

Alu RNA 及其突变体真核表达质粒构建以及对 A549 细胞活性氧簇产生的影响

雷恩宇,毛 壮,纪奇峰,束 毅,王 伟*,颜 真*

空军军医大学药学院药物基因组学教研室,陕西 西安 710032

[摘要] 目的:从氧化应激的 A549 细胞鉴定 Alu RNA 表达,构建 Alu RNA 及其 2 种功能缺失突变体的真核表达质粒,探讨过表达 Alu RNA 及其突变体对细胞氧化应激的影响。方法:设计 Alu RNA 特异性引物, H₂O₂ 应激 A549 细胞, RT-PCR 扩增目的片段,通过定向克隆、点突变等方法构建 pcDNA3.0-Alu(pAlu)重组质粒、右臂缺失突变体 pcDNA3.0-Alu-left arm(pAlu-LA)、G25C 突变体 pcDNA3.0-Alu G25C(pAlu-M);转染 A549 细胞, DCFH-DA 检测活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产生水平。结果:从应激的 A549 细胞成功扩增了 Alu 分子,重组的真核表达质粒 pAlu、pAlu-LA、pAlu-M 经酶切及 DNA 测序鉴定符合预期;pAlu、pAlu-LA 转染显著促进 A549 细胞 ROS 产生;与 pAlu 相比,pAlu-M 转染诱导产生的 ROS 显著降低。结论:成功克隆了氧化应激刺激下 A549 细胞产生的 Alu RNA 及其 2 种功能缺失突变体的真核表达质粒,体外实验显示 Alu RNA 通过翻译水平调控促进 A549 细胞 ROS 产生。

[关键词] Alu RNA;氧化应激;A549 细胞;基因重组;活性氧簇

[中图分类号] Q789

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)05-577-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180502

Construction of eukaryotic expression plasmids for Alu RNA and its mutants and the effect on ROS production in A549 cells

Lei Enyu, Mao Zhuang, Ji Qifeng, Shu Yi, Wang Wei*, Yan Zhen*

Department of Pharmacogenomics, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

[Abstract] **Objective:** To identify Alu RNA expressed in oxidative-stressed A549 cells and to construct eukaryotic expression plasmids for Alu RNA and its two kinds of loss-of-function mutants so as to study the effect on oxidative stress in cells with overexpression of Alu RNA and its mutants. **Methods:** Alu RNA was amplified with RT-PCR from H₂O₂ treated A549 cells. pcDNA3.0-Alu(pAlu), pcDNA3.0-Alu-left arm(pAlu-LA) and pcDNA3.0-Alu G25C(pAlu-M) were constructed by directional cloning and point mutation. After recombinant transfection, reactive oxygen species (ROS) produced in transfected A549 cells was detected by DCFH-DA. **Results:** Alu fragment was successfully amplified from stressed A549 cells. Restriction analysis and DNA sequencing proved that recombinant eukaryotic expression plasmids of pAlu, pAlu-LA and pAlu-M were constructed as expected. pAlu or pAlu-LA transfection promoted ROS production significantly in A549 cells, while pAlu-M transfection induced ROS production was markedly decreased as compared with pAlu transfection. **Conclusion:** The eukaryotic expression plasmids for Alu RNA and its loss-of-function mutants were successfully constructed from oxidative-stressed A549 cells. Data *in vitro* suggested that Alu RNA promoted ROS production in A549 cells with translational regulation.

[Key words] Alu RNA;oxidative stress;A549 cell;gene recombination;reactive oxygen species

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(05):577-581]

[基金项目] 国家自然科学基金(81702733);肿瘤生物学国家重点实验室项目(CBSKL2015Z14, CBSKL201713);陕西省科技统筹创新工程(2016KTCL03-09)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yanzhen@fmmu.edu.cn; wangwei_fmmu@163.com

