

# rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白通过下调 ENST00000522718 抑制 Act-HaCaT 细胞炎症和增殖

王黎明<sup>1</sup>, 蒋小猛<sup>2</sup>, 高悦<sup>1</sup>, 马宇骁<sup>1</sup>, 曾爱中<sup>1</sup>, 郭薇<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198; <sup>2</sup>南京医科大学逸夫医院消化内科, 南京 211112)

**摘要** 银屑病是一种以慢性皮肤炎症为主要特征的自身免疫性疾病, 其病因及发病机制尚未完全阐明。本研究在前期 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白显著改善银屑病小鼠症状并初步阐明药理机制的基础上, 利用 TNF- $\alpha$  刺激人皮肤永生化角质形成细胞株 (HaCaT), 建立银屑病细胞模型 (Act-HaCaT), 通过转录组测序并结合 qRT-PCR, 筛选 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白调控 Act-HaCaT 细胞功能时发挥关键作用的 lncRNA 分子。研究结果表明, rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白能够显著抑制 Act-HaCaT 细胞增殖和炎症因子产生, 通过筛选得到 lncRNA ENST00000522718, 并发现敲低 ENST00000522718 能够显著抑制细胞增殖和炎症因子产生, 提示 ENST00000522718 在银屑病的病理机制中发挥着重要作用。

**关键词** lncRNA; rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白; 增殖; 炎症因子

中图分类号 R593 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)06-0734-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220613

引用本文 王黎明, 蒋小猛, 高悦, 等. rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白通过下调 ENST00000522718 抑制 Act-HaCaT 细胞炎症和增殖[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(6): 734 - 741.

Cite this article as: WANG Liming, JIANG Xiaomeng, GAO Yue, et al. rhIL23R-CHR/Fc fusion protein inhibits Act-HaCaT inflammation and proliferation by downregulating ENST00000522718[J]. *J China Pharm Univ*, 2022, 53(6): 734 - 741.

## rhIL23R-CHR/Fc fusion protein inhibits Act-HaCaT inflammation and proliferation by downregulating ENST00000522718

WANG Liming<sup>1</sup>, JIANG Xiaomeng<sup>2</sup>, GAO Yue<sup>1</sup>, MA Yuxiao<sup>1</sup>, ZENG Aizhong<sup>1</sup>, GUO Wei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

<sup>2</sup>Department of Gastroenterology, Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211112, China

**Abstract** Psoriasis is an autoimmune disease characterized by chronic skin inflammation, and its etiology and pathogenesis have not been fully elucidated to date. In the previous study, rhIL23R-CHR/Fc fusion protein had been found to significantly relieve the symptoms of psoriasis mice and the pharmacological mechanism had been initially elucidated. In this study, we established a psoriasis cell model (Act-HaCaT) using TNF- $\alpha$ -activated human immortalized keratinocytes (HaCaT). In our current study, the lncRNA that plays a key role in the regulation of Act-HaCaT function by the rhIL23R-CHR/Fc fusion protein was screened by transcriptome sequencing combined with qRT-PCR. The results showed that rhIL23R-CHR/Fc fusion protein significantly inhibited cell proliferation and inflammatory factor production in Act-HaCaT. lncRNA ENST00000522718 was obtained by screening, and knockdown of ENST00000522718 was found to significantly inhibit cell proliferation and inflammatory factor production. Our findings suggest that ENST00000522718 plays an important role in the pathological mechanism of psoriasis.

**Key words** lncRNA; rhIL23R-CHR/Fc fusion protein; proliferation; inflammatory factor

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81973221); and the Chinese Foundation for

收稿日期 2022-09-23 \*通信作者 Tel: 13512512665 E-mail: guoweil205@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81973221); 中国肝炎防治基金会-天晴肝病研究基金资助课题(No. TQGB20210089)

银屑病(psoriasis)俗称“牛皮癣”,是一类免疫介导的,以角质细胞异常增殖为主要特征的慢性皮肤炎症疾病,全世界大约有 1.25 亿人患有银屑病<sup>[1]</sup>。超过 80% 的银屑病患者表现为斑块状银屑病,患者皮肤表面出现大量红色斑块,表面覆盖多层银白色鳞屑,分布在全身多个组织<sup>[2]</sup>。高水平的细胞因子和活化的免疫细胞经血液循环影响全身多个组织或器官<sup>[3]</sup>,引发 II 型糖尿病<sup>[4]</sup>、炎症性肠病<sup>[5]</sup>、心血管疾病<sup>[6]</sup>等多种并发症。由于未及时就诊、临床诊断失误及社会偏见等原因,许多银屑病患者遭受极大的痛苦。

作为一种常见的自身免疫性疾病,银屑病的病因及发病机制尚未完全阐明。遗传、环境、感染、内分泌以及神经精神等因素均可诱发银屑病<sup>[7]</sup>,适应性免疫应答参与自身抗体形成和自身反应性 T 细胞的应答,被认为是自身免疫性疾病中主要的致病因素<sup>[8]</sup>。近年研究发现,Th17 细胞及 IL-23/IL-17 轴在银屑病中引起的表皮角质形成细胞的过度增殖和分化紊乱发挥主要致病作用<sup>[3]</sup>。虽然靶向 IL-23/IL-17 治疗显著改善了银屑病患者病情,但由于存在部分患者治疗应答差等原因,仍需多种新的治疗策略或新型抗炎途径。因此,需要进一步阐明银屑病的发病机制,为开发新的诊断或治疗方法奠定基础。

