

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.06.002

结核分枝杆菌感染 RAW264.7 巨噬细胞 MALAT1 的表达及其作用研究^{*}

黄舒颖^{1,2}, 张 诚³, 黄自坤⁴, 罗 清⁴, 卿 城^{5△}

(1. 南昌大学第一附属医院妇产科, 南昌 330006; 2. 江西卫生职业学院, 南昌 330052;

3. 南昌大学第一附属医院超声科, 南昌 330006; 4 南昌大学第一附属医院检验科, 南昌 330006;

5. 南昌大学第一附属医院重症医学科, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨结核分枝杆菌感染 RAW264.7 巨噬细胞肺腺癌转移相关转录本 1(MALAT1) 的表达及其作用。**方法** H37Rv 感染 RAW264.7 巨噬细胞系, 分别在感染后的 0、48 h 后收集细胞, RT-qPCR 检测细胞内 MALAT1 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α) mRNA 表达。通过 siRNA 干扰技术沉默巨噬细胞 MALAT1 表达, 检测 H37Rv 感染细胞后 TNF-α mRNA 表达及 MALAT1 表达对 H37Rv 杀菌功能影响。**结果** H37Rv 感染巨噬细胞后 MALAT1 和 TNF-α mRNA 水平明显上升 ($P<0.05$)。沉默 MALAT1 的巨噬细胞感染 H37Rv 后 TNF-α mRNA 表达明显上调 ($P<0.01$), 结核菌清除能力明显增强 ($P<0.05$)。**结论** H37Rv 感染 RAW264.7 巨噬细胞可促进 MALAT1 表达上调, 沉默 MALAT1 可增强巨噬细胞对 H37Rv 清除能力。

[关键词] 分枝杆菌, 结核; 长链非编码 RNA MALAT1; RAW264.7 巨噬细胞

[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0905-04

Expression and role of MALAT1 in RAW264.7 macrophages infected by Mycobacterium tuberculosis^{*}

HUANG Shuying^{1,2}, ZHANG Cheng³, HUANG Zikun⁴, LUO Qing⁴, QING Cheng^{5△}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Nanchang University,

Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Jiangxi Health Vocational College, Nanchang, Jiangxi

330052, China; 3. Department of Ultrasonography, First Affiliated Hospital of Nanchang

University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 4. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated

Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 5. Department of Intensive

Care Unit, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and role of MALAT1 in RAW264.7 macrophages after H37Rv Mycobacterium tuberculosis(MTB) infection. **Methods** H37Rv was infected to RAW264.7 macrophage cell line, and the cells were collected at 0, 48 h after infection. Intracellular MALAT1 and TNF-α mRNA expressions were detected by RT-qPCR. By using siRNA interference technique, MALAT1 was silenced in macrophages, and after H37Rv infection to the cells, the expression of TNF-α mRNA in macrophages and the influence of MATAT1 expression on H37Rv bactericidal function were detected. **Results** The levels of MALAT1 and TNF-α mRNA after macrophage infection by H37Rv were significantly increased ($P<0.05$). By silencing MALAT1 in macrophage infection by H37Rv, the TNF-α mRNA expression was significantly up-regulated ($P<0.01$), and the ability of MTB scavenging capacity was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** H37Rv infecting RAW264.7 macrophages can promote MALAT1 expression up-regulation, and silencing MALAT1 can enhance the scavenging ability of macrophages to intracellular H37Rv.

[Key words] Mycobacterium tuberculosis; lncRNA MALAT1; RAW264.7 macrophages

结核感染严重威胁人类健康, 是单一病原菌导致患者死亡最高的感染性疾病。世界卫生组织公布的报告显示, 全球每年约有 700 万新发病例, 死亡人数高达 200 万人^[1]。当前研究认为, 结核病与机体免疫功能密切相关。结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 感染机体后主要寄生于巨噬细胞内, 是典型的胞内致病菌。当机体免疫力强时, 巨噬细胞免疫激活, 可杀灭胞内寄生的 MTB; 而人体免疫低下时, MTB 可抑制巨噬细胞活化, 长期存活于巨噬细胞内^[2]。当前的研究对 MTB 如何逃避免疫反应尚未

