

论著·基础研究

长链非编码 RNA AC073046.25 在系统性红斑狼疮易感基因 *TET3* 表达调节中的作用

徐 宁, 周 甜, 侯国俊, 沈 南, 唐元家

上海交通大学医学院附属仁济医院风湿病科, 上海市风湿病学研究所, 上海 200127

[摘要] **目的**·探究长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) AC073046.25 在单核细胞中对 Tet 甲基胞嘧啶双加氧酶 3 (Tet methylcytosine dioxygenase 3, *TET3*) 表达的调控作用, 分析其作为系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 诊断的生物标志物的可行性。**方法**·通过表观遗传学修饰及胞浆胞核定位对 AC073046.25 的细胞特异性及功能进行预测。在 U-937 细胞中利用反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 对 AC073046.25 进行敲低 (knock down), 通过实时荧光定量 PCR 分析 ASO 敲低 AC073046.25 后对 *TET3* 表达水平的影响。收集健康志愿者 ($n=32$) 与 SLE 患者 ($n=46$) 的单核细胞, 通过皮尔逊系数分析 AC073046.25 与 *TET3* 表达水平之间的相关性。将健康志愿者记为健康对照组, 同时按系统性红斑狼疮疾病活动指数 (systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI) 评分标准将 SLE 患者分为疾病稳定组和疾病活跃组, 采用非配对双侧 student's *t* 检验比较 AC073046.25 与 *TET3* 在健康对照组及不同疾病活动组间的差异。**结果**·表观遗传学数据及胞浆胞核定位实验提示, AC073046.25 可能在单核细胞中参与 *TET3* 的表达调控。在 U-937 细胞中, ASO 敲低 AC073046.25 后, *TET3* 表达水平降低 (ASO 组均 $P=0.002$)。相关性分析显示, 原单核细胞中 AC073046.25 与 *TET3* 的表达呈正相关 ($r=0.650$, $P=0.000$)。非配对双侧 student's *t* 检验结果显示, 分别与健康对照组和疾病稳定组相比, AC073046.25 在疾病活跃组中的表达水平降低 ($P=0.002$, $P=0.000$)。**结论**·在单核细胞中 AC073046.25 能够调控 *TET3* 的表达, 在疾病活动度较高的 SLE 患者单核细胞中其表达水平显著降低; 继而提示, AC073046.25 可作为活跃性 SLE 的生物标志物辅助疾病活动性诊断。

[关键词] 长链非编码 RNA; Tet 甲基胞嘧啶双加氧酶 3; 系统性红斑狼疮; 易感基因**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.08.005 **[中图分类号]** R593.24¹ **[文献标志码]** ARole of long noncoding RNA AC073046.25 in regulation of systemic lupus erythematosus susceptibility gene *TET3* expression

XU Ning, ZHOU Tian, HOU Guo-jun, SHEN Nan, TANG Yuan-jia

Shanghai Institute of Rheumatology, Department of Rheumatology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the regulatory effect of long noncoding RNA (lncRNA) AC073046.25 on the expression of Tet methylcytosine dioxygenase 3 (*TET3*) in monocytes, and analyze the feasibility of AC073046.25 as a biomarker for the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods**·The cell specificity and function of AC073046.25 were predicted by epigenetic modification and cytoplasm/nuclear location experiment. In U-937 cells, antisense oligonucleotide (ASO) was used to knock down AC073046.25. The effect of ASO knockdown on *TET3* expression was analyzed by quantitative real-time PCR. Monocytes from healthy volunteers ($n=32$) and SLE patients ($n=46$) were collected. The correlation between AC073046.25 and *TET3* expression was analyzed by Pearson coefficient. Healthy volunteers were included in the healthy control group, and the SLE patients were divided into SLE-inactive group and SLE-active group according to the systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI). The differences of AC073046.25 and *TET3* expression in healthy control group and different disease activity groups were compared by unpaired bilateral student's *t* test. **Results**·The epigenetic modification and cytoplasm/nuclear location experiment showed that AC073046.25 may be involved in the regulation of *TET3* expression in monocytes. In U-937 cells, after ASO knocked down AC073046.25, *TET3* expression level decreased (both $P=0.002$ in ASO groups). Correlation analysis showed that AC073046.25 expression was positively correlated with *TET3* expression in primary monocytes ($r=0.650$, $P=0.000$). Unpaired bilateral student's *t* test showed that the expression level of AC073046.25 in the SLE-active group was lower than that in the healthy control group ($P=0.002$) and the SLE-inactive group ($P=0.000$). **Conclusion**·In monocytes, AC073046.25 can regulate the expression of *TET3*, and its expression is significantly decreased in monocytes derived from disease active SLE patients, which implicating that AC073046.25 can be thought as a biomarker for SLE disease activity diagnosis.

