

I型登革病毒感染前后血管内皮细胞长链非编码RNA表达谱分析

郑宝嘉¹, 江振友¹, 司露露², 郭前方², 江丽芳², 周俊梅², 王辉¹

(1. 暨南大学基础医学院微生物与免疫学系教研室, 广东 广州 510632; 2. 中山大学热带病防治研究教育部重点实验室//中山医学院微生物学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】运用高通量测序技术检测I型登革病毒(DENV-1)感染人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)后长链非编码RNA(lncRNA)的差异表达,分析以探讨导致血管内皮细胞功能改变或受损的可能分子机制。【方法】DENV-1感染人脐静脉内皮细胞24 h后,分别提取对照组和病毒感染组的RNA样本进行测序,筛选差异表达的lncRNA,进行GO和KEGG富集分析,构建共表达网络图。【结果】共筛查到2 623个显著差异表达的lncRNA,其中1 441个为表达上调,1 182个为表达下调。发现表达差异lncRNA及其预测靶基因主要富集于影响抗原提呈、干扰素合成、细胞凋亡、细胞粘附等生物过程。【结论】DENV-1感染HUVEC后,lncRNA表达谱发生明显变化,与登革出血热/登革休克综合征的发生发展密切相关。

关键词: I型登革病毒;人脐静脉血管内皮细胞;长链非编码RNA

中图分类号:R377.33

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2019)02-0228-09

Long Non-Coding RNA Expression Profile in Vascular Endothelial Cells before and after Infected by Dengue Virus Type I

ZHENG Bao-jia¹, JIANG Zhen-you¹, SI Lu-lu², GUO Qian-fang², JIANG Li-fang²,
ZHOU Jun-mei², WANG Hui¹

(1. Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Key Laboratory of Tropical Diseases Control, Ministry of Education, and Department of Medical Microbiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: ZHOU Jun-mei; E-mail: junmeizh@126.com; WANG Hui; E-mail: twanghzzm@jun.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To use high-throughput sequencing technologies for examining differentially expressed long non-coding RNA (lncRNA) in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) infected by dengue virus type I (DENV-1), to analyze and explore the potential molecular mechanisms of HUVEC dysfunction or damage. 【Methods】 After 24 hours of DENV-1 infection, RNA samples were extracted from control groups and viral groups. Sequencing and the differentially expressed lncRNAs were screened, and then GO and KEGG enrichment analysis were conducted and a co-expression network map was constructed. 【Results】 In contrast to the control group, there were 2 623 lncRNA expressed differently, among which 1 441 were up-regulated, while 1 182 were down-regulated. It was found that the differentially expressed lncRNA and the predicted corresponding target genes were mainly distributed in the regions of biological processes of antigen presentation, interferon synthesis, apoptosis and cell adhesion. 【Conclusion】 After HUVEC were infected with

收稿日期:2018-10-22

基金项目:广州市健康医疗协同创新重大专项(201508020263)

作者简介:郑宝嘉,硕士研究生,研究方向:登革病毒感染与lncRNA的相互关系,E-mail:776134438@qq.com;周俊梅,通信作者,副教授,硕士生导师,E-mail:junmeizh@126.com;王辉,通信作者,副教授,硕士生导师,E-mail:twanghzzm@jun.edu.cn

DENV-1, lncRNA expression profile changes significantly, which is closely related to the occurrence and development of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS).

Key words: Dengue virus type I; human umbilical vein endothelial cells; long non-coding RNA

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(2): 228-236]

登革病毒(Dengue virus, DENV)是一种有包膜的单正链RNA病毒,属于黄病毒科黄病毒属,主要通过埃及伊蚊和白纹伊蚊等蚊媒传播。根据其抗原性的不同,分为DENV-1, DENV-2, DENV-3和DENV-4四个血清型。过去的20年内,在东南亚、美国中南部和南非地区,登革感染的数量呈持续上升的趋势。据WHO报道,全球每年大约有高达8 000万人感染登革病毒,24 000人死于登革感染,超过100个国家的30亿人处于登革病毒感染的危险之中^[1]。2014年广东省和2016年云南省均发生了登革热的暴发流行,其主要流行型别为DENV-1^[2-3]。登革病毒感染可引起登革热(Dengue fever, DF),严重时还可出现登革出血热/登革休克综合征(Dengue hemorrhagic fever/Dengue shock syndrome, DHF/DSS),表现为高热、广泛性出血、弥散性血管内凝血等症状,其主要病理改变为血管通透性增加所引起的血浆渗漏和出血^[4],是登革病毒感染致死性高的严重并发症。DHF/DSS的发病机理一直是人们研究登革病毒的重要方向,但至今尚未完全阐明。人类基因中只有约2%基因能够编码蛋白,其余为转录调控元件和非编码RNA。根据长度不同,非编码RNA可分为小非编码RNA (small non-coding RNA, sncRNA)和长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA)。lncRNA是一类长度大于200个核苷酸的非编码RNA,占非编码RNA的80%^[5]。lncRNA可通过调节染色质重塑、控制基因转录、参与mRNA转录后、调节蛋白质功能、参与细胞间的信号传导等发挥重要调控作用^[6]。研究发现,病毒感染可引起宿主细胞内lncRNA的表达异常,从而改变宿主正常功能,调控细胞增殖分化、凋亡及信号传导,最终促进病毒感染^[7]。据报道,人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、冠状病毒、单纯疱疹病毒、EB病毒、人类巨细胞病毒感染后,宿主细胞内lncRNA表达异常,与疾病的发生发展密切相关^[8-13]。近年来的登革疫情以DENV-1为主,而血管内皮细胞是登革病毒的主要靶细胞^[14],其

