

论 著

lncRNA NEAT1激活PI3K/Akt信号通路对A β_{25-35} 诱导的PC12细胞凋亡的影响及机制

翟志恒, 田杨, 周玉妮, 宋玉成

济宁医学院济宁市精神病防治院, 山东济宁 272051

[摘要] **目的** 探讨lncRNA NEAT1通过激活PI3K/Akt信号通路对A β_{25-35} 诱导的阿尔茨海默病(AD)模型细胞凋亡的影响及可能机制。**方法** 以0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} 诱导PC12细胞, 构建AD细胞模型。用5 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} 处理PC12细胞, 并于24、48、72 h采用qRT-PCR检测lncRNA NEAT1相对表达水平。取PC12细胞, (1)设置对照组、敲降lncRNA NEAT1组、si-NC组、空载体组及过表达lncRNA NEAT1组, 对照组不做任何处理, 其余4组分别用含si-lncRNA NEAT1、si-NC、pcDNA3.1-NC、pcDNA3.1-lncRNA NEAT1的Opti-MEM培养基培养并转染8 h, 然后使用20 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} 处理。采用qRT-PCR检测lncRNA NEAT1相对表达水平; CCK-8法检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 并以G₁和G₂期细胞比例反映细胞增殖情况; ELISA法检测细胞上清中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。(2)设置对照组、空载体组及过表达lncRNA NEAT1组, 采用Western blotting检测p-PI3K、p-Akt蛋白相对表达水平。(3)设置对照组、si-NC组、敲降lncRNA NEAT1组、空载体组、过表达lncRNA NEAT1组及过表达lncRNA NEAT1+LY294002组, 过表达lncRNA NEAT1+LY294002组细胞转染pcDNA3.1-lncRNA NEAT1后, 加入10 $\mu\text{mol/L}$ PI3K通路抑制剂LY294002处理, 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。**结果** 不同浓度的A β_{25-35} 均可明显抑制lncRNA NEAT1的表达, 且呈浓度依赖性($P=0.001$)。与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组lncRNA NEAT1相对表达水平、细胞增殖率、G₂期细胞比例明显增高, 细胞凋亡率、G₁期细胞比例明显降低($P<0.05$); 与si-NC组相比, 敲降lncRNA NEAT1组lncRNA NEAT1相对表达水平、细胞增殖率、G₂期细胞比例明显降低, 细胞凋亡率、G₁期细胞比例明显升高($P<0.05$)。ELISA检测结果显示, 与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组细胞上清中IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平明显降低($P<0.05$); 与si-NC组相比, 敲降lncRNA NEAT1组细胞上清中IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平明显升高($P<0.05$)。Western blotting检测结果显示, 与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组信号通路相关蛋白p-PI3K、p-Akt相对表达水平增高(p-PI3K: 0.86 ± 0.05 vs. 0.15 ± 0.02 , $P=0.003$; p-Akt: 0.86 ± 0.06 vs. 0.11 ± 0.04 , $P=0.000$)。与过表达lncRNA NEAT1组相比, 过表达lncRNA NEAT1+LY294002组细胞凋亡率明显升高($9.00\% \pm 0.10\%$ vs. $5.13\% \pm 0.21\%$, $P=0.004$)。**结论** lncRNA NEAT1可通过调控PI3K/Akt通路促进A β_{25-35} 诱导的PC12细胞增殖, 抑制PC12细胞凋亡。

[关键词] 阿尔茨海默病; 长链非编码RNA; 核富集转录本1; PI3K/Akt

[中图分类号] R74

[文献标志码] A

[文章编号] 0577-7402(2021)12-1188-08

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.12.04

Effect and mechanism of lncRNA NEAT1 activating PI3K/Akt signal pathway on the influence of PC12 cell apoptosis induced by A β_{25-35}

Zhai Zhi-Heng, Tian Yang, Zhou Yu-Ni, Song Yu-Cheng

Jining Psychiatric Hospital of Jining Medical College, Jining, Shandong 272051, China

This work was supported by the Supporting Fund for Teachers' Research of Jining Medical College (JYFC2019FKJ032)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of lncRNA NEAT1 activating PI3K/Akt signaling pathway on the influence of Alzheimer's disease (AD) PC12 model cells apoptosis induced by A β_{25-35} . **Methods** PC12 cells were induced with A β_{25-35} of concentrations 0, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ to construct AD cell model. PC12 cells were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} , and the relative expression level of lncRNA NEAT1 was detected by qRT-PCR at the time points 24, 48 and 72 hours, respectively. PC12 cells were divided into: (1) control group, lncRNA NEAT1 knockdown group, si-NC group, empty body group and lncRNA NEAT1 overexpression group. Among them the cells in control group were not treated anyway; in the other four groups were cultured with Opti-MEM medium containing si-lncRNA NEAT1, si-NC, pcDNA3.1-NC and pcDNA3.1-lncRNA NEAT1 and transfected for 8 hours, and then treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ A β_{25-35} ; qRT-PCR was used to detect the relative expression level of

[基金项目] 济宁医学院教师科研扶持基金(JYFC2019FKJ032)