[Key words] long noncoding RNA (lncRNA); Tet methylcytosine dioxygenase 3 (*TET3*); systemic lupus erythematosus (SLE); susceptibility gene**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81871287, 31630021, 31930037); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SSMU-ZDCX20180100)。**[作者简介]** 徐 宁 (1993—), 男, 硕士生; 电子信箱: sjtuxuning@foxmail.com。**[通信作者]** 唐元家, 电子信箱: tangyuanjia028@163.com。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81871287, 31630021, 31930037); Innovative Research Team of High-Level Local Universities in Shanghai (SSMU-ZDCX20180100)。**[Corresponding Author]** TANG Yuan-jia, E-mail: tangyuanjia028@163.com。

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种复杂的自身免疫病, 主要表现为自身抗体的分泌、I 型干扰素信号通路的异常活化^[1]。有研究^[2-3]发现, 除了产生自身抗体的 B 细胞外, 单核/巨噬细胞、T 细胞、树突状细胞和中性粒细胞等均与 SLE 密切相关。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度在 200 bp 以上的、不具有蛋白翻译功能的 RNA^[4]。其曾被认为是没有功能的转录组暗物质, 但越来越多的研究^[5-6]发现 lncRNA 可在体内病理生理代谢反应中发挥重要的调控作用。不仅如此, lncRNA 还可以作为增强子 RNA (enhancer RNA, eRNA) 参与基因的表达调控。eRNA 常转录自基因编码区以外的增强子区域^[7], 以顺式 (*cis*-) 或反式 (*trans*-) 调控作用参与基因表达^[8-9]。由于 eRNA 转录自增强子区域, 故可根据增强子的表观遗传学修饰信号即组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸单甲基化 (H3K4me1) 和组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸乙酰化 (H3K27ac) 情况来鉴定 lncRNA 是否存在增强子活性^[10]。

Tet 甲基胞嘧啶双加氧酶 (Tet methylcytosine dioxygenase, Tet) 是一类 DNA 去甲基化酶, 主要包括 TET1、TET2 和 TET3^[11]。其中, *TET1* 可抑制非霍奇金淋巴瘤的增殖^[12], *TET2* 与白介素 6 (interleukin-6, *IL-6*) 和 Forkhead box 蛋白 P3 (forkhead box protein P3, *FOXP3*) 的表达相关^[13-14], *TET3* 与胚胎发育和肿瘤发生相关^[15-16]。另有报道^[17]显示, *TET3* 可作为负调控分子抑制干扰素 β 的表达。全基因组关联研究 (Genome-wide association study, GWAS)^[18]发现 *TET3* 是 SLE 易感基因, 提示其可能参与 SLE 疾病的发展。但有关 *TET3* 表达调控机制尚不清楚。根据 Ensembl 数据库中的基因注释, 我们发现在 *TET3* 转录本的上游存在一条 lncRNA AC073046.25, 而已有报道^[19-20]提示, 编码基因邻近区域的 lncRNA 可作为 eRNA 调节基因的表达。故本研究从 SLE 易感基因 *TET3* 的表达调控出发, 探究 AC073046.25 与 *TET3* 表达水平之间的关系, 以及在 SLE 患者和健康志愿者中 AC073046.25 的表达差异, 以期 SLE 的诊断提供一种新的生物标志物。

1 对象与方法

1.1 研究对象、试剂及仪器

1.1.1 试验对象和细胞培养 选择 2018—2019 年于上海交通大学医学院附属仁济医院风湿病科就诊的 SLE 患者 46 例 (均为女性), 平均年龄 (34.52 \pm 9.27) 岁。所有患者均符合 2009 年美国风湿病协会 (American College of Rheumatology, ACR) 颁布的 SLE 诊断标准^[21]。同时, 招

募与 SLE 患者的年龄、性别分布相匹配的, 无 SLE 家族遗传病史, 无糖皮质激素摄入的健康志愿者 32 名 (健康对照组)。本研究已通过上海交通大学医学院附属仁济医院伦理委员会审批 (伦理审批号为【2013】126 号), 所有被试均签署了知情同意书。

本研究相关实验中所用 U-937 细胞为自组织淋巴瘤的单核细胞系, 购自中国科学院细胞库。在含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 1640 培养基中培养 U-937 细胞, 待生长密度达 70% 即可传代。本实验所用细胞为指数生长期的第 3 ~ 9 代细胞, 生长状态良好。