随着测序技术的发展,非编码(non-coding,nc)RNA 对银屑病遗传性和致病性的影响成为人们关注的焦点。长链非编码(long non-coding,lnc)RNA 是一类长度大于 200 个核苷酸的 ncRNA,通过碱基互补配对与 DNA, RNA 或蛋白相互作用来调节基因表达<sup>[9]</sup>,几乎参与了生物学进程的各个方面。Gupta 等<sup>[10]</sup>获得了银屑病患者皮肤和健康皮肤 lncRNA 差异表达谱,发现了 lncRNA 在银屑病及阿达木单抗治疗中的潜在重要性,并通过基因共表达网络分析了差异表达的 lncRNA 在银屑病中的初步作用机制<sup>[11]</sup>。研究发现,lncRNA PSORS1C3 易感基因与银屑病发病显著相关<sup>[12]</sup>。银屑病非损伤皮肤中应激诱导的银屑病易感基因 PRINS 过表达,导致非损伤表皮的应激反应发生改变,促进了银屑病的发病<sup>[12-13]</sup>,并通过调节 GIP3 降低角质形

成细胞的凋亡<sup>[12-14]</sup>。Tsoi 等<sup>[15]</sup>在银屑病皮肤和正常皮肤中鉴定出 1 214 个差异表达的 lncRNA 分子,推测可能参与银屑病的免疫病理。lncRNA MEG3 通过调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 TNF- $\alpha$  刺激的角质形成细胞和银屑病小鼠中促进自噬并抑制炎症<sup>[16]</sup>。lncRNA SPRR2C<sup>[17]</sup>, lncRNA MIR31HG<sup>[18]</sup>, lncRNA RP6-65G23.1<sup>[19]</sup> 及 lncRNA H19<sup>[20]</sup> 等通过改变角质形成细胞的表型和功能参与银屑病的病理过程。越来越多的研究证据表明,lncRNA 与银屑病发病关系密切<sup>[21]</sup>。

本课题组前期获得了靶向 IL-23 p19 亚基的 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白,在银屑病小鼠体内研究发现 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白与 IL-23 结合后,阻断 IL-23/IL-23R 结合,抑制 Th17 细胞和 ILC3 细胞等介导的炎症应答<sup>[22]</sup>。基于前期的研究基础,使用 TNF- $\alpha$  刺激人皮肤永生化角质形成细胞株(HaCat),建立银屑病细胞模型(Act-HaCaT),进一步在体外探究 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白调控 Act-HaCaT 细胞功能的下游关键 lncRNA 分子,并研究 lncRNA 分子在 Act-HaCaT 细胞中的作用机制。通过了解银屑病发病关键分子,寻找银屑病生物标志物,为个体化和针对性的治疗提供新的靶标。

## 1 材料

### 1.1 试剂

HaCat 细胞(广州吉妮欧生物科技公司);FBS、DMEM-HG 基础培养基(美国 Gibco 公司);硫酸链霉素、氨卞青霉素[中国生工生物工程(上海)股份有限公司];重组人 TNF- $\alpha$ (美国 PeproTech 公司);Trizol(美国 Intrivogen 公司);HiScript<sup>®</sup> III RT SuperMix、SYBR Green(南京诺唯赞生物科技公司);ELISA 检测试剂盒(杭州联科生物科技公司);MTT(德国 Merck 公司);siRNA(上海吉玛制药技术有限公司)。

### 1.2 仪器

Nanodrop 2000、Quanstudio<sup>™</sup> 3 Real-Time PCR Instruction、细胞培养箱、Countstar 细胞计数仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];全波长酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]。

## 2 方法

### 2.1 银屑病细胞模型建立

HaCat 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM-HG 基础培养基并加有终浓度为 100 U/mL 硫酸链霉素和氨卞青霉素的完全培养基中培养。

按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞的密度种植细胞于 24 孔板中,并在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜贴壁培养,24 h 后给药终浓度为 10 ng/mL TNF- $\alpha$ ,继续培养 24 h,建立银屑病细胞模型(Act-HaCaT)。

### 2.2 全长转录组测序

利用全长转录组测序技术(广州基迪奥生物科技有限公司)获得 Act-HaCaT 和 HaCat 细胞的 lncRNA 表达谱,测序总共对 26 566 个 lncRNA 基因进行了检测,共有 219 个 lncRNA 显著差异表达(FDR < 0.05,  $\log_2FC \geq 1, P < 0.05$ )。

### 2.3 RNA 分离提取和 qRT-PCR

根据说明书使用 Trizol 试剂提取 HaCat 和 Act-HaCaT 细胞总 RNA。使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 的浓度和纯度。使用 HiScript<sup>®</sup> III RT SuperMix 将每个样本的 1  $\mu$ g 总 RNA 逆转录为 cDNA,SYBR Green 通过 qRT-PCR 对基因表达进行定量。具体方案如文献所述<sup>[23]</sup>。