Alu RNA 是一种非编码 RNA。Alu 元件是人类基因组 DNA 上短散在元件 (short interspersed element, SINE) 家族成员,其拷贝数占据全基因组 DNA 约 10%,因其序列具有限制性内切酶 *Alu* 的识别位点而得名;Alu RNA 是 Alu 元件的转录本,其二级结构可形成不完全互补配对的发夹状左右 2 个臂^[1]。Alu RNA 左右 2 个臂分别具有信号识别颗粒 (signal recognition particle, SRP) 结合和 RNA 聚合酶 II 结合的功能,研究发现左臂第 25 位碱基位于该结合位点的核心,该位点的 G25C 突变会显著影响 Alu RNA 与 SRP 的结合,从而影响靶基因的翻译^[2];Alu RNA 右臂具有 RNA 聚合酶 II 结合位点,Alu RNA 可能通过右臂与 RNA 聚合酶 II 竞争性结合而发挥转录调控的功能^[3]。

近年来多项研究表明,Alu RNA 常作为一种非编码 RNA 在多种疾病中大量表达,比如炎症、肿瘤、退行性病变等,我们前期研究发现 Alu RNA 在上皮样细胞氧化应激时大量表达,推测其可能参与氧化应激的调控过程,但调控机制尚待阐明^[4-5]。肺泡 II 型上皮细胞是肺泡的主要组成之一,肺泡上皮细胞的氧化应激和炎症会造成肺泡通透性增加,从而引起多种呼吸道疾病,如急性肺损伤 (acute lung injury) 就是以重度氧化应激和炎性损伤为特征的常见危重病。本研究拟从 H₂O₂ 应激的肺泡 II 型上皮细胞系 A549 细胞中克隆 Alu RNA,通过构建 Alu RNA 重组真核表达质粒 (pAlu) 及 Alu 左臂 G25C 点突变体 (pAlu-M)、Alu 右臂缺失突变体 (pAlu-LA),利用基因转染的方法观察 Alu RNA 对细胞氧化应激的影响,为揭示 Alu RNA 在肺泡 II 型上皮细胞中调控氧化应激的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

E.coli DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa 公司,日本);肺泡 II 型上皮细胞系 A549 细胞 (中国科学院上海生命科学院细胞库)。pMD-18T 线性化质粒 (TaKaRa 公司,日本);pcDNA3.0 (Invitrogen 公司,美国)。RNAiso Plus、cDNA 合成试剂盒、限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* I (TaKaRa 公司,日本);PCR master mix、T4 DNA 连接酶 (北京康为世纪生物科技有限公司);DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司);点突变试剂盒 Fast Mutagenesis Kit (南京诺唯赞生物科技有限公司)。引物合成均由北京奥科鼎盛生物科技有限公

司完成。细胞培养用 RPMI1640 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司,美国);Lipofectamine 3000 转染试剂盒 (Invitrogen 公司,美国);活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 特异性检测试剂盒 DCFH-DA (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养细胞氧化应激与 Alu 的扩增和重组

利用含 0.5 mmol/L H₂O₂ 的 RPMI1640 培养基处理 A549 细胞 4 h,使其达到氧化应激状态;收集细胞并提取总 RNA,利用 Alu RNA 特异性引物通过 RT-PCR 扩增氧化应激的 A549 细胞中的 Alu RNA。引物序列为 F:5'-GGCCGGGCGCGGTGGCTCACG-3';R:5'-TTTTTGAGACGGAGTTTCGCGPCR-3'。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,反应 30 个循环;72 °C 延伸 10 min,PCR 产物保存于 4 °C。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的条带,并按说明书将其与 pMD-18T 载体连接进行 TA 克隆,转化 DH5 α 感受态细胞。挑取单克隆扩大培养,并用质粒提取试剂盒提取克隆入 T 载体的质粒。将连入目的片段的 T 载体质粒、pcDNA3.0 空载体用 *Hind* III、*EcoR* I 双酶切,将回收的目的片段、pcDNA3.0 按摩尔比 3~10:1 用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜,之后转化 DH5 α 感受态细胞、挑取单克隆菌落扩大培养并提取质粒。构建完成的质粒 pcDNA3.0-Alu (pAlu) 用 *Hind* III、*EcoR* I 双酶切鉴定并进行 DNA 测序鉴定。