1.1.2 试剂与仪器 RPMI-1640 培养基、FBS、Opti-MEM 无血清培养基 (Gibco, 美国), NE-PER 胞浆胞核分离试剂盒 (Thermo, 美国), 人 CD4⁺、CD8⁺、CD14⁺ 和 CD19⁺ 细胞阳选分离磁珠 (Miltenyi, 德国), TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国), PrimeScriptTM 反转录试剂盒与 TB Green[®] Premix Ex TaqTM 荧光定量试剂盒 (Takara, 日本), ViiATM 7 实时定量 PCR 系统 (Applied Biosystems, 美国), TransIntroTM EL 转染试剂 (北京金全生物技术有限公司), 高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 AC073046.25 所在区域基因组的表观遗传学分析 本研究涉及的表观遗传学数据均来自 RoadMap 数据库 (<http://www.roadmapepigenomics.org/data/tables/all#>), 分析步骤如下: ①点击 Browse Data 选项卡下的 Data table 选项, 选定免疫细胞亚群和组蛋白修饰类型。②点击 Go to Browser 按钮, 建立与 UCSC 数据库的链接, 并输入位置: GRCh37/hg19 chr2:74208245-74218245。③点击 View 选项下的 PDF/PS 选项, 将数据保存为后缀 .EPS 的文件。④使用 AI 图像处理软件, 将与表观遗传修饰无关的部分删除, 只保留基因注释和表观遗传修饰峰图的数据即可。

1.2.2 胞浆胞核分离、RNA 抽提与实时荧光定量 PCR 分析 收集 U-937 细胞并计数, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 2 次后重悬, 以 2×10^6 个细胞为单位分装至 1.5 mL 离心管中, $500 \times g$ 离心 3 min, 弃上清液并于室温充分干燥细胞沉淀。而后, 根据 NE-PER 胞浆胞核分离试剂盒说明书, 先分离 U-937 细胞的胞浆再分离胞核。采用 TRIzol 抽提分离产物的 RNA, 按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA。利用 TB Green[®] Premix Ex TaqTM 试剂盒, 以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测, 并以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示靶基因的相对表达水平。随后, 分析胞浆和胞核 RNA 中 AC073046.25 的表达量, 计算胞浆或胞核来源

的 AC073046.25 表达量占总表达量 (胞浆 + 胞核) 的百分比。本实验采用主要定位在胞浆的甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 和主要定位在胞核的 lncRNA 核内丰富转录本 1 (nuclear enriched abundant transcript 1, *NEAT1*) 作为对照。qPCR 引物序列如表 1。

表 1 qPCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences for qPCR

Primer	Sequence (5' → 3')
<i>GAPDH</i>	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R: GGCTGTTGTCATCTTCTCATGG
AC073046.25	F: ATCCCTTTTCTGAGGGCTGC R: AAGTGGCTTCAGTCTCGTGG
<i>TET3</i>	F: AGTGTCCGAAAGCCCATTCAG R: GCAAATAGCGCAAGAGAAGGTT
<i>NEAT1</i>	F: AGCTGCGTCTATTGAATTGGTAAAGTAA R: GACAGAAAGATCCCAACGATAAAAATAA

1.2.3 ASO/siRNA 转染 为验证 AC073046.25 mRNA 水平降低后对 *TET3* 表达的影响, 我们利用反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 对 AC073046.25 进行敲低。实验步骤如下: 于转染前 18 h, 将 U-937 细胞均匀接种于 24 孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞。实验分为阴性对照组 (ASO-NC) 和实验组 (AC073046.25-ASO1、AC073046.25-ASO2); 向 50 μ L Opti-MEM 无血清培养基中加入 2 μ L 100 mmol/L 的 ASO, 充分混匀后静置 3 min, 再向其中加入 2 μ L TransIntro™ EL 转染试剂, 轻柔混匀后室温静置 15 min, 随后将上述混合物缓慢滴加至 U-937 上清液中培养 6 h 后, 离心收集细胞, 使用 TRIzol 抽提 RNA, 经反转录后行 qPCR 检测 (引物见表 1)。为验证 *TET3* mRNA 水平降低是否会对 AC073046.25 产生影响, 我们还利用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 对 *TET3* 进行敲低。在 siRNA 转染实验中, 分为阴性对照组 (siRNA negative control, siRNA-NC) 和实验组 (siRNA-*TET3*), 除需将 2 μ L 的 ASO 替换为 2 μ L 20 mmol/L 的 siRNA 外, 其余步骤均与 ASO 转染实验一致。ASO 及 siRNA 的转染序列如表 2。

