

# lncRNA BDNF-AS 在氧糖剥夺/复氧复糖条件下的表达、定位及互作蛋白质分析

李建明<sup>1\*</sup>, 唐亮<sup>1</sup>, 向勤<sup>1</sup>, 杨大为<sup>1</sup>, 项炬<sup>2</sup>

(1. 长沙医学院 基础医学院, 中国湖南 长沙 410219; 2. 中南大学 计算机学院, 中国湖南 长沙 410083)

**摘要:** 脑缺血缺氧会引起长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 表达变化。为了探究 lncRNA BDNF-AS 在氧糖剥夺/复氧复糖条件下的表达、定位及互作蛋白质, 将 SH-SY5Y 细胞缺氧缺氧 8 h、复氧复糖 24 h, 构建氧糖剥夺/复氧复糖细胞模型; 采用 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 法检测细胞活力; 采用 qRT-PCR 检测核质中 lncRNA BDNF-AS 表达水平; 利用 pull-down 和质谱技术对 lncRNA BDNF-AS 互作蛋白质进行鉴定; 利用基因本体论 (Gene Ontology, GO)、京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析互作蛋白质的功能及参与的通路; 利用 STRING 数据库分析蛋白质-蛋白质相互作用网络。结果显示: 氧糖剥夺/复氧复糖条件下, lncRNA BDNF-AS 表达量显著升高, 且胞质表达量显著高于胞核; 氧糖剥夺/复氧复糖组有 120 种蛋白质可能与 lncRNA BDNF-AS 存在潜在的相互作用。进一步的生物信息学分析表明, lncRNA-BDNF-AS 可能与 UBA52、NKAP、TBK1、RAB1A、RPL38 等蛋白质存在互作关系。综上所述, lncRNA BDNF-AS 可能通过绑定自噬和凋亡相关蛋白质影响神经细胞功能。

**关键词:** lncRNA BDNF-AS; 脑缺血; 氧糖剥夺/复氧复糖 (OGD/R); 互作蛋白质

中图分类号: Q752, R743.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)01-0001-08

## Expression, Localization and Protein-protein Interaction Analysis of lncRNA BDNF-AS Under Oxygen and Glucose Deprivation/Reoxygenation Condition

LI Jianming<sup>1\*</sup>, TANG Liang<sup>1</sup>, XIANG Qin<sup>1</sup>, YANG Dawei<sup>1</sup>, XIANG Ju<sup>2</sup>

(1. School of Basic Medical Sciences, Changsha Medical University, Changsha 410219, Hunan, China; 2. School of Computer Science and Engineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China)

**Abstract:** Cerebral ischemia and hypoxia can cause the change of long non-coding RNA (lncRNA) expression. To investigate the expression and localization of lncRNA BDNF-AS and its interacting proteins under the condition of oxygen and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R), SH-SY5Y cells were treated with hypoxia for 8 h and reoxygenation (R) for 24 h to establish a OGD/R cell model. The cell viability was measured by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. The expression level of lncRNA-BDNF-AS was detected by qRT-PCR in both the nucleus and cytoplasm. The interacting proteins of lncRNA BDNF-AS were analyzed by using pull-down method and mass spectrometry. Functional analysis of interacting proteins was performed using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. The protein-protein interaction network was analyzed using STRING database. Under OGD/R condition, the expression of lncRNA BDNF-AS was significantly increased, and was significantly higher in the cytoplasm than in the nucleus. In the OGD/R group, there were 120 kinds of specific proteins expressed in SH-SY5Y cells. Bioinformatic analysis showed

收稿日期: 2022-06-27; 修回日期: 2022-10-21; 网络首发日期: 2022-12-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81873780); 湖南省教育厅科学研究项目(21A0586, 22A0662); 湖南省卫计委科学研究项目(2022-02082739); 长沙市杰出创新青年培养计划项目(kq2206058, kq2206056); 湖南省应用特色学科资助项目

作者简介: \* 通信作者: 李建明(1975—), 男, 湖南娄底人, 博士, 教授, 主要从事神经退行性疾病机制及药物干预研究, E-mail: ljming-su@163.com。

that lncRNA BDNF-AS might interact with proteins including UBA52, NKAP, TBK1, RAB1A and RPL38. Therefore, lncRNA BDNF-AS may affect neuronal function by binding autophagy- and apoptosis-associated proteins.