[作者简介] 翟志恒, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事阿尔茨海默病发病的分子机制研究

lncRNA NEAT1; CCK-8 was used to detect the cell viability; flow cytometry was used to detect the apoptosis of PC12 cells, and the proliferation of PC12 cells was reflected by the ratio of G₁ to G₂ phase of cell cycle; the inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-18, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cell supernatant were detected by ELISA. (2) control group, empty body group, and lncRNA NEAT1 overexpression group, Western blotting was used to detect the relative expression levels of p-PI3K and p-Akt. (3) control group, si-NC group, lncRNA NEAT1 knockdown group, empty body group, lncRNA NEAT1 overexpression group, and lncRNA NEAT1 overexpression+LY294002 group. Cells in lncRNA NEAT1 overexpression+LY294002 group were transfected with pcDNA3.1-lncRNA NEAT1, and 10 μ mol/L PI3K pathway inhibitor LY294002 were added, and then flow cytometry was used to detect the apoptosis of PC12 cells. **Results** Different concentrations of A β ₂₅₋₃₅ could significantly inhibit the expression of lncRNA NEAT1 in a concentration-dependent manner ($P=0.001$). Compared with empty body group, the relative expression level of lncRNA NEAT1, the cell proliferation rate, and the proportion of cells in G₂ phase of lncRNA NEAT1 overexpression group increased, the cell apoptosis rate and the proportion of cells in G₁ phase decreased ($P<0.05$). Compared with si-NC group, the relative expression level of lncRNA NEAT1, the cell proliferation rate, and the proportion of cells in G₂ phase of lncRNA NEAT1 knockdown group decreased, the cell apoptosis rate and the proportion of cells in G₁ phase increased ($P<0.05$). ELISA results showed that, compared with empty body group, the levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, IL-18, and TNF- α decreased significantly in lncRNA NEAT1 overexpression group ($P<0.05$); compared with si-NC group, the levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α increased significantly in lncRNA NEAT1 knockdown group ($P<0.05$). Western blotting results showed that, compared with empty body group, the expression levels of signal pathway related proteins p-PI3K and p-Akt increased in lncRNA NEAT1 overexpression group (p-PI3K: 0.86 ± 0.05 vs. 0.15 ± 0.02 , $P=0.003$; p-Akt: 0.86 ± 0.06 vs. 0.11 ± 0.04 , $P=0.000$). Compared with lncRNA NEAT1 overexpression group, the apoptosis rate in lncRNA NEAT1 overexpression+LY294002 group increased obviously ($9.00\% \pm 0.10\%$ vs. $5.13\% \pm 0.21\%$, $P=0.004$). **Conclusion** lncRNA NEAT1 can promote A β ₂₅₋₃₅ induced PC12 cell proliferation and inhibit cell apoptosis by regulating PI3K/Akt pathway.

[Key words] Alzheimer's disease; long noncoding RNA; nuclear-enriched abundant transcript 1; PI3K/Akt

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD), 又称老年性痴呆, 是一种不可逆的中枢神经系统退行性疾病^[1], 临床主要表现为渐进性记忆障碍等神经精神症状, 严重影响患者的社交、工作与生活功能^[2]。目前, AD的具体发病机制尚未明确, 尚无有效的治疗方法^[3]。因此, 开发潜在的精准AD生物标志物具有重要意义^[4]。长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)在神经退行性疾病中的作用近年逐渐受到重视^[5]。核富集转录本1(nuclear-enriched abundant transcript 1, NEAT1)是一种广泛表达的lncRNA, 在神经退行性疾病中的表达发生了明显变化^[6]。Zhang等^[7]发现, 在小鼠巨噬细胞中, NEAT1可以激活pro-caspase-1, 促进炎性小体NLRP3聚集, 稳定cleaved-caspase-1, 并提高caspase-1的活性。本研究探讨了lncRNA NEAT1激活PI3K/Akt信号通路对A β ₂₅₋₃₅诱导的AD模型细胞凋亡的影响及可能机制, 以期开发新的AD生物标志物提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 PC12细胞购自中国科学院; 胎牛血清(FBS)、DMEM高糖培养基、青/链霉素购自美国Invigentech公司; Lipofectamine 2000、质粒孵育培养基Opti-MEM及A β ₂₅₋₃₅购自美国Sigma公司; 胰蛋白酶购自美国Amresco公司; 反转录试剂盒、Annexin V-FITC/PI试剂盒、TB Green Premix EX Taq II 试剂盒、CCK-8检测试剂盒购自北京百奥

莱博科技有限公司; 兔抗p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、GAPDH一抗以及羊抗兔二抗购自武汉菲恩生物科技有限公司; Trizol试剂购自美国Invitrogen公司; SYBR Green qPCR Master Mix试剂盒购自日本TaKaRa公司; pcDNA3.1 lncRNA NEAT1质粒及相应空载体购自广州吉赛生物科技股份有限公司; 小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)及相应阴性对照(siRNA NC, si-NC)购自上海吉玛制药技术有限公司; 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-18和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; PI3K通路抑制剂LY294002(HY-10108)购自美国MedChemExpress公司。酶标仪(Imark)购自美国伯乐公司; 实时荧光定量PCR仪(ABI7700)购自美国ABI公司; 流式细胞仪(FACSCalibur)购自美国BD公司; Western blotting检测系统购自美国Molecular Devices公司。

1.2 AD细胞模型构建 PC12细胞于含0.1 ml/ml胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM高糖培养基中, 置于5% CO₂、37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养。取对数生长期细胞接种于96孔板中, 加入不同浓度的A β ₂₅₋₃₅(0、5、10、20 μ mol/L)作用24 h, 建立AD细胞模型。考虑到A β ₂₅₋₃₅对PC12细胞毒性的影响, 选择5 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅处理PC12细胞, 并于24、48、72 h检测lncRNA NEAT1相对表达水平。