表 2 ASO 及 siRNA 转染序列
Tab 2 Transfection sequences of ASO and siRNA

ASO/siRNA	Sequence (5' → 3')
ASO-NC	TCTACTCGTCGCTACGTACC
AC073046.25-ASO1	CAGCGTCCAGACCCTGGAGG
AC073046.25-ASO2	GGGAGAGTGGCCCCCTACGG
siRNA-NC	UAAGGCUAUGAAGAGAUAC
siRNA- <i>TET3</i>	GAACCUUCUCUUGCGCUAU

1.2.4 不同原代免疫细胞亚群的分离 收集健康志愿者和 SLE 患者的外周血样本, 分别通过密度梯度离心法将 2 个样本中的单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 进行分离, 步骤如下: 将所得样本用含有 2% 牛血清白蛋白与 2 mmol/L 乙二胺四乙酸的 PBS (即美天旋缓冲液) 稀释 2 倍。向 50 mL 离心管中加入密度梯度离心介质 Ficoll 15 mL, 并将稀释后的外周血样本沿管壁缓慢加至 Ficoll 液面上方, 设置离心机加减速度为零, $400 \times g$ 离心 45 min 后吸取位于 Ficoll 与水相之间的 PBMCs。对该细胞进行计数后, 用美天旋缓冲液洗涤 2 次, 按 CD14⁺/CD4⁺/CD8⁺/CD19⁺ 磁珠使用说明书进行相应免疫细胞亚群的分离。

1.2.5 RNA 测序 采用 TRIzol 抽提从上述方法中获得的健康志愿者的免疫细胞亚群的 RNA, 并送至苏州金唯智公司进行 RNA-seq 测序, 包括对原始数据进行质控和分析。目前, 常采用 2 种衡量标准对转录本的表达水平进行分析: 即每百万个映射的读数中映射到外显子的每一千个碱基上的读数个数 (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM) 和每百万个外显子模型读数中映射到转录本每千个碱基的个数 (transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads, TPM)。由于 TPM 可以更精确地反映转录本的表达水平, 因此本研究采用 TPM 作为衡量 AC073046.25 在不同免疫细胞亚群中表达水平的依据。

1.2.6 SLE 患者疾病活动度评分 采用系统性红斑狼疮疾病活动指数 (systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI) 对 SLE 患者的疾病活动程度进行评分, 并据此将患者分为疾病活跃组 (SLEDAI > 4 分) 与疾病稳定组 (SLEDAI \leq 4 分)。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0 软件对研究数据进行统计分析。通过计算皮尔逊相关系数, 分析健康志愿者与 SLE 患者的原代单核细胞中 AC073046.25 与 *TET3* 表达水平之间的相关性。通过非配对双侧 Student's *t* 检验, 比较健康志愿者、疾病活跃组与疾病稳定组间 AC073046.25 与 *TET3* 表达水平的差异。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

