

整合调控网络分析筛选骨髓增生异常综合征 *ABAT* 基因相关长链非编码 RNA SET2-1 及其对细胞增殖和凋亡的影响

王倩¹ 王小钦¹ 陈燕珍² 赵光杰¹ 吴宛玲¹ 李念夷^{1△}

(¹复旦大学附属华山医院血液科, ²国际医疗中心 上海 200040)

【摘要】 目的 构建具有骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)特征的整合调控网络,从中筛选出调控 *ABAT*(4-aminobutyrate aminotransferase)基因的长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA),并初步探讨其在 MDS 中的表达和功能。方法 采用甲基化芯片和全基因组表达谱基因芯片对 MDS 患者和对照者的骨髓标本进行差异基因筛选,将筛选出的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)、差异甲基化基因(differentially methylated genes, DEMs)、差异表达 LncRNA(differentially expressed LncRNAs, DELs)进行整合分析,构建共表达调控网络,从中筛选出与 *ABAT* 基因具有相关性的 LncRNA-SET2-1。采用 qRT-PCR 检测 MDS 患者和对照者骨髓标本中 LncRNA-SET2-1 和 *ABAT* 的表达水平,并在 MDS 转白细胞系 SKM-1、急性白血病细胞系 THP-1,以及对照细胞系 HEK-293T 中检测 LncRNA-SET2-1 的表达水平。建立稳定过表达 LncRNA-SET2-1 的 SKM-1、THP-1 细胞系, qRT-PCR 检测 *ABAT* 表达变化、CCK-8 法检测细胞增殖活力变化、流式细胞术检测细胞凋亡变化。并在 *ABAT* 敲减的 SKM-1、THP-1 细胞中检测 LncRNA-SET2-1 表达变化。结果 通过共表达调控网络分析,筛选得到 LncRNA-SET2-1 与 *ABAT* 的相关性最高。MDS 患者及 SKM-1、THP-1 细胞中 LncRNA-SET2-1 和 *ABAT* 的表达水平均显著下调($P < 0.0001$)。LncRNA-SET2-1 过表达后, *ABAT* 的表达量显著上调($P < 0.01$),而 *ABAT* 敲减后, LncRNA-SET2-1 的表达量未发生显著变化。LncRNA-SET2-1 过表达后, SKM-1、THP-1 细胞的增殖活力显著下降,而凋亡细胞比例显著升高。结论 LncRNA-SET2-1 可能为 *ABAT* 的上游调控分子。LncRNA-SET2-1 在 MDS 患者和 MDS 转白细胞系中均异常低表达,具有抑制 MDS 转白细胞增殖活力及促进细胞凋亡的功能。

【关键词】 骨髓增生异常综合征(MDS); 长链非编码 RNA; *ABAT* 基因; 基因芯片分析; 共表达网络

【中图分类号】 R551.3 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2021.01.003

Screening of *ABAT* gene related LncRNA-SET2-1 based on integrated regulatory network analysis and its effect on cell proliferation and apoptosis in myelodysplastic syndrome

WANG Qian¹, WANG Xiao-qin¹, CHEN Yan-zhen², ZHAO Guang-jie¹, WU Wan-ling¹, LI Nian-yi^{1△}
(¹Department of Hematology, ²WorldWide Medical Center, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 **Objective** By constructing an integrated regulatory network with the characteristics of myelodysplastic syndrome (MDS), we tried to screen the long non-coding RNA (LncRNA) that regulates the *ABAT* (4-aminobutyrate aminotransferase) gene, and to preliminarily explore its expression and function in MDS. **Methods** The differential genes of bone marrow samples collected from MDS patients and controls were screened by methylation microarray and whole genome expression profile microarray.

[△]Corresponding author E-mail: nianyili@gmail.com

网络首发时间:2020-07-20 11:21:36 网络首发地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.R.20200717.0830.012.html

Integrated analysis of the differentially expressed genes (DEGs), differentially methylated genes (DEMs) and differentially expressed LncRNAs (DELs) were conducted for constructing a co-expression regulatory network. The LncRNA-SET2-1 correlated with *ABAT* gene was screened from the integrated regulatory network. The expression levels of LncRNA-SET2-1 and *ABAT* in bone marrow samples of MDS patients and controls were detected by qRT-PCR. The expression level of LncRNA-SET2-1 was detected in MDS transformed leukemia cell line SKM-1, acute leukemia cell line THP-1 and control cell line HEK-293T. The SKM-1 and THP-1 cell lines with stable overexpression of LncRNA-SET2-1 were established. In these cell lines, the expression of *ABAT* was detected by qRT-PCR, the cell viability by CCK-8 and apoptosis by flow cytometry. The expression changes of LncRNA-SET2-1 were also detected in *ABAT* knockdown SKM-1 and THP-1 cells. **Results** Through the analysis of co-expression regulatory network, LncRNA-SET2-1 had the highest correlation with *ABAT*. The expression levels of LncRNA-SET2-1 and *ABAT* in MDS patients, SKM-1 cells and THP-1 cells were significantly down-regulated ($P < 0.0001$). After overexpression of LncRNA-SET2-1, the expression level of *ABAT* was significantly increased ($P < 0.01$). When *ABAT* was knocked down, the expression of LncRNA-SET2-1 did not change significantly. When LncRNA-SET2-1 was overexpressed, the cell viability of SKM-1 and THP-1 cells was reduced significantly, and the cell apoptosis was increased significantly. **Conclusion** LncRNA-SET2-1 may be the upstream regulator of *ABAT*. LncRNA-SET2-1 with functions of cell proliferation inhibition and cell apoptosis induction was aberrantly down-regulated in MDS patients and MDS transformed leukemia cell lines.