1.3 qRT-PCR检测lncRNA NEAT1相对表达水平 按照Trizol说明书步骤提取总RNA, 反转录成

cDNA, 测定cDNA浓度, 利用TB Green Premix EX Taq II 试剂盒进行qRT-PCR扩增。反应体系(20 μ l): 1 μ l cDNA、上下游引物各0.5 μ l、10 μ l SYBR Premix Ex Taq、8 μ l ddH₂O。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 34 s, 共40个循环。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成。lncRNA NEAT1: 上游引物5'-GGCAGGTCTAGTTTGGGCAT-3', 下游引物5'-CCTCATCCCTCCCAGTACCA-3'; GAPDH: 上游引物5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACA-3', 下游引物5'-ATGACAAGCTTCCCGTTCTC-3'。以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算lncRNA NEAT1的相对表达水平。实验重复3次, 结果取平均值。

1.4 lncRNA NEAT1细胞转染 将5 μ l Lipofectamine 2000加入250 μ l Opti-MEM培养基中混匀, 室温静置5 min; 分别取5 μ g siRNA-lncRNA (si-lncRNA) NEAT1、si-NC、pcDNA3.1-NC、pcDNA3.1-lncRNA NEAT1加入250 μ l Opti-MEM培养基中混匀, 室温静置5 min; 将含Lipofectamine 2000的Opti-MEM培养基分别与含si-lncRNA NEAT1、si-NC、pcDNA3.1-NC或pcDNA3.1-lncRNA NEAT1的Opti-MEM培养基混匀, 室温静置25 min。取PC12细胞接种于96孔板中, 设置对照组、敲降lncRNA NEAT1组、si-NC组、空载体组及过表达lncRNA NEAT1组。敲降lncRNA NEAT1组、si-NC组、空载体组及过表达lncRNA NEAT1组每孔加入质粒混合液混匀并于培养箱中培养, 转染8h后更换为新鲜常规培养基继续培养48 h, 然后分别加入20 μ mol/L A β_{25-35} 继续培养24 h后更换为新鲜常规培养基继续培养; 对照组不做处理, 培养方法同其余各组。

1.4.1 qRT-PCR检测lncRNA NEAT1相对表达水平

按照1.3中的步骤检测各组lncRNA NEAT1相对表达水平。

1.4.2 CCK-8法检测细胞活力 收集各组细胞, 接种于96孔板中(5 \times 10³个/孔), 设置3个复孔, 培养24 h后, 每孔加入10 μ l CCK-8溶液孵育2 h, 采用酶标仪测定各孔450 nm处的吸光度(A₄₅₀)值。

1.4.3 流式细胞术检测细胞周期分布 收集各组细胞, 使用胰蛋白酶消化, 1000 r/min离心6 min, 弃上清; 用培养液重悬细胞, 并用无水乙醇在-20 $^{\circ}$ C条件下过夜固定细胞; 去除固定液, 用PBS重悬细胞, 1000 \times g离心5 min, 重复2次; PBS清洗细胞, 用含RNase A的溶液消化1 h; 加入PI溶液终止消化并避光染色8 min, 采用流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.4.4 ELISA检测细胞上清中炎症因子水平 使用IL-1 β 、IL-6、IL-18和TNF- α ELISA试剂盒检测细胞

上清中IL-1 β 、IL-6、IL-18和TNF- α 的水平。将各组细胞接种于96孔板中培养48 h, 洗涤4次, 加入生物素标记的抗体工作液、酶偶联物, 室温孵育30 min; 洗涤, 加入显色底物显色, 采用酶标仪测定各孔450 nm处的吸光度(A₄₅₀)值。实验重复3次, 结果取平均值。

1.5 Western blotting检测p-PI3K、p-Akt蛋白相对表达水平 收集对照组、空载体组及过表达lncRNA NEAT1组细胞, 接种于96孔板中(5 \times 10³个/孔), 加入RIPA裂解液, 将96孔板于0 $^{\circ}$ C振荡30 min, 4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心15 min, 取上清, 采用BCA法测定总蛋白浓度。取25 μ g蛋白上样, 行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(90 V 30 min, 120 V至溴酚蓝到达凝胶底部), 然后转至PVDF膜上。加入5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 加入一抗兔抗p-PI3K(1:1000)、PI3K(1:1000)、Akt(1:1000)、p-Akt(1:1000)及内参GAPDH(1:1000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; TBST洗涤3次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000), 室温孵育1 h; TBST洗涤3次, 用ECL显色液显色, ImageJ软件对条带进行灰度分析。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况 取PC12细胞, 以5 \times 10³个/孔的密度接种于无菌96孔板中, 设置对照组、si-NC组、敲降lncRNA NEAT1组、空载体组、过表达lncRNA NEAT1组及过表达lncRNA NEAT1+LY294002组, 对照组、si-NC组、敲降lncRNA NEAT1组、空载体组、过表达lncRNA NEAT1组处理同1.4, 过表达lncRNA NEAT1+LY294002组细胞转染pcDNA3.1-lncRNA NEAT1后, 加入10 μ mol/L PI3K通路抑制剂LY294002处理。培养48 h后用不含EDTA的胰蛋白酶对贴壁细胞进行消化并于室温下孵育, 制备细胞悬浮液。取5 \times 10⁴个细胞, 加入缓冲液悬浮细胞并转移至流式管中, 然后加入5 μ l Annexin V-FITC混匀, 于室温避光条件下孵育15 min, 上机前5 min加入5 μ l PI进行染色, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复3次, 结果取平均值。

1.7 统计学处理 使用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8软件进行统计分析和制图。计量资料经正态性检验, 符合正态分布者以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-*t*检验; 不符合正态分布者以M(Q₁, Q₃)表示, 组间比较采用Mann-Whitney U检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 A β_{25-35} 对PC12细胞中lncRNA NEAT1表达的影响 qRT-PCR检测结果显示, 0、5、10、20 μ mol/L A β_{25-35} 作用24 h后, PC12细胞中lncRNA NEAT1相

