

## 伯氏疏螺旋体在 HMC3 细胞感染模型中 *WDR36* 和 *WRN* 基因的表达分析

李 贞<sup>1)</sup>, 董森元<sup>1)</sup>, 马碧书<sup>1)</sup>, 付书雅<sup>1)</sup>, 宝福凯<sup>1,2)</sup>, 柳爱华<sup>2)</sup>  
(1)昆明医科大学海源学院, 云南 昆明 650106;  
(2)昆明医科大学基础医学院, 云南 昆明 650500)

**[摘要]** 目的 为探索神经莱姆病的分子机制, 通过转录组学与伯氏疏螺旋体感染发现相关的 2 个基因 *WDR36* 和 *WRN*, 以证明其具有靶点治疗的潜力。方法 通过建立非人灵长类动物模型, 利用高通量测序技术获取转录组学数据。通过 GO 富集分析, 识别出 2 个具有研究价值的 *WDR36* 和 *WRN* 差异表达基因。为进一步验证这 2 个基因在 *Bb* 感染神经莱姆病中的作用, 采用人脑胶质细胞 HMC3 细胞株作为模型。实验组细胞接受了不同 MOI(1 和 10)的 *Bb* 接种, 并在感染后 6 h、12 h 和 24 h 收集细胞悬液。使用 trizol 法提取 RNA, 并通过 qPCR 法测定 *WDR36* 和 *WRN* 基因的 mRNA 相对表达水平。结果 在 *Bb* 感染的 HMC3 细胞中, 发现 *Bb* MOI=1 为适宜感染浓度。结果表明 *WDR36* 的表达量在 24 h 与 12 h 对比有显著的上调( $P < 0.01$ ), 且 6 h 的 PBS 组与实验组基因表达含量对比上升但不明显( $P > 0.05$ ), 12 h、24 h 上升明显, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), *WRN* 的表达量在 24 h 与 12 h 对比有显著上调, 且 6 h、12 h、24 h 的实验组分别比其 PBS 组基因表达含量呈上升趋势, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 *WDR36* 和 *WRN* 的上调可能与 LNB 的神经病理过程相关, 这些发现为进一步研究 LNB 的分子机制提供了新的视角, 并可能为开发针对 *Bb* 感染的新型治疗方案提供潜在的分子靶点。

**[关键词]** 伯氏疏螺旋体; *WDR36*; *WRN*; HMC3 细胞株

**[中图分类号]** R384.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)11-0009-07

## Expression Analysis of *WDR36* and *WRN* Genes of *Borrelia Burgdorferi* in HMC3 Cell Line Infection Model

LI Zhen<sup>1)</sup>, DONG Senyuan<sup>1)</sup>, MA Bishu<sup>1)</sup>, FU Shuya<sup>1)</sup>, BAO Fukai<sup>1,2)</sup>, LIU Aihua<sup>2)</sup>  
(1) Haiyuan College, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650106;  
(2) School of Basic Medicine Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** The aim is to explore the molecular mechanism of neurological Lyme disease, particularly by identifying two differentially expressed genes *WDR36* and *WRN* associated with *Borrelia burgdorferi* infection through transcriptome analysis. Secondly, to verify their association in the pathogenesis of *Borrelia burgdorferi* infection and demonstrate their potential therapeutic targets. **Methods** By establishing a non-human primate model and utilizing high-throughput sequencing technology to obtain transcriptomic data. Through GO enrichment analysis, two differentially expressed genes with research value, *WDR36* and *WRN*, were identified. To further validate the role of these two genes in *Bb* infection of Lyme disease, the HMC3 cell line of human glial cells was used as a model. The experimental group cells received *Bb* inoculation with different MOI (1 and 10), and cell suspensions were collected at 6 h, 12 h, and 24 h after infection. Extract RNA using the triazol method and determine the relative mRNA expression levels of *WDR36* and *WRN* genes using qPCR. **Result** It was found that

**[收稿日期]** 2024-09-27

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(32060180、82160304); 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2023J1397)

**[作者简介]** 李贞(1987~), 女, 云南曲靖人, 医学硕士, 副教授, 主要从事病原生物学, 免疫学科研及教学工作。

**[通信作者]** 宝福凯, E-mail: baofukai@kmmu.edu.cn; 柳爱华, E-mail: liuaihua@kmmu.edu.cn

*Bb* MOI=1 was the appropriate infection concentration in HMC3 cells infected with *Bb*. The results showed that the expression level of *WDR36* was significantly upregulated at 24 h and 12 h, and the gene expression content of the 6 h PBS group increased but not significantly compared to the experimental group. The increase was significant at 12 h and 24 h, and there was a significant statistical difference with  $P < 0.01$ . The expression level of *WRN* was significantly upregulated at 24 h and 12 h, and the gene expression content of the 6 h, 12 h, and 24 h experimental groups showed an upward trend compared to their PBS group, and there was a significant statistical difference with  $P < 0.01$ . **Conclusion** The upregulation of *WDR36* and *WRN* may be associated with the neuropathological processes of LNB. These findings provide a new perspective for further studying the molecular mechanisms of LNB and may provide potential molecular targets for developing novel treatment strategies for *Bb* infection.