【Key words】 myelodysplastic syndrome (MDS); long non-coding RNA; *ABAT* gene; microarray analysis; co-expression regulatory network

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)是一组造血干/祖细胞克隆性疾病,表现为髓系发育不良,血细胞减少,并有进展为急性髓系白血病的风险^[1]。对MDS发生的分子机制认识至今仍十分有限,阻碍了MDS治疗的进展^[2]。近年来表观遗传学改变在MDS发生中的作用日益受到重视。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是一类由RNA聚合酶Ⅱ合成、长度大于200个核苷酸、没有长阅读框架的RNA^[3]。功能研究表明LncRNA在表观遗传学水平对细胞生命活动发挥着重要的调控作用^[4]。虽然目前已有研究表明HOXB-AS3^[5]、XIST^[6]、MEG3^[7]等LncRNA与MDS有关,但相对LncRNA众多的基因数量和高等真核生物复杂调控网络中的重要作用,仍有大量可能参与MDS病理过程的LncRNA未被发现。我们在前期研究中发现*ABAT*基因在MDS患者中具有高甲基化低表达的特点,*ABAT*的异常表达与MDS的不良预后有关,且可影响MDS转白细胞系的增殖和凋亡^[8-9],但对于调控*ABAT*的上游分子仍不明确。近年来的研

究表明,通过对多种高通量分析方法得到的数据进行整合分析,相比只对单一芯片数据进行分析更加有助于揭示肿瘤发生过程中复杂的生物调控过程^[10-11]。因此,本研究中我们将MDS患者与对照者骨髓标本的DEGs、DEMs、DELs进行整合分析,构建具有MDS特征的调控网络,从中筛选出调控*ABAT*的LncRNA,并对其在MDS中的功能进行初步研究。本研究有助于进一步了解LncRNA在MDS发生过程中的作用,以为MDS的治疗提供新的策略和靶点。

资料和方法

标本来源 LncRNA检测选择2015年1月1日至2016年12月30日复旦大学附属华山医院血液科收治的23例MDS患者,其中男性15例、女性8例,平均年龄65岁(29~82岁);作为对照的7例非造血肿瘤患者(如缺铁性贫血、免疫性血小板减少症、脾功能亢进症等)平均年龄38岁(23~78岁),两组性别分布差异无统计学意义。芯片检测病例组为4例

MDS 患者,其中 2 例分型为 RAEB-1 (refractory anemia with excess blasts 1), 2 例为 RAEB-2, 男性 3 例、女性 1 例,平均年龄 67 岁(24~80 岁);另以年龄(± 5 岁)、性别匹配,选择同期行骨髓穿刺检查的 4 例非造血肿瘤患者作为对照组。所有患者采集骨髓标本时均为初次诊断、未接受化疗、排除 MDS/骨髓增殖性疾病(myeloproliferative neoplasms, MPN)及 MDS 转白患者。采集骨髓标本 2~3 mL 后,均使用 Ficoll 淋巴细胞分离液(美国 GE 公司)密度梯度离心法获得骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BMMNCs)。MDS 诊断及分型均按照 2016 年版 WHO 淋巴造血系统肿瘤分类标准^[1]。本研究经复旦大学附属华山医院伦理委员会批准(批准号:2015-269),患者均签署了临床研究知情同意书。

细胞系 人急性白血病细胞系 THP-1 购自中国科学院(上海),人 MDS 转白急性白血病细胞系 SKM-1 购自日本细胞库(the Japanese Collection of Research Bioresources, LCRB)。作为对照的 HEK-293T 细胞系购自中国科学院(上海)。所有细胞系均在 RPMI-1640 培养基(Hyclone, 美国 GE 公司)中培养,添加 10% 胎牛血清(Gibco-BRL, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司),置于 5% CO₂, 37 °C 培养箱,每 2 天换液 1 次。

芯片分析 通过血液基因组 DNA 和 RNA 提取试剂盒(美国 Qiagen 公司)对 4 例 MDS 患者和 4 例对照患者的骨髓标本提取基因组 DNA 和 RNA。采用 Infinium Human Methylation 450K BeadChips 甲基化芯片和 Agilent human genomewide gene expression 60K BeadChips 表达谱基因芯片(上海欧易生物科技有限公司)检测。60K BeadChip 人类全基因组表达芯片(Agilent)中共包含 27 958 个 Entrez Gene RNA 和 7 419 个 LncRNA。芯片扫描后会获得原始信号值、标准化信号值以及检出情况,对所有样本进行主成分分析(principal component analysis, PCA),考察样品的分布情况,确定重复样品的均一性,之后根据芯片确认单中提供的分析方法进行数据比对。分位数归一化和随后的数据处理通过 Genespring 软件(版本 12.0, 美国 Agilent Technologies 公司)完成。之后对原始数据进行筛选,表达量在两组间表达差异超过 2 倍, Student's *t* 检验 $P < 0.01$ 被认为存在差异表达。