**Key words:** lncRNA BDNF-AS; cerebral ischemia; oxygen and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R); interacting protein

(*Life Science Research*, 2023, 27(1): 001-008)

慢性脑缺血是老年人死亡和长期残疾的主要原因之一,不可逆性脑损伤的频繁发生和神经元功能的丧失,导致认知功能障碍和某些运动功能障碍<sup>[1]</sup>。随着年龄的增长,慢性脑缺血被认为是血管性痴呆、阿尔茨海默病等神经退行性疾病和认知障碍的主要原因<sup>[2-3]</sup>。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是转录本长度超过 200 nt, 缺少完整的开放阅读框, 无蛋白质编码功能的 RNA 分子。其可通过表观遗传修饰、选择性剪接、转录后调控和翻译调控等多种机制参与调控蛋白质编码和表观遗传基因<sup>[4]</sup>。lncRNA 的失调与人类动脉粥样硬化、脑卒中等血管疾病密切相关<sup>[5]</sup>。

lncRNA BDNF-AS 是脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 编码基因的天然反义转录物。其基因在第 5 外显子位置与 BDNF 基因重叠, 且有一段 225 bp 序列完全互补, 与 BDNF 基因转录方向相反<sup>[6]</sup>。BDNF 与血管性痴呆、阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病相关<sup>[7-8]</sup>。研究表明, lncRNA BDNF-AS 在 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的帕金森病模型、多巴胺神经元以及 MPP<sup>+</sup> 处理的 SH-SY5Y 细胞中表达上调<sup>[9]</sup>。此外, 在布比卡因诱导背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 神经毒性的过程中, lncRNA BDNF-AS 呈剂量依赖性和时间依赖性显著上调<sup>[10]</sup>。但目前, lncRNA BDNF-AS 在氧糖剥夺/复氧复糖 (oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 条件下 SH-SY5Y 细胞模型中的表达及作用情况还未知。本研究主要通过检测 OGD/R SH-SY5Y 细胞模型中 lncRNA BDNF-AS 的表达变化, 分析 lncRNA BDNF-AS 的细胞定位及互作蛋白质, 以期为后续进一步阐明 lncRNA BDNF-AS 在神经细胞缺氧中的作用提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞分组及处理

在含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)

(Gibco 公司, 美国) 的 MEM (minimum Eagle's medium) 培养基 (Gibco 公司, 美国) 中培养 SH-SY5Y 细胞 (湖南丰晖生物科技有限公司), 培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。24 h 后于倒置显微镜下观察细胞形态。当细胞生长到 80% 融合度时, 用 0.05% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (南京建成生物工程研究所) 消化液消化后备用。SH-SY5Y 细胞分为正常对照组和氧糖剥夺/复氧复糖 (OGD/R) 组。OGD/R 组细胞先在含无糖 Earle (南京建成生物工程研究所)、95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的条件下缺氧处理 4 h、6 h、8 h, 再复氧复糖处理 24 h、48 h。

### 1.2 细胞活力检测

收集各组对数生长期细胞并计数。将细胞种到 96 孔板中, 密度为 5 000 个/孔, 每孔加 1/10 体积 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 溶液 (武汉博士德生物工程有限公司), 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 h。采用酶联免疫法测定各孔光密度 (optical density, OD) 值 (450 nm 波长)。

### 1.3 核质分离

取各组对数生长期的细胞 (1×10<sup>6</sup>~3×10<sup>6</sup> 个细胞), 加入 500 μL 破膜缓冲液 (湖南丰晖生物科技有限公司), 裂解 5 min。4 °C、500g 离心 5 min, 吸取上清 (细胞质部分), 加入裂解液 (湖南丰晖生物科技有限公司)。剩余的沉淀 (细胞核部分) 用 200 μL 破膜缓冲液洗涤, 500g 离心 5 min, 弃去上清; 加入 500 μL 破核缓冲液 (湖南丰晖生物科技有限公司), 裂解 15 min; 加入裂解液, 提取 RNA。

### 1.4 RNA 提取及荧光定量 PCR

#### 1.4.1 RNA 提取

采用 TRIzol 法提取全细胞、细胞质及细胞核 RNA。采用紫外分光光度法检测 RNA 纯度及浓度 (NanoDrop, 美国赛默飞世尔科技公司)。取 OD 值在 1.8~2.0 的 RNA 进行鉴定, 确定 RNA 无明显降解。

#### 1.4.2 实时荧光定量 PCR

采用 PrimeScript™ RT Master Mix (Invitrogen 公司, 美国) 将 500 ng 的 RNA 反转录成 cDNA。在

ABI 7500 系统(ABI 公司, 美国)上, 用 SYBR® Pre-mix Ex Taq™ (Takara 公司, 日本)进行实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR)实验。以  $\beta$ -actin (Sigma 公司, 美国)表达水平作为标准化内参。lncRNA BDNF-AS 表达水平按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行计算。引物序列见表 1。

## 1.5 RNA pull-down 实验

### 1.5.1 体外转录与纯化

针对 lncRNA BDNF-AS 上下游设计引物, 引物序列见表 2。使用 PrimeSTAR 高保真酶(Sigma 公司, 美国)扩增目的片段。切胶回收目的片段后, 取 0.5  $\mu$ g PCR 纯化 DNA 产物。用 T7 体外转录试剂盒(Invitrogen 公司, 美国)进行转录: 37 °C 孵育 3 h, 反应体系中加入 1  $\mu$ L DNase I (Sigma 公司, 美国); 37 °C 孵育 15 min, 将 DNA 模板消化。用 RNeasy Mini Kit 试剂盒(QIAGEN 公司, 德国)纯化转录后的 RNA。