对表达水平降低(依次为 0.90 ± 0.05 、 0.67 ± 0.07 、 0.53 ± 0.03 、 0.34 ± 0.09), 且呈浓度依赖性($F=110.51$, $P=0.001$, 图1A)。与对照组(0.99 ± 0.10)相比, $5 \mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 作用PC12细胞24、48、72 h后, lncRNA NEAT1相对表达水平随着时间延长而

降低(依次为 0.49 ± 0.05 、 0.27 ± 0.05 、 0.18 ± 0.05), 差异有统计学意义($F=109.42$, $P=0.002$, 图1B)。根据图1A的结果, $20 \mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理24 h后, lncRNA NEAT1的表达最低, 建模效果最好。因此, 选择 $20 \mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 进行后续实验。

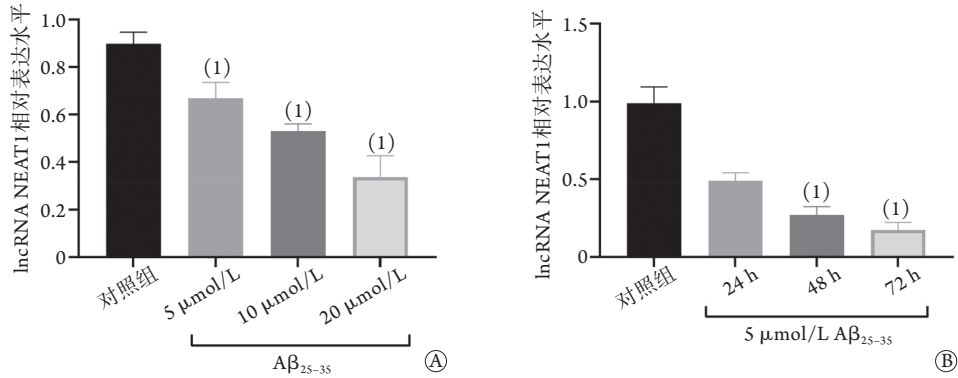


图1 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的PC12细胞中lncRNA NEAT1相对表达水平

Fig.1 Relative expression level of lncRNA NEAT1 in PC12 cells induced by $\text{A}\beta_{25-35}$

A. 不同浓度 $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理的PC12细胞中lncRNA NEAT1的表达情况; B. $5 \mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 处理不同时间对PC12细胞中lncRNA NEAT1表达的影响; 与对照组比较, (1) $P<0.05$ 。

2.2 lncRNA NEAT1载体构建效果 qRT-PCR检测结果如图2所示, 与对照组(0.93 ± 0.09)相比, 空载体组(0.54 ± 0.12)与si-NC组(0.52 ± 0.09) lncRNA NEAT1相对表达水平明显降低($P=0.008$, $P=0.001$); 与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组lncRNA NEAT1相对表达水平增高(2.21 ± 0.16 , $P=0.001$); 与si-NC组相比, 敲降lncRNA NEAT1组lncRNA NEAT1相对表达水平降低(0.23 ± 0.02 , $P=0.000$), 表明lncRNA NEAT1的过表达和敲降载体构建成功, 可用于后续实验。

2.3 lncRNA NEAT1对AD模型细胞活力的影响 CCK-8法检测结果显示, 与对照组($116.33\% \pm 5.51\%$)相比, $\text{A}\beta_{25-35}$ 刺激后, 空载体组($53.85\% \pm 5.57\%$)

与si-NC组($55.18\% \pm 8.50\%$)细胞增殖率明显降低($P=0.000$, $P=0.000$); 与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组细胞增殖率明显增高($142.85\% \pm 5.00\%$, $P=0.013$); 与si-NC组相比, 敲降lncRNA NEAT1组细胞增殖率明显降低($21.18\% \pm 4.93\%$, $P=0.003$, 图3)。

2.4 lncRNA NEAT1对AD模型细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示, 与对照组($4.50\% \pm 0.10\%$)相比, $\text{A}\beta_{25-35}$ 刺激后, 空载体组($8.10\% \pm 0.10\%$)与si-NC组($7.40\% \pm 0.26\%$)细胞凋亡率明显升高($P=0.001$, $P=0.001$); 与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组细胞凋亡率降低($5.07\% \pm 0.15\%$, $P=0.012$); 与si-NC组相比, 敲降lncRNA NEAT1组细胞凋亡率明显升高($14.70\% \pm 0.20\%$, $P=0.000$, 图4)。

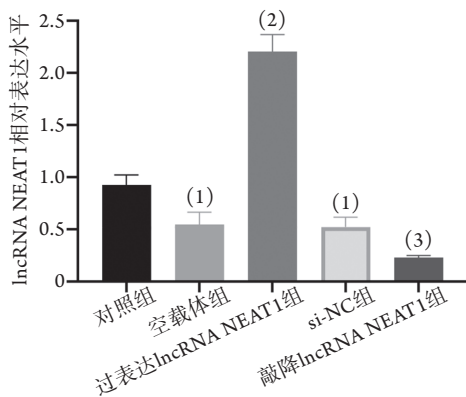


图2 lncRNA NEAT1载体构建效果(qRT-PCR)

Fig.2 Construction effect of lncRNA NEAT1 vector detected by qRT-PCR

与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与空载体组比较, (2) $P<0.05$; 与si-NC组比较, (3) $P<0.05$ 。