为了构建 MDS 相关的调控网络,我们采用一种基于 LncRNA-微 RNA(microRNA, miRNA)靶向方法来预测 LncRNA 的潜在靶标。首先,对每种 DELs,通过 miRcode 数据库^[12]获得潜在的 miRNA 产物。之后在数据库 miRbase v21、mirTarbase、miRanda 2010、miRbase v18、Tarbase5.0、targets can v6.2 中预测 miRNA 的潜在靶标,过滤掉了少于 3 个数据库注释的基因。将剩余的基因与芯片筛选出的差异表达基因组进一步比较。然后使用 chipBase 数据库分析 LncRNA 的转录因子,进一步分析转录因子与差异基因,利用此种方法构建了 MDS 相关的 LncRNA-miRNA-DEGs-转录因子(transcription factors, TFs)调控网络。

基于 LncRNA-TFs-DEGs 调控网络筛选 *ABAT* 基因的调控 LncRNA 采用 Pearson 相关系数(PCC)评估来构建 *ABAT* 与相关 LncRNA 的共表达调控网络。通过计算绝对 PCC,取 P 值 ≤ 0.01 , PCC 倍数 > 0.99 作为阈值,建立 *ABAT* 基因和 DELs 的共表达网络模型。我们通过计算 PCC 和 P 值来评估 LncRNA-信使 RNA(messenger RNA, mRNA)的相关性。用 Cytoscape software 3.2.0(美国 The Cytoscape Consortium 公司)绘制 *ABAT*-DELs-DEGs 共表达网络。

qRT-PCR 法检测 LncRNA-SET2-1 和 *ABAT* 的表达 用 Trizol (Invitrogen, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)抽提骨髓标本及培养细胞的总 RNA,用 Takara PrimeScript RT Master Mix 试剂盒(日本 Takara 公司)将 RNA 反转录为 cDNA。使用 Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR system (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)进行 qRT-PCR 扩增,反应体系为 20 μ L,冰上加入反转录产物 2 μ L,每条引物 0.4 μ L (10 μ mol/L), SYBR® Premix Ex Taq™ (日本 Takara 公司) 10 μ L, ROX Reference Dye II (日本 Takara 公司) 0.4 μ L, 双蒸水 6.8 μ L。反应条件:95 °C 反应 30 s 预变性,95 °C 反应 5 s, 60 °C 反应 34 s,共 40 个循环。引物序列如下, LncRNA-SET2-1, Forward: 5'-TCGCCGGAGTC-ATATTATCG-3', Reverse: 5'-CAGCAGCAGGA-AGAGCAGTT-3'; *ABAT*, Forward: 5'-CCGACT-ACAGCATCCTCTCC-3', Reverse: 5'-GGTTCTC-TTTCACAACTCTTCC-3'; GAPDH, Forward: 5'-GACCTGACCTGCCGT-CTA-3', Reverse: 5'-

AGGAGTGGGTGTCGCTG-T-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 LncRNA-SET2-1 和 ABAT 表达水平,以 GAPDH 为内参,每组取 3 个复孔均值,根据各样本的平均 CT 值,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因表达水平, LncRNA-SET2-1 或 ABAT 相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta CT}$ (LncRNA-SET2-1 或 ABAT) $-2^{-\Delta\Delta CT}$ (GAPDH)。

构建 LncRNA-SET2-1 过表达慢病毒载体和稳定转染的细胞系 按照分子克隆技术指南^[13]构建含有 LncRNA-SET2-1 过表达片段的 GV470 慢病毒载体(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)。取对数生长期的 SKM-1 细胞和 THP-1 细胞,按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 6 孔板,过夜后将 LncRNA-SET2-1 过表达的慢病毒载体和对照空载体分别转染 SKM-1 细胞和 THP-1 细胞。由于慢病毒载体带有绿色荧光蛋白序列,转染后 72 h 通过使用流式细胞仪检测绿色荧光蛋白强度来评估细胞转染效率,阳性细胞比例大于 80%。之后,在 SKM-1 细胞和 THP-1 细胞的培养基中分别加入 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素。培养 2 周后获得稳定转染带有嘌呤霉素抗性慢病毒载体的细胞系。继续培养 4 天后,应用 qRT-PCR 检测稳定转染细胞系中 LncRNA-SET2-1 的表达水平。

CCK-8 法检测细胞增殖活力 使用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒检测细胞增殖活力。将稳定过表达 LncRNA-SET2-1 的 SKM-1 细胞、THP-1 细胞和转染空载体的对照细胞,按 $1 \times 10^3/\text{孔}$ 接种于 96 孔板,每组设 3 个复孔,培养 5 天,每 3 天更换一次细胞培养液。分别培养至 24 h、48 h、72 h、96 h 时,每孔加入 $5 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂,继续培养 4 h 后分光光度计上测量各孔 450 nm 处吸光度值 (D),计算细胞增殖指数。