[ **Key words** ] *Borrelia burgdorferi*; *WDR36*; *WRN*; HMC3 cell line

莱姆病是 1 种由硬蜱传播的伯氏疏螺旋体 (*borrelia burgdorferi*, *Bb*) 引起的多阶段、多系统感染性疾病, 常见于夏季, 影响人类和动物。感染初期, 患者可能出现圆形红色皮疹, 此时抗生素治疗通常有效。然而, 若未能及时诊断和治疗, *Bb* 可进一步侵犯血液和神经系统, 导致神经莱姆病 (lyme neuro borreliosis, LNB), 这是莱姆病的 1 种严重并发症, 影响约 10% 的患者<sup>[1]</sup>。LNB 的临床表现多样, 包括神经根神经炎、淋巴细胞性脑膜炎等, 而脑炎和脊髓炎则较为罕见<sup>[2]</sup>。

诊断 LNB 时, 需检测患者的血清和脑脊液。感染后 3 周内, 可检测到特异性 IgM 抗体; 6 周后, 特异性 IgG 抗体出现。值得注意的是, 即使在康复后, 这些抗体也可能持续存在, 因此血清抗体阳性并不能单独作为感染的确诊依据<sup>[3]</sup>。

目前, LNB 的治疗推荐包括静脉滴注头孢曲松或口服多西环素, 但需注意孕妇禁用<sup>[4-5]</sup>。尽管如此, 某些情况下抗生素治疗可能效果不佳, 或患者可能出现持久的神经损伤或认知障碍。鉴于传统诊断和治疗方法的局限性, 本研究采用生物信息学分析, 旨在探索新的诊断和治疗策略。

笔者通过 Pubmed 回顾了相关文献, 发现色氨酸-天门冬氨酸重复序列 36 基因 (WD40-repeat 36, *WDR36*) 和 *WRN* 基因组织表达定位多处相同如: 脑、脊髓、淋巴和脾脏等多个组织中表达显著<sup>[6-8]</sup>。因此猜测 *WDR36* 也与该模型的炎症反应存在基因途径联系。这些发现促使笔者将研究放在 *WDR36* 和 *WRN* 基因上, 以期揭示它们在神经莱姆病炎症反应中的作用。

色氨酸-天门冬氨酸重复序列 36 基因 (WD40-repeat 36, *WDR36*) 最早是由 Monemi 在研究 2 个大型高加索家系时发现, 定位 GLC1G, 染色体

5q22.1<sup>[9]</sup>。*WDR36* 大小为 34.7 kB, 有 23 个外显子, 编码含 950 个氨基酸的蛋白, 其编码产物含有 4 个保守域就包括鸟苷酸结合蛋白 WD40 重复域<sup>[10]</sup>。其中 *WDR36* 所属的 WD 重复蛋白家族的成员参与多种细胞过程, 如细胞周期、信号转导、细胞凋亡和基因调控<sup>[11]</sup>, WD40 重复 (WDR) 结构域是人类蛋白质组中最丰富的蛋白质相互作用结构域之一。迄今为止, 已注释了 360 多个结构域, 这些结构域是参与多种信号通路的多蛋白复合物的重要亚基, 例如: DNA 损伤传感和修复、基因表达和染色质组织的表观遗传调控、泛素信号传导和蛋白质降解、细胞周期和免疫相关途径<sup>[12]</sup>。在功能方面上 *WDR36* 基因编码的 *WDR36* 蛋白是一个多功能蛋白, 其在加工 rRNA, 维持细胞核正常形态及脑、眼、消化道的正常发育方面发挥重要作用。另外, *WDR36* 基因所编码的蛋白是 T 细胞激活蛋白, 参与了 T 细胞的活化并且与白细胞介素 (interleukin-2, IL-2) 有高度的相互调节作用<sup>[13]</sup>。据报道, IL-2 主要是由 CD4<sup>+</sup>T 细胞产生, 可以刺激自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 的增殖分化, 诱导细胞毒性淋巴细胞和淋巴因子活化杀伤细胞 (lymphokine activated killer cells, LAK), 促进 B 细胞增殖和分泌抗体和激活巨噬细胞<sup>[14]</sup>。IL-2 对机体的免疫应答和抗病毒感染有重要作用。因此, *WDR36* 基因对机体的免疫起着必要的关系。