### 2.4 酶联反应吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

收集细胞培养上清液,1 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,使用 ELISA 检测试剂盒,检测 IL-6 和 IL-8 的蛋白浓度。分别在对应孔中加入 2 倍倍比稀释的标准品 100  $\mu$ L 和细胞上清液 100  $\mu$ L 后,在每个孔中加入检测抗体稀释液 50  $\mu$ L,300 r/min 摇床上震荡孵育 2 h,洗涤;加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 100  $\mu$ L 室温孵育 45 min 并洗涤后,加底物 100  $\mu$ L 显色 15 min,每孔加入反应终止液 100  $\mu$ L,使用酶标仪在 450 和 570 nm 下进行检测。

### 2.5 MTT

按每孔  $5 \times 10^3$  个细胞培养细胞于 96 孔板,每孔补加含血清浓度为 1% DMEM-HG 完全培养基,至终体积为 100  $\mu$ L。将 96 孔板细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜贴壁培养。贴壁培养后给药 10 ng/mL TNF- $\alpha$ (Act-HaCaT)和不加 TNF- $\alpha$  刺激的空白对照孔(HaCat),每组设置 6 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 10  $\mu$ L,37 °C、5%

CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养,4 h 后使用 1 mL 无菌注射器吸掉培养基,每孔加 DMSO 150  $\mu$ L,500 r/min 振荡 10 min。将培养板在酶标仪上检测,检测波长为 570 nm,校正波长为 630 nm。

### 2.6 统计分析

数据统计及分析应用 GraphPad 8.0 软件进行,各项指标均以平均数  $\pm$  标准误( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间样本的差异显著性比较采用 Unpaired *t*-test (two-tailed) 进行,两组以上样本差异显著性比较使用 One-Way ANOVA 分析。 $P < 0.05$  为组间差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 TNF- $\alpha$ 促进 HaCat 细胞增殖和炎症因子的表达

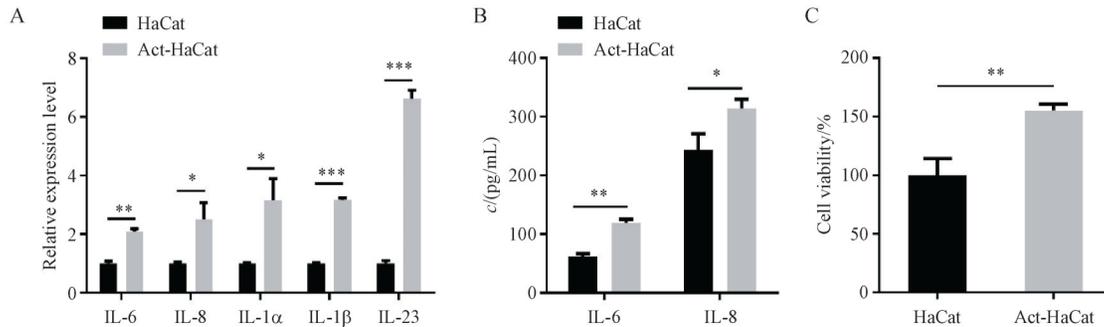
TNF- $\alpha$  体外刺激人角质形成细胞系 HaCat 细胞,是建立银屑病细胞模型的常用方法之一。使用 10 ng/mL 重组人 TNF- $\alpha$  刺激 HaCat 细胞(Act-HaCaT 组)24 h 后,显著增加了 HaCat 细胞 IL-6 ( $P < 0.01$ )、IL-8 ( $P < 0.05$ )、IL-1 $\alpha$  ( $P < 0.05$ )、IL-1 $\beta$  ( $P < 0.001$ ) 及 IL-23 ( $P < 0.001$ ) 细胞因子的转录(图 1-A),TNF- $\alpha$  刺激后 IL-23 的转录增加的最为显著,其 mRNA 水平提高了约 5 倍。此外,Act-HaCaT 组细胞培养上清液中 IL-6 ( $P < 0.01$ ) 和 IL-8 ( $P < 0.05$ ) 炎症因子的分泌水平也显著升高(图 1-B)。同时,TNF- $\alpha$  还促进了 HaCat 细胞的增殖能力 ( $P < 0.01$ )(图 1-C)。

