细胞系 NIH 3T3 具有相似的梭形细胞形态,且有卵圆形的细胞核和部分伪足(图 1 中 A、B)。免疫荧光实验检测提取细胞中波形蛋白的表达,发现几乎所有的细胞都表达波形蛋白(图 1C),此结果提示分离的胚胎成纤维细胞中几乎没有上皮细胞存在。由此可见本实验所使用分离的 MEFs 都具有成纤维细胞的特性。

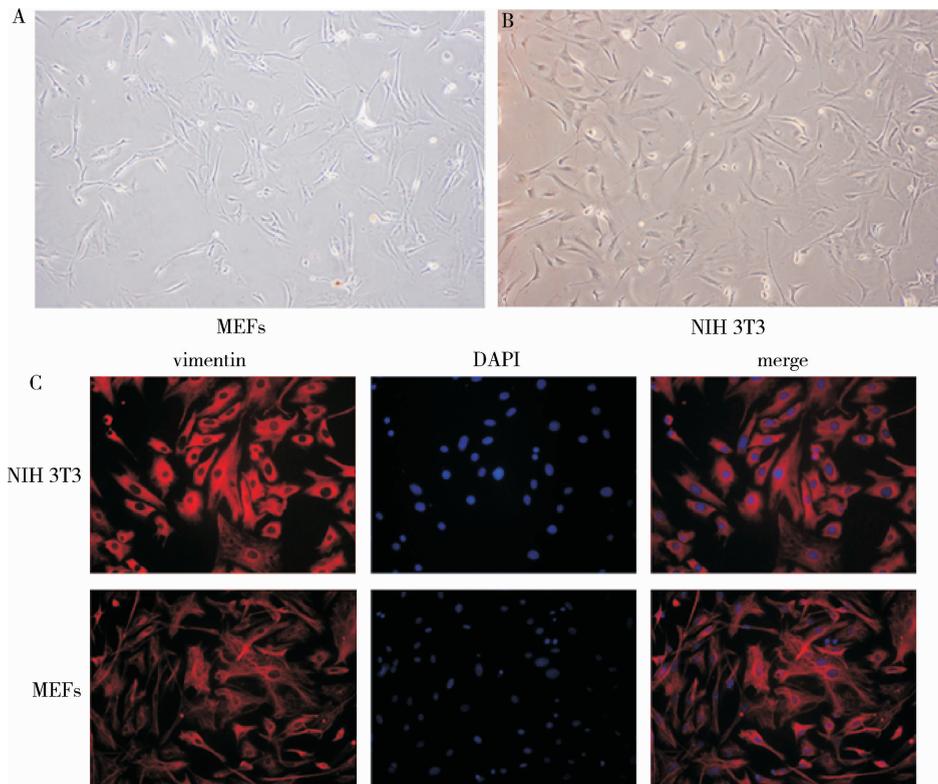


图 1 提取的 MEFs 的形态和波形蛋白表达情况(×100)

A. 提取的 MEFs 的形态结构;B. 细胞系 NIH 3T3 的形态结构;C. 免疫荧光结果;vimentin. 红色荧光为细胞波形蛋白表达结果;DAPI. 细胞核染色结果;merge. 波形蛋白和细胞核染色合并和结果

2. MEF 中内质网应激反应激活的检测结果:本研究通过使用衣霉素(tunicamycin)处理小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)诱导其发生 UPR。细胞 UPR 的重要调控分子 XBP-1 的 mRNA 在加入衣霉素处理 16h 后被剪接,出现了明显的剪接后条带(图 2A),且实时定量 PCR 结果显示加入衣霉素处理 16h 后重要指示分子 BiP 的 mRNA 表达有显著增加(图 2B)。此结果表明,加入衣霉素处

理的 3 组 MEFs 内的 UPR 较未加入衣霉素处理的对照组成功激活。

3. 内质网应激反应激活后 MEF 中 lncRNA 的表达谱变化:芯片分析结果显示,与衣霉素未处理组相比,衣霉素处理后并发生了 UPR 的 MEFs 有 411 个 lncRNAs 表达显著上调,790 个 lncRNAs 表达显著下调(统计学处理变化倍数 > 2 倍);变化倍数大于 5 倍的上调 lncRNAs 有 19 个,下调 lncRNAs 的有 67 个

