

LncRNA JHDM1D-AS1 对 MPP⁺ 诱导的帕金森细胞模型线粒体功能的机制研究

李斯琴^a, 王兴^b, 阿日奔吉日嘎拉^b (巴彦淖尔市医院 a. 神经内科; b. 脊柱外科, 内蒙古巴彦淖尔 015000)

摘要: 目的 探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) JHDM1D 反义 RNA 1 (JHDM1D antisense RNA 1, JHDM1D-AS1) 对帕金森细胞模型线粒体功能的影响及分子机制。方法 采用 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 处理 SH-SY5Y 细胞构建帕金森细胞模型, 记为 MPP⁺ 组, 正常细胞作为对照组 (control 组)。将 JHDM1D-AS1 mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 分别转染至 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中, 利用 RT-PCR 检测 JHDM1D-AS1 表达。流式细胞技术分析 JHDM1D-AS1 表达对 SH-SY5Y 细胞凋亡、线粒体膜电位及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量的影响。Western blot 实验分析 JHDM1D-AS1 表达对沉默调节蛋白 1 (SIRT1) 表达的影响, 并利用双荧光素酶报告验证两者的靶向关系。使用 SIRT1 激活剂 Resveratrol 对转染 JHDM1D-AS1 mimic 的细胞进一步处理, 证实 JHDM1D-AS1 调控 SIRT1 对帕金森细胞线粒体的影响。结果 control 组 JHDM1D-AS1 相对表达为 0.85 ± 0.21, MPP⁺ 模型组 JHDM1D-AS1 相对表达为 1.25 ± 0.33, 较 control 组增加, 差异有统计学意义 ($t=62.017, P < 0.05$)。转染 JHDM1D-AS1 mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 序列后, JHDM1D-AS1 相对表达分别为 1.63 ± 0.38 和 0.72 ± 0.17, 与 MPP⁺ 组比较差异有统计学意义 ($F=112.035, P < 0.05$)。MPP⁺ 组细胞凋亡率为 17.64%, JHDM1D-AS1 mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 组细胞凋亡率分别为 25.92% 和 10.74%, 差异有统计学意义 ($F=49.052, P < 0.05$)。MPP⁺ 组绿色荧光强度为 22.20%, JHDM1D-AS1-mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 组绿色荧光强度分别为 43.97% 和 10.65%, 差异有统计学意义 ($F=57.390, P < 0.05$)。流式结果显示, MPP⁺ 组相对荧光强度为 27.58% ± 4.25%, JHDM1D-AS1 mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 组相对荧光强度分别为 45.10% ± 6.05% 和 14.82% ± 3.70%, 差异有统计学意义 ($F=25.794, P < 0.05$)。Control 组 SIRT1 蛋白表达为 1.00 ± 0.23, MPP⁺ 模型组 SIRT1 表达下调为 0.70 ± 0.27, 差异有统计学意义 ($t=35.740, P < 0.05$)。转染 JHDM1D-AS1 mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 后, SIRT1 表达分别为 0.44 ± 0.16 和 1.34 ± 0.22, 与 MPP⁺ 组比较差异有统计学意义 ($F=29.508, P < 0.05$)。Target Scan 软件预测, JHDM1D-AS1 与 SIRT1 序列存在结合位点, 双荧光素酶实验显示, JHDM1D-AS1 过表达可降低 WT-SIRT1 荧光素酶活性。JHDM1D-AS1 过表达时线粒体膜电位降低, SIRT1 激活过表达时线粒体膜电位升高, 转染 JHDM1D-AS1 mimic 并激活 SIRT1 后线粒体膜电位水平回升。结论 沉默 JHDM1D-AS1 表达可抑制 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 其作用机制可能与 JHDM1D-AS1 靶向调控 SIRT1, 进而影响帕金森细胞模型线粒体功能有关。

关键词: 帕金森细胞模型; 长链非编码 RNA JHDM1D-AS1; 沉默调节蛋白 1; 1-甲基-4-苯基吡啶离子; 线粒体功能

中图分类号: R745; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2023) 03-047-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.03.009

Mechanism Study of LncRNA JHDM1D-AS1 on Mitochondrial Function in MPP⁺-induced Parkinson's Cell Models

LI Si-qin^a, WANG Xing^b, ARIBENJI Rigala^b (a. Department of Neurology; b. Department of Spine Surgery, Bayannur Hospital, Inner Mongolia Bayannur 015000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and molecular mechanism of long non-coding RNA (LncRNA) JHDM1D antisense RNA 1 (JHDM1D-AS1) on mitochondrial function in Parkinson's cell model. **Methods** The SH-SY5Y cells were treated with 1-methyl-4-phenylpyridine ion (MPP⁺) to construct a Parkinson's cell model, which was recorded as the MPP⁺ group, and the normal cells were used as the control group. JHDM1D-AS1 mimic and JHDM1D-AS1 siRNA were transfected into MPP⁺-induced SH-SY5Y cells, respectively, and the expression of JHDM1D-AS1 was detected by RT-PCR. Flow cytometry was used to analyze the effect of JHDM1D-AS1 expression on SH-SY5Y cell apoptosis, mitochondrial membrane potential and