### 3.2 rhIL23R-CHR/Fc 抑制 TNF- $\alpha$ 刺激的 HaCat 细胞的功能

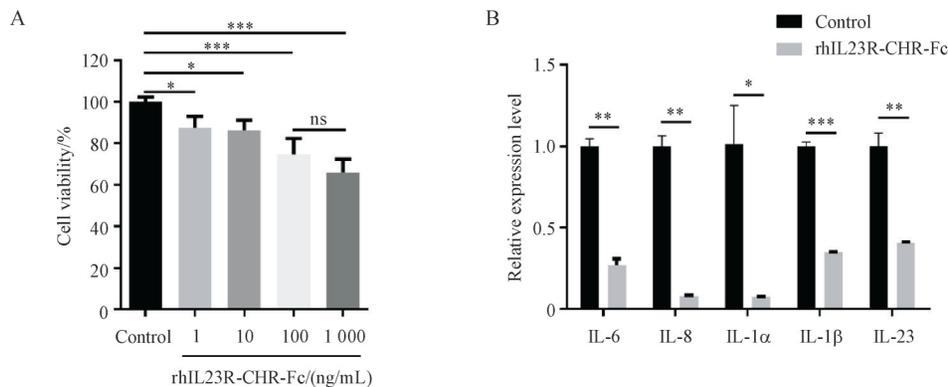
在前期的体内实验结果中,发现 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白通过抑制体内 Th17 和 ILC3 细胞介导的炎症免疫应答,降低炎症因子的转录水平和蛋白表达,能够显著改善银屑病样小鼠的症状。在银屑病病理皮损中,人角质形成细胞表达 IL-23 等炎症因子,诱导 Th17 细胞的活化,形成银屑病的炎症反应回路。本研究结果显示 rhIL23R-CHR/Fc 给药后抑制了 Act-HaCaT 细胞的增殖,且具有浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ),rhIL23R-CHR/Fc 质量浓度在 100 和 1 000 ng/mL 时可极显著抑制 Act-HaCaT 细胞增殖,抑制率分别为  $(25.49 \pm 7.84)\%$  和  $(33.96 \pm 6.44)\%$ (图 2-A),与 100 ng/mL rhIL23R-CHR/Fc 相比,1 000 ng/mL rhIL23R-CHR/Fc 对细胞增殖的抑

制率更高,但无显著性差异,因此后续以 100 ng/mL rhIL23R-CHR/Fc 作为合适的给药浓度。在给药 100 ng/mL rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白后,在 Act-

HaCaT 细胞中上调表达的 IL-6、IL-8、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  以及 IL-23 等炎症因子其转录水平均受到明显抑制 ( $P < 0.05$ )(图 2-B)。



**Figure 1** Proliferation and inflammation factor production in HaCat cells and HaCat cells activating by TNF- $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 A: Detection of cellular inflammatory factor transcriptional levels by qRT-PCR; B: Detection of cellular IL-6 and IL-8 expression levels by ELISA; C: Effect of TNF- $\alpha$  on the proliferation of HaCat cells was detected by MTT  
 $^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01, ^{***}P < 0.001$



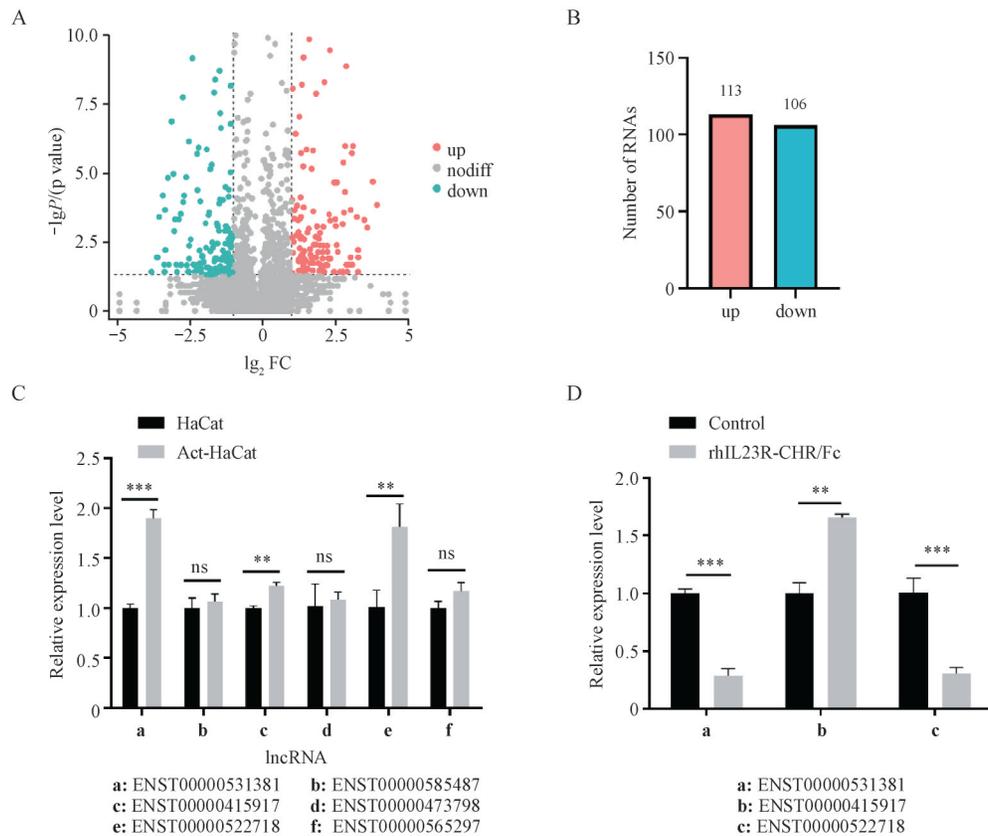
**Figure 2** rhIL23R-CHR/Fc fusion protein inhibited proliferation and inflammation factor production in Act-HaCaT ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 A: Different concentrations of rhIL23R-CHR/Fc inhibited the proliferation of Act-HaCaT; B: rhIL23R-CHR/Fc inhibited the transcriptional levels of Act-HaCaT inflammatory factors. Act-HaCaT cells untreated with rhIL23R-CHR/Fc were used as Control  
 $^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01, ^{***}P < 0.001$