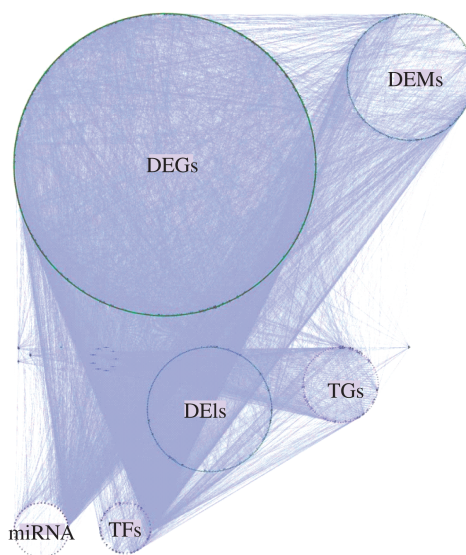
流式细胞术检测细胞凋亡 将稳定过表达 LncRNA-SET2-1 的 SKM-1 细胞、THP-1 细胞和转染空载体的对照细胞按 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 6 孔板,培养 48 h 后收集细胞,PBS 洗 2 次后加入 $200 \mu\text{L}$ 结合缓冲液重悬细胞,加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-APC 和 $5 \mu\text{L}$ 7-AAD(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)混匀,避光室温孵育 15 min。流式细胞仪(BD Accuri C6,美国 BD Biosciences 公司)检测细胞凋亡率,使用 Flowjo 7.6 软件进行数据统计分析。每次实验重复 3 次。

统计学处理 应用 SPSS 25.0 软件处理数据。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差

分析,两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

芯片整合分析 MDS 患者相对对照者的 BMMNCs,应用表达谱基因芯片共筛选出 1 937 个 DEGs,其中 853 个基因表达上调,1 084 个基因表达下调;筛选出 214 个 DELs,其中 102 个 LncRNA 表达上调,112 个 LncRNA 表达下调。应用甲基化基因芯片筛选出 515 个 DEMs,其中高甲基化基因 304 个,低甲基化基因 211 个。对筛选出的 DEGs、DELs、DEMs 进行整合分析,构建 MDS 的 LncRNA-miRNA-DEGs-TFs 调控网络(图 1)。该调控网络包括:LncRNA-TFs-DEGs 调控网络,TFs-miRNA-LncRNA 调控网络,miRNA-DEGs-DEMs 调控网络。GO(Gene ontology)分析差异表达基因参与的生物学过程,前 10 位 GO 富集的生物学过程包括:细胞内级联信号,凋亡调控,磷酸代谢过程,免疫反应,防御反应,细胞增殖调控,生物合成过程正向调控,磷酸化过程,通过 RNA 聚合酶 II 启动子的转录调控,生物黏附。



The circles in the figure are composed of differentially expressed genes (DEGs), differentially expressed LncRNAs (DELs), differentially expressed methylated genes (DEMs), LncRNA related microRNA (miRNA), predicted target genes (TGs), and predicted transcription factors (TFs) respectively. The lines among the six circles represent the interaction between different factors.

图 1 MDS 整合调控网络

Fig 1 The integrated regulatory network of MDS

基于 LncRNA-TFs-DEGs 调控网络筛选 *ABAT* 基因的调控 LncRNA 在前期的研究中,我们筛选出 6 个高甲基化低表达的基因(*ABAT*, *DAPPI*, *FADD*, *LRRFIPI*, *PLBDI*, *SMPD3*)并建立了 MDS 的 CpG 岛甲基化表型,可能成为 MDS 诊断的潜在分子生物学标志^[8]。本研究对以上 6 个基因进行了深入的信号通路整合分析,仅 4 个基因(*ABAT*, *DAPP1*, *FADD* 和 *SMPD3*)有功能信号通路。我们在前期研究中发现,*ABAT* 基因异常低表达与 MDS 的不良预后有关,下调其表达水平可促进髓系肿瘤细胞系的增殖能力、抑制细胞凋亡,提示 *ABAT* 可能参与 MDS 的发生过程^[9]。因此,我们在构建的 MDS 调控网络中,对 *ABAT* 参与的 LncRNA-mRNA 调控网络进一步分析。通过建立 *ABAT*-DELs-DEGs 共表达网络,我们发现了 6 个与 *ABAT* 共表达且相关性最强的 DELs。根据 PCC 对这 6 个

LncRNA 进行排序发现,LncRNA-SET2-1 与 *ABAT* 变化趋势的 PCC 最高(表 1)。利用 UCSC 数据库(<http://genome.ucsc.edu>)检索发现,LncRNA-SET2-1 位于人类基因组 6 号染色体,为反义 RNA,包括 3 个外显子,长度约 385bp。对其进行 PhyloCSF 评分,确定其为非编码 RNA。经 DELs-DEGs 共表达网络分析发现,LncRNA-SET2-1 与 *ABAT*、*NCF2*、*SPTLC2*、*QPRT* 基因共表达。进一步通过 LncRNA-miRNA-DEGs-TFs 调控网络分析和数据库信息的匹配,预测到 LncRNA-SET2-1 可能为 miRNA96 的前体,而 *ABAT* 可能为 miRNA96 的靶分子。根据以上生物信息学分析,LncRNA-SET2-1 可能对 *ABAT* 具有调控作用,且参与了 MDS 发展过程。因此,我们进一步研究 LncRNA-SET2-1 在 MDS 患者及细胞系中的表达情况,及对 MDS 转白细胞功能的影响。