功能改变与受损将直接或间接导致DHF/DSS的发生。本研究拟通过分析DENV-1感染人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)后lncRNA的差异表达,探索导致血管内皮细胞功能改变或受损的可能分子机制,为揭示DHF/DSS发病机制提供思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

人原代脐静脉血管内皮细胞、ECM内皮细胞培养基、纤连蛋白和胰酶购自美国sciencell公司,加入配备好的生长因子、双抗和20%胎牛血清培养。C6/36细胞和I型登革病毒FS01/01 2014病毒株由本实验室长期保种。间接细胞免疫荧光登革病毒特异性抗原抗体购自上海艾博抗公司,血管内皮细胞vWF抗原抗体购自Life technology公司,羊抗鼠荧光二抗购自Thermo Fish公司。使用Trizol法提取细胞RNA。逆转录试剂盒和TB Green RT-qPCR试剂盒购自Takara公司。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉血管内皮细胞的复苏传代及免疫荧光鉴定 液氮中取出细胞冻存管,于37℃温水中快速融解,待融解完全则吸取转移至装有3~6倍培养基的离心管,2 000×g, 10 min离心后弃上清,吸取新的培养基吹打混匀,分装到孵育有纤连蛋白的细胞瓶,在37℃、体积分数5%CO₂培养箱培养,隔日换新的培养基。待细胞丰度达到90%,则进行传代:弃去培养基,用杜氏磷酸缓冲液(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS)洗细胞两次,加入1~2 mL含0.5 g/L胰酶(含EDTA)消化2~3 min,在显微镜下观察待细胞变圆,则倒掉胰酶,加入培养基吹打后1:2分装。免疫荧光鉴定血管内皮细胞vWF因子:将无菌圆玻片置于24孔板底部,以5×10⁵/孔的细胞铺板,24 h后用磷酸缓冲盐溶液(phosphate Buffered Saline, PBS)洗一次再用40 g/L多聚甲醛固定,用PBS洗3次,加

0.5% Triton X-100 室温通透 20 min 后用 5% 牛血清白蛋白在 37 °C 封闭。加入 1:200 稀释的 vWF 抗原抗体, 4 °C 过夜, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline with Tween-20, PBST)洗 3 次后加 1:500 稀释的羊抗鼠荧光二抗孵育 45 min, PBST 洗 5 次, 每次 3 min, 最后在载玻片上滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭剂, 取出细胞爬片倒置于载玻片上进行染核和封片, 置荧光显微镜下观察拍片。

1.2.2 C6/36 细胞的培养及 I 型登革病毒的扩增
用含 80 mmol/L 胎牛血清的 MEM 培养基培养 C6/36, 待细胞铺满细胞瓶底后 1:2 或 1:3 分装, 隔日感染病毒。扩增病毒: 传代 24 h 后可感染病毒, 设置对照组和病毒组, 对照组加 2 mL 的含 20 mmol/L 胎牛血清的细胞维持液, 病毒组加 100 μ L 的病毒原液和 400 μ L 的维持液, 放在 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 的培养箱吸附 2 h 后, 弃感染上清, 补充维持液, 放回培养箱, 每日观察。待细胞病变达 ++~+++ 时, 收取细胞悬液, 储存于 -80 °C 冰箱, 取 100 μ L 做病毒 TCID₅₀ 的测定。

1.2.3 I 型登革病毒感染血管内皮细胞的鉴定及测序
将无菌圆玻片放入 24 孔板内, HUVEC 以 5×10^5 /mL 每孔铺板, 置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱内培养 24 h 后, 加入已稀释好的病毒原液感染细胞, 吸附 2 h 后弃病毒上清液, 加入维持液后继续培养 24 h 后做间接免疫荧光鉴定病毒感染。免疫荧光的步骤如上所述。实验室采用不同 MOI 的病毒液感染细胞 24、48、72 h 后分别进行检测, 发现病毒载量与感染量和感染时间成正相关, 当 MOI=10 时, 24 与 48 h 细胞内的病毒载量无显著差异, 同时考虑 HUVEC 繁殖较快, 因此采用 MOI=10 的病毒剂量, 感染 HUVEC, 24 h 后送去深圳华大基因公司进行高通量测序。

1.2.4 lncRNA 的表达差异分析、GO、KEGG 和共表达网络分析
取 6 个样本, 分别为对照组和实验组, 在华大基因 Illumina HiSeq 平台进行测序, 检测出的转录本用 CPC、txCdsPredict 和 CNCI 软件比对 pfam 蛋白数据库, 对上则为 mRNA, 否则是 lncRNA。然后使用 RSEM 计算基因和转录本的表达量。用差异分析软件 DEGseq 进行组间差异分析(显著差异基因的过滤条件: Fold Change \geq 2.00 且 FDR \leq 0.001)。为了更好地了解差异表达基因的功能, 对组装得到的新 mRNA 和已知的 mRNA 进行基因注释。为了确定组间的显著差异靶基因