基金项目: 内蒙古自治区卫生健康委员会计划项目 (202202403); 内蒙古医科大学科研项目 (YKD2021LH095); 内蒙古自治区巴彦淖尔科技计划项目 (KY202151); 内蒙古自治区巴彦淖尔科技计划项目 (K202139)。

作者简介: 李斯琴 (1984-), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 脑血管疾病, 专业: 神经内科, E-mail: 15648855750@yeah.net。

通讯作者: 阿日奔吉日嘎拉 (1968-), 男, 主任医师, 研究方向: 脊柱, 专业: 骨科, E-mail: 13847852992@163.com。

reactive oxygen species (ROS) content. The effect of JHDM1D-AS1 expression on SIRT1 protein expression was analyzed by Western blot experiments, and the targeting relationship between the two was verified by dual-luciferase reporter. The cells transfected with JHDM1D-AS1 mimic were further treated with SIRT1 activator Resveratrol to confirm the effect of JHDM1D-AS1 on the mitochondria of Parkinson's cells. **Results** The relative expression of JHDM1D-AS1 in the control group was 0.85 ± 0.21 , and that in the MPP⁺ model group was 1.25 ± 0.33 , compared to the control group, with a statistically significant difference ($t=62.017, P<0.05$). After transfection with JHDM1D-AS1 mimic and JHDM1D-AS1 siRNA sequences, the relative expression of JHDM1D-AS1 was 1.63 ± 0.38 and 0.72 ± 0.17 respectively, which was statistically significant compared with MPP⁺ group ($F=112.035, P<0.05$). The apoptosis rate of MPP⁺ group, JHDM1D-AS1 mimic and JHDM1D-AS1 siRNA group were 17.64%, 25.92% and 10.74%, respectively, and the difference was statistically significant ($F=49.052, P<0.05$). The green fluorescence intensity of MPP⁺ group was 22.20%, while that of JHDM1D-AS1 mimic and JHDM1D-AS1 siRNA group was 43.97% and 10.65%, respectively, with significant difference ($F=57.390, P<0.05$). Flow cytometry results showed that the relative fluorescence intensity of MPP⁺ group was $27.58\% \pm 4.25\%$, JHDM1D-AS1 mimic and JHDM1D-AS1 siRNA group were $45.10\% \pm 6.05\%$ and $14.82\% \pm 3.70\%$, respectively, and the difference was statistically significant ($F=25.794, P<0.05$). The expression of SIRT1 protein in the control group was 1.00 ± 0.23 , and the expression of SIRT1 in the MPP⁺ model group was 0.70 ± 0.27 , and the difference was statistically significant ($t=35.740, P<0.05$). After transfection with JHDM1D-AS1 mimic and JHDM1D-AS1 siRNA, the expression of SIRT1 was 0.44 ± 0.16 and 1.34 ± 0.22 respectively, which was statistically significant compared with MPP⁺ group ($F=29.508, P<0.05$). Target scan software predicted that there was a binding site between JHDM1D-AS1 and SIRT1 sequence. Double luciferase assay showed that JHDM1D-AS1 overexpression could reduce the luciferase activity of WT-SIRT1. The mitochondrial membrane potential decreases when JHDM1D-AS1 was overexpressed. The mitochondrial membrane potential increases when SIRT1 activation was overexpressed. Mitochondrial membrane potential levels rebound after transfection of JHDM1D-AS1 mimic and activation of SIRT1. **Conclusion** Silencing the expression of JHDM1D-AS1 could inhibit MPP⁺-induced apoptosis of SH-SY5Y cells, and its mechanism may be related to the targeted regulation of SIRT1 by JHDM1D-AS1, thereby affecting the mitochondrial function of the Parkinson's cell model.

Keywords: Parkinson's cell models; LncRNA JHDM1D-AS1; SIRT1; 1-methyl-4-phenylpyridine; mitochondrial function

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是老年人常见的神经退行性疾病之一, 发病率呈逐年上升趋势, 然而该病的发生受到社会因素、药物因素、患者因素等多种因素的影响, 导致其病因及发病机制至今尚未明确^[1-2]。既往研究显示, 线粒体功能障碍是导致神经系统中细胞凋亡的主要原因, 也被认为是引起 PD 患者体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 累积的主要原因之一, 在 PD 发病过程中起着重要作用^[3]。因此, 寻找调节神经元细胞线粒体功能的生物学标志物, 并深入探讨其分子机制, 对于治疗 PD 疾病具有重要的临床意义。沉默调节蛋白 1 (SIRT1) 是一种具有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性的蛋白去乙酰基酶, 可以调节细胞寿命、能量代谢及神经保护等^[4]。有研究报道, SIRT1 激活剂通过激活 SIRT1 依赖性 PGC-1 α /NRF1/TFAM 信号通路, 来改善线粒体生物合成受损功能, 从而预防神经发育性疾病^[5]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 不仅可作为遗传信息中间载体的辅助性角色, 而且更多地承担了各种调控功能, 已被证实参与脑发育、阿尔茨海默症及 PD 疾病中发挥重要调节作用^[6]。JHDM1D 反义 RNA 1 (JHDM1D antisense RNA 1, JHDM1D-AS1) 是一种新发现的 Lnc RNA, 定位于染色体