表 1 通过 *ABAT*-DELs-DEGs 共表达网络发现的 6 个与 *ABAT* 基因共表达且相关性最强的 DELs

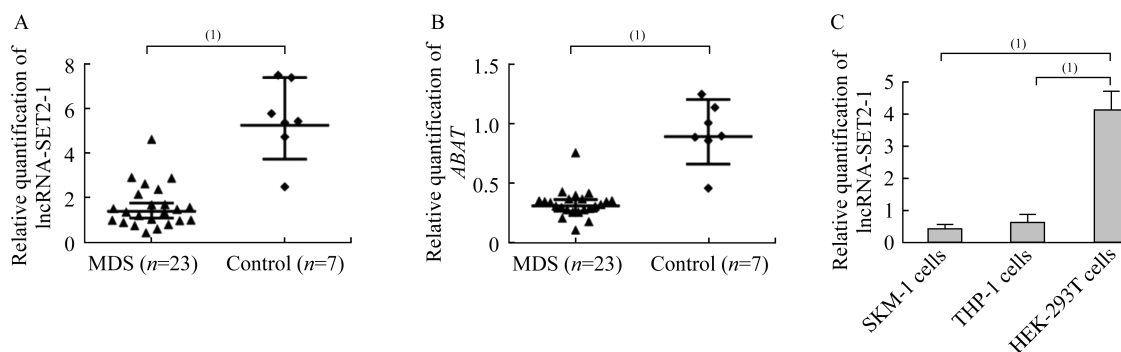
Tab 1 Six DELs that are correlated with the *ABAT* gene based on the *ABAT*-DELs-DEGs co-expression network

No.	LncRNA	Chromosomal localization	Expression change	PCC	P
1	LncRNA-SET2-1	chr6:167382710-167411729	Down	0.988	0.011
2	Loc100131564	chr1:93796837-93806487	Down	0.979	0.021
3	Jh806582.2	chr17:49425-59050	Down	0.959	0.041
4	None	chr4:13067152-13347902	Up	-0.968	0.018
5	Jh591181.2	chr10:46972944-46982894	Up	-0.963	0.036
6	None	chr5:61931044-61948469	Up	-0.954	0.046

PCC: Pearson correlation coefficient.

LncRNA-SET2-1 在 MDS 患者和 MDS 转白细胞系中的表达情况 MDS 患者骨髓细胞中 LncRNA-SET2-1 的相对表达量明显低于对照组 (1.63 ± 0.96 vs. 5.55 ± 1.69 , $P < 0.0001$),同时检测 *ABAT* 基因在 MDS 患者骨髓细胞中的相对表达量

也显著低于对照组 (0.33 ± 0.12 vs. 0.93 ± 0.25 , $P < 0.0001$)。在 MDS 转白细胞系 SKM-1 和急性白血病细胞系 THP-1 中,LncRNA-SET2-1 的表达量显著低于对照细胞 HEK-293T (0.42 ± 0.12 vs. 4.12 ± 0.60 , 0.62 ± 0.23 vs. 4.12 ± 0.60 , $P < 0.0001$) (图 2)。



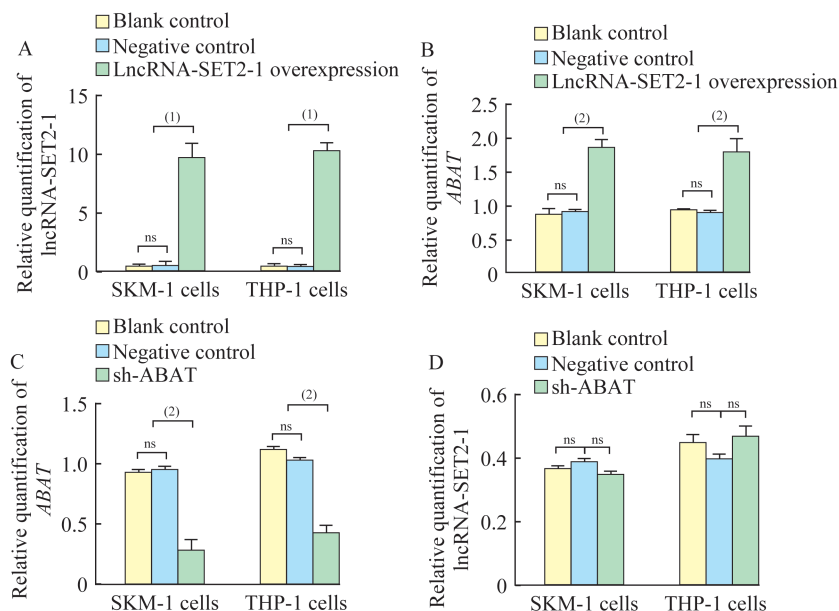
A: Relative expression level of LncRNA-SET2-1 was downregulated in MDS patients detected by qRT-PCR; B: The relative expression level of *ABAT* gene was also downregulated in MDS patients; C: The expression of LncRNA-SET2-1 was downregulated in MDS cell lines SKM-1 and THP-1, HEK-293T cells were used as a control. ⁽ⁱ⁾ $P < 0.0001$.