^{*} 基金项目: 江西省自然科学基金(20161BAB215224, 20171BAB205028); 江西省教育厅科研项目(GJJ160120); 江西省卫生计生委科技计划(20185084)。 作者简介: 黄舒颖(1990—), 医师, 讲师, 主要从事肿瘤免疫、微生物免疫学研究。 △ 通信作者, E-mail: 254685443@qq.com。

完全掌握,相关研究对未来结核病防控具有重要意义。

长链非编码 RNA (long-noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 nt 的非编码 RNA 分子,几乎不具有蛋白编码能力。研究证实 lncRNA 广泛存在于哺乳动物体内,在转录剪切后可直接折叠成高级结构,以 RNA 的形式与蛋白、DNA 或者 RNA 结合,对目标靶分子进行转录和转路后水平调控^[3]。在免疫调控^[4]、肿瘤生长^[5]、细胞代谢^[6]等多种生物学过程中发挥重要作用。lncRNA 人类肺腺癌转移相关转录本 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 最先是在肺部肿瘤中被发现,随后证实其在膀胱癌、乳腺癌等肿瘤疾病中发挥重要作用^[7]。近年来研究证实 MALAT1 参与了机体炎症免疫过程,是体内重要的免疫调节因子。ZHAO 等^[8]研究发现 LPS 刺激 THP-1 和 RAW264.7 巨噬细胞后,细胞内 MALAT1 表达升高,进一步研究发现, MALAT1 是通过调控核因子- κ B (NF- κ B) 炎症信号通路调节炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 表达。PUTHANVEETIL 等^[9]研究表明 MALAT1 可调节高糖诱导的内皮细胞炎症反应。目前,有关 MALAT1 在 RAW264.7 巨噬细胞抗结核免疫中的作用鲜见报道。本研究拟通过 MTB 感染 RAW264.7 巨噬细胞,RT-qPCR 检测 MALAT1、TNF- α mRNA 表达,探讨 MALAT1 在 RAW264.7 巨噬细胞抗结核免疫中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 MTB 标准菌株 H37Rv (ATCC 27294) 在本实验室保存;RAW264.7 巨噬细胞 (中科院上海细胞研究所);DMSO、DMEM (美国 Hyclone 公司);胎牛血清 (杭州四季青公司);Trizol 试剂、Lipofectamine™ 2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司);PCR 引物 (上海生工生物工程公司);逆转录试剂盒与荧光定量 PCR 试剂盒 (大连宝生物 TaKaRa 公司);siRNA 干扰试剂 (广州锐博公司)。荧光定量 PCR 采用 Applied Biosystems 7600 系统 (美国 ABI 公司)。其他所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞感染 MTB 模型的建立 将处于对数期生长的 RAW264.7 巨噬细胞加入 24 孔板培养 (37 °C、5% CO₂) 至细胞贴壁良好,H37Rv 按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 5 感染巨噬细胞,4 h 后 PBS 清洗细胞并继续培养,12 h 后 Trizol 法提取细胞总 RNA。

1.2.2 RT-qPCR 在感染后的不同时间点 (0、48 h) Trizol 法分别提取细胞总 RNA,具体实验步骤按试剂说明书进行。RT-qPCR 检测细胞 MALAT1、TNF- α mRNA 表达情况,采用 TaKaRa 公司逆转录试剂盒与

荧光定量 PCR 试剂盒进行实验,具体的操作步骤、实验条件设置按照试剂盒操作说明书进行。TNF- α ^[10]: 上游引物 5'-CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT-3',下游引物 5'-GCT ACG ACG TGG GCT ACA G-3';MALAT1^[8]: 上游引物 5'-CAT GGC GGA ATT GCT GGT A-3',下游引物 5'-CTG CCA ACA GCA TAG CAG TA -3';内参基因 GAPDH^[8]: 上游引物 5'-TGG TGA AGC AGG CAT CTG AC-3',下游引物 5'-TGC TGT TGA AGT CGC AGG AG-3'。