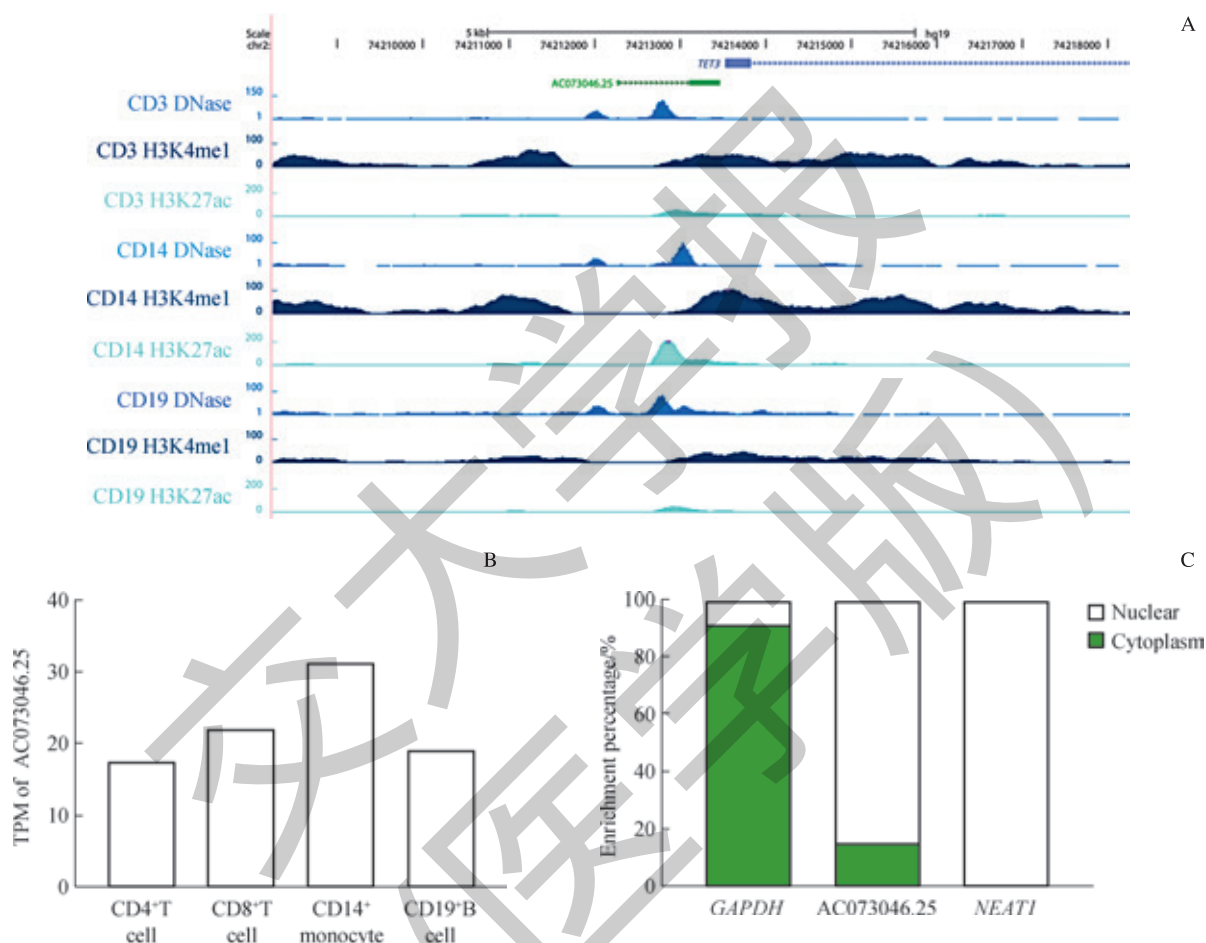
2.1 lncRNA AC073046.25 对 *TET3* 的表达调节作用

由于 *TET3* 上游存在一条与之同向的 lncRNA, 从空

间上来说, 我们认为该 lncRNA 存在调控 *TET3* 表达的可能性。因此, 本研究首先对该 lncRNA 所在区域的表现遗传修饰进行分析, 结果 (图 1A) 显示在 CD14⁺ 单核细胞中的 AC073046.25 位点处探测到了较强的 H3K4me1 与 H3K27ac 信号; 而结合原代不同免疫细胞亚群的 RNA-seq 数据 (图 1B) 可以发现, AC073046.25 在单核细胞中表达水平较高, 继而推断该 lncRNA 有可能在 CD14⁺ 的单核

细胞中发挥功能。

由于 eRNA 参与基因转录水平调控, 因此其主要定位于细胞核。本研究采用胞浆胞质分离实验对 AC073046.25 的定位进行探究, 随后经 qPCR 检测 (图 1C) 显示, 在 U-937 细胞中 AC073046.25 主要定位在细胞核内 (84.8% 的 AC073046.25 分布于细胞核内, 仅有 15.2% 分布在胞浆)。