7q34, 有研究报道, JHDM1D-AS1 在神经发育、细胞分化、氧化应激等多个生物学过程中起关键作用^[7]。本研究通过生物信息学预测发现, SIRT1 可能是 JHDM1D-AS1 的靶基因, 那么, JHDM1D-AS1 是否能通过调控 SIRT1 在 PD 细胞模型中发挥潜在作用呢? 故本研究利用多巴胺能神经毒素 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 处理 SH-SY5Y 细胞构建 PD 模型, 并检测 JHDM1D-AS1 差异表达对 PD 模型细胞凋亡及线粒体功能的影响, 从而深入探讨 JHDM1D-AS1/SIRT1 轴在 PD 进展过程中的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购自中国科学院细胞库, 进行复苏、传代培养后, 用于后续实验。

1.2 仪器与试剂 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) (美国 Sigma 公司); LJHDM1D-AS1 mimic, JHDM1D-AS1 siRNA 序列构建和 RT-PCR 引物由上海生工生物工程有限公司设计合成; AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒 (美国 BD 公司); ROS 试剂盒 (上海通蔚生物科技有限公司); 双荧光素酶基因检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 兔

源 SIRT1, 鼠源 β -actin 抗体及 HRP 标记羊抗兔 (鼠) II 抗 (美国 Abcam 公司); PCR 仪 (德国 Biometra); 细胞培养箱 (日本三洋公司); 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司); 流式细胞分析仪 (美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养: 采用含 10g/dl 胎牛血清的 DMEM 培养液, 加入 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 37 $^{\circ}$ C, 5ml/dl CO₂ 孵育箱中培养, 当细胞融合度为 80% 时, 胰蛋白酶消化传代, 待细胞长至取对数生长期后进行后续实验。

1.3.2 PD 模型构建及细胞转染: 取对数生长期 SH-SY5Y 细胞接种于 6 孔板, 在其培养液中加入 MPP⁺ 试剂 (终浓度为 5 mmol/L), 轻轻摇晃混合均匀, 恒温孵育 24 h, 构建 PD 模型; 将正常培养的细胞设为对照组 (control 组)。将 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞重新接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁时将 JHDM1D-AS1 mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 序列转染至 SH-SY5Y 细胞中, 分别记为 JHDM1D-AS1 mimic 组和 JHDM1D-AS1 siRNA 组, 培养 6 h 后更换新鲜培养液继续培养 48 h, 收集细胞检测转染效率。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力: 取对数生长期 SH-SY5Y 细胞, 胰酶消化、重悬, 接种于 96 孔板, 每孔 5×10^3 个细胞, 37 $^{\circ}$ C, 5ml/dl CO₂ 孵育箱培养 24 h, 加入 MPP⁺ 处理 24 h, 每组设 3 个重复孔, 后分别培养 1~5 天, 吸出培养液, 每孔分别加入 CCK-8 液继续孵育 2 h, 在 450 nm 处测量各组吸光度值。

1.3.4 RT-PCR 检测转染效率: 利用 RNA 提取试剂盒提取各组 SH-SY5Y 细胞总 RNA, 采用反转录试剂盒合成 cDNA, 反转录条件为: 42 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 85 $^{\circ}$ C 灭活 5 min。以反转录合成的 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 40 个循环。扩增后的样品经 PCR 仪测定, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中 JHDM1D-AS1 相对表达量, 以 β -actin 为内参, 引物序列为: JHDM1D-AS1 上游引物: 5'-TGTTGTTCTGTCACCCACCC-3', 下游引物: 5'-TGCATGGGTCTTTCCACTCC-3'; β -actin 上游引物: 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3', 下游引物: 5'-GCTGTCACCTTACCGTTCC-3'。

1.3.5 细胞凋亡水平检测: 取转染后各组 SH-SY5Y 细胞, PBS 洗涤 2 次后, 离心, 重悬, 每组加入 3 μ l Annexin V-FITC, 室温避光孵育 10 μ l, 后再加入 3 μ l PI 染液, 室温避光孵育 15 min, 离心去上清, 每管加入 200 μ l 1 \times Binding buffer, 混匀后在 1h 内行流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.6 线粒体膜电位变化: 取转染后各组 SH-SY5Y 细胞, 重悬, 分别加入 JC-1 荧光染料, 浓度为 1 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 离心, 收集底部细胞, 加入 1 ml PBS 缓冲液轻轻漂洗, 同等条件下离心后收集细胞, 加入提前预热的 500 μ l PBS 缓冲液, 轻轻弹起细胞使其混合均匀, 经流式细胞仪检测。

1.3.7 ROS 含量测定: 收集转染后 SH-SY5Y 细胞悬液, 加入 200 μ l 浓度为 5 μ mol/L 的 Cell Rox Red 荧光染料, 轻摇混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 离心去上清, 加入 1 ml PBS 缓冲液轻轻漂洗后, 再次离心去上清, 加入 300 μ l PBS 缓冲液, 轻摇混匀后通过流式细胞仪进行检测。

1.3.8 Western blot 检测 SIRT1 蛋白表达情况: 取转染后 SH-SY5Y 细胞, 胰蛋白酶消化, 加入蛋白裂解液提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 后转 PVDF 膜, 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入 SIRT1 和 β -actin 一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日加入 IgG-HRP 二抗, 室温孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 加入 ECL 发光液, 暗室曝光并拍照, 采用 Image-J 软件分析 SIRT1 蛋白相对表达。