在 1992 年首先利用连锁分析技术将 Werner 基因 (Werner syndrome gene, *WRN*) 定位在 8 号染色体 (8p12), 后 1996 年应用传统的定位克隆方法确定了 *WRN* 基因, 并对其进行了测序分析 *WRN* 基因跨度超过 250 kB 有 35 个外显子, 其中 34 个为编码外显子, 由 1432 个氨基酸残基组成、分子质量为 160 kD 的 *WRN* 蛋白 (*WRN<sub>p</sub>*) 编码<sup>[15]</sup>。*WRN*

有别于其它 RecQ 家族解旋酶的一点是其 N 端具有外切酶结构域 *WRN*-exo, 同时 C 端包含很长的低保守序列, 据报道, 这些保守性低的序列能够与多种 DNA 代谢相关的蛋白质有相互作用<sup>[16-17]</sup>。*WRN* 是 DNA 解旋酶 RecQ 家族的成员之一, 参与多种生物学过程, 包括 DNA 损伤修复、端粒维持、自噬、凋亡、基因组维护等<sup>[18-19]</sup>。*WRN* 基因功能障碍易导致过早衰老, 使人类容易患上各种类型的肿瘤和癌症<sup>[20]</sup>。

研究表明, *WDR36* 基因在 T 细胞活化和 IL-2 产生中扮演关键角色, 而 *WRN* 蛋白则参与调控机体的天然免疫反应<sup>[14, 17]</sup>。鉴于二者均与炎症反应相关, 笔者推测它们可能在 LNB 的发病机制中发挥作用。LNB 的主要病理过程涉及 *Bb* 激活神经胶质细胞, 进而释放炎性因子, 导致中枢和周围神经系统的损伤或功能紊乱。为了验证 *WDR36* 和 *WRN* 在 *Bb* 感染引起的 LNB 中的潜在作用, 笔者进行实验验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

1× 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 由 Thermo Fisher Scientific (Gibico) 公司供应、10× TBST 由北京索莱宝公司提供、HMC3 细胞购买自上海中乔新舟生物科技有限公司、MEM 培养基由上海中乔新舟生物科技有限公司提供、PCR 试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司提供、*Borrelia burgdorferi* 4680 菌株从德国菌株保藏中心 (DSMZ) 购得、RIPA 裂解液由北京索莱宝科技有限公司提供、RNAiso plus 由宝生物工程(大连)有限公司提供、RNase-free water 由宝生物工程(大连)有限公司提供、SYBR 荧光定量试剂由宝生物工程(大连)有限公司提供、Tris base 由生工生物工程(上海)股份有限公司提供、二甲基亚砜 (DMSO) 由德国 Sigma 公司提供、甘氨酸由北京鼎国生物技术有限公司提供、甲醇由生工生物工程(上海)股份有限公司提供、氯仿由天津市化学试剂一厂提供、琼脂粉由 Thermo Fisher Scientific (OXOID) 公司提供、四甲基乙二胺 (TEMED) 由生工生物工程(上海)股份有限公司提供、胎牛血清由 Thermo Fisher Scientific (Gibico) 公司提供、台盼蓝由生工生物工程(上海)股份有限公司提供、胰蛋白胍由赛默飞世尔科技(中国)有限公司提供、引物合成由北京擎科生物新业生物技术有限公司提供。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 转录组分析** 本研究利用与人类基因组相似度高达 93% 以上的恒河猴作为实验模型, 以模拟人类对 LNB 的反应<sup>[21]</sup>。本研究通过昆明医科大学动物实验伦理审查委员会的审批 (kmmu20211590)。实验方法基于恒河猴脑额叶组织与 *Bb* 共培养测序得到的转录组学数据。从转录组学数据中筛选了 3 个时间点的数据集, 采用阈值  $\log_2 \text{FC} > 1$  和  $P < 0.05$  进行显著性分析, 并利用 Venn 图得到了 23 个差异基因并直观展示不同时间点基因表达的差异性。

本研究通过 STRING 蛋白互作数据库构建了基因互作网络, 并筛选出与免疫反应相关的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。

进一步利用 Metascape 工具, 设定阈值为  $P < 0.01$ 、最小计数  $\geq 3$  且富集因子  $> 1.5$  的标准进行了 GO 功能富集分析。

