

过表达环状 RNA 泛素连接酶 E3 (*circHERC4/hsa_circ_0007113*) 抑制细胞衰老的研究

李华玲¹ 杨迪¹ 韦俊杰¹ 陈章悦¹ 陈菊萍²

摘要 目的 研究泛素连接酶 E3 的环状 RNA (*circHERC4/hsa_circ_0007113*) 与人胚肺成纤维细胞 (IMR-90) 的衰老的关系。方法 从 *circBase* 数据库上获得环状 RNA *circHERC4* 的全基因序列, 将其克隆到环状 RNA 表达载体 *pLC5-ciR* 中, 体外构建重组体 *pLC5-ciR (+) hsa_circ_0007113* 经 PCR、酶切、测序等对重组质粒进行鉴定。利用脂质体 2000 转染试剂将重组质粒转染到 HEK293T 和 IMR90 细胞中, 并利用 RT-PCR 检测正常细胞组、空载体组及重组载体组中环状 RNA *circHERC4* 的表达情况; SA- β -gal 染色检测各组细胞衰老情况; CCK-8 法检测各组细胞增殖情况。结果 测序正确, 成功构建了环状 RNA *circHERC4* 的过表达载体, *circHERC4* 可在 HEK293T 细胞中高效表达。与对照组相比, 重组载体组的 SA- β -gal 染色阳性率降低 ($P < 0.05$), 细胞增殖率升高 ($P < 0.05$)。过表达 *circHERC4* 后能提高 IMR90 细胞的增殖, 抑制细胞的衰老。结论 *circHERC4* 具有潜在的抗衰老作用, 为深入研究 *circHERC4* 的功能奠定了基础。

关键词 环状 RNA; 衰老; 泛素连接酶 4 环状 RNA (*circHERC4/hsa_circ_0007113*); 人胚肺成纤维细胞 (IMR-90)

中图分类号 Q291

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1100-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.016

人体衰老的本质是细胞的衰老^[1-2], 而衰老细胞的积累和癌症、糖尿病和神经退行性疾病有关^[3-4]。近年来发现有许多非编码 RNA 影响着控制衰老的通路^[5-6], 其表达水平在衰老的过程中发生了改变并发挥着重要的调控作用。其中环状 RNA 结构较线性 RNA 更稳定, 不会被核酸外切酶 R 所酶切, 且有较强的组织表达特异性、时间和空间特异性以及疾病特异性, 而环状 RNA 在衰老过程中

的作用研究较少。

本课题组前期采用基因芯片技术, 在衰老细胞中发现 *hsa_circ_0007113* 的下调明显, 其亲本基因是泛素连接酶 E3 (HERC4)。HERC4 是近年来发现的一种 E3 泛素连接酶, 参与肺癌、宫颈癌、乳腺癌等肿瘤的发生和发展^[7-8], 对于其产生的环状 RNA 的研究更是鲜有报道。因此, 本研究通过基因工程手段构建环状 RNA *hsa_circ_0007113* 的真核生物表达载体, 经过测序验证正确后, 利用脂质体转染试剂转染人胚肾 (HEK293T) 上皮细胞, 用 qRT-PCR 检测 *hsa_circ_0007113* 的表达, 并转入人胚肺成纤维细胞 IMR-90 中, 通过 β -半乳糖苷酶染色和 CCK-8 检测细胞的衰老程度和增殖程度, 为深入了解该环状 RNA 在衰老生物学中的功能提供了有力的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 HEK293T (人胚肾上皮细胞)、IMR-90 (人胚肺成纤维细胞) 为 ATCC 来源, 购自南京科佰公司。胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶、DMEM 培养基、Optium-Medium、双抗 (青霉素及链霉素) 均购自美国 Gibco 公司。KOD Plus Neo 购自日本 TOYOBO, T4 DNA Ligase、FastDigest Enzyme 购自美国 Thermo Scientific。Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 购自北京 TransGen Biotech。质粒小量抽提试剂盒 (E. Z. N. A.® Endo-free Plasmid Mini Kit I (50))、DNA 胶回收试剂盒 (E. Z. N. A.® Gel Extraction Kit) 购自美国 Omega, TRIzol 试剂、RnaseR 纯化试剂盒购自北京天根公司。逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自南京诺唯赞公司。过表达载体 *pLC5-ciR* 试剂盒购自广州吉赛生物公司。PCR 引物由上海生工合成。 β -半乳糖苷酶检测试剂盒、CCK-8 试剂盒购自上海碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 *hsa_circ_0007113* 序列全长的扩增 从 *circBase* 数据库 (<http://www.circbase.org/>) 上查到环状 RNA *hsa_circ_0007113* (*circBank* ID: *hsa_cir-*