1.3.9 双荧光素酶基因报告实验: 分别构建含有野生型和突变型 SIRT1 基因的荧光素酶报告基因质粒, 将其与 JHDM1D-AS1 mimic 及 control 共转染于 SH-SY5Y 细胞中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h 后, 利用双荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光强度。

1.3.10 SIRT1 激活剂处理后 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位变化: 为进一步证实 JHDM1D-AS1 通过靶向作用 SIRT1 调控 PD 细胞线粒体功能, 研究在上述转染了 JHDM1D-AS1 mimic 的细胞中加入了 SIRT1 激活剂 Resveratrol 溶液, 恒温孵育 24 h, 后通过流式细胞仪分析 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位变化。

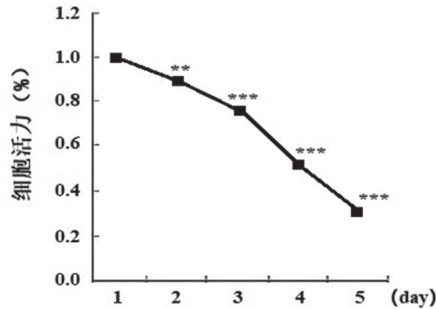
1.4 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行结果分析, 所有数据均采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP⁺ 对 SHSY5Y 细胞活力的影响 见图 1。研究采用 MPP⁺ 处理 SH-SY5Y 细胞构建 PD 模型, 经 CCK-8 检测显示, MPP⁺ 处理后 1, 2, 3, 4, 5 天时 SH-SY5Y 细胞活力分别为 1.00 ± 0.01 , 0.89 ± 0.04 , 0.77 ± 0.03 , 0.54 ± 0.02 , 0.33 ± 0.02 , 随着培养时间延长细胞活力逐渐降低 (均 $P < 0.05$)。

2.2 JHDM1D-AS1 在各组细胞中的表达 RT-PCR 结果显示, control 组 SH-SY5Y 细胞中 JHDM1D-AS1 相对表达水平为 0.85 ± 0.21 , MPP⁺ 组细胞

中 JHDM1D-AS1 相对表达水平为 1.25 ± 0.33 , 较 control 组增加, 差异有统计学意义 ($t=62.017$, $P < 0.05$)。转染 JHDM1D-AS1 mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 序列后, 两组细胞中 JHDM1D-AS1 相对表达水平分别为 1.63 ± 0.38 和 0.72 ± 0.17 , 与 MPP⁺ 组相比, 三组间差异亦有统计学意义 ($F=112.035$, $P < 0.05$), 说明转染成功。



注: 与第 1 天相比, ** $t=4.824$, $P < 0.01$, *** $t=10.086, 20.172, 29.381$, 均 $P < 0.001$ 。

图 1 MPP⁺ 处理对 SH-SY5Y 细胞活力的影响

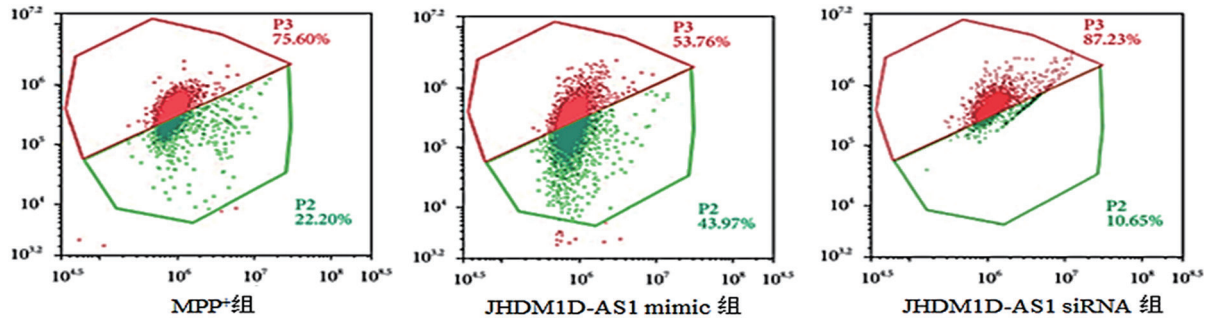


图 2 JHDM1D-AS1 差异表达对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响

2.5 JHDM1DAS1 对 MPP⁺ 诱导的 SHSY5Y 细胞中 ROS 含量的影响 流式结果显示, MPP⁺ 组 ROS 相对荧光强度为 $27.58\% \pm 4.25\%$, 转染 JHDM1D-AS1 mimic 后, SH-SY5Y 细胞中 ROS 含量显著增加, 其相对荧光强度为 $45.10\% \pm 6.05\%$; 转染 JHDM1D-AS1 siRNA 后, SH-SY5Y 细胞中 ROS 含量显著减少, 其相对荧光强度为 $14.82\% \pm 3.70\%$, 三组间比较差异有统计学意义 ($F=25.794$, $P < 0.05$)。