图 2 LncRNA-SET2-1 和 *ABAT* 在 MDS 患者和 MDS 转白细胞系中的表达水平

Fig 2 Expression levels of LncRNA-SET2-1 and *ABAT* in MDS patients and cell lines

MDS转白细胞系中 LncRNA-SET2-1 过表达对 ABAT 基因表达的影响 稳定转染 LncRNA-SET2-1 过表达慢病毒载体的 SKM-1 细胞系和 THP-1 细胞系中, LncRNA-SET2-1 的相对表达量高于对照空载体组 (9.65 ± 1.24 vs. 0.44 ± 0.34 , 10.10 ± 0.89 vs. 0.38 ± 0.21 , $P < 0.0001$)。稳定过表达 LncRNA-SET2-1 的 SKM-1 细胞和 THP-1 细胞中 ABAT 基

因的相对表达量较对照组上调 2 倍 (1.86 ± 0.13 vs. 0.91 ± 0.02 , 1.79 ± 0.21 vs. 0.89 ± 0.03 , $P < 0.01$)。但我们对前期研究中构建的 ABAT 敲减 SKM-1 和 THP-1 细胞系^[9]中 LncRNA-SET2-1 的相对表达水平进行检测, 与对照组相比未发生显著改变 (0.35 ± 0.01 vs. 0.39 ± 0.01 , 0.47 ± 0.03 vs. 0.40 ± 0.01 , $P > 0.05$) (图 3)。



A: LncRNA-SET2-1 was significantly over-expressed in MDS cell lines which stably infected with lentivirus carrying LncRNA-SET2-1; B: The expression level of ABAT was upregulated in LncRNA-SET2-1 stable overexpression cell lines; C: ABAT was significantly under-expressed in MDS cell lines which ABAT was knocked down; D: The expression level of LncRNA-SET2-1 was not significantly changed in ABAT knockdown cell lines. ⁽¹⁾ $P < 0.0001$; ⁽²⁾ $P < 0.01$; ns: No statistical difference. Blank control: Control cells were not infected with a lentiviral vector; Negative control: Control cells were infected with empty lentiviral vectors; LncRNA-SET2-1 overexpression: LncRNA-SET2-1 overexpression cell lines; sh-ABAT: ABAT knockdown cell lines.

图3 LncRNA-SET2-1 过表达对 ABAT 基因表达的影响

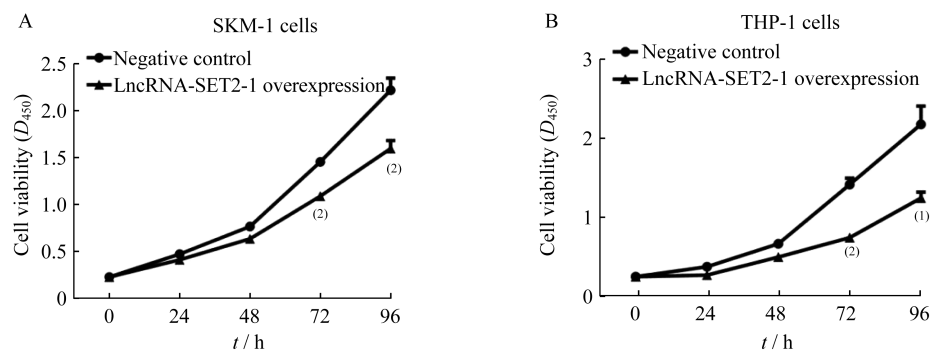
Fig 3 Effect of LncRNA-SET2-1 overexpression on ABAT gene

MDS转白细胞系中 LncRNA-SET2-1 过表达对细胞增殖和凋亡的影响 稳定过表达 LncRNA-SET2-1 的 SKM-1 细胞和 THP-1 细胞培养 24 h 后, 与对照组相比, 细胞增殖活力在 72 h (D 值分别为 1.10 ± 0.03 vs. 1.47 ± 0.02 , 0.75 ± 0.02 vs. 1.42 ± 0.08 , $P < 0.001$)、96 h (D 值分别为 1.61 ± 0.09 vs. 2.23 ± 0.13 , $P < 0.001$; 1.25 ± 0.08 vs. 2.18 ± 0.23 , $P < 0.05$) 均显著下降 (图 4)。流式细胞术检测过表达 LncRNA-SET2-1 的 SKM-1 细胞凋亡细胞比例显著高于对照组 ($73.39\% \pm 2.78\%$ vs. $57.77\% \pm 2.36\%$, $P = 0.02$), 同样, 过表达 LncRNA-SET2-1 的 THP-1 细胞凋亡细胞比例也显著高于对照组 ($74.59\% \pm 3.07\%$ vs. $54.48\% \pm 2.19\%$, $P = 0.001$) (图 5)。说明

LncRNA-SET2-1 过表达对 MDS 转白细胞的增殖活力具有抑制作用, 并促进 MDS 转白细胞凋亡。

讨 论

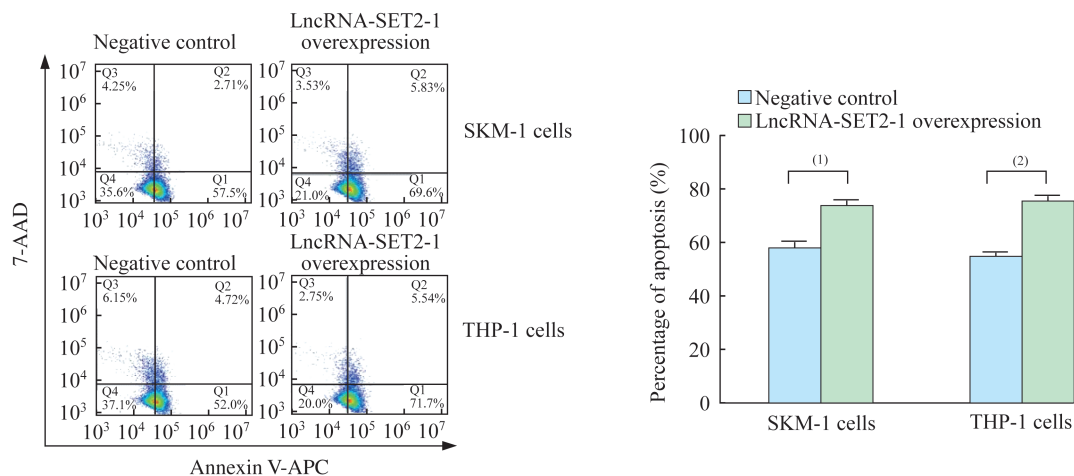
LncRNA 作为人类细胞中大量存在的非编码 RNA, 在信号转导、细胞增殖分化、细胞周期、个体发育等重要生命活动中发挥关键的调控作用, 涉及到表观遗传水平、转录水平以及转录后水平等多个层面的复杂调控^[14]。目前, 在多种类型肿瘤中都已发现存在 LncRNA 的失调, 说明其与肿瘤的发展密切相关^[15]。LncRNA 在调控造血发育中也起到重要作用, 其异常调控参与了造血肿瘤的发展, 如