2021-11-29 接收

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究重大项目 (编号: 18KJA320014)

作者单位: ¹扬州大学医学院生化教研室 扬州 225001

²扬州大学附属第一人民医院皮肤科 扬州 225001

作者简介: 李华玲, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 2274292599@qq.com

cHERC4_012) 的 682 bp 的全基因序列,引物序列为: (F) 5'-CCGAATTCAGATTGCTTGTGGACGAGCA-3'; (R) 5'-TCCGGATCCAGGCCAAGCTGTCCATCAGA-3'。(下划线为 EcoRI 和 BamHI 的双酶切位点,前边为保护碱基)。以细胞的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系 50 μ l: 10 \times PCR buffer for KOD-plus-neo 5 μ l, KOD-plus-neo 1 μ l, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.5 μ l, MgSO₄ (25 mmol/L) 5 μ l, cDNA 模板 1 μ l, ddH₂O 32 μ l。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。得到 PCR 产物后用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段。

1.2.2 hsa_circ_0007113 过表达载体的构建及鉴定

将回收的目的片段和 pLC5-ciR 载体分别用 EcoRV、BamHI 进行双酶切,保持 37 $^{\circ}$ C、1 h,然后用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,并回收目的条带。再用 T4 DNA 连接酶连接目的片段和空载体质粒,在 EP 管中配置连接反应液,用移液枪吹打混匀,保持 22 $^{\circ}$ C、30 min,然后 16 $^{\circ}$ C 过夜连接,构建重组表达质粒 pLC5-ciR (+) hsa_circ_0007113。将连接产物转化感受态细胞 Trans1 T1,在 LB 固体培养基(氨苄)中培养、筛选,挑选阳性单菌落,接种于 LB 液体培养基(氨苄) 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 6 h,以菌液为模板进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳进行检测,用较亮目的条带的阳性菌液扩大培养,提取质粒,并进行双酶切验证,将成功切出目的条带的菌液加甘油保菌后送上海生工生物有限公司测序。测序引物为 F: 5'-ACCAAGGAAGGTGGAGTGT-3'; R: 5'-AGGCCAA GCTGTCCATCAGA-3'。将测序结果正确的重组质粒,用无内毒素的质粒大提试剂盒提取质粒, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 细胞转染实验 采用脂质体转染方法,将处于对数生长期的 HEK293T 或 IMR90 细胞接种到 6 孔板中,观察细胞形态,待细胞覆盖率约 (70 ~ 90) % 时,在 100 μ l 无血清的 Opti-MEM 培养基中加入 3 μ g 质粒 DNA,柔和混匀;在 100 μ l 不含血清培养基中稀释 4 μ l lipofectamine 2000 转染试剂,轻柔混匀,室温放置 5 min。二者混匀后静置 20 min,加入无血清培养基的细胞孔中,轻摇混匀,培养 (5 ~ 6) h 后,更换完全培养基后,37 $^{\circ}$ C 培养待检测。另外将空载体转染组和未转染组分别设置为阴性和阳性对照。

1.2.4 实时荧光定量法检测环状 RNA 表达效果

收集转染 40 h 后的细胞,以未经转染的细胞作为阴性对照组,转染重组质粒的细胞为过表达组,用 TRIzol 提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,反应条件为: 30 $^{\circ}$ C、10 min; 42 $^{\circ}$ C、20 min; 95 $^{\circ}$ C、5 min。逆转录使用随机引物。以逆转录得到的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR,反应条件同前。