### 1.5.2 磁珠制备

取 3  $\mu$ g 生物素 (biotin) 标记的 RNA, 加入 50  $\mu$ L Structure 缓冲液(广州辉骏生物科技股份有限公司)。95 °C 加热 2 min, 冰浴 3 min, 室温静置 30 min。使用 RIPA 裂解缓冲液(北京天根生化科技有限公司) 500  $\mu$ L 冲洗磁珠 3 次后, 用 50  $\mu$ L RIPA 裂解缓冲液重悬磁珠。将磁珠加入到 RNA 中, 室温孵育 1 h。将磁珠与 RNA 的混合物去上清, 随后用 RIPA 裂解缓冲液冲洗 3 次, 缓慢翻转混匀。

### 1.5.3 RNA pull-down 分析

用 500  $\mu$ L RIPA 裂解缓冲液裂解细胞, 弃沉淀, 保留上清。往制备的磁珠-RNA 混合物中加入上述上清液, 室温孵育 1 h。将孵育好的磁珠-

RNA-蛋白质混合物弃上清, 使用 RIPA 裂解缓冲液冲洗 5 次, 1 次 1 mL。向磁珠中加入洗脱液(北京天根生化科技有限公司), 于室温条件下在混匀仪上洗脱 15 min。取部分洗脱产物于混合物中, 加 2 $\times$  SDS 上样缓冲液, 95 °C 变性 10 min, 进行 SDS-PAGE 分析; 剩下的产物用于质谱分析。

## 1.6 质谱分析

向蛋白质溶液中加入 4  $\mu$ L 0.05 mol/L 三(2-氯乙基)磷酸酯[tris (2-chloroethyl) phosphate, TCEP] 溶液(Sigma 公司, 美国), 60 °C 反应 1 h。还原后, 加入 55  $\mu$ L 甲基硫代磺酸甲酯(methyl methanethio-sulfonate, MMTS)溶液(mmol/L, 美国 Sigma 公司), 室温避光 45 min。将蛋白质溶液加入超滤管, 12 000g 离心 20 min, 留沉淀。加入 100  $\mu$ L 8 mol/L 尿素(urea, UA)溶液(pH 8.5) (Amresco 公司, 美国), 12 000g 离心 20 min, 离心两次, 留沉淀。加入 100  $\mu$ L 0.25 mol/L 三乙胺-硼烷(triethylamine borane, TEAB) (Sigma 公司, 美国), 12 000g 离心 20 min, 重复 3 次, 留沉淀。加入 50  $\mu$ L 0.5 mol/L TEAB 和 2% 胰酶(Promega 公司, 美国) (胰酶与蛋白质的质量比为 1 : 50), 37 °C 孵育过夜(12 h)。次日补加 1% 胰酶(胰酶与蛋白质质量比为 1 : 100), 37 °C 孵育 4 h。肽段用样品溶解液(0.1% 甲酸、2% 乙腈)溶解, 4 °C、13 200 r/min 离心 20 min, 取上清, 进行质谱鉴定。色谱柱信息: 300  $\mu$ m ID  $\times$  5 mm, Acclaim PepMap RSLC C18, 5  $\mu$ m, 100  $\text{Å}$  (160454, 美国 Thermo 公司); Acclaim PepMap 75  $\mu$ m  $\times$  150 mm, C18, 3  $\mu$ m, 100  $\text{Å}$  (160321, 美国 Thermo 公司)。流动相信息: 流动相 A 为 0.1% 甲酸; 流动相 B 为 0.1% 甲酸、80% 乙腈; 流速为 300 nL/min。分析时间: 65 min。获取 RAW 格式的原始质谱数

表 1 lncRNA BDNF-AS qRT-PCR 引物  
Table 1 The qRT-PCR primers of lncRNA BDNF-AS

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Actin-175-forward	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
Actin-175-reverse	GAAGGTAGTTTCGTGGATGCC
lncRNA BDNF-AS-158-forward	GATTGCCAGGCCTGACGACT
lncRNA BDNF-AS-158-reverse	CTCCAATGATCATGCTCCCTCC

表 2 lncRNA BDNF-AS PCR 扩增引物  
Table 2 The primers of lncRNA BDNF-AS

Primer name	Primer sequence (5'→3')
T7-BDNF-AS-forward	TAATACGACTCACTATAGGGATCGGAGATCAGGAAGG
T7-BDNF-AS-reverse	CACTGAAAAGTCTTGCCCCAC
T7-BDNF-AS-AF	ATCGCGAGATCAGGAAGG
T7-BDNF-AS-AR	TAATACGACTCACTATAGGGCACTGAAAAGTCTTGCCCCAC