### 3.3 差异表达 lncRNA 和 mRNA 的生物信息学分析

利用全长转录组测序技术获得 Act-HaCaT 和 HaCat 细胞的 lncRNA 的表达谱,结果显示,Act-HaCaT 与 HaCat 细胞相比,差异表达的 lncRNA 共有 219 个,其中表达上调的有 113 个,表达下调的 lncRNA 有 106 个(图 3-A, 3-B)。

基于生物信息学分析结果,利用 qRT-PCR 对 Act-HaCaT 中前 20 个显著上调进行二次验证,与测序结果趋势一致的有 3 个上调的 lncRNA: ENST00000531381、ENST00000522718 和 ENST00000415917(图 3-C)。因此接下来以显著上调的 lncRNA 作为研究对象。

通过 rhIL23R-CHR/Fc 给药,探索 rhIL23R-CHR/Fc 在调控 Act-HaCaT 细胞的功能时,可能参与调控的 lncRNA 分子。以前期筛选显著上调的 lncRNA 为基础,利用 qRT-PCR 进行筛选,结果显示,在 Act-HaCaT 细胞中给药 100 ng/mL rhIL23R-CHR/Fc 后,目标 lncRNA 分子 ENST00000531381 ( $P < 0.001$ )和 ENST00000522718 ( $P < 0.001$ )的转录水平受到明显抑制,而 lncRNA ENST00000415917 在融合蛋白给药后转录水平增加(图 3-D)。表明 rhIL23R-CHR/Fc 可能通过调节 ENST00000531381 和 ENST00000522718 的基因表达,进而影响 Act-HaCaT 细胞的功能。



**Figure 3** Screening of lncRNA downstream of rhIL23R-CHR/Fc ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: Differentially expressed lncRNA Volcano Plot (HaCat vs Act-HaCaT); B: Differentially expressed lncRNA Statistics Plot (HaCat vs Act-HaCaT); C: Screening of differentially expressed lncRNAs by qRT-PCR; D: Screening of differentially expressed lncRNAs using rhIL23R-CHR/Fc treatment, Act-HaCaT cells untreated with rhIL23R-CHR/Fc were used as Control

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

### 3.4 目标 lncRNA 抑制 Act-HaCaT 细胞的增殖及炎症因子转录

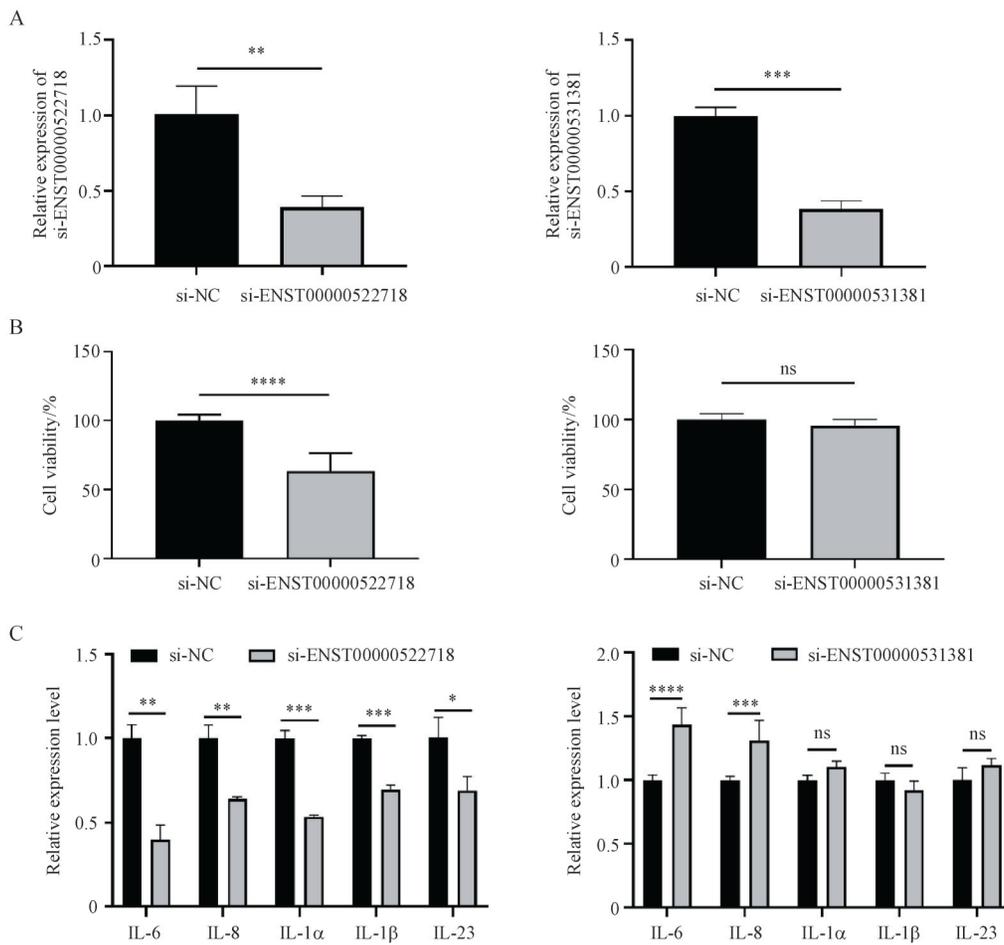
通过 rhIL23R-CHR/Fc 给药后,筛选得到可能参与 IL-23 通路的 lncRNA ENST00000531381 和 ENST00000522718。使用 siRNA 对目标 lncRNA ENST00000531381 和 ENST00000522718 进行敲减。与阴性对照 (si-NC) 组相比, siRNA 干扰后 lncRNA 靶基因的水平降低 (图 4-A)。