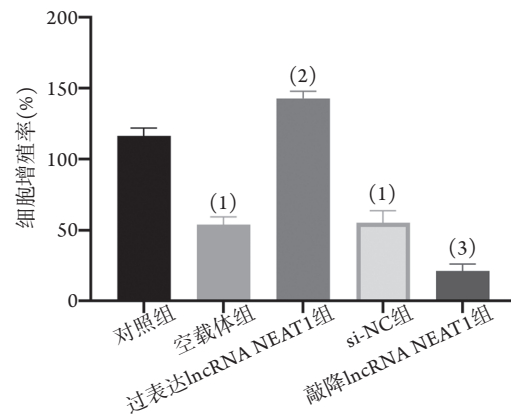


图3 lncRNA NEAT1对AD模型细胞活力的影响

Fig.3 Effect of lncRNA NEAT1 on cell viability of AD model cells
与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与空载体组比较, (2) $P<0.05$; 与si-NC组比较, (3) $P<0.05$ 。

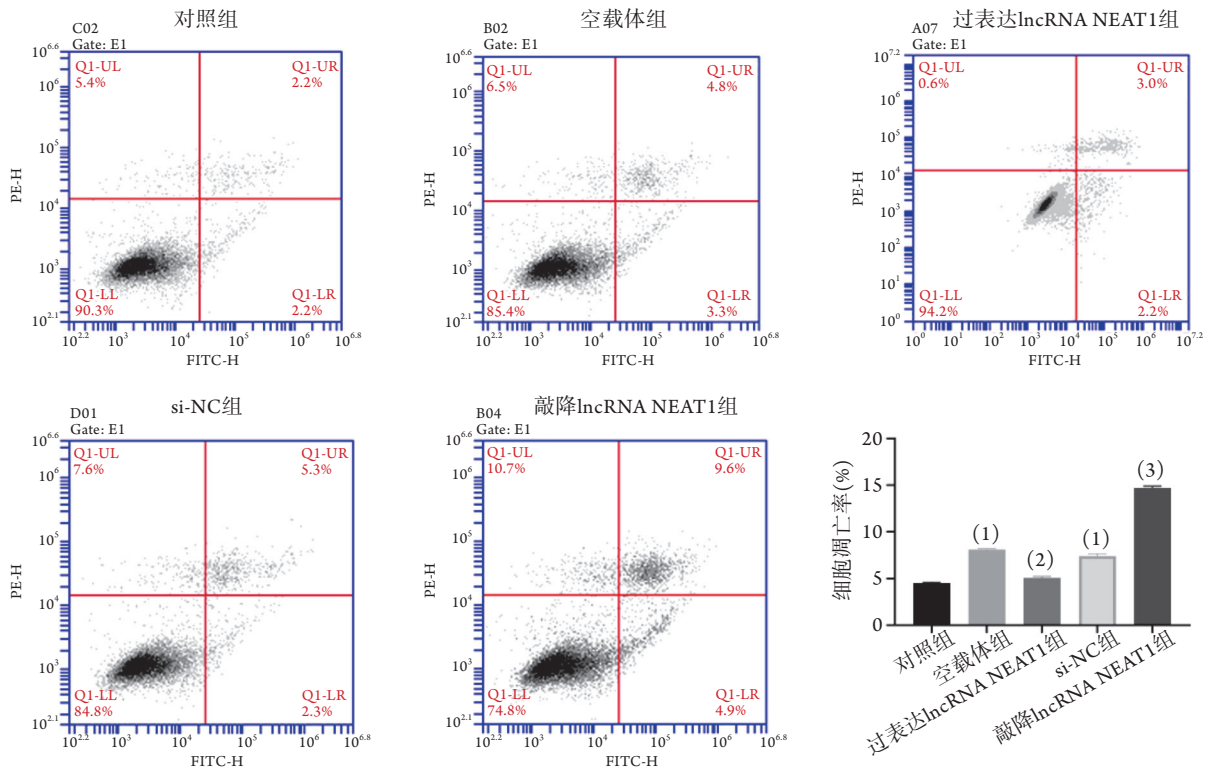


图4 lncRNA NEAT1对AD模型细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of lncRNA NEAT1 on apoptosis of AD model cells

与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与空载体组比较, (2) $P < 0.05$; 与si-NC组比较, (3) $P < 0.05$ 。

2.5 lncRNA NEAT1对AD模型细胞周期的影响

流式细胞术检测结果显示, 与对照组(G_1 期: $60.15\% \pm 1.00\%$; G_2 期: $6.56\% \pm 0.95\%$)相比, $A\beta_{25-35}$ 刺激后, 空载体组(G_1 期: $61.81\% \pm 1.53\%$; G_2 期: $9.81\% \pm 1.53\%$)与si-NC组(G_1 期: $60.15\% \pm 4.58\%$; G_2 期: $10.70\% \pm 0.73\%$) G_1 和 G_2 期细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$); 与对照组和空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组(G_1 期: $52.15\% \pm 1.00\%$)细胞比例明显降低($P = 0.001$, $P = 0.003$), G_2 期($21.15\% \pm 1.00\%$)细胞比例明显升高($P = 0.000$, $P = 0.001$); 与si-NC组相比, 敲降lncRNA NEAT1组(G_1 期: $68.81\% \pm 1.53\%$)细胞比例明显升高($P = 0.012$), G_2 期($5.48\% \pm 1.53\%$)细胞比例明显降低($P = 0.021$, 图5)。

2.6 lncRNA NEAT1对AD模型细胞上清中炎症因子水平的影响 ELISA检测结果显示, 与对照组相比, $A\beta_{25-35}$ 刺激后, 空载体组和si-NC组细胞上清中IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平明显升高($P < 0.05$); 与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组细胞上清中IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平明显降低($P < 0.05$); 与si-NC组相比, 敲降lncRNA NEAT1组细胞上清中IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平明显升高($P < 0.05$, 表1)。