据。将质谱文件和蛋白质检索库输入 Protein-Pilot™ software (version 4.5, 美国 AB SCIEX 公司) 进行质谱检索。

## 1.7 生物信息学分析

### 1.7.1 GO 和 KEGG 分析

对 OGD/R 组独有的差异蛋白质进行生物信息学分析。利用 QuickGO 从 3 个方向(细胞组分、生物过程和分子功能)对目标蛋白进行注释(<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>; 2022-03-15), 并统计 3 个方向所涉及的基因本体论(Gene Ontology, GO)条目及其蛋白质数目。使用京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>; 2022-03-15)对目标蛋白进行通路注释。根据通路条目信息表数据, 绘制目标蛋白的通路分类图。

### 1.7.2 蛋白质互作分析

蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络采用 STRING 软件(<https://cn.string-db.org/>; 2022-03-16)进行分析。阈值得分设置为>0.4, 对比数据设置为 *Homo sapiens*。

## 1.8 统计分析

使用 Image J (Vision 1.8.0.112) (<https://imagej.en.softonic.com/>; 2022-02-19)对蛋白质凝胶图像进行灰度分析。采用 OptiQuant 软件(Packard Instruments 公司, 美国)分析免疫反应物的 OD 值。所有数据采用 SPSS 20.0 软件分析。资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 两组间资料比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。所有实验重复 3 次,  $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OGD/R 条件下 lncRNA BDNF-AS 的表达及定位

为了研究 lncRNA BDNF-AS 在 OGD/R 条件下的表达变化及定位, SH-SY5Y 细胞首先被缺氧缺糖处理 4 h、6 h、8 h, 然后再复氧复糖处理 24 h、48 h, 最后采用 CCK-8 法检测细胞活力, 并采用核质分离及 qRT-PCR 法检测 lncRNA BDNF-AS 的表达量。结果显示: 与缺氧缺糖处理 0 h 组相比, 缺氧缺糖处理 4 h、6 h、8 h 及复氧复糖处理 24 h 后, 细胞活力均显著降低( $P < 0.05$ ) (图 1A); 而且, 与正常对照组相比, 缺氧缺糖处理 4 h、6 h、8 h, 复氧复糖处理 24 h 后, lncRNA BDNF-AS 表达量有上升趋势, 但是只有缺氧缺糖处理 8 h、复氧复糖处理 24 h 组的 lncRNA BDNF-AS 表达上调显著( $P < 0.05$ ) (图 1B)。因此, 后续实验的细胞模型采用缺氧缺糖 8 h、复氧复糖 24 h 的处理条件。此外, OGD/R 处理后, 胞质中 lncRNA BDNF-AS 的表达量显著升高( $P < 0.05$ ), 而胞核中的表达量无显著差异( $P > 0.05$ ) (图 1C、D), 说明 OGD/R 条件下, lncRNA BDNF-AS 主要在胞质中表达。

### 2.2 lncRNA BDNF-AS 互作蛋白质鉴定

为检测 lncRNA BDNF-AS 互作蛋白质的种类与功能, 采用 RNA pull-down 实验及质谱检测分析 lncRNA BDNF-AS 绑定的蛋白质。1%的琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, PCR 产物经电泳后

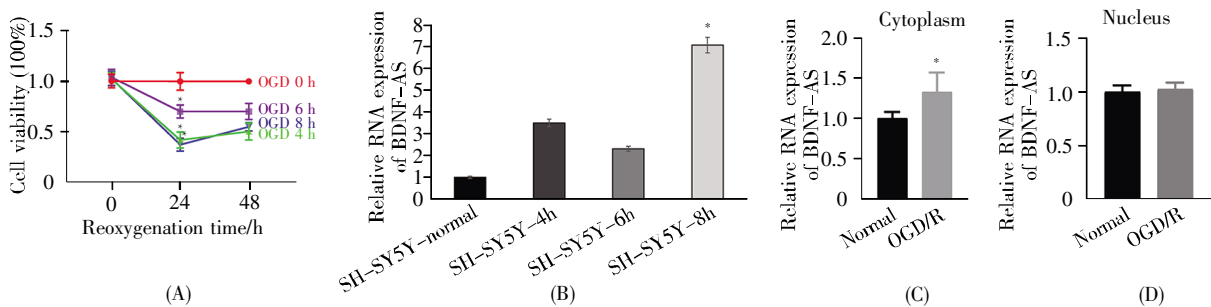


图 1 OGD/R 条件下, SH-SY5Y 细胞活力及 lncRNA BDNF-AS 的表达水平与核质定位

(A) 氧糖剥夺 4 h、6 h、8 h 及复氧复糖处理 24 h 或 48 h 条件下, SH-SY5Y 细胞活力的变化; (B) 氧糖剥夺 4 h、6 h、8 h 及复氧复糖处理 24 h 条件下 lncRNA BDNF-AS 表达水平; (C) 核质分离后 lncRNA BDNF-AS 在胞质的表达水平; (D) 核质分离后 lncRNA BDNF-AS 在胞核的表达水平。“\*”表示与正常对照组相比差异显著,  $P < 0.05$ 。