1.2.3 siRNA 细胞转染 制备 MALAT1 siRNA 及 control siRNA (siNC),具体由上海 Gene Pharma 公司完成。siRNA 引物序列^[8]: 上游引物 5'-GCG GAA GCU GAU CUC CAA UTT -3',下游引物: 5'-AUU GGA GAU CAG CUU CCG CTT -3'。巨噬细胞分为空白对照组、siMALAT1 转染组及 siNC 转染组。培养的巨噬细胞贴壁良好后,将 siMALAT1 或 siNC 转染,根据 Lipofectamine™ 2000 转染操作说明书进行操作,转染 4~6 h 后更换完全培养基,24 h 后收集细胞,Trizol 提取细胞 RNA,RT-qPCR 检测 siRNA 敲减效果。

1.2.4 siMALAT1 后 TNF- α mRNA 的表达 siMALAT1 后的巨噬细胞与 H37Rv 按 MOI=5 的比例对细胞进行感染,48 h 后 RT-qPCR 检测细胞 TNF- α mRNA 表达。

1.2.5 siMALAT1 后 MTB 杀菌功能 siMALAT1 后的巨噬细胞与 H37Rv 按 MOI=5 的比例进行感染,4 h 后用 PBS 清洗细胞 (H37Rv 感染后 0 h 时间点)。分别于 H37Rv 感染后 0、72 h 收集并裂解各组巨噬细胞,将裂解液进行系列梯度稀释后立即接种于含有 OADC 的 7H10 固体培养基上,3~4 周后进行 MTB 菌落计数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本间采用 t 检验,多组间采用 ANOVA 方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H37Rv 感染巨噬细胞后 MALAT1 及 TNF- α mRNA 变化 RT-qPCR 检测显示,感染后 48 h 细胞内 MALAT1 和 TNF- α mRNA 表达均上调 ($P < 0.05$),见图 1。

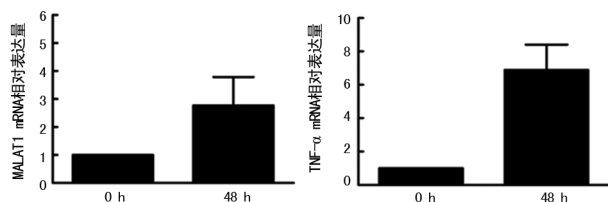


图 1 H37Rv 感染巨噬细胞后 MALAT1 和 TNF- α mRNA 表达情况

2.2 MALAT1 沉默后对巨噬细胞 TNF- α mRNA 表达影响 通过 RNAi 技术成功沉默巨噬细胞 MALAT1 表达, 见图 2A。将该细胞感染 H37Rv, 沉默 MALAT1 后的巨噬细胞与 siNC 转染组比较, TNF- α mRNA 表达明显增加($P<0.05$), 见图 2B。

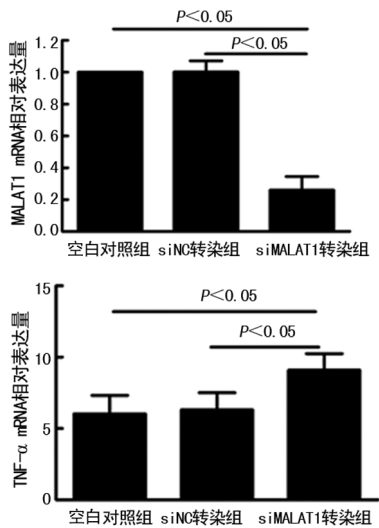


图 2 MALAT1 沉默后巨噬细胞 TNF- α mRNA 表达情况

2.3 MALAT1 沉默对巨噬细胞抗 H37Rv 杀菌能力的影响 siMALAT1 转染组与 siNC 转染组细胞荷菌量在 0 h 时差异无统计学意义($P>0.05$)。在 H37Rv 感染 72 h 后, siMALAT1 转染组巨噬细胞内 H37Rv 的存活率明显减少($P<0.05$), 见图 3。