1.2.2 Alu 右臂缺失突变体 (pAlu-LA) 的重组

以构建成功的 pAlu 为模板,用特异性引物扩增 Alu RNA 左臂,引物序列为 F:5'-TCACGCCTCTA-ATCCCAGCACTTTGGAAAGCC-3';R:5'-TGGGAT-TAGAGGCGTGAGCCAC CGCGCCCGGC-3'。PCR 反应条件同上。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并回收,类似上述过程,对回收产物进行 TA 克隆,将连入目的片段的重组 T 载体用 *Hind* III、*EcoR* I 双酶切,并将切下的小片段与 pcDNA3.0 连接、转化 DH5 α 感受态细胞、扩大培养、提取质粒 pcDNA3.0-Alu-left arm (pAlu-LA)。对构建完成的质粒 pAlu-LA 用 *Hind* III、*EcoR* I 双酶切鉴定并进行 DNA 测序鉴定。

1.2.3 Alu 左臂 G25C 点突变体 (pAlu-M) 重组质粒构建

以构建成功的 pAlu 为模板,采用点突变试剂盒用待突变位点附近特异性引物根据 Fast Mutagenesis Kit 说明书进行 pAlu G25C 点突变。引物序列为

F: 5'-GGCCGGGCGCGGTGGCTCACG-3'; R: 5'-AT-TTTTACTAGAGACAGGGTTTCAC-3'。将反应产物转化 DH5 α 感受态细胞、挑取单克隆扩大培养并提取质粒。将构建完成的重组质粒 pcDNA3.0-Alu G25C(pAlu-M) 进行双向 DNA 测序鉴定。

1.2.4 A549 细胞培养及转染

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 于 37 °C、5% CO₂ 培养 A549 细胞。将细胞接种于无菌的小玻片上并置于 24 孔板中,将构建成功的重组质粒 pAlu、pAlu-LA、pAlu-M 分别用 Lipofectamine3000 转染 A549 细胞 24 h,转染空质粒 pcDNA3.0 作为 Mock 组对照。

1.2.5 实时定量 PCR 检测转染效率

细胞接种于 6 孔板,用 Lipofectamine3000 并依照其说明转染空质粒 pcDNA3.0 的 A549 细胞作为对照组(Mock 组),转染 pAlu、pAlu-M、pAlu-LA 作为实验组,用 Alu RNA 扩增引物检测 Mock 组、pAlu 转染组和 pAlu-M 组,用 pAlu-LA 扩增引物检测 pAlu-LA 转染组,依照日本 TaKaRa 公司 One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 说明进行实时定量 PCR。

1.2.6 DCFH-DA 探针检测细胞 ROS 水平

按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA 使终浓度为 10 μ mol/L,去除细胞培养液,加入 0.25 mL 稀释好的 DCFH-DA 37 °C 孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗细胞 3 次充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA,荧光显微镜观察拍照并计数每次独立重复实验视野中被荧光标记的细胞和总细胞数。

1.3 统计学方法

采用 STATA MP 14 软件进行数据分析和作图。多组间均数比较采用 One-way ANOVA,多重比较采用 Tukey 法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞应激与 Alu RNA 目的片段扩增

采用 0.5 mmol/L H₂O₂ 处理 A549 细胞 4 h 作为细胞应激模型,通过反转录氧化应激的细胞总 RNA,采用 Alu RNA 特异性引物通过 PCR 扩增目的片段,预期目的片段长度 289 bp。经过 1% 琼脂糖凝胶电泳,发现在约 300 bp 处有一条特异性条带(图 1A),该结果符合预期。