Fig.1 Detection of SH-SY5Y cell viability, lncRNA BDNF-AS expression level and nucleoplasmic localization under the condition of OGD/R

(A) SH-SY5Y cell viability after exposure to OGD for 4 h, 6 h and 8 h, and reoxygenation for 24 h and 48 h; (B) The expression level of lncRNA BDNF-AS after exposure to OGD for 4 h, 6 h and 8 h, and reoxygenation for 24 h; (C) The expression level of lncRNA BDNF-AS in the cytoplasm after nucleoplasm separation; (D) The expression level of lncRNA BDNF-AS in the nucleus after nucleoplasm separation. “\*” indicates significant difference compared with the normal group,  $P < 0.05$ .

的片段大小与目的片段大小相符(图 2A)。SDS-PAGE 结果显示, pull-down 洗脱液有明显的条带, 并且两个磁珠样本均没有太多蛋白质条带(图 2B), 说明结合蛋白质洗脱良好, 可直接进行质谱检测。正常对照组和 OGD/R 组差异蛋白质的对比分析结果显示, OGD/R 组的潜在互作蛋白质有 120 种, 其中特有蛋白质 105 种(图 2C)。

### 2.3 lncRNA BDNF-AS 互作蛋白质 GO 和 KEGG 富集分析

采用 GO 和 KEGG 分析 lncRNA BDNF-AS 互作蛋白质的生物学功能。GO 分析表明, lncRNA BDNF-AS 潜在的互作蛋白质富含 180 种细胞成分, 其中与神经系统疾病相关的有: 泛素连接酶复合体、核糖核蛋白复合体、蛋白酶复合体、轴突胞质等; 参与了 48 个分子功能, 其中与神经系统疾病相关的有: 钙依赖性磷脂结合、载脂蛋白结合、谷氨酸受体结合、钙结合等; 涉及 180 个生物过程, 其中与神经系统疾病相关的有: 神经发生调节、Notch 信号通路、细胞凋亡负调控、NF- $\kappa$ B 转录因子活性的负调控、神经胶质细胞细胞凋亡负调控等(图 3A)。

KEGG 通路富集分析表明, lncRNA BDNF-AS 潜在的互作蛋白质参与多条生物学通路, 其中与神经系统疾病相关的有: 细胞自噬、线粒体自噬、神经退行性疾病、Ras 信号通路、Toll 样受体途径、NOD 样受体途径等(图 3B)。

PPI 分析表明, lncRNA BDNF-AS 可能与泛素-52 氨基酸融合蛋白(ubiquitin-52 amino acid fusion protein, UBA52)、RAB3 GTPase 激活非催化蛋白亚基 2 (RAB3 GTPase activating non-catalytic protein subunit 2, RAB3GAP2)、NF- $\kappa$ B 激活蛋白 (NF- $\kappa$ B activating protein, NKAP)、TANK 结合激酶 1 (TANK binding kinase 1, TBK1)、RAB1A、R 蛋白 L38 (R-protein L 38, RPL38) 等蛋白质存在互作关系(图 4)。

## 3 讨论

在人类神经发育和疾病中, lncRNA 是中枢和周围神经系统神经成熟、损伤、变性或再生的关键调控因子<sup>[11-13]</sup>。lncRNA BDNF-AS 是众多有功能的 lncRNA 中自然保守的非编码反义 RNA 转录本之一, 在各种人体和动物组织中均有表达, 对抑制神经营养因子 BDNF 的转录具有显著作用。Modarresi 等<sup>[14]</sup>证明, 通过下调 lncRNA BDNF-AS, BDNF 被去抑制, 从而促进神经突生长。因此, lncRNA BDNF-AS 可能对神经发育或再生具有重要的调节作用。此外, Zhang 等<sup>[10]</sup>报道, 下调 lncRNA BDNF-AS 可减少背根神经节神经元的凋亡。Zheng 等<sup>[15]</sup>发现, 干扰小 RNA (small interfering RNA, siRNA) 介导的 lncRNA BDNF-AS 下调可改善小鼠胚胎神经干细胞来源的神经元的凋亡, 并诱导神经突生长, 提示 lncRNA BDNF-AS