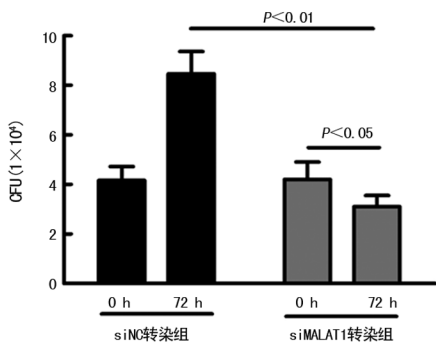


图 3 siMALAT1 对巨噬细胞清除结核菌能力的影响

3 讨 论

随着微生物学、分子生物学、药物化学及医学其他学科的进步, 人类在抗结核病治疗方面取得了突破性的进展, 但至今仍未实现彻底治愈该病的能力。近年来随着 HIV 流行、多耐药结核菌的产生, 对当前的结核病治疗提出了新的目标。结核菌是一种胞内寄生微生物, 作为结核菌主要宿主细胞的巨噬细胞在抗结核免疫过程中扮演重要角色。巨噬细胞可以直接吞噬和杀伤结核菌, 同时也可提呈抗原以激发机体的体液及细胞免疫反应。结核菌可通过阻止巨噬细胞吞噬体和溶酶体融合, 抑制巨噬细胞活化等多重方式对抗巨噬细胞的杀菌作用,

从而实现了在胞内长期存活, 躲避机体免疫清除的目的^[11-12]。因此, 巨噬细胞抗结核免疫过程在结核病的防控中具有重要的临床及科研价值。

lncRNA 曾经被认为是无用的转录分子, 然而近年的研究彻底颠覆了人们以往的认知, 即 lncRNA 是一类具有重要调控功能的细胞分子。在免疫系统领域, lncRNA 在巨噬细胞^[13]、淋巴细胞^[14]、树突状细胞^[15]等免疫细胞的功能调控方面发挥着重要的作用。已有部分研究显示, lncRNA 与巨噬细胞抗结核免疫反应有关, 例如 lncRNA CD244 可调控结核感染过程中 CD8⁺ T 细胞 IFN- γ 和 TNF- α 分泌^[16]。巨噬细胞沉默 lncRNA MEG3 可增强其对 BCG 清除能力^[13]。这些研究认为 lncRNA 在结核菌感染巨噬细胞后的细胞免疫反应中发挥重要作用。

本研究选取了跟炎症免疫密切相关 lncRNA 分子 MALAT1, 它最早在非小细胞肺癌研究中被发现, 之后的大量研究发现该分子与炎症反应密不可分。XU 等^[17]在对乳腺癌的研究中发现 MALAT1 可调控炎症相关信号通路 PI3K/Akt; ZHOU 等^[18]发现在口腔鳞癌中 MALAT1 可影响胞内炎症通路 NF- κ B 活化。PUTHANVEETIL 等^[9]研究表明 MALAT1 可调节高糖诱导的内皮细胞炎症因子 TNF- α 表达。也有研究证实 MALAT1 与巨噬细胞 NF- κ B 炎症通路活化有关^[8]。由于结核菌感染巨噬细胞后会诱发一系列炎症反应, 笔者推测 MALAT1 可能参与了结核菌感染相关炎症反应过程, 且当前尚未有 MALAT1 在 H37Rv 感染 RAW264.7 巨噬细胞后表达及作用的相关研究。

本研究结果表明, H37RV 感染会上调 MALAT1 在巨噬细胞中表达; 与此同时, 细胞内炎症因子 TNF- α mRNA 表达也上调。表明结核菌感染巨噬细胞后, 细胞迅速活化, 促炎因子表达上调, 这是免疫细胞启动免疫过程以杀伤结核菌的表现。鉴于 MALAT1 在炎症反应中的调控作用, 本文构建了 MALAT1 沉默的巨噬细胞, 之后再感染结核菌, 结果发现, siMALAT1 后可促进巨噬细胞 TNF- α mRNA 表达上调, 即 MALAT1 表现出抑制炎症反应的作用。进一步细菌计数实验发现, siMALAT1 后可明显增强 RAW264.7 巨噬细胞对结核菌的胞内清除能力, 充分表明了 MALAT1 积极参与了巨噬细胞感染结核菌后的免疫反应过程。

综上所述, 本研究表明结核菌 H37Rv 感染 RAW264.7 巨噬细胞后可上调细胞内 MALAT1 和炎症因子 TNF- α mRNA, 沉默 MALAT1 将增强巨噬细胞对结核菌的清除能力, 为结核病免疫治疗提供了新的靶点和思路。