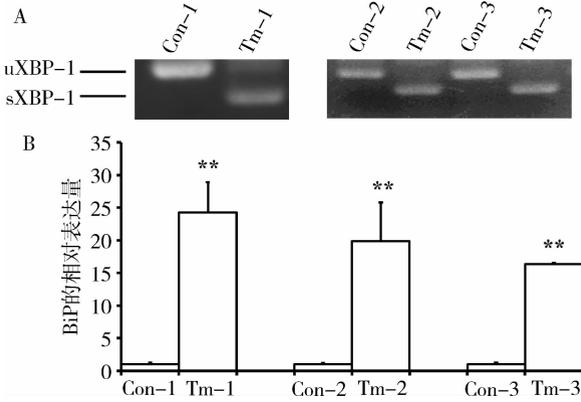


图2 MEF细胞内质网应激反应的激活

A. 3组MEFs样本中 $xbp-1$ 的mRNA剪接结果,Con代表没有加入衣霉素诱导的MEFs,Tm代表加入衣霉素诱导16h后的MEFs; B. 加入衣霉素诱导的MEFs中UPR激活指示分子BiP的mRNA相对于衣霉素未处理组MEFs的表达变化倍数(相对于GAPDH标准化);与对照组相比,** $P < 0.01$

(图3)。针对芯片结果中显著变化的lncRNAs,进行实时荧光定量PCR验证(图4),相对表达量的结果与芯片结果一致。

4. lncRNA功能预测的结果:选择衣霉素处理组与衣霉素未处理组中差异表达上调、下调各200个显著变化的lncRNAs作为lncRNA生物信息学功能预测分析的目标,对这些lncRNA计算得到与之共表达的蛋白编码基因,再对每一个lncRNA对应的蛋白编码基因进行GO分析。筛选GO靶基因的标准是 $P < 0.05$ 且假阳性率(false discovery rate, FDR) < 0.05 。对各个GO分析的条目进行频次统计,并选择出现次数多的条目做图分析,结果见图5。芯片筛选出的与差异lncRNA共表达的基因包括:Atf6、Atf4、Ero1b和Edem1等与内质网应激通路相关的重要基因。GO图结果显示,与倍数显著变化的lncRNA共表达的蛋白编码基因多存在于细胞组分的细胞质中,参与了许多与代谢相关的生物学途径,且这些基因的分子功能多为结合功能。

讨 论

细胞的内质网应激反应是细胞遭受多种应激刺激后,大量未折叠或错误折叠的蛋白质堆积于内质网腔中引起的一种应激反应,与肿瘤、神经退行性疾病、糖尿病等临床常见疾病的发生、发展关系密切^[6-8]。目前研究结果已经揭示了细胞中内质网应激反应的主要转导通路,并且已有文章报道相当一部分的microRNA参与并调控了细胞内质网应激反应^[13]。然而,关于小鼠细胞内质网应激反应通路调控机制的研

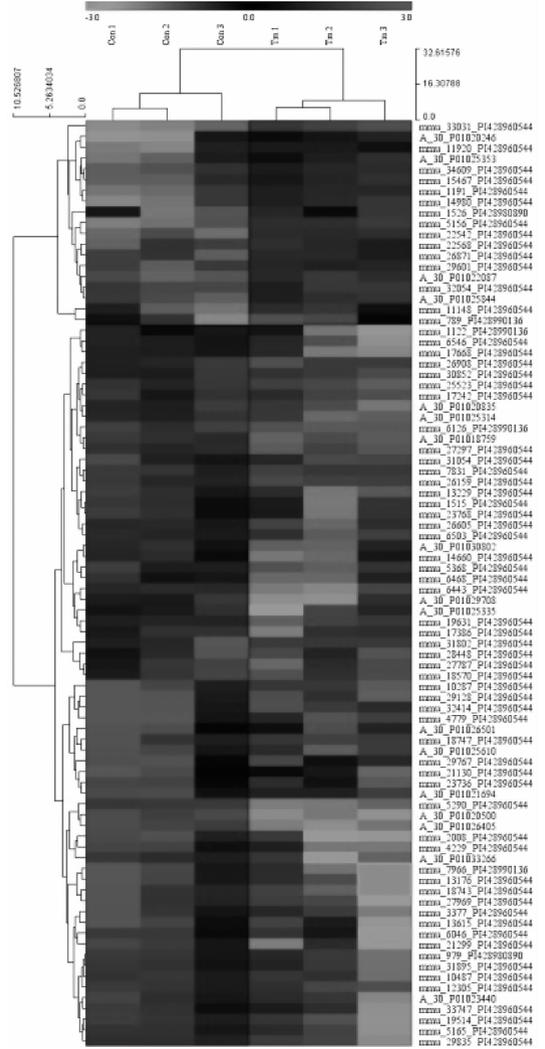


图3 衣霉素处理后的MEFs与未处理组相比较的lncRNA表达谱聚类图

红色聚类代表表达上调的lncRNA,绿色聚类代表表达下调的lncRNA;使用芯片中衣霉素处理组与对照组相比变化倍数大于5倍($P < 0.05$)的lncRNA聚类