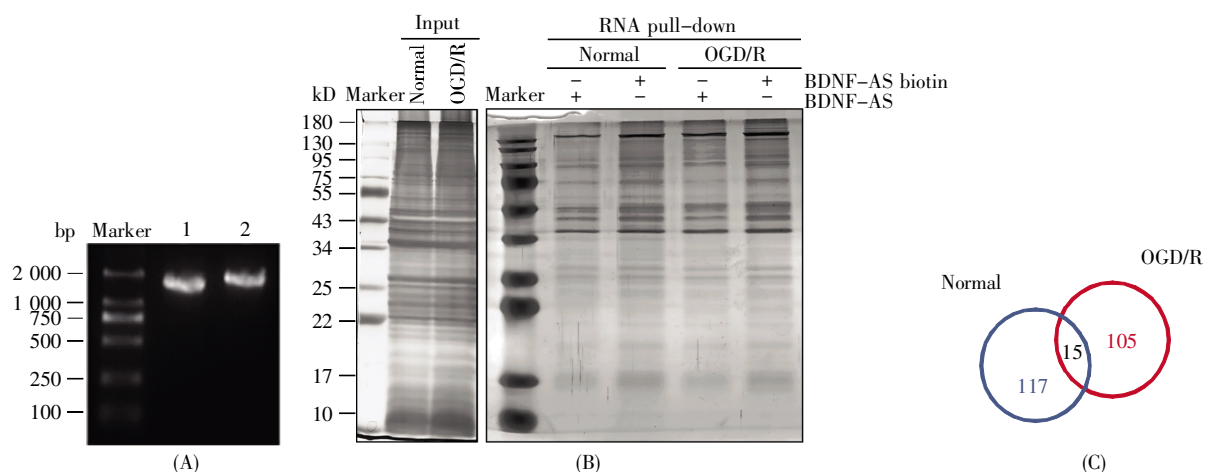


图 2 lncRNA BDNF-AS 互作蛋白质分析

(A) 转录产物琼脂糖凝胶电泳图。1: *BDNF* 基因正义链转录物, 2: *BDNF* 基因反义链转录物; (B) Pull-down 洗脱液的 SDS-PAGE 胶图; (C) 正常对照组和 OGD/R 组差异蛋白质的对比分析。

### Fig.2 Analysis of lncRNA BDNF-AS interaction proteins

(A) Agarose electrophoresis of transcription products. 1: Transcript of *BDNF* gene sense sequence; 2: Transcript of *BDNF* gene antisense sequence; (B) SDS-PAGE of pulled down proteins; (C) Analysis of the differential proteins between the normal group and OGD/R group.