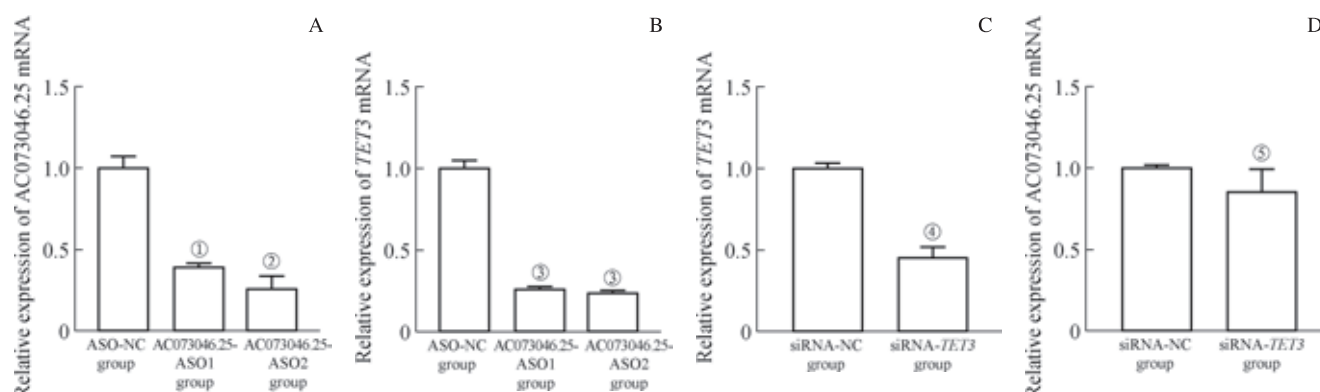
Note: A. H3K4me1 and H3K27ac histone modification signals of lncRNA AC073046.25 region in different immune cell subtypes, leftmost labels are different histone modifications of different cell subsets, ordinate value represents the abundance of histone modification at the corresponding position of chromosome. B. Expression level of AC073046.25 in different primary immune cell subsets. C. Cytoplasm/nuclear location experiment of lncRNA AC073046.25.

图 1 lncRNA AC073046.25 的功能性预测

Fig 1 Functional prediction of lncRNA AC073046.25

为进一步验证 AC073046.25 的功能, 我们在 U-937 细胞中设计功能缺失实验, 即用 ASO 对 AC073046.25 进行敲低, 并通过 qPCR 对敲低效率及敲低后对 *TET3* 的表达影响进行分析。结果 (图 2A、2B) 显示, 与 ASO-NC 组相比, ASO 实验组可在 RNA 水平有效敲低 AC073046.25, 效率均 >50% (ASO1: $P=0.008$, ASO2: $P=0.010$); 同时该实验组在敲低 AC073046.25 后, *TET3*

mRNA 水平降低 (均 $P=0.002$)。继而说明, 在 U-937 细胞中 AC073046.25 对 *TET3* 的表达存在调控作用。而通过 siRNA 将 *TET3* 在 mRNA 水平上进行敲低后结果 (图 2C、2D) 发现, siRNA 敲低 *TET3* ($P=0.008$) 并未影响 AC073046.25 的表达。基于上述结果, 我们认为在 U-937 细胞中 AC073046.25 对 *TET3* 的表达存在调控作用, 且该调控作用是单向的。



Note: A-B. Expression levels of AC073046.25 (A) and *TET3* (B), after ASO knocked down AC073046.25 in U-937 cells. ^① $P=0.008$, ^② $P=0.010$, ^③ $P=0.002$, compared with the ASO-NC group. C-D. Expression levels of *TET3* (C) and AC073046.25 (D), after siRNA knocked down *TET3* in U-937 cells. ^④ $P=0.008$, ^⑤ $P=0.288$, compared with the siRNA-NC group.

图 2 siRNA/ASO 转染 U-937 细胞后, qPCR 检测 AC073046.25 和 *TET3* 的表达水平

Fig 2 After siRNA/ASO was transfected into U-937 cells, the expression levels of AC073046.25 and *TET3* were detected by qPCR

2.2 AC073046.25 与 *TET3* 在原代单核细胞中的表达相关性分析

在确定了 AC073046.25 在 U-937 细胞中对 *TET3* 存在表达调控作用后, 我们采用 qPCR 检测单核细胞中 AC073046.25 与 *TET3* 的表达水平, 并在 GraphPad Prism 软件中计算皮尔逊系数对二者表达水平作相关性分析; 其中, X 轴 AC073046.25 表达量为自变量, Y 轴 *TET3* 表达量为因变量。结果 (图 3) 显示, 在原代单核细胞中 AC073046.25 与 *TET3* 的表达水平间存在正相关性 ($r=0.650$, $P=0.000$)。