2.6 JHDM1DAS1 与 SIRT1 之间的靶向关系 Target Scan 软件预测显示, JHDM1D-AS1 与 SIRT1 序列

表 1

双荧光素酶报告基因检测结果

类别	Control 组	JHDM1D-AS1mimic 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
WT-SIRT1	1.00 ± 0.12	0.42 ± 0.08	34.732	0.000
MUT-SIRT1	1.02 ± 0.05	0.98 ± 0.03	0.481	0.614

2.7 JHDM1DAS1 对 MPP⁺ 诱导的 SHSY5Y 细胞中 SIRT1 蛋白的影响 Western blot 结果显示, Control 组 SIRT1 蛋白相对表达为 1.00 ± 0.23 , MPP⁺ 组 SIRT1 蛋白表达下调为 0.70 ± 0.27 , 两组间差异有

2.3 JHDM1DAS1 对 MPP⁺ 诱导的 SHSY5Y 细胞凋亡的影响 细胞凋亡结果显示, MPP⁺ 组 SH-SY5Y 细胞凋亡率为 17.64%, 转染 JHDM1D-AS1 mimic 和 JHDM1D-AS1 siRNA 序列后, SH-SY5Y 细胞凋亡率分别为 25.92% 和 10.74%, 三组间比较差异有统计学意义 ($F=49.052$, $P < 0.05$), 说明 JHDM1D-AS1 过表达可促进 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 沉默 JHDM1D-AS1 表达则结果相反。

2.4 JHDM1DAS1 调控 MPP⁺ 诱导的 SHSY5Y 细胞膜电位变化 见图 2。根据 JC-1 染料依赖膜电位的极性发现, JHDM1D-AS1 过表达时, JC-1 以单体形式被释放到胞质内, 绿色荧光增强, 线粒体膜电位降低; 沉默 JHDM1D-AS1 表达时, 红色荧光增强, 线粒体膜电位升高, 三组间比较差异有统计学意义 ($F=57.390$, $P < 0.05$)。

具有靶向结合位点, 见图 3。双荧光素酶报告基因显示, JHDM1D-AS1 过表达可降低 WT-SIRT1 荧光素酶活性, 而对 MUT-SIRT1 荧光素酶活性无显著影响, 进一步说明 JHDM1D-AS1 与 SIRT1 之间为负向调控关系, 见表 1。



图 3 JHDM1D-AS1 与 SIRT1 的结合位点

统计学意义 ($t=35.740$, $P < 0.05$)。转染 JHDM1D-AS1 mimic 后, SIRT1 相对表达为 0.44 ± 0.16 , 较 MPP⁺ 组下调; 转染 JHDM1D-AS1 siRNA 后, SIRT1 蛋白表达为 1.34 ± 0.22 , 较 MPP⁺ 组上调, 三组间

比较差异亦有统计学意义 ($F=29.508, P < 0.05$)。2.8 JHDM1DAS1 通过 SIRT1 调控 SHSY5Y 细胞线粒体膜电位 为了证实 MPP⁺ 诱导的 PD 模型中 JHDM1D-AS1 是否通过 SIRT1 调控线粒体功能, 研究在 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中加入 SIRT1 激活剂 Resveratrol 后, SIRT1 相对表达为 1.46 ± 0.34 , 较 MPP⁺ 组 0.70 ± 0.27 明显上调, 差异有统计学意义 ($t=3.032, P < 0.05$); 在转染 JHDM1D-AS1 mimic 组加入激活剂 Resveratrol, SIRT1 相对表达为 0.97 ± 0.21 , 较仅转染 JHDM1D-AS1 mimic 组

0.44 ± 0.16 相比明显上调, 组间差异有统计学意义 ($t=3.477, P < 0.05$), 表明 SIRT1 激活成功。进一步经流式细胞仪检测发现, 相比 MPP⁺ 组, JHDM1D-AS1 过表达时线粒体膜电位明显降低, SIRT1 激活时线粒体膜电位明显升高, 转染 JHDM1D-AS1 mimic 并激活 SIRT1 后, 线粒体膜电位水平回升, 说明 JHDM1D-AS1 的确可通过靶向调控 SIRT1 影响 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体功能, 见图 4。