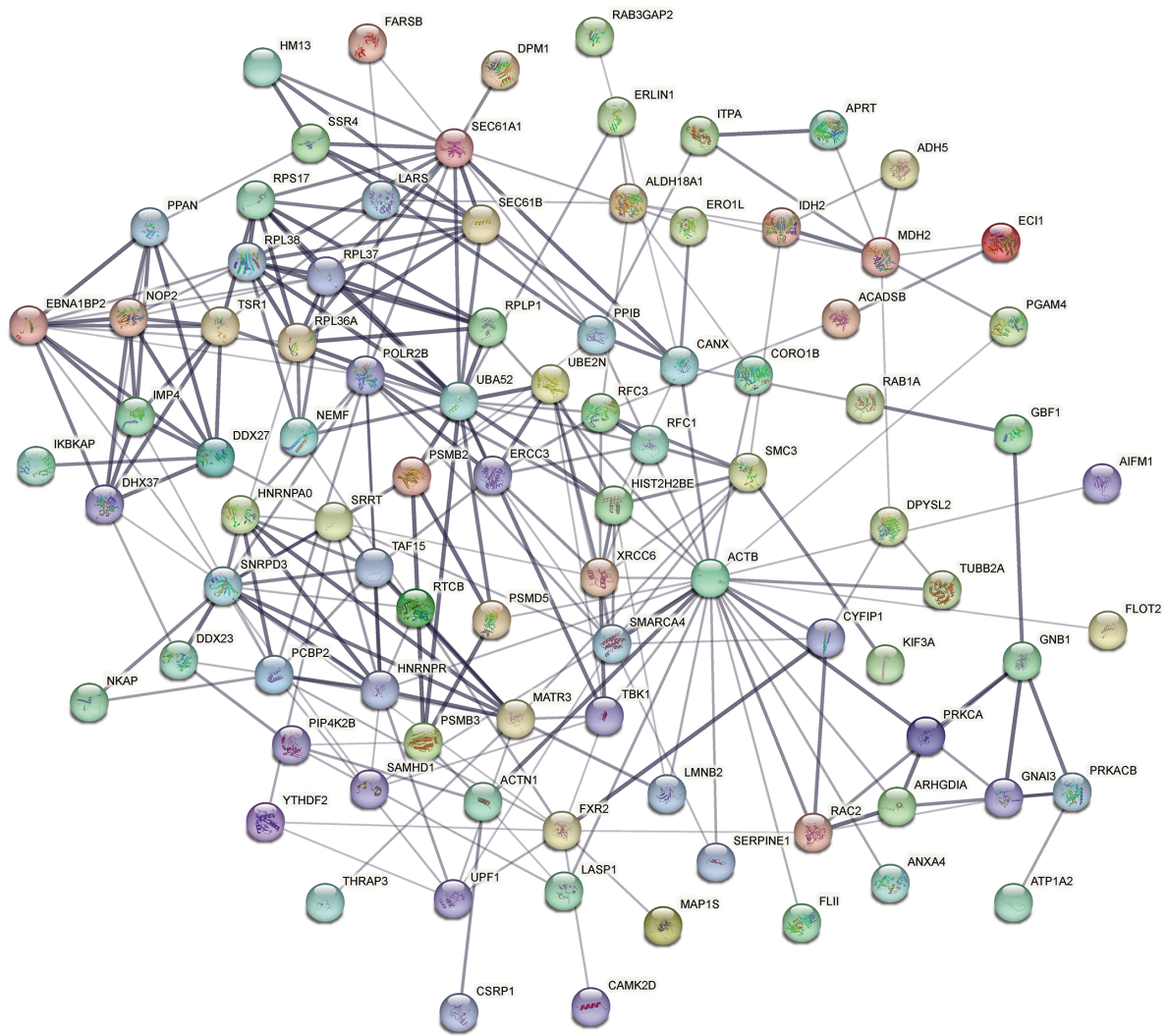


图 4 lncRNA BDNF-AS 互作蛋白质的 PPI 分析

Fig.4 PPI analysis of lncRNA BDNF-AS interacting proteins

TBK1 蛋白特异性表达。研究表明,脑缺血会造成明显的神经元损伤,缺血后处理通过激活自噬可减少神经元的凋亡,从而减轻脑缺血损伤<sup>[21]</sup>。王娜娜<sup>[22]</sup>使用氧化损伤诱导物  $H_2O_2$  处理原代神经元后发现, TBK1 蛋白可调控 OPTN (optineurin) 蛋白从线粒体解离,并携带 OPTN 一同转运进核,最终阻碍 Parkin 介导的线粒体自噬。另有研究报道, TBK1 激酶以及自噬受体 P62 的突变可增加神经退行性疾病的发病风险,其机制可能与 TBK1 蛋白通过磷酸化 P62 调节选择性自噬有关<sup>[23]</sup>。此外,本研究利用质谱方法得出, OGD/R 条件下 SH-SY5Y 细胞系有自噬相关的 TBK1 蛋白的特异性表达。此结果提示, OGD/R 可能诱导 SH-SY5Y 细胞自噬。

综上所述, lncRNA BDNF-AS 在 OGD/R 的 SH-SY5Y 细胞模型中表达上调; OGD/R 条件下

lncRNA BDNF-AS 定位于 SH-SY5Y 细胞质; lncRNA BDNF-AS 可能通过绑定自噬(TBK1)和凋亡(AIFM1、NKAP、RAC2 和 RAB1A)相关蛋白质调控细胞自噬和凋亡。

#### 参考文献(References):

- [1] 穆浩月, 鞠奕, 赵性泉. 慢性脑缺血病理生理机制与临床表现的研究进展[J]. 中国医学前沿杂志(电子版) (MU Haoyue, JU Yi, ZHAO Xingquan. Research progress on pathophysiological mechanism and clinical manifestation of chronic cerebral hypoperfusion[J]. Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science (Electronic Version)), 2021, 13(4): 21-25.
- [2] 徐钧, 储照虎. 慢性脑缺血与阿尔茨海默病[J]. 医学综述(XU Jun, CHU Zhaohu. Chronic cerebral ischemia and Alzheimer's disease[J]. Medical Recapitulate), 2012, 18(20): 3432-3434.
- [3] 常文广, 滕军放. 慢性脑缺血对老龄大鼠学习记忆能力和髓鞘碱性蛋白的影响[J]. 中国老年学杂志(CHANG Wenguang, TENG Junfang. Effects of chronic cerebral ischemia on learning and memory and myelin basic protein in aged rats[J]. Chinese Journal of Gerontology), 2010, 30(2): 230-232.