2.7 lncRNA NEAT1对AD模型细胞中PI3K/Akt信

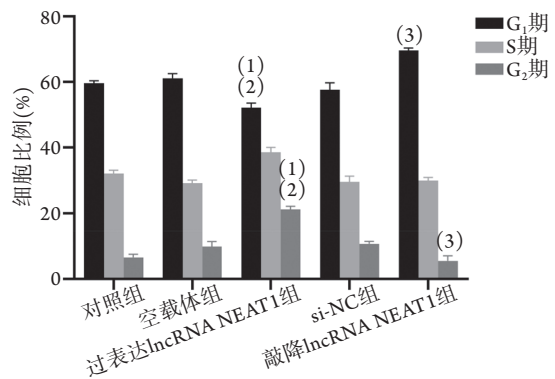


图5 lncRNA NEAT1对AD模型细胞周期的影响

Fig.5 Effect of lncRNA NEAT1 on cell cycle of AD model cells

与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与空载体组比较, (2) $P < 0.05$; 与si-NC组比较, (3) $P < 0.05$ 。

号通路活性的影响 Western blotting检测结果显示, 与对照组相比, $A\beta_{25-35}$ 刺激后, 空载体组信号通路相关蛋白p-PI3K、p-Akt相对表达水平明显下降(p-PI3K: 0.15 ± 0.02 vs. 1.02 ± 0.05 , $P = 0.005$; p-Akt: 0.11 ± 0.04 vs. 0.95 ± 0.07 , $P = 0.000$); 与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组(p-PI3K: 0.86 ± 0.05 ; p-Akt: 0.86 ± 0.06)信号通路相关蛋白p-PI3K、p-Akt相对表达水平明显增高($P = 0.003$, $P = 0.000$, 图6)。

表1 lncRNA NEAT1对AD模型细胞上清中炎症因子水平的影响(pg/ml, $\bar{x}\pm s$, n=3)

Tab.1 Effect of lncRNA NEAT1 on the inflammatory factor levels of AD model cells (pg/ml, $\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	IL-1 β	IL-6	IL-18	TNF- α
对照组	42.45 \pm 1.98	14.54 \pm 0.68	54.76 \pm 2.11	213.59 \pm 11.58
空载体组	117.19 \pm 4.97 ⁽¹⁾	83.91 \pm 4.87 ⁽¹⁾	187.61 \pm 5.64 ⁽¹⁾	529.67 \pm 22.30 ⁽¹⁾
过表达lncRNA NEAT1组	76.23 \pm 5.78 ⁽²⁾	60.31 \pm 4.45 ⁽²⁾	127.45 \pm 5.71 ⁽²⁾	342.33 \pm 9.29 ⁽²⁾
si-NC组	117.00 \pm 5.57 ⁽¹⁾	85.00 \pm 3.00 ⁽¹⁾	182.67 \pm 6.81 ⁽¹⁾	550.00 \pm 39.36 ⁽¹⁾
敲降lncRNA NEAT1组	159.67 \pm 15.50 ⁽³⁾	118.33 \pm 7.64 ⁽³⁾	215.00 \pm 5.00 ⁽³⁾	734.67 \pm 20.53 ⁽³⁾

AD. 阿尔茨海默病; IL. 白细胞介素; TNF- α . 肿瘤坏死因子- α ; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与空载体组比较, (2) $P < 0.05$; 与si-NC组比较, (3) $P < 0.05$ 。

2.8 通路抑制剂LY294002对AD模型细胞凋亡的影响 为了证实PI3K/Akt通路与AD模型细胞凋亡的关系, 向A β_{25-35} 处理的PC12细胞中分别加入pcDNA3.1-lncRNA NEAT1与pcDNA3.1-lncRNA NEAT1+LY294002, 使用流式细胞术检测AD模型细胞凋亡情况。结果显示, 与对照组相比, A β_{25-35} 刺

激后, 空载体组细胞凋亡率明显升高(8.20% \pm 0.26% vs. 4.4% \pm 0.21%, $P = 0.002$); 与空载体组相比, 过表达lncRNA NEAT1组细胞凋亡率明显降低(5.13% \pm 0.21%, $P = 0.011$); 与过表达lncRNA NEAT1组相比, 过表达lncRNA NEAT1+LY294002组细胞凋亡率明显升高(9.00% \pm 0.10%, $P = 0.004$, 图7)。

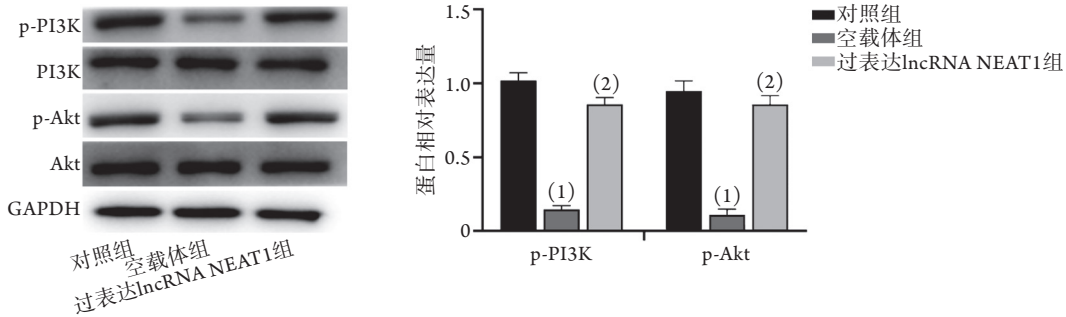


图6 lncRNA NEAT1对AD模型细胞中PI3K/Akt信号通路活性的影响

Fig.6 Effect of lncRNA NEAT1 on the PI3K/Akt signaling pathway activity of AD model cells