敲低目标 lncRNA 后,利用 MTT 检测其对 Act-HaCaT 细胞增殖的影响。结果显示,与对照组相比,敲低 ENST00000522718 后, Act-HaCaT 细胞的增殖受到明显抑制 ( $P < 0.01$ ), 而敲低 ENST00000531381 对 Act-HaCaT 细胞的增殖无显著影响 (图 4-B)。敲低 ENST00000522718 显著抑制 Act-HaCaT 细胞中炎症因子的转录 ( $P < 0.05$ ), 而敲低 ENST00000531381 不仅未抑制,而且还部

分促进了 Act-HaCaT 细胞中炎症因子的转录 (图 4-C)。因此, ENST00000522718 可能是 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白可能是参与 IL-23 通路降低 Act-HaCaT 炎症和增殖能力的关键分子。

## 4 讨论

角质形成细胞与免疫细胞异常增殖是银屑病主要病理特征<sup>[24]</sup>。活化的 Th 细胞产生炎症细胞因子诱导角质形成细胞的基因表达,调节角质形成细胞的应答反应。被激活的角质形成细胞参与银屑病病理,维持并加剧皮肤炎症,释放趋化因子等招募活化的 T 细胞,形成银屑病致病的炎症循环回路<sup>[25]</sup>。人正常皮肤角质形成细胞衍生的 HaCat 细胞是银屑病药理学研究及药物筛选的常用体外模型。可通过添加 TNF- $\alpha$  诱导 HaCat 细胞模拟银屑病的病理<sup>[16,26]</sup>。研究表明, TNF- $\alpha$  不仅调节免疫和



**Figure 4** Determining the function of lncRNAs in cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 A: Knockdown of lncRNA employing siRNA; B: Effects on proliferation after knockdown of lncRNA in Act-HaCaT; C: Variations of inflammation factor production after knockdown of lncRNA  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

炎症反应,而且还调节组织重塑,细胞凋亡,细胞周期和细胞运动等进程。用 10 ng/mL TNF- $\alpha$  处理 HaCat 细胞 24 h 后细胞培养上清液中 IL-17A、IL-23 及 IL-22 的表达明显升高<sup>[27]</sup>。此外, TNF- $\alpha$  还能刺激 HaCat 细胞 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 IL-8 的转录<sup>[28]</sup>。本研究利用 TNF- $\alpha$  刺激的 HaCat 细胞为模型细胞,通过与未刺激的 HaCat 细胞比较,发现 TNF- $\alpha$  不仅诱导了 HaCat 细胞炎症因子的转录和蛋白表达,而且还促进 HaCat 细胞的体外增殖。

目前对于银屑病的病理机制尚不完全清楚,故而限制了相关临床检测和预后指标的发现。大多数哺乳动物和其他复杂生物体的基因组会转录成 ncRNA,包括 miRNA、lncRNA 和环状(circle, circ)RNA 等。近年来 ncRNA 调控网络调节机体复杂的生理过程逐渐被揭示,在自身免疫疾病、肿瘤

及心血管疾病中发挥重要作用<sup>[29-32]</sup>。lncRNA 是 ncRNA 中转录程度最高的 RNA,在多种肿瘤中发挥了重要的生物学功能<sup>[33-34]</sup>,然而关于 lncRNA 在银屑病中的作用了解较少。为了进一步发现银屑病发病的关键分子,通过二代测序发现 HaCat 细胞和 Act-HaCaT 细胞的差异表达 lncRNA 共有 219 个,利用 qRT-PCR 技术差异 lncRNA 进行初步筛选,得到候选 3 个差异上调的目标 lncRNA 分子 ENST00000531381、ENST00000522718 和 ENST00000415917。

在前期研究中发现 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白能够显著改善银屑病小鼠症状,并探讨了 rhIL23R-CHR/Fc 在银屑病小鼠体内的药理机制,基于以上结果,本研究试图探索 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白影响 HaCat 细胞功能的潜在机制。体外实验结果