究,目前尚不完善。

lncRNA是近年来被研究者广泛关注的 > 200 bp的内源性非蛋白编码RNA。大量报道揭示了许多lncRNA参与了哺乳动物的重要生理过程并起到重要作用。本实验通过基因芯片技术,检测了小鼠成纤维细胞经衣霉素处理激活内质网应激反应后lncRNA的表达谱,与未使用衣霉素处理的MEFs对比,miRNA数据库中的FR224363、FR357954、FR091011以及NONCODEv3.0数据库中的n416306等lncRNA的表达有显著的变化,实时荧光定量PCR验证结果与芯片变化趋势一致,表明了芯片结果的可靠性^[14,15]。

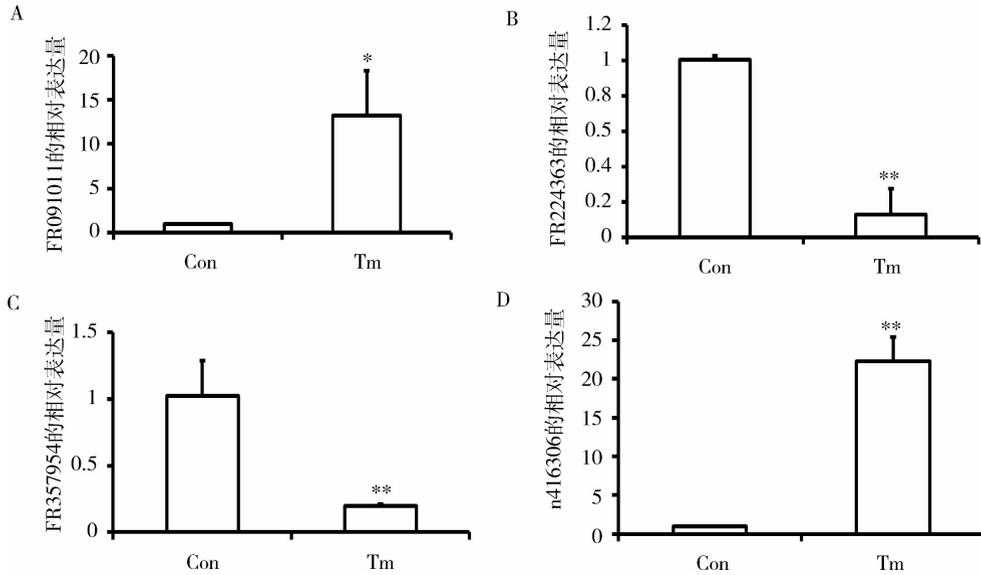


图 4 MEFs 中部分 lncRNA 实时荧光定量 PCR 结果验证

A、B、C、D 分别代表 FR091011、FR224363、FR357954 和 n416306 在 2 种 MEFs 当中的相对表达量(相对于 18s rRNA)。与 Con 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