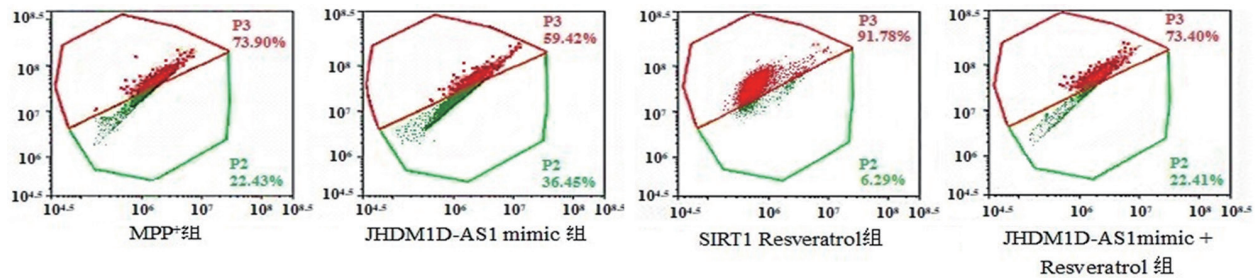


图 4 SIRT1 激活剂处理后 JHDM1D-AS1 过表达对线粒体膜电位的影响

3 讨论

据调查, PD 是仅次于阿尔茨海默病的第二大神经退行性疾病, 其发病率、致残率较高, 严重影响着患者的生活质量^[8]。目前而言, 临床治疗 PD 的药物及方法主要是缓解其症状, 并不能阻止病情的恶化, 因此, 从基因水平寻找可有效干预 PD 发生发展的靶向因子, 是近年来医学工作者研究的热点及难点。有研究指出, JHDM1D-AS1 是一种营养饥饿反应性 LncRNA, 由组蛋白去甲基化酶 JHDM1D 的反义链产生, 具有抗氧化应激及神经保护作用^[9]。SHI 等^[10] 研究数据显示, 上调 JHDM1D-AS1 表达, 可以抑制 Bcl-2 蛋白水平和 eIF2 α 磷酸化水平, 进而导致干细胞凋亡, 提示 JHDM1D-AS1 在 ROS 诱导的细胞凋亡中起促进作用。LIU 等^[11] 研究显示, JHDM1D-AS1 可能作为靶向 miR-101-3p 的竞争性内源性 RNA, 结合在 DUSP1 mRNA 的 3'UTR 上, 从而抑制神经元凋亡, 发挥神经保护作用。WANG 等^[12] 研究发现, JHDM1D-AS1 可以调节 MPP⁺ 诱导的神经元细胞凋亡、炎症和氧化应激, 其作用机制可能是 JHDM1D-AS1 通过 miR-134-5p/PIK3R3 轴诱导神经元损伤, 进而参与 PD 的发生发展, 提示 JHDM1D-AS1 与 PD 疾病进展关系密切。

PD 最主要的病理特征是脑中黑质中多巴胺能神经元细胞选择性丢失, 诱发线粒体功能异常、氧化应激, 最终导致细胞凋亡, 引起神经元细胞不可逆损伤^[13]。广泛应用多巴胺能神经毒性物质建立体外 PD 细胞模型是目前研究的重要手段。MPP⁺ 是

多巴胺能神经元相对选择性神经毒素, 是 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 的活性代谢产物, 其能对中脑黑质多巴胺能神经元产生选择性破坏作用, 研究证实 MPP⁺ 诱导可产生与 PD 相似的神经细胞氧化应激和凋亡等病理变化, 是目前制备 PD 细胞模型的常用诱导剂^[14-15]。而神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 具有与多巴胺能神经元相似的生化特征, MPP⁺ 处理的 SH-SY5Y 细胞被认为是高度模拟神经细胞线粒体功能障碍导致氧化应激的 PD 细胞模型^[14]。本研究中采用终浓度 5 mmol/L MPP⁺ 诱导处理 SH-SY5Y 细胞后发现细胞活力明显降低, 细胞凋亡增加, ROS 含量增加, 符合 PD 病理改变, 表明 PD 细胞模型构建成功。进一步探究发现, MPP⁺ 诱导 PD 细胞模型中 JHDM1D-AS1 表达显著增加, 转染 JHDM1D-AS1 过表达序列后, 促进了 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡、ROS 含量增加及线粒体膜电位降低。线粒体膜电位的稳定是线粒体及细胞发挥正常生理功能的基本保证, 线粒体功能障碍是引起多巴胺能神经元损伤的重要机制^[3]。大量研究已证实, 不同刺激下细胞发生凋亡时常伴随线粒体膜电位的下降^[16]。本研究中观察到转染 JHDM1D-AS1 过表达时线粒体膜电位降低, 沉默 JHDM1D-AS1 表达则结果相反, 说明 JHDM1D-AS1 可能通过诱导线粒体功能异常, 引起神经元细胞损伤, 在 PD 疾病发展过程中发挥重要作用, 有望成为 PD 诊断治疗的潜在靶点, 但其具体的作用机制还有待进一步探讨。

SIRT1 是目前研究最深入的 Sirtuin 蛋白, 它

以组蛋白和多种非组蛋白为底物,通过其去乙酰化调节自噬、凋亡、衰老、炎症反应、氧化应激、基因转录等关键生物过程,在线粒体功能及能量代谢等多种过程中发挥关键作用^[17-18]。CAMPOREZ等^[19]研究表明,在阿尔茨海默症动物模型中SIRT1活性降低,究其原因可能是它通过去乙酰化上调PGC-1 α ,而后者激活线粒体生物发生。LI等^[20]研究指出,SIRT1在PD动物模型中表达下调,给予SIRT1激活剂干预后,可以抑制小胶质细胞活化、减轻氧化应激和炎症反应,避免多巴胺神经元线粒体损伤。基于上述报道,推测JHDM1D-AS1是否通过靶向作用SIRT1而影响PD细胞模型的线粒体功能呢?本研究通过生物学软件预测发现JHDM1D-AS1与SIRT1存在结合位点,证实JHDM1D-AS1可以负向调控SIRT1,说明JHDM1D-AS1通过SIRT1轴调节PD模型细胞的生物学行为。其次研究通过转染SIRT1激活剂上调SIRT1表达,经流式细胞仪分析,SIRT1过表达时线粒体膜电位升高,在转染JHDM1D-AS1过表达并激活SIRT1后,线粒体膜电位水平回升。研究结果提示,JHDM1D-AS1过表达可以导致神经元细胞线粒体功能障碍,加速PD疾病的发展进程,激活SIRT1后,则可以保护线粒体功能,抑制MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞凋亡,发挥神经元细胞保护作用。此外,前期有大量文献证实活性氧(ROS)来源于线粒体,并且通常情况下,细胞内的ROS处于较低水平状态,若ROS水平过高,将会对细胞和基因结构造成严重损伤^[21-22]。本研究证实,JHDM1D-AS1过表达后ROS含量增加,反之沉默其表达后ROS含量减少,与既往研究报道的ROS大量累积,可导致线粒体代谢紊乱,细胞氧化应激反应增强,最终引起细胞的凋亡,导致神经元细胞不可逆损伤的结论相一致^[23]。