显示, rhIL23R-CHR/Fc 可以以浓度依赖性的方式抑制 Act-HaCaT 细胞增殖, 还能抑制 IL-23 等炎症因子转录和 IL-6、IL-8 的分泌水平, 但其作用的下游分子机制尚不明确。近年来不断有研究证明 lncRNAs 通过多种机制调节角质形成细胞的促分化和抗分化, 但 lncRNA 在调节角质形成细胞分化中的确切作用尚不明确。Gupta 等<sup>[10]</sup> 利用 RNA 测序鉴定了阿达木治疗前后的银屑病患者及与健康个体皮肤中 lncRNA 转录组, 结果发现银屑病患者与健康人有 971 个差异表达的 lncRNA, 阿达木单抗治疗前后有 157 个差异表达的 lncRNA, 而阿达木治疗后与健康人有 377 个差异表达的 lncRNA。该研究充分说明了 lncRNA 在银屑病病理发展及生物治疗中的潜在重要性。本研究中, 通过 Act-HaCaT 细胞给药 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白, 进一步筛选 rhIL23R-CHR/Fc 影响 HaCaT 细胞功能的下游 lncRNA 分子。在 3 个候选 lncRNA 中, lncRNA ENST00000531381 和 ENST00000522718 的水平在 rhIL23RCHR/Fc 给药后受到明显抑制。为了验证目标 lncRNA 分子对 HaCaT 细胞是否具有调节功能, 接下来利用 siRNA 在 Act-HaCaT 细胞中敲低目标 lncRNA 的水平, 检测细胞功能的变化, 结果证实目标 lncRNA ENST00000522718 能够调节 HaCaT 细胞的增殖及炎症因子的水平; 然而敲低 lncRNA ENST00000531381 后 HaCaT 细胞的炎症因子转录水平部分降低, 但对细胞增殖没有明显影响。因此本研究认为 ENST00000522718 是 rhIL23RCHR/Fc 调节 HaCaT 细胞功能的下游分子。

ceRNA 机制是目前研究最火热的调控方式之一, 成为银屑病治疗中的潜在新型靶标<sup>[35]</sup>。本研究基于前期的研究基础, 通过体外研究, 得到了 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白调控 Act-HaCaT 细胞功能的下游关键 lncRNA ENST00000522718, 并探究了 ENST00000522718 在 Act-HaCaT 细胞中的作用机制。之后将继续探索 ENST00000522718 下游的 miRNA 以及 mRNA, 阐明 ceRNA 网络在 rhIL23R-CHR/Fc 融合蛋白影响 HaCaT 细胞功能中的调控机制。进一步揭示 lncRNA 在银屑病发病及 rhIL23R-CHR/Fc 治疗银屑病的潜在机制, 为今后针对银屑病的核酸药物治疗研究提供候选分子。

## References

- [1] Keum H, Kim TW, Kim Y, et al. Bilirubin nanomedicine alleviates psoriatic skin inflammation by reducing oxidative stress and suppressing pathogenic signaling [J]. *J Control Release*, 2020, **325**: 359-369.
- [2] Ghoreschi K, Balato A, Enerbäck C, et al. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis [J]. *Lancet*, 2021, **397**(10275): 754-766.
- [3] Chiricozzi A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, et al. Increased expression of interleukin-17 pathway genes in nonlesional skin of moderate-to-severe psoriasis vulgaris [J]. *Br J Dermatol*, 2016, **174**(1): 136-145.
- [4] Coto-Segura P, Eiris-Salvado N, González-Lara L, et al. Psoriasis, psoriatic arthritis and type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Dermatol*, 2013, **169**(4): 783-793.
- [5] Fu Y, Lee CH, Chi CC. Association of psoriasis with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Dermatol*, 2018, **154**(12): 1417-1423.
- [6] Garshick MS, Ward NL, Krueger JG, et al. Cardiovascular risk in patients with psoriasis: JACC review topic of the week [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, **77**(13): 1670-1680.
- [7] Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, et al. Psoriasis [J]. *Lancet*, 2021, **397**(10281): 1301-1315.
- [8] Qiao YC, Pan YH, Ling W, et al. The Yin and Yang of regulatory T cell and therapy progress in autoimmune disease [J]. *Autoimmun Rev*, 2017, **16**(10): 1058-1070.
- [9] Statello L, Guo CJ, Chen LL, et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, **22**(2): 96-118.
- [10] Gupta R, Ahn R, Lai K, et al. Landscape of long noncoding RNAs in psoriatic and healthy skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2016, **136**(3): 603-609.
- [11] Ahn R, Gupta R, Lai K, et al. Network analysis of psoriasis reveals biological pathways and roles for coding and long non-coding RNAs [J]. *BMC Genomics*, 2016, **17**(1): 841.
- [12] Wu GC, Pan HF, Leng RX, et al. Emerging role of long noncoding RNAs in autoimmune diseases [J]. *Autoimmun Rev*, 2015, **14**(9): 798-805.
- [13] Szegedi K, Sonkoly E, Nagy N, et al. The anti-apoptotic protein GIP3 is overexpressed in psoriasis and regulated by the non-coding RNA, PRINS [J]. *Exp Dermatol*, 2010, **19**(3): 269-278.
- [14] Széll M, Danis J, Bata-Csörgő Z, et al. PRINS, a primate-specific long non-coding RNA, plays a role in the keratinocyte stress response and psoriasis pathogenesis [J]. *Pflugers Arch*, 2016, **468**(6): 935-943.
- [15] Tsoi LC, Iyer MK, Stuart PE, et al. Analysis of long non-coding RNAs highlights tissue-specific expression patterns and epigenetic profiles in normal and psoriatic skin [J]. *Genome Biol*,