为验证 *WDR36* 和 *WRN* 基因在 *Bb* 感染神经莱姆病的作用, 发现小胶质细胞作为中枢神经系统的一种巨噬细胞, 具有强大的吞噬功能和免疫调节作用。在静息状态下小胶质细胞缺乏吞噬功能, 当中枢神经系统受到损伤或者炎症感染时可被激活, 活化后使得炎症反应不断扩大。因此本研究以人脑小胶质细胞 3 (human brain microglia 3, HMC3) 细胞株为模型, 对实验组进行 *Bb* 接种, 分为 MOI=1 和 MOI=10, 分别在细胞铺板感染后 6 h, 12 h 和 24 h 3 个时间点收集细胞悬液, 用 trizol 法提取细胞悬液中 RNA, 通过 qPCR 法检测目的因子 *WDR36* 和 *WRN* 的 mRNA 相对表达情况。实验流程: 首先利用细胞培养技术培养 HMC3 细胞株并对培养细胞进行计数、铺板、刺激; 其次设立 PBS 对照组, 实验组为 *Bb* 感染, 分为 MOI=1 和 MOI=10; 另外分别在细胞铺板感染后 6 h, 12 h, 24 h 3 个时间点收集细胞的 RNA 悬液; 最后用 trizol 法提取细胞总 RNA, 通过 qPCR (SYBR Green) 法检测目的因子 *WDR36* 和 *WRN* 的 mRNA 相对表达情况。

**1.2.2 转录组结果验证** (1) 目的基因特异性序列查询: 登录 “NCBI” 网站中的 Gene 网页 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 查找目的基因特异序列。

(2) 引物设计: 登录引物设计网页 “Primer3 version 4.0.0” (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), 将目的基因特异性序列输入, 选择引物长度范围、物种等, 得到需要的目的基因引物。

(3) 引物特异性检验: 将设计好的引物输入

“NCBI”网站“Primer-BLAST”数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), 验证引物特异性。挑选特异性良好的引物交由北京擎科生物新业生物技术有限公司进行引物序列合成。引物序列如:

*WDR36* 基因: 上游引物(5'-3'): ACTCGCC-TTGGATGACTTCT、下游引物(5'-3'): GCAAT-CCATCGCAGCACTTA。

*WRN* 基因: 上游引物(5'-3'): AGAAAGG-CATGTGTTCCGGAG、下游引物(5'-3'): GCCAC-TCCATGTCAAATCCC。

**1.2.3 qPCR 相对定量目的基因拷贝数** (1)使用 TaKaRa 公司 SYBR 荧光染料 qPCR 反应试剂盒进行试验, 每个样本的目的基因(*WDR36*和*WRN*)设置2个复孔, 在冰上完成反应体系配置和加样操作。反应体系: RNase-free H<sub>2</sub>O: 8.5 μL; SYBR Premix ExTaq II: 12.5 μL; PCR Forward Primer: 1 μL; PCR Reverse Primer: 1 μL; cDNA 模板: 2 μL; 总计 25 μL。

目的基因(*WDR36*和*WRN*)qPCR 反应条件: 预变性: 95 °C, 15 s; 变性: 95 °C, 5 s 和退火: 60 °C, 30 s 共循环 40 次、Dissociation stage: 65 ~ 95 °C。

(2) 最终结果判定标准: 通过 Bio-Rad CFX96TM 软件得到 qPCR(SYBR Green)检测的结果, 熔解曲线平稳, 1 个熔解峰, 扩增产物单一, 判断引物特异良好。扩增曲线平滑, 阈值循环数(Ct 值)。目的基因(*WDR36*、*WRN*)Ct 值为 15 ~ 35 次, 2 个复孔间 Ct 值相差小于 0.1, 此 qPCR 的检测结果可靠。

(3) 反应结束后, 读取 Ct 值, 最终目的基因的 mRNA 相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值表示, 本方法将对照组(PBS 组)基因 mRNA 表达量设置为 1, 其他组 mRNA 表达量为对照组的倍数。计算公式:  $\Delta Ct = Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 内参基因}$ 。

### 1.3 统计学处理

利用 Graphpad Prism 6.0 软件进行作图和统计分析, 实验数据采用双因素方差分析法(Two-way ANOVA)进行统计学分析作图。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ 实验组} - \Delta Ct \text{ 对照组}$ 。

## 2 结果

### 2.1 Venn 图筛选出 23 个差异表达基因(DEGs)

以非人灵长动物(恒河猴)作模型, 利用团队

培养并测序的转录组学数据为背景, 随机筛选了 3 个时间的数据集, 设定阈值为  $|\log Fc| > 1$ ,  $P \text{ value} < 0.05$ , 通过绘制 Venn 图筛选出 23 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 见图 1。

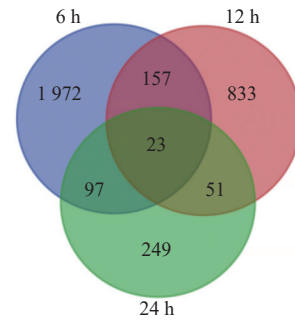


图 1 23 个差异表达基因(DEGs)的筛选

Fig. 1 Screening of 23 differentially expressed genes (DEGs)