与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与空载体组比较, (2) $P < 0.05$ 。

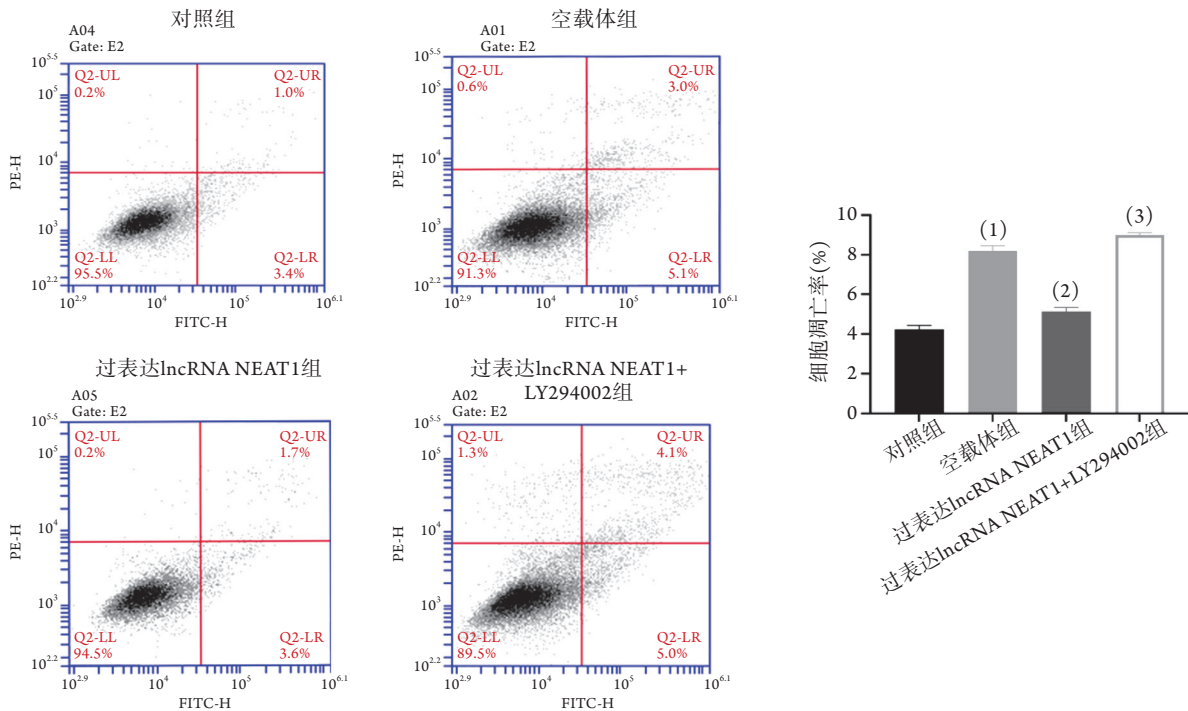


图7 PI3K/Akt通路抑制剂LY294002对AD模型细胞凋亡的影响

Fig.7 Effect of PI3K/Akt pathway inhibitor LY294002 on apoptosis of AD model cells

与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与空载体组比较, (2) $P < 0.05$; 与过表达lncRNA NEAT1组比较, (3) $P < 0.05$ 。

3 讨 论

AD是一种不可逆的进行性、持续性神经退行性疾病,影响大脑皮质和海马的广泛区域,也是最常见的痴呆类型(60%~80%)^[8]。A β 过量产生被认为是AD患者突触和神经元丢失的主要原因。AD的病因非常复杂,目前其分子病理机制尚不清楚^[9]。为此,本研究建立了体外神经细胞损伤模型,为lncRNA NEAT1抑制A β ₂₅₋₃₅诱导的PC12细胞神经毒性提供了理论依据。

lncRNA NEAT1的表达变化与疾病进展密切相关,有研究发现,其可通过上调成纤维细胞生长因子(FGF9)而促进卵巢癌细胞(OC)增殖和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的血管生成^[10]。lncRNA NEAT1与细胞凋亡也密切相关。有研究发现,敲除lncRNA NEAT1可显著抑制肝癌细胞的活力,促进细胞凋亡,并抑制细胞的迁移和侵袭^[11];在脓毒症诱导的急性肺损伤(ALI)中,过表达lncRNA NEAT1可促进WI-38细胞凋亡^[12]。此外,敲低lncRNA NEAT1可减轻脑缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡^[13];下调lncRNA NEAT1可抑制表皮生长因子受体(EGFR)的表达,促进肝癌细胞凋亡^[14]。本研究发现,lncRNA NEAT1在A β ₂₅₋₃₅刺激后的PC12细胞中呈低表达,且过表达lncRNA NEAT1后,AD模型细胞凋亡率明显降低,而敲降lncRNA NEAT1的表达时,AD模型细胞凋亡率升高。另有研究发现,沉默lncRNA NEAT1可导致视网膜母细胞瘤(RB)细胞周期发生停滞,阻止视网膜母细胞瘤的发展^[15]。本研究发现,过表达lncRNA NEAT1可促进AD模型细胞由G₁期快速进入G₂期,激发了细胞周期的进展;而敲降lncRNA NEAT1时,G₁期细胞比例明显高于对照组,G₂期细胞比例明显降低,表明敲降lncRNA NEAT1可使更多的AD模型细胞停留在G₁期,阻止细胞进入G₂期,造成了细胞周期的停滞。