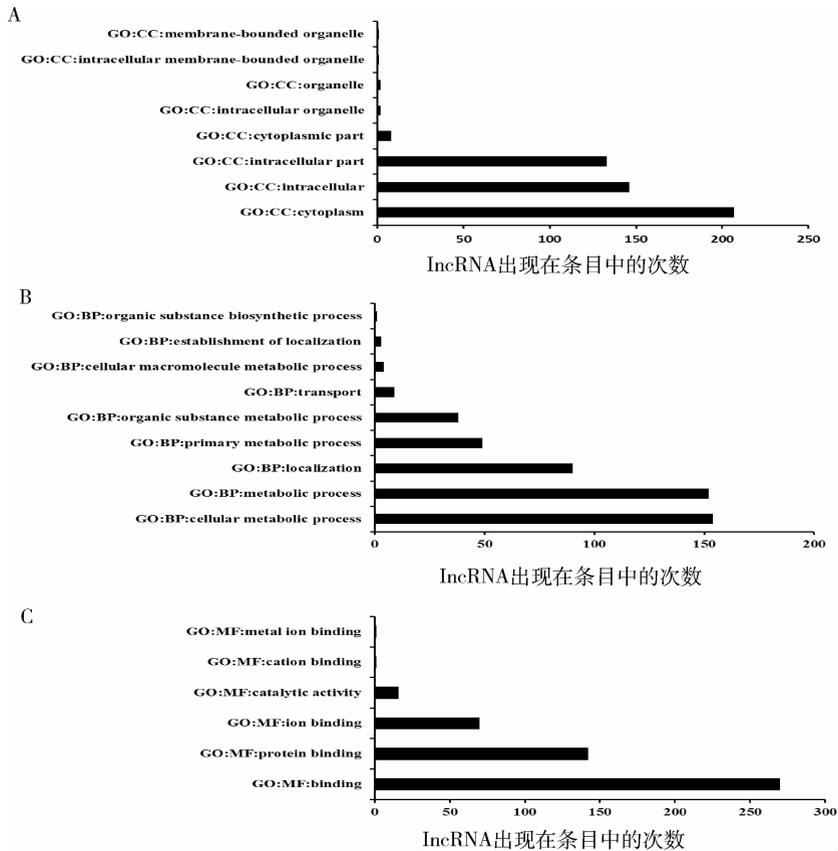


图 5 lncRNA 靶基因显著性的 GO 分析结果

A. y 轴代表 GO 分析中的不同细胞组分; B. y 轴代表 GO 分析中的不同生物学途径; C. y 轴代表 GO 分析中的不同分子功能

此外, lncRNA 的功能预测分析 GO 富集结果提示 MEFs 内质网应激反应激活以后, 发生变化的 lncRNA

可能参与并影响了细胞质中的部分分子功能, 且主要可能是影响了一些具有蛋白或离子结合功能

的分子。文献已报道分子伴侣 BiP/GRP78 与 ATF6 蛋白分子结合的脱离激活了相应蛋白的磷酸化从而引起内质网应激反应,还有许多分子伴侣与蛋白分子的结合参与调控了整个内质网应激反应信号通路。因此影响蛋白结合功能的这部分 lncRNA 可能在内质网应激反应调控机制中发挥重要的作用。同时,GO 分析结果提示与变化的 lncRNA 共表达的蛋白编码基因主要富集在与细胞代谢相关的生物学途径中,也有部分共表达基因与细胞中酶催化活性以及转运相关,由此可推测内质网应激反应激活后引起变化的 lncRNA 可能拥有较为复杂的功能并影响了较多的生物学途径。这些发生变化的 lncRNA 的具体功能还需要我们进一步的探究。同时,芯片的共表达数据分析提供了部分差异变化的 lncRNA 可能存在的靶基因,例如 fRNAdb 数据库中 FR357954 的基因就有可能有 Atf2、Sec61g 等与细胞应激反应、内质网生物功能密切相关的基因。但是,这些 lncRNA 能否调节预测的靶基因,如何调节这些靶基因,还值得深入研究。

参考文献

- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-529
- Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response [J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 739-789
- Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, et al. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands [J]. *EMBO J*, 2005, 24(24): 4368-4380
- Gardner BM, Walter P. Unfolded protein are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response [J]. *Science*, 2011, 333(6051): 1891-1894
- Dickhout JG, Carlisle RE, Austin RC. Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis [J]. *Circ Res*, 2011, 108(5): 629-642
- Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, et al. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. *Neurodegener Dis*, 2012, 10(1-4): 212-215
- Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1 [J]. *Cell Metabolism*, 2006, 4(3): 245-254
- Luo B, Lee A S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies [J]. *Oncogene*, 2013, 32(7): 805-818
- Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1298-1307
- 张怡, 赵连三, 汪成孝, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离与培养 [J]. *四川大学学报*, 2003, 34(2): 344-346
- 斯佩克特, 戈德曼, 莱因万德. 细胞实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 1011-1014
- Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals [J]. *Nature*, 2009, 458(7235): 223-227
- Maurel M, Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(12): C1117-1126
- Mituyama T, Yamada K, Hattori E, et al. The Functional RNA Database 3.0: databases to support mining and annotated of functional RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 89-92
- Bu D, Yu K, Sun S, et al. NONCODING v3.0: integrative annotation of long noncoding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 10-215

(收稿日期:2014-09-22)

(修回日期:2014-10-18)

Gli2 在髓母细胞瘤中的表达及其靶向抑制剂的作用与意义

林中啸 蔡 铭 虞晓明 张一平 杨 涛 盛汉松 陈成春 张 弩

摘要 目的 探讨 SHH(sonic hedgehog signaling pathway)信号通路下游转录因子 Gli2 在髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)中的表达及其靶向抑制剂对 MB 细胞增殖抑制的作用。方法 使用不同浓度的 Gli2 特异性抑制剂 GANT61 作用 Doay 细胞,观察细胞形态的变化,采用 CCK-8 法检测细胞的增殖抑制作用,RT-PCR 法和 Western blot 法分别检测 Doay 细胞中 Gli2 mRNA 的表达量及 Gli2 蛋白表达水平的差异。结果 使用 GANT61 作用细胞后,可见细胞形态出现明显改变,细胞异常突起增

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY13H160033);浙江省医药卫生科技计划项目(2012RCA043)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院神经外科(林中啸、蔡铭、张一平、杨涛、盛汉松、张弩);温州医科大学附属第一医院呼吸内科(虞晓明);温州医科大学解剖教研室(陈成春)

通讯作者:张弩,教授,硕士生导师,电子信箱:zhangnu65@hotmail.com