2.2 真核表达质粒 pAlu 构建

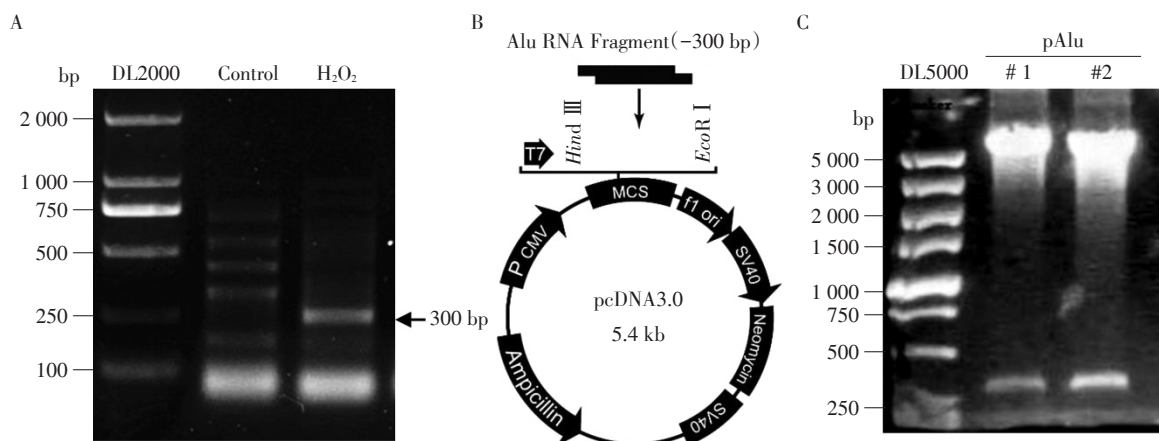
pcDNA3.0 真核表达质粒分子约为 5.4 kb,Alu 目的片段约 300 bp。按照实验方法进行定向克隆,Alu 目的片段插入真核表达质粒的构建图谱如图 1B 所示。将克隆后提取的 2 份 pAlu 质粒(pAlu#1、pAlu#2)进行 Hind III 和 EcoR I 双酶切、1% 琼脂糖凝胶电泳,发现在 300 bp 处切下特异性条带,如图 1C 所示;将 pAlu 质粒进行 DNA 测序,测序结果符合预期的 Alu 分子序列。

2.3 Alu RNA 右臂缺失突变体的目的片段扩增

以上述构建成功的 pAlu 为模板,通过 PCR 扩增 Alu RNA 左臂片段,预期目的片段为 127 bp。经过 1% 琼脂糖凝胶电泳发现在约 100 bp 处出现特异性条带(图 2A),该结果符合预期。

2.4 真核表达质粒 pAlu-LA 构建

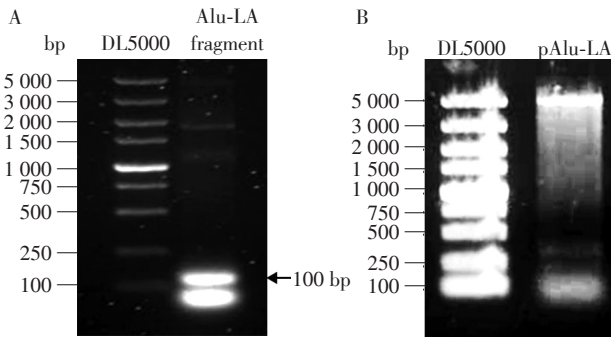
将上述 100 bp 左右条带切胶纯化,Hind III 和 EcoR I 双酶切,与载体 pcDNA3.0 进行定向克隆形成 pAlu-LA,提取质粒用 Hind III 和 EcoR I 双酶切鉴定并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,发现在 100 bp 处有被切开的特异性条带(图 2B);重组质粒 DNA 测序结果符合预期。



A: Alu RNA 目的片段扩增;B:真核表达质粒 pAlu 构建图谱;C:pAlu 双酶切鉴定。

图 1 Alu RNA 真核表达质粒 pAlu 的构建

Figure 1 Construction of eukaryotic expression plasmid pAlu for Alu RNA



A: Alu RNA 左臂片段扩增; B: 真核表达质粒 pAlu-LA 双酶切鉴定。

图2 Alu RNA 突变体 pAlu-LA 真核表达质粒的构建
Figure 2 Construction of eukaryotic expression plasmid of pAlu-LA