1.2.5 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 染色检测细胞衰老 将转染后培养 40 h 的 IMR90 细胞接种于新的 6 孔板,吸掉培养基, PBS 缓冲液洗涤后,加入 β -gal 染色固定液 1 ml/孔,室温下静置固定 15 min; 吸除细胞固定液,用 PBS 洗涤 3 min,洗涤 3 次; 加入 1 ml/孔染色工作液, 37 $^{\circ}$ C 过夜孵育; 第二天在光学显微镜下观察。蓝绿色为阳性细胞,阴性细胞不被染色; 各组在显微镜下选取 3 个视野,计数细胞总数和 β -gal 染色阳性细胞数,计算阳性细胞数占总细胞数的百分比。

1.2.6 细胞增殖率测定 转染后培养 40 h 的 IMR90 细胞,以未经转染的细胞作为阴性对照组,以转染重组质粒的细胞为过表达组,稀释成密度为每微升 500 个细胞,然后以每孔 4 μ l 共 2 000 个细胞接种至 96 孔板内, 24 h 后在光学显微镜下观察细胞生长情况。去除原始培养液,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液和 90 μ l DMEM 培养液。在含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中孵育 1 h,在 450 nm 处用酶标仪检测吸光度值。

1.3 统计学分析 采用 Graph Pad Prism 6.0 软件进行方差分析,实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 环状 RNA hsa_circ_0007113 过表达载体的构建及鉴定 根据 hsa_circ_0007113 (circBank ID: hsa_circHERC4) 的全长 682 bp 序列,以 EcoRI (GAATTC) 和 BamHI (GGATCC) 双酶切连接到修改的 pLC5-ciR 载体中,见图 1。

通过 PCR 扩增了 hsa_circ_0007113 的全长序列,经琼脂糖凝胶电泳检测,目的片段大小约 682 bp 左右。将构建的重组体 PCR 鉴定后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带大小正确的进行回收条带并测序,测序峰图正常,无杂峰或叠带,进行测序分析后,阳性克隆测序结果显示,插入的序列和预期目的基因序列完全一致,见图 2 红框中为目的基因序列,蓝框为部分成环框架序列(协助环状 RNA 成环),说明成功构建重组的环状 RNA 表达载体。

显子的起始序列(图3)。

2.3 环状 RNA hsa_circ_0007113 过表达效果检测

将重组体 pLC5-ciR (+) hsa_circ_0007113 和空载体共转染 HEK 293T 细胞 40 h 后,收集细胞提取总 RNA,进行 RT-PCR 扩增。结果表明,与对照组 (pLC5) 相比,过表达组的 hsa_circ_0007113 表达量明显增高,表达量约为对照组的 411 倍,见图 4A、B,说明 hsa_circ_0007113 能在真核细胞中成功高效表达。

2.4 环状 RNA hsa_circ_0007113 过表达的功能检测

2.4.1 过表达环状 RNA hsa_circ_0007113 对 IMR-90 细胞衰老的影响

pLC5-ciR (+) hsa_circ_

0007113 过表达组的 β -gal 染色阳性率为 $(32.6 \pm 0.031)\%$,而对照组阳性率是 $(46.1 \pm 0.071)\%$,见图 5,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),说明过表达环状 RNA hsa_circ_0007113 减轻细胞的衰老程度。

2.4.2 过表达环状 RNA hsa_circ_0007113 对 IMR-90 细胞增殖的影响

pLC5-ciR (+) hsa_circ_0007113 过表达组细胞 CCK8 检测的 OD 值为 (1.537 ± 0.071) ,与空白对照组 (OD 值 0.687 ± 0.050) 比较,见图 6,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 pLC5-ciR (+) hsa_circ_0007113 过表达组的细胞增殖活力高于对照组,hsa_circ_0007113 对 IMR-90 的增殖产生促进作用。