在哪些 GO 功能模块和哪些通路上更为集中, 进行 GO 和 KEGG 富集分析。因为目的在于找寻致 HUVEC 功能改变或受损的关键靶基因和调控的 lncRNAs, 在 GO 的 biological process 中选取所有与细胞损伤和血管生成有关的条目中, 对出示的靶基因和 lncRNAs 进行整合, 以 Pearson 相关系数衡量 lncRNA 和 mRNA 之间的相关性, 从而构建 mRNA-lncRNA (Pearson \geq 0.8) 共表达网络分析图。

1.2.5 RT-qPCR 验证测序结果
将 HUVEC 细胞悬液铺六孔板, 以 I 型登革病毒 FS01/01 病毒 MOI=10 感染 HUVEC, 对照组和病毒感染组分别做三孔, 24 h 后进行 RT-qPCR 实验。引物由上海捷瑞生物公司和广州永慧公司设计和合成, 内参为 GAPDH。总 RNA 提取采用 Trizol-氯仿-异丙醇提取法。使用 Takara 的 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒进行逆转录, 反应体系为: 4 μ L 5 \times PrimeScript RT Master Mix, 2 μ L RNA, 补水至 20 μ L; 反应条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 sec, 4 °C forever; Takara 的 TB Green RT-qPCR 反应体系为: 12.5 μ L TB Green Premix Ex Tap II, 1 μ L PCR 上游引物, 1 μ L PCR 下游引物, 2 μ L cDNA 模板量, 补水至 25 μ L; 反应条件为: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, GOTO 39。

1.3 统计学处理

RT-qPCR 实验中每组 3 个样本, 每个单独重复 3 次实验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 数据呈正态分布的进行两独立样本 *t* 检验, 非正态分布实行秩和检验。若 $P < 0.05$, 则认为两组差异具有统计学意义。

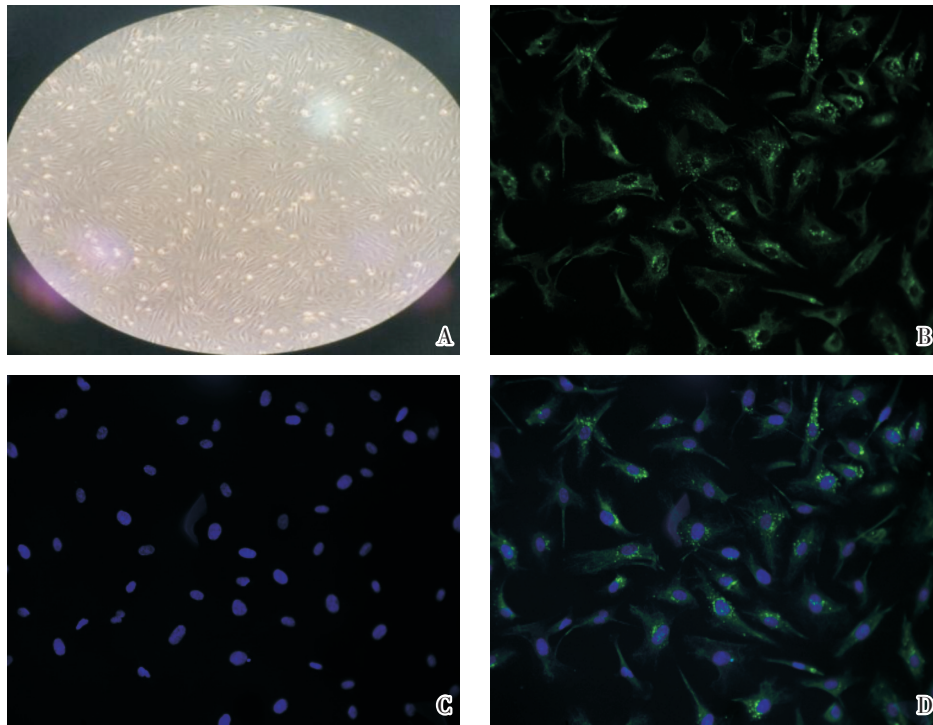
2 结果

2.1 人脐静脉血管内皮细胞的培养及鉴定

镜下形态显示(倒置显微镜, 10 \times), HUVECs 细胞呈饱满的椭圆或梭形, 致密排列铺满单层。间接免疫荧光结果显示, 细胞内 vWF 抗原呈阳性, 绿色荧光火焰似的均匀分布在胞浆内, 说明所培养的细胞是人脐静脉血管内皮细胞(图 1)。