2.5 真核表达质粒 pAlu-M 构建

利用点突变试剂盒以构建成功的 pAlu 为模板, 对其第 25 位碱基进行 G25C 点突变, 将提取的重组质粒进行 DNA 测序鉴定, 结果显示第 25 位 G 单碱基突变成 C, 局部 DNA 序列如图 3 所示, 结果符合预期, pAlu-M 突变体构建成功。

2.6 pAlu 及其突变体与 A549 细胞中 ROS 的产生

ROS 的产生与细胞氧化应激的水平呈正相关。本实验利用 Lipofectamine3000 将构建成功的 pAlu 及其突变体重组质粒分别转染 A549 细胞, 并转染 pcDNA3.0 空载体作为对照, 用实时定量 PCR 检测 Alu RNA 表达, 从而反映转染效率。结果如图 4A 所示, 转染后 Alu RNA 及其突变体表达显著增加。用 ROS 特异性探针 DCFH-DA 检测转染后细胞内 ROS 产生的水平, 并用荧光显微镜观察计数荧光

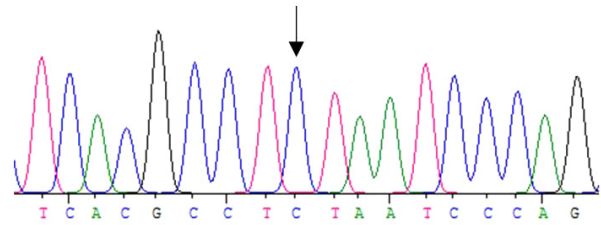
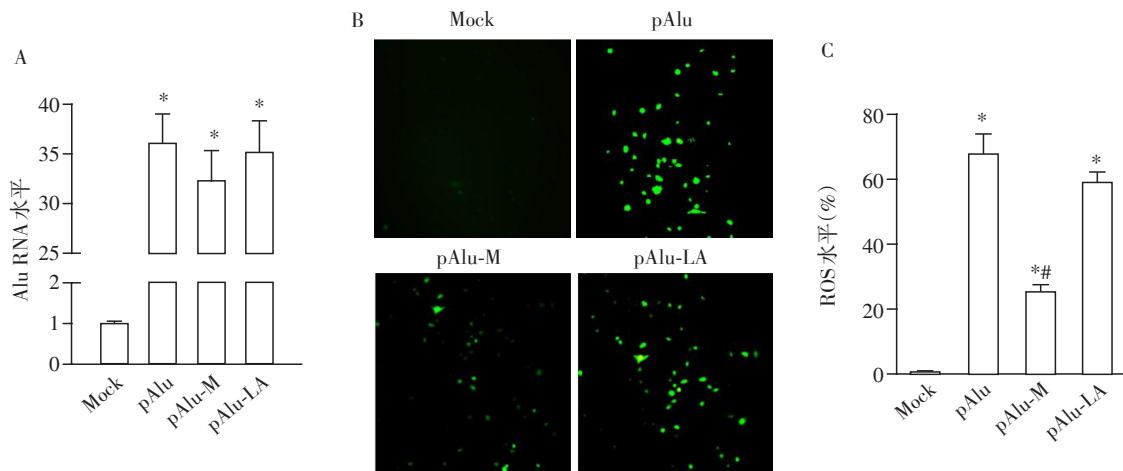


图3 测序鉴定 pAlu-M 的 G25C 点突变
Figure 3 Identification of G25C point mutation in pAlu-M by DNA sequencing

标记的细胞数占总细胞数的比例, 结果如图 4B、C 所示, 与对照组 (Mock 组) 相比, pAlu 转染显著促进了细胞内 ROS 的产生; 与 pAlu 转染相比, pAlu-M 转染的细胞所产生 ROS 显著降低, 而 pAlu-LA 转染对细胞中 ROS 产生水平影响不显著。该结果提示 Alu RNA 可能主要通过左臂与 SRP 结合在翻译水平调控细胞内 ROS 的产生能力, 从而促进氧化应激。