- [4] CHEN X, YAN G Y. Novel human lncRNA–disease association inference based on lncRNA expression profiles[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(20): 2617–2624.
- [5] 熊婉迪, 徐开宇, 陆林, 等. 长链非编码 RNA 在阿尔茨海默病中的研究进展[J]. 遗传(XIONG Wandi, XU Kaiyu, LU Lin, *et al.* Research progress on lncRNAs in Alzheimer’s disease[J]. *Hereditas*), 2022, 44(3): 189–197.
- [6] ALLEN S J, WATSON J J, SHOEMARK D K, *et al.* GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2013, 138(2): 155–175.
- [7] 方妍, 郑磊, 张凤春, 等. 血清 BDNF 与尿 AD7c–NTP 联合检测在 MCI 进展为 AD 中的预测价值[J]. 中风与神经疾病杂志(FANG Yan, ZHENG Lei, ZHANG Fengchun, *et al.* Conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer’s disease: prediction by serum brain–derived neurotrophic factor and urinary AD–associated neuronal thread protein[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*), 2016, 33(1): 9–12.
- [8] 张立群, 刘威, 王钰, 帕金森病患者认知功能障碍与血清 BDNF 及 TrkB 水平的关系研究[J]. 中国实用神经疾病杂志(ZHANG Liqun, LIU Wei, WANG Yu. The association of serum BDNF and TrkB with cognitive impairments in patients with Parkinson’s disease[J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*), 2019, 22(21): 2321–2326.
- [9] FAN Y, ZHAO X, LU K, *et al.* LncRNA BDNF–AS promotes autophagy and apoptosis in MPTP–induced Parkinson’s disease via ablating microRNA–125b–5p[J]. *Brain Research Bulletin*, 2020, 157: 119–127.
- [10] ZHANG Y, YAN L L, CAO Y, *et al.* Long noncoding RNA BDNF–AS protects local anesthetic induced neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 80: 207–212.
- [11] ZHAO R, WANG X, WANG H, *et al.* Inhibition of long noncoding RNA BDNF–AS rescues cell death and apoptosis in hypoxia/reoxygenation damaged murine cardiomyocyte[J]. *Biochimie*, 2017, 138: 43–49.
- [12] RAMOS A D, ATTENELLO F J, LIM D A. Uncovering the roles of long noncoding RNAs in neural development and glioma progression[J]. *Neuroscience Letters*, 2016, 625: 70–79.
- [13] WU P, ZUO X L, DENG H L, *et al.* Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases[J]. *Brain Research Bulletin*, 2013, 97: 69–80.
- [14] MODARRESI F, FAGHIHI M A, LOPEZ–TOLEDANO M A, *et al.* Inhibition of natural antisense transcripts *in vivo* results in gene–specific transcriptional upregulation[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 453–459.
- [15] ZHENG X Z, LIN C S, LI Y H, *et al.* Long noncoding RNA BDNF–AS regulates ketamine–induced neurotoxicity in neural stem cell derived neurons[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 82: 722–728.
- [16] HUANG X, DING J, LI Y F, *et al.* Exosomes derived from PEDF modified adipose–derived mesenchymal stem cells ameliorate cerebral ischemia–reperfusion injury by regulation of autophagy and apoptosis[J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 371(1): 269–277.
- [17] 纵亮, 王秋菊. 凋亡诱导因子与遗传性听神经病及相关疾病研究进展[J]. 中华耳科学杂志(ZONG Liang, WANG Qiuju. Research progress on apoptosis–inducing factors and hereditary auditory neuropathy and related diseases[J]. *Chinese Journal of Otolaryngology*), 2015, 13(2): 255–257.
- [18] SEVRIOUKOVA I F. Structure/function relations in AIFM1 variants associated with neurodegenerative disorders[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(18): 3650–3665.
- [19] 孙世成. RNA 结合蛋白 NKAP 以 m<sup>6</sup>A 依赖性方式调控胶质母细胞瘤细胞铁死亡的作用及机制研究[D]. 济南: 山东大学(SUN Shicheng. The Effect and Mechanism of RNA Binding Protein NKAP on Iron Death in Glioblastoma Cells in a m<sup>6</sup>A–dependent Manner[D]. Jinan: Shandong University), 2022.
- [20] 顾光燕. NKAP 在脑胶质瘤中的作用及其调控机制的研究[D]. 济南: 山东大学(GU Guangyan. Effect and Mechanism of NKAP on Glioma[D]. Jinan: Shandong University), 2018.
- [21] 刘瑶, 韩影, 许丽雅, 等. 缺血后处理对全脑缺血再灌注大鼠海马区神经元自噬的影响[J]. 中国老年学杂志(LIU Yao, HAN Ying, XU Liya, *et al.* Effects of ischemic post–processing on autophagy in hippocampal neurons of global cerebral ischemia–reperfusion rats[J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2020, 40(1): 156–160.
- [22] 王娜娜. 氧化应激通过调节 ALS 相关蛋白 TBK1 和 OPTN 影响线粒体自噬的机制[D]. 苏州: 苏州大学(WANG Nana. Oxidative Stress Regulates Mitophagy Through ALS–linked TBK1 and OPTN[D]. Suzhou: Soochow University), 2019.
- [23] 邓志强. 自噬受体在神经退行性疾病中的调节机制研究[D]. 武汉: 武汉大学(DENG Zhiqiang. The Regulation of Autophagy Receptor in Neurodegenerative Disease[D]. Wuhan: Wuhan University), 2017.