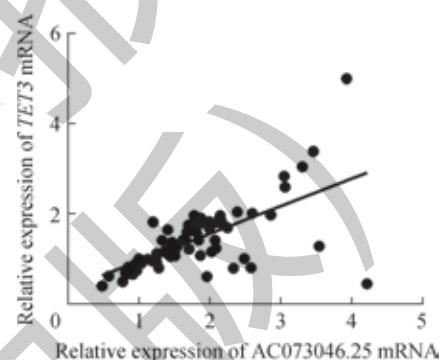


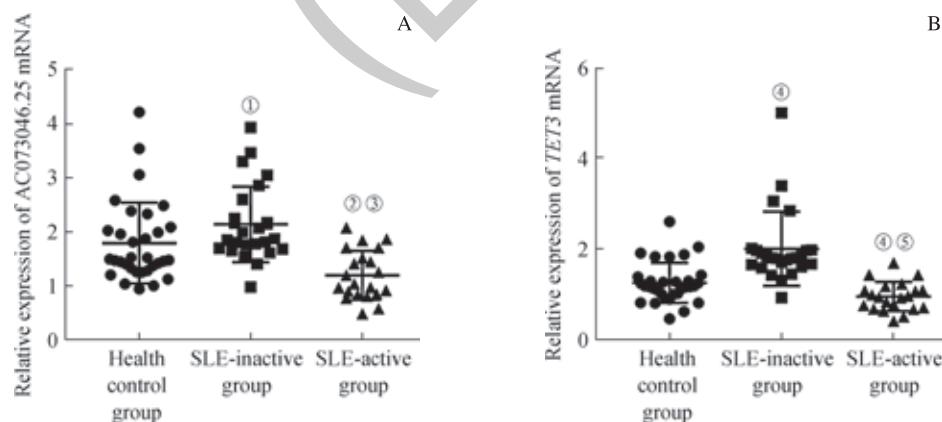
图 3 原代单核细胞中 AC073046.25 与 *TET3* 表达的相关性分析

Fig 3 Correlation analysis of AC073046.25 and *TET3* expression in primary monocytes

2.3 AC073046.25 在不同疾病活动度 SLE 患者单核细胞中的表达水平分析

虽经分析得知, 在原代单核细胞中 AC073046.25 与 *TET3* 的表达呈正相关, 但我们仍需对 AC073046.25 与 SLE 间的关系做进一步验证。通过对 46 例 SLE 患者的疾病活动情况打分并统计, 结果发现疾病稳定组共 25 例、疾病活跃组共 21 例。采用 qPCR 对健康对照组、疾病稳定组和疾

病活跃组的单核细胞中 AC073046.25 和 *TET3* 表达水平进行分析, 结果 (图 4) 所示, AC073046.25 在健康对照组与疾病稳定组的表达水平间差异无统计学意义, 在疾病活跃组则较低 ($P=0.002$, $P=0.000$); 与健康对照组相比, *TET3* 在疾病活跃组中的表达水平则表现为下调 ($P=0.010$)。



Note: A. Relative expression of AC073046.25. ^① $P=0.080$, ^② $P=0.002$, compared with the health control group; ^③ $P=0.000$, compared with the SLE-inactive group. B. Relative expression of *TET3*. ^④ $P=0.000$, ^⑤ $P=0.010$, compared with health control group; ^⑥ $P=0.000$, compared with the SLE-inactive group.

图 4 AC073046.25 及 *TET3* 在健康对照组及不同疾病活动组的单核细胞中的表达

Fig 4 Expression of AC073046.25 and *TET3* in monocytes derived from healthy control group and different disease activity groups

3 讨论

本研究结果显示, 在 U-937 细胞中通过 ASO 敲低 AC073046.25 会导致 *TET3* 表达水平的降低; 且在原代单核细胞中, AC073046.25 与 *TET3* 的表达水平呈正相关。由此我们认为, 该 AC073046.25 在单核细胞中能够调控 *TET3* 的表达。随后我们对不同疾病活动组的 SLE 患者单核细胞中 AC073046.25 的表达水平进行分析, 结果发现疾病活跃组中的 AC073046.25 表达水平显著低于健康对照组与疾病稳定组。因此, 我们认为该 lncRNA 具备作为活跃性 SLE 诊断的生物标志物的潜力, 与报道^[22] 结论一致。

lncRNA 曾因不具备编码蛋白质的能力而被视为无用的转录产物。但随着高通量测序技术水平的不断提升, 越来越多的 lncRNA 被发现, 其功能也逐渐被报道^[23]。根据研究结果, 我们认为 AC073046.25 可能以 eRNA 的形式参与 *TET3* 的表达调控。且 eRNA 在转录水平对靶基因的

调控方式可大致分为 2 种: 通过募集组蛋白修饰相关的酶来改变组蛋白的修饰水平, 影响染色质开放性^[24]; 或是与蛋白或 RNA 结合来影响其稳定性, 参与转录调控^[25]。针对 AC073046.25 具体发挥功能的机制探索, 我们计划从以下几个角度开展: 首先通过生物信息学对有可能与其直接结合的转录因子进行预测, 其次是通过 RNA 拉下 (RNA pull down) 合成生物素标记的 AC073046.25 探针, 将与之结合的蛋白质拉下, 并通过质谱对这些蛋白质进行鉴定^[26]; 除此之外, 我们还计划采用环形染色质构象捕获 (Circular chromosome conformation capture, 4C) 实验来验证 AC073046.25 可通过诱导增强子-启动子环形染色质构象的形成来调控 *TET3* 的表达^[27]。综上, 通过研究 AC073046.25 对 *TET3* 的表达调控具体机制, 不仅可以为其作为活跃性 SLE 的诊断标志物提供坚实的理论基础, 还可以为 SLE 的治疗提供新的靶点, 值得进一步深入分析。