3 讨论

Alu RNA 是灵长类特有的长链非编码 RNA 家族分子, 其基因 Alu 元件目前普遍认为由 7SL RNA 基因进化而来; 虽然许多研究报道了 Alu RNA 在病理条件下大量累积的现象, 认为 Alu RNA 表达代表一种危险信号, 然而目前关于 Alu RNA 病理和生理学功能的相关研究还很缺乏^[4-5]。研究发现 Alu RNA 大量累积会促进上皮细胞氧化应激和炎症, 是激活下游炎性小体活化和炎性因子表达的重要上游信号, 提示 Alu RNA 表达可能与氧化应激和炎症调控密切相关^[4]。肺泡上皮细胞氧化应激和炎性



A: qPCR 鉴定 A549 细胞中 Alu RNA 及其突变体的转染效率; B: Alu RNA 及其突变体转染影响 ROS 产生; C: 在分别转染各质粒的实验组中, 被荧光标记的 A549 细胞的比例。与 Mock 组比较, *P < 0.05; 与 pAlu 组比较, #P < 0.05。

图4 Alu RNA 及其突变体对 A549 细胞 ROS 产生的调控
Figure 4 Regulation of ROS production in A549 cells by Alu RNA and its mutants

损伤是多种呼吸道疾病的致病分子机制,构建 Alu RNA 真核表达质粒体外研究 Alu RNA 表达对其致病分子机制的影响,有助于揭示 Alu RNA 在肺泡上皮细胞氧化应激损伤过程中的作用。本实验结果显示, H₂O₂ 应激的肺泡 II 型上皮细胞 A549 可产生大量的 Alu RNA, Alu RNA 过表达可显著促进 A549 细胞中 ROS 的产生。ROS 是细胞在代谢过程中产生的系列活性氧簇,代表着细胞氧化应激反应的程 度,其浓度调节着机体细胞的生死平衡,与细胞增殖、分化、细胞凋亡、坏死相关的信号转导密切相关^[5-8]。

SRP 是由 7SL RNA 和 6 个蛋白亚基组成的复合物, Alu RNA 与 SRP9/14 结合能抑制蛋白质翻译起始过程, 突变左臂 G25C 则会使 Alu RNA 失去翻译抑制功能, 而突变右臂 G159C 只会使 Alu RNA 部分失去翻译抑制功能^[2], 这可能是由于该位点位于右臂还具有另外的功能——转录抑制功能; Alu RNA 右臂是 Alu RNA 与 RNA 聚合酶 II 结合的必要组件, 当 Alu RNA 与其结合后可以抑制转录过程^[3]。本实验中据此分别构建了 pAlu-M 和 pAlu-LA 两种突变体, 体外细胞转染实验证明 pAlu-M 诱导的 ROS 水平显著降低, 提示在 A549 细胞中 Alu RNA 主要通过翻译水平的调控促进 ROS 产生。该研究为进一步研究 Alu RNA 对 A549 细胞氧化应激和炎症的调控奠定了基础。

[参考文献]

[1] Hasler J, Strub K. Alu elements as regulators of gene ex-

pression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34 (19) : 5491-5497

[2] Ivanova E, Berger A, Scherrer A, et al. Alu RNA regulates the cellular pool of active ribosomes by targeted delivery of SRP9/14 to 40S subunits [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(5):2874-2887

[3] Mariner PD, Walters RD, Espinoza CA, et al. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock [J]. *Mol Cell*, 2008, 29 (4) : 499-509

[4] Tarallo V, Hirano Y, Gelfand BD, et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88 [J]. *Cell*, 2012, 149 (4):847-859

[5] Wang W, Wang W, Azadzi KM, et al. Alu RNA accumulation in hyperglycemia augments oxidative stress and impairs eNOS and SOD2 expression in endothelial cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 426:91-100

[6] Holmstrom KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(6):411-421

[7] Brewer TF, Garcia FJ, Onak CS, et al. Chemical approaches to discovery and study of sources and targets of hydrogen peroxide redox signaling through NADPH oxidase proteins [J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84:765-790

[8] 黄燕华, 华 檬, 崔学范. 芍药苷减弱真菌葡聚糖诱导的支气管上皮细胞内 NLRP3 炎性小体活化 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(3):287-292

[收稿日期] 2017-09-23