- 2015, **16**:24.
- [16] Tang ZL, Zhang K, Lv SC, *et al.* LncRNA MEG3 suppresses PI3K/AKT/mTOR signalling pathway to enhance autophagy and inhibit inflammation in TNF- $\alpha$ -treated keratinocytes and psoriatic mice[J]. *Cytokine*, 2021, **148**:155657.
- [17] Luo M, Huang P, Pan Y, *et al.* Weighted gene coexpression network and experimental analyses identify lncRNA *SPRR2C* as a regulator of the IL-22-stimulated HaCaT cell phenotype through the miR-330/*STAT1/S100A7* axis[J]. *Cell Death Dis*, 2021, **12**(1):86.
- [18] Gao JT, Chen FR, Hua MC, *et al.* Knockdown of lncRNA *MIR31HG* inhibits cell proliferation in human HaCaT keratinocytes[J]. *Biol Res*, 2018, **51**(1):30.
- [19] Duan QQ, Wang GR, Wang M, *et al.* LncRNA *RP6-65G23.1* accelerates proliferation and inhibits apoptosis via p-ERK1/2/p-AKT signaling pathway on keratinocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2020, **121**(11):4580-4589.
- [20] He YX, Yin XR, Yan JJ, *et al.* The lncRNA *H19/miR-766-3p/SIPR3* axis contributes to the hyperproliferation of keratinocytes and skin inflammation in psoriasis via the AKT/mTOR pathway[J]. *Mediators Inflamm*, 2021, **2021**:9991175.
- [21] Li BS, Tsoi LC, Swindell WR, *et al.* Transcriptome analysis of psoriasis in a large case-control sample: RNA-seq provides insights into disease mechanisms[J]. *J Invest Dermatol*, 2014, **134**(7):1828-1838.
- [22] Gao Y, Bian ZY, Xue WY, *et al.* Human IL-23R cytokine-binding homology region-fc fusion protein ameliorates psoriasis via the decrease of systemic Th17 and ILC3 cell responses[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(17):E4170.
- [23] Bian ZY, Lei W, Li QW, *et al.* Gm15575 functions as a *CeRNA* to up-regulate *CCL7* expression through sponging miR-686 in Th17 cells[J]. *Mol Immunol*, 2020, **125**:32-42.
- [24] Dainichi T, Kitoh A, Otsuka A, *et al.* The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis[J]. *Nat Immunol*, 2018, **19**(12):1286-1298.
- [25] Gooderham MJ, Papp KA, Lynde CW. Shifting the focus — the primary role of IL-23 in psoriasis and other inflammatory disorders[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2018, **32**(7):1111-1119.
- [26] Gomez C, Muangnoi C, Sorasithyanukarn FN, *et al.* Synergistic effects of photo-irradiation and curcumin-chitosan/alginate nanoparticles on tumor necrosis factor-alpha-induced psoriasis-like proliferation of keratinocytes[J]. *Molecules*, 2019, **24**(7):E1388.
- [27] Li PH, Li YL, Jiang H, *et al.* Glabridin, an isoflavan from licorice root, ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like inflammation of BALB/c mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, **59**:243-251.
- [28] Lin ZM, Ma M, Li H, *et al.* Topical administration of reversible SAHH inhibitor ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in mice via suppression of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced inflammatory response in keratinocytes and T cell-derived IL-17[J]. *Pharmacol Res*, 2018, **129**:443-452.
- [29] Mazzone R, Zwergel C, Artico M, *et al.* The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders[J]. *Clin Epigenetics*, 2019, **11**(1):34.
- [30] Anastasiadou E, Jacob LS, Slack FJ. Non-coding RNA networks in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, **18**(1):5-18.
- [31] Viereck J, Thum T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury[J]. *Circ Res*, 2017, **120**(2):381-399.
- [32] Yu DM, Guo W, Lei W, *et al.* Advances of lncRNA in immune cells and autoimmune diseases[J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2017, **48**(3):371-376.
- [33] Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. *Cancer Cell*, 2016, **29**(4):452-463.
- [34] Liu SJ, Dang HX, Lim DA, *et al.* Long noncoding RNAs in cancer metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, **21**(7):446-460.
- [35] Lin JX, Li XF, Zhang FF, *et al.* Transcriptome wide analysis of long non-coding RNA-associated *CeRNA* regulatory circuits in psoriasis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, **25**(14):6925-6935.