2.2 I 型登革病毒感染人脐静脉血管内皮细胞

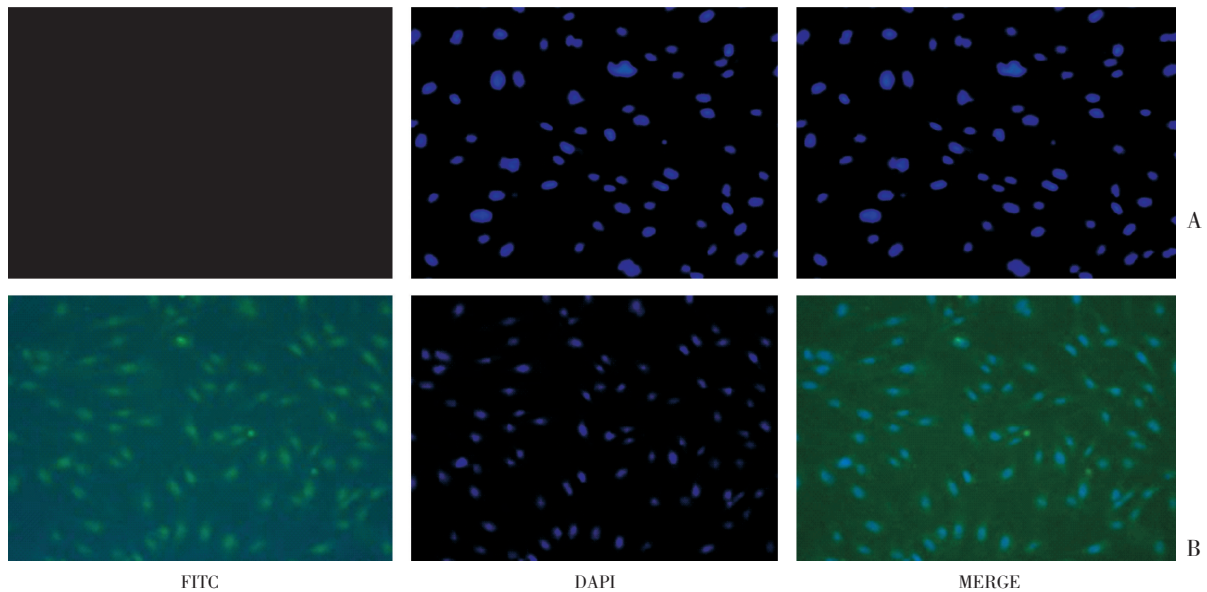
DENV-1 感染 HUVEC 24 h 后做间接免疫荧光实验(正置荧光显微镜, 10 \times), 结果显示, 与没有感染病毒的 HUVEC 对照组对比, DENV-1 特异性抗原的绿色荧光散在分布在胞浆, 表明 DENV-1 能感染 HUVEC(图 2)。



A: HUVEC in the microscopic views, ×10; B: Fluorescence staining for VWF in HUVEC, ×20

图1 人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)的培养鉴定

Fig.1 Identification of HUVEC



A: Negative control group; B: Viral-infected group

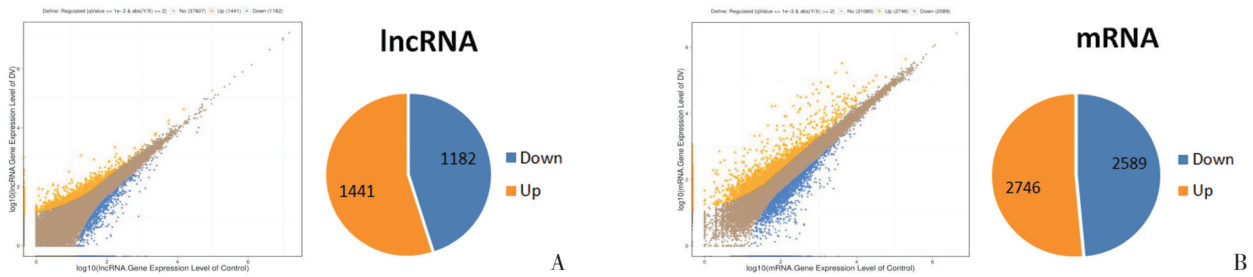
图2 DENV-1感染HUVEC后24 h DENV-1特异性抗原的免疫荧光检测

Fig.2 Fluorescence staining detection of DENV-1-specific antigen in HUVEC infected with DENV-1 for 24 hours

2.3 lncRNA 和 mRNA 组间差异表达分析

测序结果显示,病毒组与对照组之间的 lncRNA 和 mRNA 的表达差异。运用 DESeq 软件分析,设置 Fold Change ≥ 2 且 FDR ≤ 0.01 为显著差异基因的过滤条件,图3中的 X 轴是对照组样本基因

的表达量对数, Y 轴是病毒组样本表达量对数,蓝色代表下调的基因,橙色代表上调的基因,褐色是非显著差异基因。图3的 A 图为差异表达的 lncRNA, B 图为差异表达的 mRNA。此次测序共筛选到 2 623 个显著差异表达的 lncRNA 和 5 335 个显



A: Significant differentially expressed lncRNA between groups; B: Significant differentially expressed mRNA between groups