已知lncRNA NEAT1可调控AD细胞的增殖和凋亡,但其具体作用机制尚不明确。有研究发现,在HeLa细胞中,敲降lncRNA NEAT1会抑制p-Akt、p-PI3K的表达^[16]。另有研究发现,lncRNA NEAT1可通过影响miR-211/PI3K/Akt轴调节脓毒症的炎症反应^[17]。由此可见,在疾病发展过程中,lncRNA NEAT1与PI3K/Akt信号通路密切相关。为了进一步验证lncRNA NEAT1对AD模型细胞凋亡的调控机制,本研究将lncRNA NEAT1进行高表达处理,利用Western blotting检测PI3K/Akt信号通路相关蛋白的表达,结果发现lncRNA NEAT1过表达可增加AD模型细胞中p-PI3K、p-Akt的表达,抑制A β ₂₅₋₃₅诱导的细胞凋亡,而加入PI3K通路抑制剂后则可逆转上

述效果,证实lncRNA NEAT1可通过调控PI3K/Akt信号通路的活性而影响AD模型细胞的凋亡。

综上所述,本研究结果表明,A β ₂₅₋₃₅刺激后,PC12细胞中lncRNA NEAT1的表达明显降低;而过表达lncRNA NEAT1可明显抑制A β ₂₅₋₃₅诱导的细胞凋亡和炎症反应,lncRNA NEAT1可能通过激活PI3K/Akt信号通路而激活AD模型细胞的炎症反应,促进AD的进展。但该结论未在动物体内进行验证,后续将建立AD小鼠模型,以进一步探索lncRNA NEAT1对AD发生发展的影响。

【参考文献】

- [1] J Zhang J, Zheng B, Gao A, *et al.* A 3D densely connected convolution neural network with connection-wise attention mechanism for Alzheimer's disease classification[J]. *Magn Reson Imaging*, 2021, 78: 119-126.
- [2] Xiao HX, Li T, Peng F, *et al.* The molecular mechanism of autophagy and its research progress in neurodegenerative diseases[J]. *Med J Chin PLA*, 2019, 44(4): 341-346. [肖昊翔, 李天, 彭帆, 等. 自噬在神经退行性疾病中的作用研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2019, 44(4): 341-346.]
- [3] Yang A, Liu C, Wu J, *et al.* A review on α -mangostin as a potential multi-target-directed ligand for Alzheimer's disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 897: 173950.
- [4] Lim KH, Kim SH, Yang S, *et al.* Advances in multiplex PCR for Alzheimer's disease diagnostics targeting CDK genes[J]. *Neurosci Lett*, 2021, 749: 135715.
- [5] Li L, Xu Y, Zhao M, *et al.* Neuro-protective roles of long non-coding RNA MALAT1 in Alzheimer's disease with the involvement of the microRNA-30b/CNR1 network and the following PI3K/Akt activation[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 117: 104545.
- [6] Ke S, Yang Z, Yang F, *et al.* Long noncoding RNA NEAT1 aggravates A β -induced neuronal damage by targeting miR-107 in Alzheimer's disease[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(7): 640-650.
- [7] Zhang P, Cao L, Zhou R, *et al.* The lncRNA Neat1 promotes activation of inflammasomes in macrophages[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1495.
- [8] Yepes M. The plasminogen activating system in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(10): 1973-1977.
- [9] Ding Y, Zhong Y, Baldeshwiler A, *et al.* Protecting P-glycoprotein at the blood-brain barrier from degradation in an Alzheimer's disease mouse model[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2021, 18(1): 10.
- [10] Yuan J, Yi K, Yang L. LncRNA NEAT1 promotes proliferation of ovarian cancer cells and angiogenesis of co-incubated human umbilical vein endothelial cells by regulating FGF9 through sponging miR-365: An experimental study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(3): e23423.
- [11] Zhang Y, Huang C, Zhu Z, *et al.* lncRNA NEAT1 regulates the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells by acting as a miR-320a molecular sponge and targeting L antigen family member 3[J]. *Int J Oncol*, 2020, 57(4): 1001-1012.
- [12] Chen C, Zhang H, Ge M, *et al.* LncRNA NEAT1 acts as a key regulator of cell apoptosis and inflammatory response by the miR-944/TRIM37 axis in acute lung injury[J]. *J Pharmacol Sci*,

- 2021, 145(2): 202-212.
- [13] Ni X, Su Q, Xia W, *et al.* Knockdown lncRNA NEAT1 regulates the activation of microglia and reduces Akt signaling and neuronal apoptosis after cerebral ischemic reperfusion[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 19658.
- [14] Kou JT, Ma J, Zhu JQ, *et al.* LncRNA NEAT1 regulates proliferation, apoptosis and invasion of liver cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(8): 4152-4160.
- [15] Chen X, Zhao S, Li Q, *et al.* LncRNA NEAT1 knockdown inhibits retinoblastoma progression by miR-3619-5p/LASP1 axis[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 574145.
- [16] Guo HM, Yang SH, Zhao SZ, *et al.* LncRNA NEAT1 regulates cervical carcinoma proliferation and invasion by targeting Akt/PI3K[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(13): 4090-4097.
- [17] Xia D, Yao R, Zhou P, *et al.* LncRNA NEAT1 reversed the hindering effects of miR-495-3p/STAT3 axis and miR-211/PI3K/Akt axis on sepsis-relevant inflammation[J]. *Mol Immunol*, 2020, 117: 168-179.

(收稿日期: 2021-06-16; 修回日期: 2021-10-09)
(责任编辑: 纪方方)