综上所述,MPP⁺诱导的PD细胞模型中,沉默JHDM1D-AS1表达可以负向调控SIRT1蛋白水平,抑制SH-SY5Y细胞发生凋亡,减轻氧化应激反应,增加线粒体膜电位水平,保护线粒体功能,发挥了神经元细胞保护作用,在一定程度上为临床诊断和治疗PD病提供新的思路及理论基础。但本研究还存在一定的局限性,后期可结合体内动物实验验证JHDM1D-AS1在PD疾病形成过程中的可能作用机制。

参考文献:

- [1] 闫欣,商素亮,李娜,等. 血浆S1P和HDL-C表达水平与帕金森病患者临床症状的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(3): 182-186, 190.
YAN Xin, SHANG Suliang, LI Na, et al. Correlation between plasma S1P, HDL-C expressions levels

and clinical symptoms in patients with Parkinson's disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(3): 182-186, 190.

- [2] MARTINEZ B, PELOW P V. Neuroprotection by immunomodulatory agents in animal models of Parkinson's disease[J]. Neural Regeneration Research, 2018, 13(9): 1493-1506.
- [3] 胡安霞,尹昌浩,郭一鸣,等. 线粒体功能障碍和氧化应激在帕金森病中的作用[J]. 医学综述, 2021, 27(15): 2929-2934.
HU Anxia, YIN Changhao, GUO Yiming, et al. Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease[J]. Medical Recapitulate, 2021, 27(15): 2929-2934.
- [4] ELIBOL B, KILIC U. High levels of SIRT1 expression as a protective mechanism against disease-related conditions[J]. Front Endocrinol, 2018, 9: 614.
- [5] ZHAO Qian, TIAN Zhiyuan, ZHOU Guoyu, et al. SIRT1-dependent mitochondrial biogenesis supports therapeutic effects of resveratrol against neurodevelopment damage by fluoride[J]. Theranostics, 2020, 10(11): 4822-4838.
- [6] KONDO A, NONAKA A, SHIMAMURA T, et al. Long noncoding RNA JHDM1D-AS1 promotes tumor growth by regulating angiogenesis in response to nutrient starvation[J]. Molecular and Cellular Biology, 2017, 37(18): e00125-17.
- [7] MALMSTRÖM E, KHAN H N, VEER C V, et al. The long non-coding antisense RNA JHDM1D-AS1 regulates inflammatory responses in human monocytes[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 934313.
- [8] FIANDACA M S, LONSER R R, ELDER J B, et al. Advancing gene therapies, methods, and technologies for Parkinson's disease and other neurological disorders[J]. Neurologia Neurochirurgia Polska, 2020, 54(3): 220-231.
- [9] 孔桂香,高丽萍,朱华,等. 结直肠癌患者血清外泌体的JHDM1D-AS1水平及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(8): 729-735.
KONG Guixiang, GAO Liping, ZHU Hua, et al. Level and clinical significance of serum exosomal JHDM1D-AS1 in patients with colorectal cancer[J]. Chinese Clinical Oncology, 2021, 26(8): 729-735.
- [10] SHI Bai, SHAO Bingyi, YANG Chonshi, et al. Upregulation of JHDM1D-AS1 protects PDLSCs from H₂O₂-induced apoptosis by decreasing DNAJC10 via phosphorylation of eIF2 α [J]. Biochimie, 2019, 165: 48-56.
- [11] LIU Luping, ZHANG Jie, PU Bo, et al. Upregulation of JHDM1D-AS1 alleviates neuroinflammation and neuronal injury via targeting miR-101-3p-DUSP1 in spinal cord after brachial plexus injury[J]. International Immunopharmacology, 2020, 89 (Pt A): 106962.
- [12] WANG Cuihui, ZHANG Hongying, LI Ji. LncRNA JHDM1D-AS1 suppresses MPP⁺-induced neuronal injury in Parkinson's disease via miR-134-5p/PIK3R3 axis[J]. Neurotoxicity Research, 2021, 39(6): 1771-1781.