A: The cell viability of SKM-1 cells with LncRNA-SET2-1 overexpression was reduced; B: The cell viability of THP-1 cells with LncRNA-SET2-1 overexpression was also reduced; ⁽¹⁾ $P < 0.05$; ⁽²⁾ $P < 0.001$. Negative control: Control cells were infected with empty lentiviral vectors; LncRNA-SET2-1 overexpression: LncRNA-SET2-1 overexpression cell lines.

图4 LncRNA-SET2-1过表达抑制MDS转白细胞增殖活力

Fig 4 LncRNA-SET2-1 overexpression reduced the viability of MDS transformed leukemia cell



The fraction of apoptotic cells in the SKM-1 and THP-1 cells with LncRNA-SET2-1 overexpression was increased. ⁽¹⁾ $P < 0.05$; ⁽²⁾ $P < 0.01$. Negative control: Control cells were infected with empty lentiviral vectors; LncRNA-SET2-1 overexpression: LncRNA-SET2-1 overexpression cell lines.

图5 LncRNA-SET2-1过表达促进MDS转白细胞凋亡

Fig 5 LncRNA-SET2-1 overexpression induced MDS transformed leukemia cell apoptosis

AML, MPN, ALL 等^[16-17]。虽然目前已有 LncRNA 与 MDS 发展有关的报道,但相比 AML,对参与 MDS 病理过程的 LncRNA 认识仍十分有限。我们在前期研究中发现, *ABAT* 基因在 MDS 中具有诊断和预后价值,并可影响 MDS 转白细胞的增殖活力和凋亡。本研究中,我们基于基因芯片整合分析构建 *ABAT*-DELs-DEGs 共表达网络,筛选出 *ABAT* 基因可能的调控 LncRNA,并对该 LncRNA 在 MDS 患者和 MDS 转白细胞中的表达情况及功能进行了初步研究。

高通量基因芯片是帮助发现 MDS 发生过程中新的调控分子的重要工具,但是,仅依靠单一的 LncRNA 芯片或者 mRNA 芯片,难以从海量的数据

中筛选出有价值的信息。利用多种不同芯片进行生物信息学整合分析、构建分子调控网络有助于揭示复杂的生物调控过程、筛选发现生物调控网络中的关键分子^[18]。本研究中,我们对 MDS 患者和对照者骨髓标本中的 DELs、DELs 和 DEMs 进行整合分析,通过对 DELs 靶分子与结合转录因子的预测,与表达芯片筛选出的 DELs 进行对比分析,构建了 MDS 相关的 LncRNA-miRNA-DEGs-TFs 调控网络。在该网络的基础上,我们寻找到可能作为 LncRNA-SET2-1 剪切产物的 miRNA96,推测 miRNA96 可能作为 *ABAT* 的转录因子对 *ABAT* 基因进行调控,提示可能存在 LncRNA-SET2-1-miRNA96-*ABAT* 调控轴。

我们首次在MDS患者骨髓标本和MDS转白细胞系中检测发现LncRNA-SET2-1表达显著下调,与同时检测的ABAT基因表达变化趋势一致。过表达LncRNA-SET2-1后,ABAT基因表达上调,而下调ABAT表达,LncRNA-SET2-1表达不受影响,提示LncRNA-SET2-1可能为ABAT上游调控分子,且对ABAT具有正向调控作用。功能研究表明,LncRNA-SET2-1过表达会抑制MDS转白细胞增殖、促进细胞凋亡,说明在MDS中,LncRNA-SET2-1异常下调可能对造血细胞肿瘤化具有一定作用。由于在MDS患者和MDS转白细胞系中,LncRNA-SET2-1与ABAT基因表达变化一致,对细胞表型影响一致,且LncRNA-SET2-1可能为ABAT上游调控分子,结合芯片整合分析可能存在LncRNA-SET2-1-miRNA96-ABAT调控轴的结果,我们推测LncRNA-SET2-1和ABAT可能存在竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)的关系。ceRNA是LncRNA发挥生物学功能的9种主要方式之一,代表了一种全新的基因表达调控模式,相比miRNA调控网络,涉及更多的RNA分子,更为精细和复杂,是目前肿瘤研究领域的一个热点^[19-21]。对LncRNA-SET2-1-miRNA 96-ABAT调控轴的研究可为我们从转录组水平深入探索MDS的发病机制提供一个新的视角。