### 2.2 免疫反应相关的 DEGs 的相互作用关系网络

以非人灵长动物(恒河猴)作模型, 利用团队培养并测序的转录组学数据为背景, 绘制与免疫反应相关的 DEGs 的相互作用关系网络图, 其中 13 个显著的免疫差异基因被标红, 包括 *CFH*、*OGN*、*BTA1*、*WDR36*、*TMEM87A*、*ALCAM*、*MFN1*、*WRN*、*CENPC*、*SF3B1*、*CTNNA1*、*ZBED5* 和 *FOLR2*。*WDR36* 和 *WRN* 的位置用红色方框表示, 见图 2。

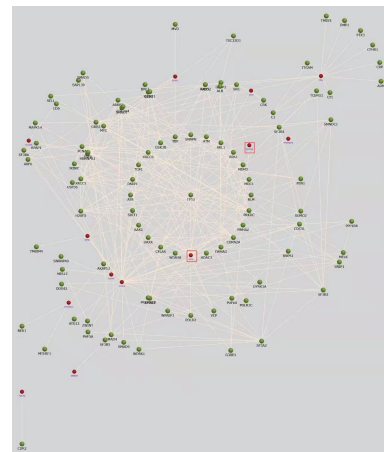


图 2 免疫反应相关 DEGs 的相互作用关系网络

Fig. 2 The interaction network of immune response related DEGs

### 2.3 GO 富集分析

参与的生物过程(biological process, BP): 细胞对外界刺激; 基因的分子功能(molecular function, MF): 三磷酸核糖核苷磷酸酶活性, 见图 3。

### 2.4 主要差异表达基因

结果显示, *TMEM87A*、*WRN* 和 *FOLR2* 与细

胞对外界刺激的反应(BP)相关; *BTA1*、*MFN1* 和 *WRN* 与三磷酸核糖核苷磷酸酶活性相关, 见表 1。其中, *WRN* 基因出现了富集重合显示了重要的研究潜力。

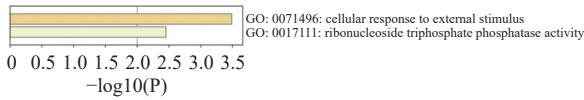


图 3 GO 富集分析含量

Fig. 3 GO enrichment analysis content

表 1 主要差异表达基因 BP(*TMEM87A*、*WRN*、*FOLR2*) 和 MF(*BTA1*、*MFN1*、*WRN*)

Tab. 1 BP(*TMEM87A*、*WRN*、*FOLR2*) and MF(*BTA1*、*MFN1*、*WRN*) selected genes

基因	GO富集BP	GO富集MF
<i>CFH</i>	未选择	未选择
<i>OGN</i>	未选择	未选择
<i>BTA1</i>	未选择	选中
<i>WDR36</i>	未选择	未选择
<i>TMEM87A</i>	选中	未选择
<i>ALCAM</i>	未选择	未选择
<i>MFN1</i>	未选择	选中
<i>WRN</i>	选中	选中
<i>CENPC</i>	未选择	未选择
<i>SF3B1</i>	未选择	未选择
<i>CTNNA1</i>	未选择	未选择
<i>ZBED5</i>	未选择	未选择
<i>FOLR2</i>	选中	未选择

### 2.5 *WDR36* 和 *WRN* 基因表达的实验验证

目的基因 *WDR36* 在 HMC3 细胞被 *Bb* 感染后, 6 h, 12 h, 24 h, PBS 组(阴性对照组)和 *Bb* 感染组(实验组)的细胞做统计学分析, 发现 *Bb* MOI=1 为适宜感染浓度, 若 *Bb* MOI=10, 细胞在 24 h 耐受不佳, 见图 4。所以本研究采用 *Bb* MOI=1 感染组(实验组)和 PBS 组(阴性对照组), 不同时间点(6 h, 12 h, 24 h), 通过对目的基因 *WDR36* 的检测, 2 组实验对照发现 *WDR36* 的表达量在 24 h 与 12 h 对比有显著的上调( $P < 0.01$ ), 且 6 h 的 PBS 组与试验组基因表达含量对比上升但不明显( $P > 0.05$ ), 12 h、24 h 上升明显( $P < 0.01$ ), 见图 5。

目的基因 *WRN* 在 HMC3 细胞被 *Bb* 感染后, 通过对 6 h, 12 h, 24 h, PBS 组(阴性对照组)和 *Bb* 感染组(实验组)的检测分析, 表明 *Bb* MOI=1 为适宜感染浓度, 若 *Bb* MOI=10, 细胞在 24 h 并未呈阶梯式增长, 见图 6。所以本研究采用 *Bb* MOI=1 感染组(实验组)和 PBS 组(阴性对照组), 不同时间点(6 h, 12 h, 24 h), 通过对目的基因