- 影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2022, 38(4): 466-470.
RONG Yu, HU Zhidong, ZHAO Na. The effects of LncRNA NEAT1 on cell cycle arrest, apoptosis and Hippo/YAP signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cells[J]. Journal of Practical Stomatology, 2022, 38(4): 466-470.
- [17] MA Changju, TANG Xiaojuan, TANG Qing, et al. Curcumin repressed cell proliferation and angiogenesis via SP1/miR-125b-5p/VEGFA axis in non-small cell lung cancer[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1044115.
- [18] CHENG Zhiqing, GONG Limei, CAI Qinghe. LncRNA00978 contributes to growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via mediating microRNA-125b-5p/SOX12 pathway[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 11228-11239.
- [19] HUANG Jiajia, JIANG Dongdong, ZHAO Shasha, et al. Propranolol suppresses infantile hemangioma cell proliferation and promotes apoptosis by upregulating miR-125b expression[J]. Anti-Cancer Drugs, 2019, 30(5): 501-507.
- [20] LIU Yiping, QIU Zhongzhi, LI Xuhui, et al. Propofol induces ferroptosis and inhibits malignant phenotypes of gastric cancer cells by regulating miR-125b-5p/STAT3 axis[J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2021, 13(12): 2114-2128.
- [21] HU Tingting, ZHANG Qian, GAO Lingxue. LncRNA CAR10 upregulates PDPK1 to promote cervical cancer development by sponging miR-125b-5p[J]. Biomed research international, 2020, 2020: 4351671.
- [22] CHEN Qianbo, XI Xiaoting, MA Jia, et al. The mechanism by which crocetin regulates the lncRNA NEAT1/miR-125b-5p/SOX7 molecular axis to inhibit high glucose-induced diabetic retinopathy[J]. Experimental Eye Research, 2022, 222: 109157.
- [23] SUN Bin, HUANG Zhi, YANG Hua, et al. MicroRNA-195-5p inhibits the progression of hemangioma via targeting SKI[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2022, 23(2): 165.
- [24] 张聪, 曹立宇. 基于肿瘤数据库分析 IGFBP5 基因在结直肠癌中的表达及意义 [J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(3): 375-380.
ZHANG Cong, CAO Liyu. Expression of IGFBP5 gene in colorectal cancer: a study based on tumor database[J]. The Practical Journal of Cancer, 2021, 36(3): 375-380.
- [25] 饶大庞, 虞海峰, 王帅彬, 等. miRNA-149 靶向 IGFBP5 抑制膀胱癌细胞侵袭的分子机制研究 [J]. 中国现代医生, 2018, 56(35): 1-4, 14, 169.
RAO Dapang, YU Haifeng, WANG Shuaibin, et al. Molecular mechanism of miRNA-149 targeting IGFBP5 to inhibit invasion of bladder cancer cells[J]. China Modern Doctor, 2018, 56(35): 1-4, 14, 169.

收稿日期: 2022-10-14 修回日期: 2023-02-09

(上接第52页)

- [13] 王晓蕊, 朱松鑫, 温晓鸣, 等. 多巴胺代谢异常在帕金森病相关病理变化中的作用 [J]. 生理学报, 2021, 73(1): 89-102.
WANG Xiaorui, ZHU Songxin, WEN Xiaoming, et al. The role of abnormal dopamine metabolism in Parkinson's disease-related pathological changes[J]. Acta Physiologica Sinica, 2021, 73(1): 89-102.
- [14] 吕海燕, 侯广玉, 朱梅. MPTP 致帕金森病动物模型的研究进展 [J]. 实验动物科学, 2022, 39(4): 64-68.
LÜ Haiyan, HOU Guangyu, ZHU Mei. Research progress of MPTP to Parkinson's disease animal models[J]. Laboratory Animal Science, 2022, 39(4): 64-68.
- [15] SHISHIDO T, NAGANO Y, ARAKI M, et al. Synphilin-1 has neuroprotective effects on MPP⁺-induced Parkinson's disease model cells by inhibiting ROS production and apoptosis[J]. Neuroscience Letters, 2019, 690: 145-150.
- [16] GANJAM G K, BOLTE K, MATSCHKE L A, et al. Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(11): 865.
- [17] 龙借帆, 李翠, 高元标, 等. 联合检测血清 SIRT1 和 CTRP5 水平对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者预后的预测价值研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(3): 162-166, 176.
LONG Jiefan, LI Cui, GAO Yuanbiao, et al. Prognostic value of combined detection of serum SIRT1 and CTRP5 levels in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(3): 162-166, 176.
- [18] SUN Jiangtao, LI Guifang, LIU Yiwen, et al. Targeting histone deacetylase SIRT1 selectively eradicates EGFR TKI-resistant cancer stem cells via regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in lung adenocarcinoma[J]. Neoplasia, 2020, 22(1): 33-46.
- [19] CAMPOREZ D, BELCAVELLO L, ALMEIDA J F F, et al. Positive association of a Sirt1 variant and parameters of oxidative stress on Alzheimer's disease[J]. Neurological Sciences, 2021, 42(5): 1843-1851.
- [20] LI Xuan, FENG Ya, WANG Xixi, et al. The critical role of SIRT1 in Parkinson's disease: mechanism and therapeutic considerations[J]. Aging and disease, 2020, 11(6): 1608-1622.
- [21] CADENAS S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection[J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2018, 1859(9): 940-950.
- [22] SIES H, BELOUSOV V V, CHANDEL N S, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23(7): 499-515.
- [23] TAUFFENBERGER A, MAGISTRETTI P J. Reactive oxygen species: beyond their reactive behavior[J]. Neurochemical Research, 2021, 46(1): 77-87.

收稿日期: 2022-10-13 修回日期: 2023-01-18