参 考 文 献

- [1] Imgenberg-Kreuz J, Almlöf JC, Leonard D, et al. DNA methylation mapping identifies gene regulatory effects in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(5): 736-743.
- [2] Tsokos GC. Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(6): 605-614.
- [3] Tsokos GC, Lo MS, Costa Reis P, et al. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(12): 716-730.
- [4] Valadkhan S, Gunawardane LS. lncRNA-mediated regulation of the interferon response[J]. *Virus Res*, 2016, 212: 127-136.
- [5] Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.
- [6] Wu YF, Zhang FF, Ma JY, et al. Association of large intergenic noncoding RNA expression with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 131.
- [7] Fedoseeva DM, Kretova OV, Tchurikov NA. Molecular analysis of enhancer RNAs and chromatin modifications in the region of their synthesis in *Drosophila* cells possessing genetic constructs[J]. *Dokl Biochem Biophys*, 2012, 442: 7-11.
- [8] Xiang JF, Yin QF, Chen T, et al. Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus[J]. *Cell Res*, 2014, 24(5): 513-531.
- [9] Wang KC, Yang YW, Liu B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 120-124.
- [10] Li WB, Notani D, Rosenfeld MG. Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(4): 207-223.
- [11] Wu XJ, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond[J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(9): 517-534.
- [12] Cimmino L, Dawlaty MM, Ndiaye-Lobry D, et al. TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(6): 653-662.
- [13] Yang RL, Qu CY, Zhou Y, et al. Hydrogen sulfide promotes Tet1- and Tet2-mediated Foxp3 demethylation to drive regulatory T cell differentiation and maintain immune homeostasis[J]. *Immunity*, 2015, 43(2): 251-263.
- [14] Zhang Q, Zhao K, Shen QC, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6[J]. *Nature*, 2015, 525(7569): 389-393.
- [15] Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes[J]. *Nature*, 2011, 477(7366): 606-610.
- [16] Misawa K, Imai A, Mochizuki D, et al. Association of TET3 epigenetic inactivation with head and neck cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(36): 24480-24493.
- [17] Xue SJ, Liu C, Sun XJ, et al. TET3 Inhibits type 1 IFN production independent of DNA demethylation[J]. *Cell Rep*, 2016, 16(4): 1096-1105.
- [18] Morris DL, Sheng YJ, Zhang Y, et al. Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Genet*, 2016, 48(8): 940-946.
- [19] Zhang Q, Chao TC, Patil VS, et al. The long noncoding RNA *ROCK1* regulates inflammatory gene expression[J]. *EMBO J*, 2019, 38(8): E100041.
- [20] Ilott NE, Heward JA, Roux B, et al. Long non-coding RNAs and enhancer RNAs regulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3979.
- [21] Wang JH, Dai M, Cui YG, et al. Association of abnormal elevations in IFIT3 with overactive cyclic GMP-AMP synthase/stimulator of interferon genes signaling in human systemic lupus erythematosus monocytes[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(12): 2036-2045.
- [22] Tatmir A, Talpos-Caia A, Anselmo F, et al. The complement system as a biomarker of disease activity and response to treatment in multiple sclerosis[J]. *Immunol Res*, 2017, 65(6): 1103-1109.
- [23] Zhao Y, Li H, Fang SS, et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D203-D208.
- [24] McHugh CA, Chen CK, Chow A, et al. The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3[J]. *Nature*, 2015, 521(7551): 232-236.
- [25] Ulitsky I, Bartel DP. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms[J]. *Cell*, 2013, 154(1): 26-46.
- [26] Zhang PF, Pei X, Li KS, et al. Circular RNA circFGFR1 promotes progression and anti-PD-1 resistance by sponging miR-381-3p in non-small cell lung cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 179.
- [27] Millau JF, Gaudreau L. Detection of short-range DNA interactions in mammalian cells using high-resolution circular chromosome conformation capture coupled to deep sequencing[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1334: 245-259.

[收稿日期] 2020-02-17

[本文编辑] 邢宇洋