参考文献

- [1] 陈洁, 弭阳, 邓亚婷, 等. 慢病毒介导的 TACO-shRNA 通过促进吞噬体与溶酶体融合提高巨噬细胞清除结核分枝杆菌的能力[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, 35(10): 735-740.
- [2] MOREIRA-TEIXEIRA L, SOUSA J, MCNAB F W, et al. Type I IFN inhibits alternative macrophage activation during mycobacterium tuberculosis infection and leads to enhanced protection in the absence of IFN- γ signaling[J]. J Immunol, 2016, 197(12): 4714-4726.
- [3] SALLAM T, SANDHU J, TONTONOV P. Long noncoding RNA discovery in cardiovascular disease: decoding form to function[J]. Circ Res, 2018, 122(1): 155-166.
- [4] WANG P, XU J F, WANG Y J, et al. An interferon-independent lncRNA promotes viral replication by modulating cellular metabolism[J]. Science, 2017, 358(6366): 1051-1055.
- [5] WANG Y Q, HE H L, LI W, et al. MYH9 binds to lncRNA gene PTCSC2 and regulates FOXE1 in the 9q22 thyroid cancer risk locus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(3): 474-479.
- [6] XIAO Z D, HAN L, LEE H, et al. Energy stress-induced lncRNA FILNC1 represses c-Myc-mediated energy metabolism and inhibits renal tumor development[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 783.
- [7] YOSHIMOTO R, MAYEDA A, YOSHIDA M, et al. MALAT1 long non-coding RNA in cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(1): 192-199.
- [8] ZHAO G, SU Z Y, SONG D, et al. The long noncoding RNA MALAT1 regulates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response through its interaction with NF-kappa B[J]. FEBS Lett, 2016, 590(17): 2884-2895.
- [9] PUTHANVEETIL P, CHEN S L, FENG B, et al. Long non-coding RNA MALAT1 regulates hyperglycaemia induced inflammatory process in the endothelial cells[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(6): 1418-1425.
- [10] PARK P H, MCMULLEN M R, HUANG H L, et al. Short-term treatment of RAW264. 7 macrophages with adiponectin increases tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression via ERK1/2 activation and Egr-1 expression; role of TNF-alpha in adiponectin-stimulated interleukin-10 production[J]. J Biol Chem, 2007, 282(30): 21695-21703.
- [11] HMAMA Z, PENA-DIAZ S, JOSEPH S, et al. Immunoevasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis[J]. Immunol Rev, 2015, 264(1, SI): 220-232.
- [12] AMARAL E P, LASUNSKAIA E B, D'IMPÉRIO-LIMA M R. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death[J]. Microbes Infect, 2016, 18(1): 11-20.
- [13] PAWAR K, HANISCH C, PALMA VERA S E, et al. Down regulated lncRNA MEG3 eliminates mycobacteria in macrophages via autophagy[J]. Sci Rep, 2016(6): 19416.
- [14] YU X J, ZOU L H, JIN J H, et al. Long noncoding RNAs and novel inflammatory genes determined by RNA sequencing in human lymphocytes are up-regulated in permanent atrial fibrillation[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(5): 2314-2326.
- [15] CHEN J H, WANG S W, JIA S N, et al. Integrated analysis of long non-coding RNA and mRNA expression profile in pancreatic cancer derived exosomes treated dendritic cells by microarray analysis[J]. J Cancer, 2018, 9(1): 21-31.
- [16] WANG Y, ZHONG H L, XIE X D, et al. Long noncoding RNA derived from CD244 signaling epigenetically controls CD8⁺ T-cell immune responses in tuberculosis infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(29): E3883-3892.
- [17] XU S P, SUI S Y, ZHANG J F, et al. Downregulation of long noncoding RNA MALAT1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via the PI3K-AKT pathway in breast cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 4881-4891.
- [18] ZHOU X, LIU S, CAI G S, et al. Long Non coding RNA MALAT1 promotes tumor growth and metastasis by inducing Epithelial-Mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2015(5): 15972.

(收稿日期: 2018-10-10 修回日期: 2018-12-22)