图3 组间显著差异表达的lncRNA和mRNA

Fig.3 Significantly differentially expressed lncRNA and mRNA between groups

表1 排名前10的上调或下调的显著差异表达的已知lncRNA

Table 1 Top 10 up or down significant differentially expressed know_lncRNA

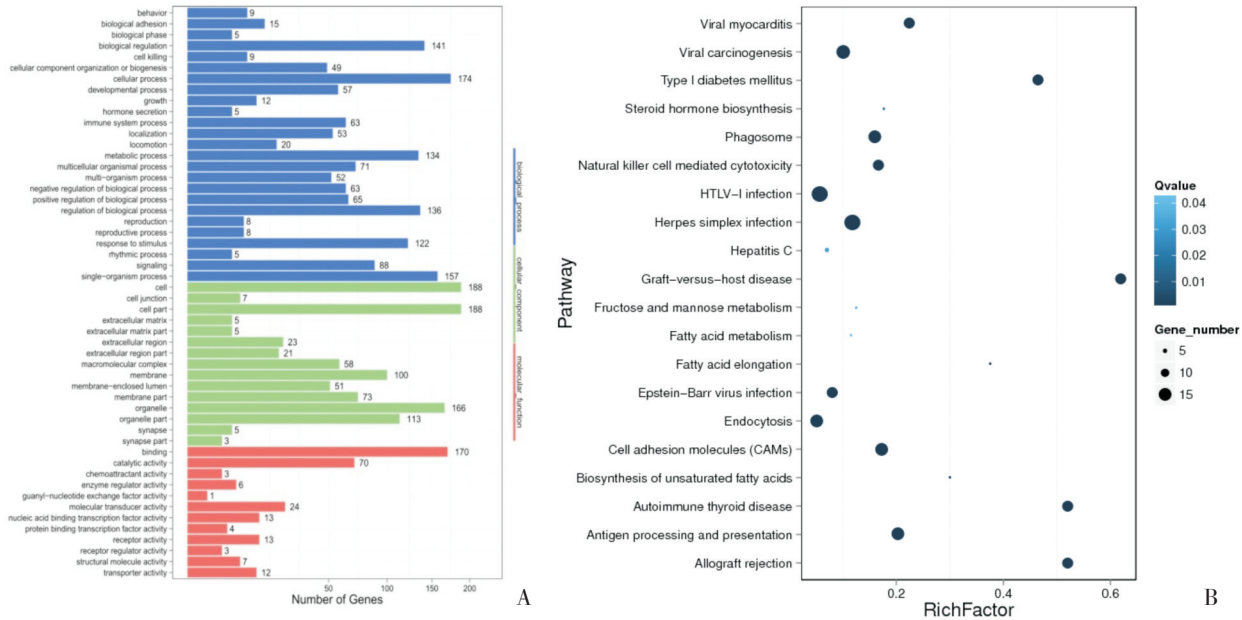
lncRNA transcript ID	log2Ratio(DV/Control)	Up or Down	RNA length	Chromosome
NONHSAT084827	9.57	Up	7 585	Chr22
NONHSAT160713	9.38	Up	876	Chr11
NONHSAT180327	8.98	Up	824	Chr19
NONHSAT181060	8.42	Up	2 724	Chr19
NONHSAT162875	8.40	Up	662	Chr12
NONHSAT212247	8.32	Up	614	Chr7
NONHSAT021502	8.10	Up	2 106	Chr11
NONHSAT140442	8.08	Up	866	Chr16
NONHSAT168169	7.71	Up	765	Chr14
NONHSAT151378	7.65	Up	1 487	Chr1
NONHSAT179500	-11.33	Down	1 382	Chr19
NONHSAT198917	-11.25	Down	838	Chr4
NONHSAT217414	-10.53	Down	620	Chr8
NONHSAT160863	-9.79	Down	878	Chr11
NONHSAT170899	-9.75	Down	1 417	Chr15
NONHSAT088940	-9.47	Down	4 513	Chr3
NONHSAT004254	-9.32	Down	402	Chr1
NONHSAT172842	-9.18	Down	1 209	Chr16
NONHSAT028112	-8.39	Down	429	Chr12
NONHSAT179313	-8.38	Down	1 886	Chr19

著差异表达mRNA表达。其中,有1441个lncRNA和2746个mRNA表达上调,1182个lncRNA和2589个mRNA表达下调。列举排名前10的lncRNA于表1。

2.4 GO、KEGG富集分析

通过GO富集分析lncRNA调控的mRNA所在

的生物学功能、途径和细胞定位,以及KEGG富集分析所在的信号通路。结果显示,GO富集分析(图4A)中,差异表达的靶基因的功能更多与应激反应(ontology: biological process, GO: 0050896),细胞内(ontology: cellular component, GO: 0005622),抗原结合(ontology: molecular fuction, GO: 0003823)



A: GO analysis; B: KEGG analysis

图4 GO和KEGG富集分析
Fig.4 GO and KEGG rich analysis

等有关。KEGG富集分析(图4B)发现,排名靠前的lncRNA调控的靶基因主要参与自身免疫反应、免疫排斥、抗原加工与提呈、细胞粘附、I型糖尿病、病毒性心肌炎和单纯疱疹感染等相关通路。

2.5 共表达网络分析

在GO富集分析biological process部分中选取与细胞损伤和血管生成有关的所有条目中的靶基因和lncRNAs进行整合,构建mRNA-lncRNA (Pearson ≥ 0.8)共表达网络分析图(图5),目的是找出与细胞功能改变、细胞损伤和通透性改变相关的重要靶基因和lncRNA。红色代表表达上调的靶基因lncRNA,绿色代表下调的靶基因和lncRNA,圆状为靶基因,三角状为lncRNA,形状的大小变化表示lncRNA调控的靶基因表达倍数的大小,实线表示靶基因与lncRNA的表达成正相关,虚线为负相关。一个lncRNA可调控一个或多个靶基因,一个靶基因可由一个或多个lncRNA所调控,基于共表达网络图中,DENV-1感染HUVEC后,宿主细胞差异表达的lncRNA主要调控以下几方面:抗原呈递、限制病毒复制(MHCI、SP100、B2M);干扰素产生(IRF7、HERC5、TREX1、Mx1);细胞凋亡(IL15RA、XAF1、IFITM3、IFI6);细胞粘附和血管通透性(IFITM3、BST2、VEGFA)。从测序结果中选3个lncRNA和1个mRNA进行RT-qPCR