本研究首次基于MDS患者骨髓标本不同基因芯片的整合分析,发现可能存在LncRNA-SET2-1-miRNA96-ABAT调控轴,并初步验证了LncRNA-SET2-1对ABAT基因具有正向调控作用,且LncRNA-SET2-1表达失调可能参与了MDS的病理过程。由于本文仅对LncRNA-SET2-1在MDS中的功能进行了初步探索,因此具有一定局限性,关于LncRNA-SET2-1与ABAT之间具体调控方式和是否存在ceRNA的实验正在进行中。本研究为从转录组水平深入探索MDS发生的分子机制提供了新的生物信息学分析方法,并提出了可能参与MDS发生的新的LncRNA及其作用方式,对LncRNA-SET2-1-ABAT调控轴的深入研究将为认识MDS的病理机制提供新的方向。

作者贡献声明 王倩 论文构思,数据采集,数据统计和分析,论文撰写和修订。王小钦 数据审核,论文修订。陈燕珍 临床样本分析。赵光杰

细胞转染实验。吴宛玲 细胞活性和凋亡实验。李念夷 生物信息学分析,数据统计和分析,论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] ARBER DA, ORAZI A, HASSERJIAN R, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(20):2391-2405.
- [2] LIU L, WANG HY, WEN JG, *et al.* Mutated genes and driver pathways involved in myelodysplastic syndromes—a transcriptome sequencing based approach[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(8):2158-2166.
- [3] AKHADE VS, PAL D, KANDURI C. Long noncoding RNA: genome organization and mechanism of action[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1008:47-74.
- [4] SCHMITZ SU, GROTE P, HERRMANN BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(13):2491-2509.
- [5] HUANG HH, CHEN FY, CHOU WC, *et al.* Long non-coding RNA HOXB-AS3 promotes myeloid cell proliferation and its higher expression is an adverse prognostic marker in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):617.
- [6] YILDIRIM E, KIRBY JE, BROWN DE, *et al.* Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice[J]. *Cell*, 2013, 152(4):727-742.
- [7] BENETATOS L, HATZIMICHAEL E, DASOULA A, *et al.* CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes[J]. *Leukemia Res*, 2010, 34(2):148-153.
- [8] 赵晓丽,王小钦,李爽,等.骨髓增生异常综合征CpG岛甲基化模式的建立及其诊断价值研究[J]. *中华血液学杂志*, 2014, 10(35):944-948.
- [9] ZHAO GJ, LI NY, LI S, *et al.* High methylation of the 4-aminobutyrate aminotransferase gene predicts a poor prognosis in patients with myelodysplastic syndrome[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(2):491-504.
- [10] LI LF, PENG ML, XUE WH, *et al.* Integrated analysis of dysregulated long non-coding RNAs/microRNAs/mRNAs in metastasis of lung adenocarcinoma[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):372.

- [11] SHANG JL, DING Q, YUAN SS, *et al.* Network analyses of integrated differentially expressed genes in papillary thyroid carcinoma to identify characteristic genes[J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10(1): pii: E45.
- [12] JEGGARI A, MARKS DS, LARSSON E. miRcode: a map of putative microRNA target sites in the long non-coding transcriptome [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28 (15): 2062-2063.
- [13] GEILING B, VANDAL G, POSNER AR, *et al.* A modular lentiviral and retroviral construction system to rapidly generate vectors for gene expression and gene knockdown *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (10): e76279.
- [14] KOPP F, MENDELL JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.
- [15] PENG WX, KOIRALA P, MO YY. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36 (41): 5661-5667.
- [16] ALVAREZ-DOMINGUEZ JR, LODISH HF. Emerging mechanisms of long noncoding RNA function during normal and malignant hematopoiesis [J]. *Blood*, 2017, 130 (18): 1965-1975.
- [17] MERA S, LINDBERG J, NILSSON C, *et al.* Expression Levels of long non-coding RNAs are prognostic for AML outcome [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 52.
- [18] TAWANA K, DRAZER MW, CHURPEK JE. Universal genetic testing for inherited susceptibility in children and adults with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: are we there yet? [J]. *Leukemia*, 2018, 32 (7): 1482-1492.
- [19] JARROUX J, MORILLON A, PINSKAYA M. History, discovery, and classification of lncRNAs [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1008: 1-46.
- [20] TAY Y, RINN J, PANDOLFI PP. The Multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 344-352.
- [21] CHAN JJ, TAY Y. Noncoding RNA: RNA regulatory networks in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1310.

(收稿日期: 2020-04-23; 编辑: 王蔚)

(上接第 16 页)

- [19] SHEN J, CHEN X, HENDERSHOT L, *et al.* ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals [J]. *Dev Cell*, 2002, 3(1): 99-111.
- [20] ROZPEDEK W, PYTEL D, MUCHA B, *et al.* The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress [J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(6): 533-544.
- [21] HIRAMATSU N, MESSAH C, HAN J, *et al.* Translational and posttranslational regulation of XIAP by eIF2 α and ATF4 promotes ER stress-induced cell death during the unfolded protein response [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(9): 1411-1420.
- [22] DUNLOP RA, POWELL JT, METCALF JS, *et al.* L-Serine-mediated neuroprotection includes the upregulation of the ER stress chaperone protein disulfide isomerase (PDI) [J]. *Neurotox Res*, 2018, 33(1): 113-122.

(收稿日期: 2020-06-29; 编辑: 张秀峰)