*WRN* 的检测, 2 组实验对照发现 *WRN* 的表达量在 24 h 与 12 h 对比有显著上调( $P < 0.01$ ), 且 12 h、24 h 的实验组分别比其 PBS 组基因表达含量呈上升趋势( $P < 0.01$ ), 见图 7。

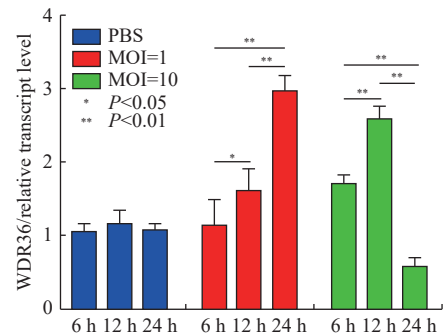


图 4 组内 HMC3 在不同时间点 *WDR36* 表达量的比较  
Fig. 4 Comparison of *WDR36* secretion of HMC3 at different time points in the group

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

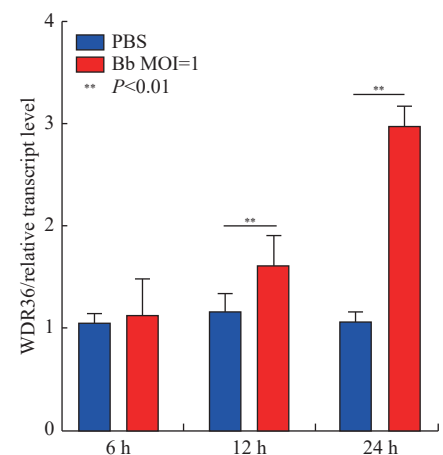


图 5 组间 HMC3 在不同时间点 *WDR36* 表达量的比较  
Fig. 5 Comparison of *WDR36* secretion of HMC3 at different time points between groups

\*\* $P < 0.01$ 。

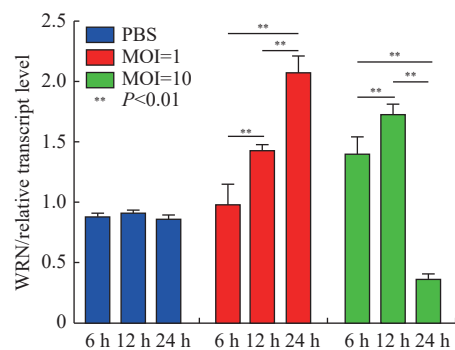


图 6 组内 HMC3 在不同时间点 *WRN* 表达量的比较  
Fig. 6 Comparison of *WRN* secretion of HMC3 at different time points in the group

\*\* $P < 0.01$ 。

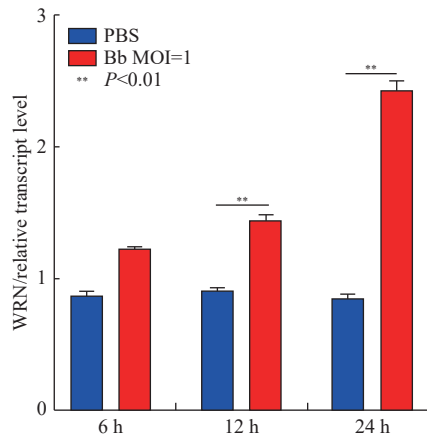


图 7 组间 HMC3 在不同时间点 WRN 表达量的比较

Fig. 7 Comparison of WRN secretion of HMC3 at different time points between groups

\*\* $P < 0.01$ .

### 3 讨论

在 *Bb* 感染的人脑胶质细胞 HMC3 细胞株中, 观察到 *WDR36* 和 *WRN* 基因的转录水平在感染后显著上调。特别是在感染后的 6 h 和 12 h, 这 2 个基因的表达水平显著增加, 而在 24 h 时, 这种上调趋势有所减缓。这一现象表明, 在 *Bb* 感染的早期阶段, *WDR36* 和 *WRN* 基因可能在 LNB 的病理过程中发挥作用。

进一步的分析显示, 在适宜的感染浓度 (*Bb* MOI=1) 下, 24 h 感染组的 *WDR36* 和 *WRN* 基因表达量明显高于 12 h 感染组, 这表明随着感染时间的延长, 这 2 个基因的表达水平可能会进一步增加。然而, 笔者也注意到在高感染浓度 (*Bb* MOI=10) 下, 长时间的培养 (24 h) 会导致细胞出现不耐受现象, 这可能影响基因表达的稳定性。