验证测序,结果显示lncRNA:NONHSAT207308 ($n=6, t=-0.937, P=0.001$)、NONHSAT149597 ($n=6, t=-12.077, P<0.001$)表达下调;lncRNA:NONHSAT077292 ($n=6, t=3.703, P=0.021$)及预测靶基因SP100 ($n=6, Z=-1.993, P=0.046$)表达上调,差异有统计学意义,与测序结果相符(图6)。

3 讨论

长链非编码RNA(lncRNA)长度大,大部分经剪切加工有poly A尾似mRNA的结构,但不具有完整的开放阅读编码框或者开放阅读编码框短于50~100 nt,编码蛋白的可能性低^[15]。最初被认为是基因组转录的“噪音”或RNA聚合酶II转录的副产物,没有生物学功能,而后研究发现lncRNA可参与覆盖表观遗传调控、转录调控、转录后调控和蛋白翻译调控等各个基因调控层面^[16-18]。病毒感染方面,有限编码能力的病毒通过调控宿主细胞内lncRNA的表达,可促进病毒感染^[19]。

登革感染是世界性卫生问题,感染轻者出现自限性的登革热,重者则发展到登革出血热/登革休克综合征(Dengue hemorrhagic fever/Dengue shock syndrome, DHF/DSS),严重危及生命。至今,发现登革病毒感染致DHF/DSS的发病机制包括抗体

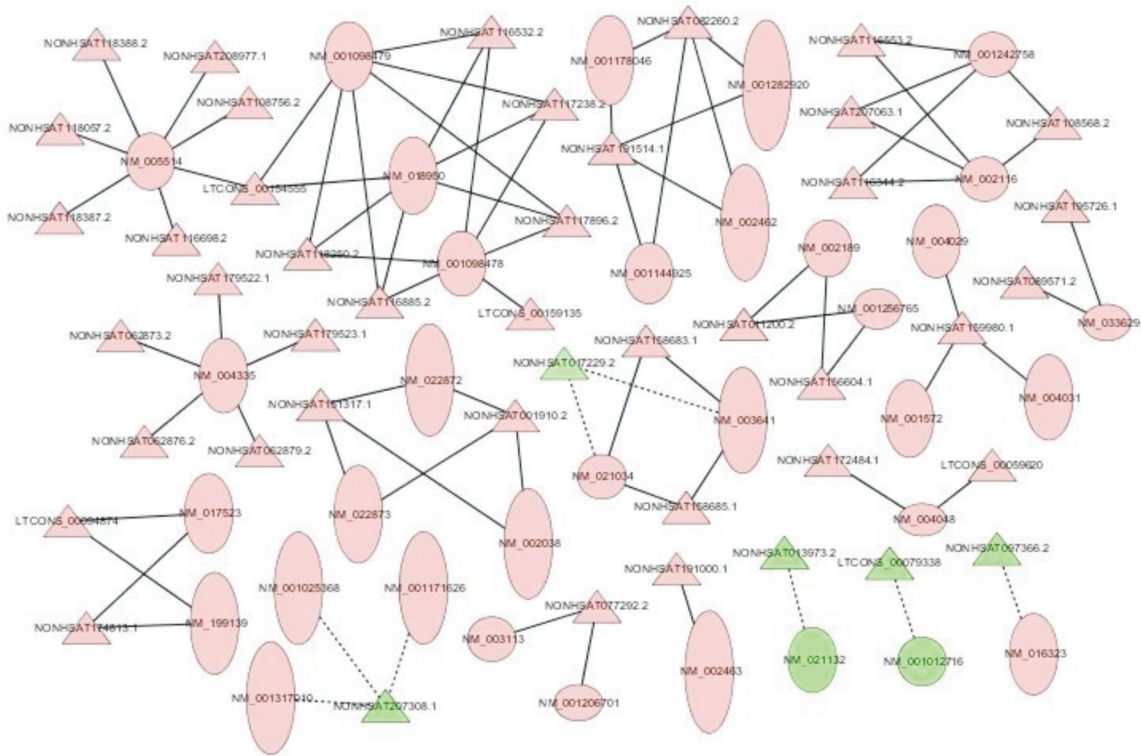
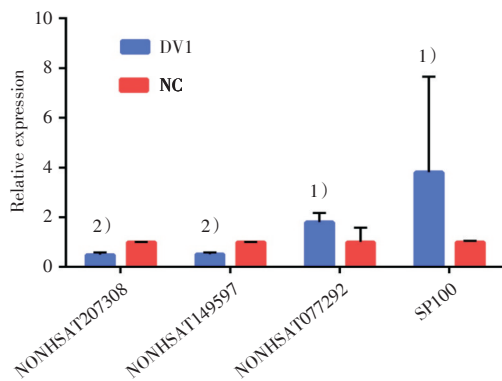


图5 LncRNA-mRNA 共表达网络图

Fig.5 LncRNA-mRNA co-expression network plot



1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ vs. Control

图6 RT-qPCR 验证测序数据

Fig.6 Verification of sequencing data by RT-qPCR

依赖增强作用、免疫细胞激活和细胞因子产生、细胞凋亡和血小板破坏,初次登革感染后血清型交叉反应的T细胞杀伤作用等^[20],但还未完全阐明。血管内皮细胞是登革病毒的宿主细胞,感染会导致细胞功能改变及受损,直接或间接会导致 DHF/DSS 的发生。近年来,我国主要的流行病毒株为 I 型登革病毒,所以我们以血管内皮细胞为感染对象,意在发现 DENV-1 致 DHF/DSS 的潜在分子发病机制,为今后 DHF/DSS 的预防和控制提

供思路。本研究分析发现 I 型登革病毒感染血管内皮细胞后,细胞内的 lncRNA 出现表达差异,可造成血管内皮细胞功能改变或损伤,与 DHF/DSS 发生发展有直接或间接的影响。

通过高通量测序,以设置 Fold Change ≥ 2 且 FDR ≤ 0.01 为显著差异基因的过滤条件,筛选出的有 2 623 个 lncRNA 和 5 335 个 mRNA 表达显著差异,其中上调的 lncRNA 和 mRNA 分别有 1 141 个和 2 746 个,下调的 lncRNA 和 mRNA 依次有 1 182 个和 2 589 个,其中包含 371 个此次测序出的新的 lncRNA,说明 I 型登革病毒感染血管内皮细胞,可致细胞内 lncRNA 和 mRNA 表达差异,且有新的 lncRNA 转录产生。GO 和 KEGG 是目前基因分类最为完善的两个数据库,为了确定组间的显著差异靶基因在哪些 GO 功能模块和哪些通路上更为集中,进行了 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析中,显著差异的靶基因富集在应激反应、对化学物质刺激或压力反应,信号转导等生物过程,提示 DENV-1 感染 HUVEC 后,这些显著差异的靶基因能促进分子与分子之间结合(分子与受体),活化下游分子,传导信号,激活一系列以抵抗病毒感染的应激反应或诱导细胞功能变化的信号通路。

例如,在GO的分子功能板块,显著差异表达的lncRNA富集于参与抗原结合、蛋白结合和血小板源生长因子受体结合功能;而在生物过程板块,差异表达的lncRNA更趋向于影响I型干扰素的形成、调控介导细胞因子活化的通路和抗原呈递过程。在KEGG富集分析中,排名靠前的显著差异的靶基因主要富集于自身免疫反应、免疫排斥、抗原加工与提呈、I型糖尿病、病毒性心肌炎、单纯疱疹感染相关通路上。自身免疫反应与免疫排斥反应是机体自身抗原发生的免疫反应,均有可能造成自身细胞或组织的免疫病理损伤。

因为我们较为关注哪些差异靶基因可能影响血管内皮细胞功能改变或损伤从而导致血管通透性增加,所以在GO富集结果中选取相关生物过程条目构建lncRNA-mRNA共表达网络图。发现导致血管内皮细胞损伤的主要关键靶基因可能位于抗原加工呈递、细胞凋亡、I和II干扰素信号通路、细胞粘附等生物过程中。测序结果显示lncRNA调控的*IRF7*、*IFI6*等基因高表达能促进I型、II型干扰素的产生,在一定程度上能干扰病毒复制,保护宿主;但另一方面,其可释放促炎症因子,例如IFN- γ 、TNF- α 、IL-1等,可介导血管内皮细胞发生渗漏。在抗原加工与提呈反应中,lncRNAs调控*MHC-I*的加速抗原加工和呈递,供CD4+T细胞的TCR识别,活化效应性T细胞,可直接杀伤靶细胞导致血管内皮细胞损伤死亡;另外,*BST2*、*CAMs*等关于细胞粘附的靶基因也表达差异,细胞粘附作用增强,可诱导驱使白细胞和血小板粘附聚集,激活的免疫细胞聚集后又可释放多种炎症介质,引起局部炎症反应,诱发内皮细胞功能改变和损伤^[21]。

让我们更为注意的是,发现差异表达的lncRNA参与调控多个与凋亡有关的基因或信号通

路。在表达倍数前10的lncRNA中,发现下调倍数高的NONHSAT088940.2(表4)调控靶基因NM_001256192和NM_001162429表达上调,通过NCBI注释为程序性死亡6相互作用蛋白(Programmed cell death 6 interacting protein, PDCD6IP),共表达网络中也出现与凋亡相关的靶基因如*IL-15RA*、*XAFA*、*IFITM3*、*IFI6*等高表达,此外p38MAPK信号通路、P13K-AKT信号通路、JAK-STAT信号通路的激活,一方面可分泌大量的炎症因子,可趋化招募其他免疫细胞聚集后杀伤靶细胞;一方面又可诱导细胞凋亡,其都会导致细胞功能改变、受损和死亡,细胞通透性增加,可发展为血浆渗漏、出血,影响DHF/DSS的发生发展。

KEGG分析出差异常表达的靶基因也富集于内吞作用和吞噬体的形成,有文献报道II、III型登革病毒感染进入血管内皮细胞(ECV304)与网络蛋白介导的内吞途径有关^[22-23],细胞质膜的内吞作用形成小泡(caveolae),可穿透细胞送出某些大分子物质,其过程也可引起细胞通透性的改变^[24],由此可见lncRNAs调控介导I型登革病毒利用内吞方式来完成对血管内皮细胞的入侵、脱壳和复制增殖,且一定程度导致细胞通透性发生变化。有趣的是,测序后发现有些靶基因富集于病毒致癌性的通路(ko:05203)上,类似EB、HBV、HPV感染会有致癌的可能,但是登革病毒感染是否具有致癌作用,需进一步实验研究。