在对比实验组与 PBS 对照组时, 发现在 6 h 的感染条件下, *WRN* 基因的表达上调幅度比 *WDR36* 更为显著。这表明 *WRN* 基因在 *Bb* 感染的早期反应中可能扮演更重要的角色, 因此, *WRN* 基因可能是 1 个更适合进行后续实验分析和研究的靶点。

LNB 患者在接受抗生素漫长的治疗后会出现在治疗后莱姆病治疗后综合征 (post-treatment Lyme disease syndrome, PTLDS), 伴有疲劳、肌肉关节痛和认知障碍, 当前未知此原因<sup>[22]</sup>, *Bb* 引起脑膜血管型伴脑血管梗死、萎缩型伴脑膜脑炎、皮质萎缩和胶质增生, 可导致发展更为迅速的痴呆<sup>[23]</sup>, 中枢神经系统外的感染导致中枢神经系统内的免疫反应, 可能与缓慢进展型痴呆症有关<sup>[24]</sup>, 因此推测 *WRN* 的基因稳定与患者抗生素治疗后出现

过早衰老和痴呆、认知障碍、疲劳等症状相关。

《中国卫生健康统计年鉴 2021》数据显示, 2020 年我国城市居民冠心病死亡率为 126.91/10 万, 农村为 135.88/10 万<sup>[25]</sup>, 冠心病的治疗在我国仍是 1 项难题。据报道, 在通脉养心丸治疗冠心病的研究中, 通过筛选差异表达基因和检索蛋白相互作用时就有 *WDR36* 基因的存在<sup>[26]</sup>。推测如遇到同时患有神经莱姆病和冠心病的患者使用通脉养心丸可能对 2 种疾病能起到治疗效果。

据报道, *WDR36* 和 *WRN* 基因都与炎症反应有关系, 在现阶段莱姆病炎症机制的研究指出伯氏疏螺旋体会致神经细胞凋亡<sup>[27]</sup>, 当 *Bb* 影响神经系统时, 神经疏螺旋体病, 免疫调节性炎症级联反应可触发神经胶质细胞凋亡, 导致各种神经学表现<sup>[28-30]</sup>。凋亡是种非炎症、程序性细胞死亡, 而与凋亡密切相关的另 1 种炎症介导的程序性细胞死亡则是焦亡, 细胞焦亡研究中它的经典途径是依赖于半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 与 IL-1 $\beta$  和 IL-18 分泌, 从而介导促炎效应<sup>[31]</sup> 在焦亡和凋亡细胞中都存一定作用机制<sup>[32]</sup>, 目前没有报道细胞焦亡与 LNB 的关系, 所以怀疑神经莱姆病导致的炎症不仅只有凋亡因素, 也存有细胞焦亡的可能性。

LNB 的临床表现多样性受 *Bb* 的基因型和宿主细胞反应性的影响。本研究通过转录组学分析, 结合人脑胶质细胞 HMC3 模型的实验验证, 推测 *WDR36* 和 *WRN* 基因在 *Bb* 感染引起的神经莱姆病中表达上调, 这可能与它们在神经炎症和细胞应激反应中的功能有关。此外, 考虑到这两个基因在感染过程中的动态表达模式, 它们可能作为潜在的治疗靶点, 用于干预或缓解 LNB 的病程。未来的研究可以进一步探索这些基因在 LNB 发病机制中的具体作用, 以及它们作为治疗靶点的潜力。

通过血清学检查确诊 LNB 患者的主要感染病原体为 *Bb* 时, *WDR36* 和 *WRN* 基因的上调表达可能成为疾病进程中的生物标志物。这不仅为揭示 LNB 的分子机制提供了新的视角, 也为针对 *Bb* 感染的新型治疗策略的开发提供了可能的分子靶点。未来研究将深入探讨这些基因在不同 *Bb* 基因型和宿主细胞背景下的功能, 以及它们在 LNB 治疗中的潜在应用, 以期为临床治疗提供更精准的指导。

### [参考文献]

- [1] Koedel U, Pfister H W. Lyme neuroborreliosis[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2017, 30(1): 101-107.