总之,I型登革病毒感染血管内皮细胞后,细胞内lncRNAs表达差异,其调控作用可介导调控细胞凋亡和其他间接因素,例如细胞粘附、细胞因子和炎症因子的分泌,干扰素和其他信号通路的激活,诱导血管内皮细胞功能改变或受损死亡,细胞通透性增加及发生渗漏,与DHF/DSS有着密切的联系。

参考文献:

- [1] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 504-507.
- [2] 郭前方,崔国辉,方丹云,等. 2014年广东省登革热大流行的病原来源及分子进化特点[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(1):21-28. Guo QF, Cui GH, Fang DY, et al. Origin and Phylo-

genetic Characteristics of Dengue Virus Isolated from the Large Outbreak of Dengue in Guangdong Province in 2014 [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(1):21-28.

- [3] 帕岩回,胡挺松,张海林,等. 2016年云南畹町口岸地区登革热疫情的病原学和流行病学调查[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2017(4):234-238. Pa YH, Hu TS, Zhang HL, et al. Investigation on pathogen and epidemiology of dengue fever epide-

- micinWanding port area of Yunnan province, China in 2016 [J]. *Chin J Front Health Quarant*, 2017 (4):234-238.
- [4] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2001, 12(2):147-147.
- [5] Costa F. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology[J]. *Gene*, 2005, 357(2):83-94.
- [6] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions [J]. *Nat Rev Genetics*, 2009, 10(3):155-159.
- [7] Mazar J, Zhao W, Khalil AM, et al. The Functional Characterization of Long Noncoding RNA SPRY4-IT1 in Human Melanoma Cells [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19):8959-8969.
- [8] Saayman S, Ackley A, Turner AMW, et al. An HIV-Encoded Antisense Long Noncoding RNA Epigenetically Regulates Viral Transcription [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(6):1164-1175.
- [9] Lau CC, Sun T, Ching AK, et al. Viral-human chimeric transcript predisposes risk to liver cancer development and progression [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(3):335-349.
- [10] Peng X, Gralinski L, Armour CD, et al. Unique Signatures of Long Noncoding RNA Expression in Response to Virus Infection and Altered Innate Immune Signaling[J]. *Mbio*, 2010, 1(5): e00206-10.
- [11] Sonkoly E, Bata-Csorgo Z, Pivarsci A, et al. Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS [J]. *J Bio Chem*, 2005, 280(25):24159-24167.
- [12] Iwakiri D, Takada K. Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection [J]. *Adv Cancer Res*, 2010, 107(3):119-136.
- [13] Reeves MB, Davies AA, Mcsharry BP, et al. Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death [J]. *Science*, 2007, 316(5829):1345-1348
- [14] 江丽芳, 江振友, 郭辉.登革病毒对人血管内皮细胞感染性的研究[J]. *中国病毒学*, 1997, 45(45):598-600.
Jiang LF, Jiang ZY, GUO HY. Study on dengue virus infection of human endothelial cells [J]. *Virologica Sinica*, 1997, 45(45):598-600.
- [15] 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.
- [16] Tiffany Hung, Chang HY. Long noncoding RNA in genome regulation [J]. *Rna Bio*, 2010, 7(5):582-585.
- [17] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncodingRNAs [J]. *Mol Cell* .2011, 43(6):904-914.
- [18] Chen YA, Aravin AA. Non-Coding RNAs in Transcriptional Regulation [J]. *CurrMolBiol Rep*, 2015, 1(1):1-9.
- [19] 于俊涛, 吴文才, 张雪青, 等. 长链非编码RNA及其与病毒关系的研究进展[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 38(3):354-360.
Yu JT, Wu WC, Zhang XQ, et al. Research progress in long noncoding RNA and its relationship with virus [J]. *J Zhe Jiang Normal Univ (Nat Sci)*, 2015, 38(3):354-360.
- [20] 晏辉钧, 江丽芳. 登革出血热发病机制的研究进展[J]. *热带医学杂志*, 2003, 3(3):372-374.
Yan HJ, Jiang LF. Advances in the pathogenesis of dengue haemorrhagicfever [J]. *J Trop Med*, 2003, 3(3):372-374.
- [21] 肖瑞. 登革病毒对血管内皮细胞粘附分子表达的影响[D]. 暨南大学, 2006.
Xiao R. Effect of the expression of CAM on HU-VECs induced by DV2 [D]. *Ji Nan Univ*, 2006.
- [22] 彭涛. Clathrin 内吞途径在登革病毒进入 ECV304 细胞过程中作用的研究 [D]. 第三军医大学, 2006.
Peng T. Infectious entry of Dengue virus type 2 into ECV304 cells occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway [D]. *Army Medical Univ*, 2006.
- [23] Piccini L E, Castilla V, Damonte E B. Dengue-3 Virus Entry into Vero Cells: Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in the Outcome of Infection [J]. *Plos One*, 2015, 10(10):e0140824.
- [24] 赵克森, 黄巧冰. 血管通透性增高的基本机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(4):549-553.
Zhao KS, Huang QB. The basic mechanism of increased microvascular permeability [J]. *Chin J Pathophys*, 2003, 19(4):549-553.

(编辑 孙慧兰)