- [2] Ogrinc K, Bogovic P, Maraspin V, et al. Why is the duration of erythema migrans at diagnosis longer in patients with Lyme neuroborreliosis than in those without neurologic involvement? [J]. *Pathogens*, 2024, 13(2): 137.
- [3] 曹文静, 岳鹏, 徐鑫, 等. 神经莱姆病诊治进展 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(3): 369–373.
- [4] Dersch R, Toews I, Sommer H, et al. Methodological quality of guidelines for management of Lyme neuroborreliosis [J]. *BMC Neurol*, 2015, 15(11): 242.
- [5] Halperin J. Diagnosis and management of Lyme neuroborreliosis [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2018, 16(1): 5–11.
- [6] Skarie J M, Link B A. The Primary open-angle glaucoma gene *WDR36* functions in ribosomal RNA processing and interacts with the p53 stress - response pathway [J]. *Human molecular genetics*, 2008, 17(16): 2474–2485.
- [7] Hui C W, St-Pierre M K, Detuncq J, et al. Nonfunctional mutant WRN protein leads to neurological deficits, neuronal stress, microglial alteration, and immune imbalance in a mouse model of Werner syndrome [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 73(10): 450–469.
- [8] Chen L, Huang S, Lee L, et al. WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair [J]. *Aging Cell*, 2003, 2(4): 191–199.
- [9] Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1 [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(6): 725–733.
- [10] 王雅琴, 朱益华. *WDR36* 基因与原发开角型青光眼 [J]. *福建医药杂志*, 2011, 33(3): 136–138.
- [11] 石珂. 江西籍原发性开角型青光眼家系的遗传学调查及与 *WDR36* 基因突变的相关性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2011.
- [12] An S, Yao D, Zhang W, et al. *WDR36* safeguards self-renewal and pluripotency of human extended pluripotent stem cells [J]. *Front Genet*, 2022, 22(13): 905395.
- [13] 石珂, 汪昌运. 江西籍开角型青光眼家系 *WDR36* 基因突变研究 [J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(8): 1185–1188.
- [14] Lotze M T, Frana L W, Sharrow S O, et al. In vivo administration of purified human interleukin 2. I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin 2 [J]. *J Immunol*, 1985, 134(1): 157–166.
- [15] 朱曦, 张国伟, 管怀进. WRN 基因研究进展 [J]. *江苏医药*, 2015, 41(12): 1430–1433.
- [16] 吉磊. RecQ 解旋酶 WRN 和 RecQ1 酶学特性和结构研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2020.
- [17] Hui C W, St-Pierre M K, Detuncq J, et al. Nonfunctional mutant WRN protein leads to neurological deficits, neuronal stress, microglial alteration, and immune imbalance in a mouse model of Werner syndrome [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 73(12): 450–469.
- [18] Picco G, Cattaneo C M, Crisafulli G, et al. Werner Helicase Is a Synthetic-Lethal Vulnerability in Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer Refractory to Targeted Therapies, Chemotherapy, and Immunotherapy [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(8): 1923–1937.
- [19] Derenty C, Ellis N A. Bloom's syndrome: Why not premature aging? A comparison of the BLM and WRN helicases [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 33(6): 36–51.
- [20] Cui X, Hou J, Wang S, et al. Werner helicase mediates the senescence and cell cycle of leukemia cells by regulating DNA repair pathways [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 255(6): 128305.
- [21] 郑宏毅, 郑永唐. 非人灵长类动物: 免疫学基础研究到临床应用的桥梁 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(8): 1121–1130.
- [22] Sebastienp, Jacques D, Catherinep, et al. Diagnosis and treatment of "chronic Lyme": Primum non nocere [J]. *BMC Infect Dis*, 2023, 23(1): 642.
- [23] Bransfield R C. Neuropsychiatric Lyme borreliosis: An overview with a focus on a specialty psychiatrist's clinical practice [J]. *Healthcare (Basel)*, 2018, 6(3): 104.
- [24] Bransfield R C. The psychoimmunology of lyme/tick-borne diseases and its association with neuropsychiatric symptoms [J]. *Open Neurol J*, 2012, 6(10): 88–93.
- [25] 中国心血管健康疾病报告撰写委员会. 中国心血管健康与疾病报告 2022 要点解读 [J]. *中国心血管杂志*, 2023, 28(4): 297–312.
- [26] Xiao Z W, Liu Y, Li Z Y, et al. Molecular mechanism of Tongmai Yangxin Pill intervention in elderly patients with coronary heart disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(22): 8265–8275.
- [27] 毕云凤. 伯氏疏螺旋体致神经细胞凋亡和炎症反应的机制研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2023.
- [28] Ramesh G, Borda J T, Dufour J. Interaction of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* with brain parenchyma elicits inflammatory mediators from glial cells as well as glial and neuronal apoptosis [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(5): 1415–1427.
- [29] Ramesh, G, Borda, J T, Gill A. Possible role of glial cells in the onset and progression of Lyme neuroborreliosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2009, 6(8): 23.
- [30] Ramesh G, Didier P J, England J D. Inflammation in the pathogenesis of Lyme neuroborreliosis [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(4): 1344–1360.
- [31] Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-planillo R, et al. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 241–247.
- [32] Sung. Death and survival from executioner caspase activation [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2024, 156(3): 66–73.