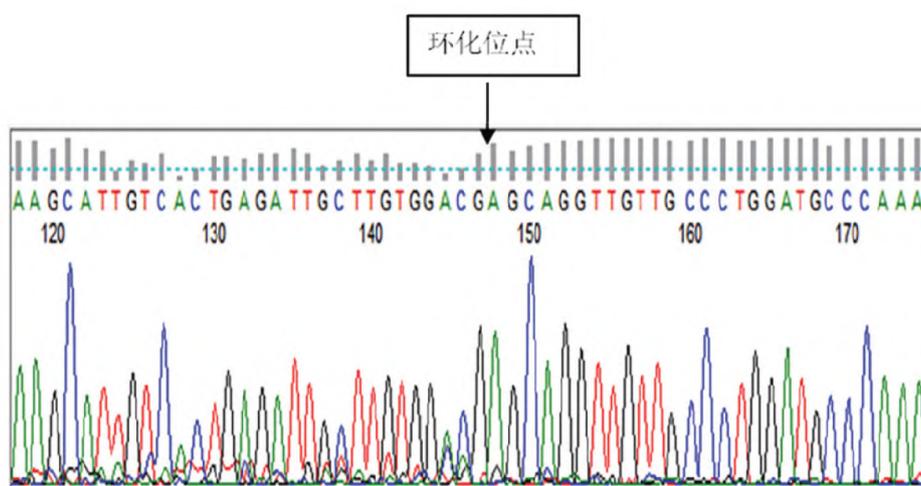


图3 环状 RNA hsa_circ_0007113 反向剪接位点经 sanger 测序验证

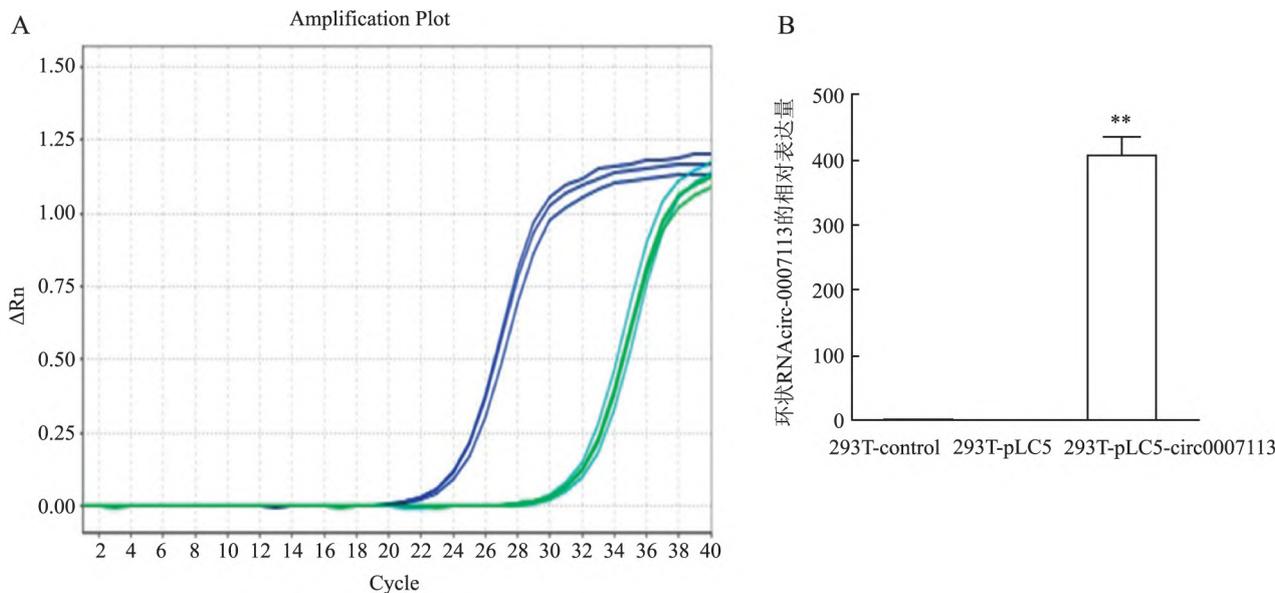


图4 qRT-PCR 验证过表达载体转染 HEK293T 细胞后阴性对照组 (control)、空载体组 (293T-pLC5) 和过表达组 293T-pLC5-circ0007113 的相对表达

A: 扩增曲线; B: 相对表达量; 与对照和空载体组比较: ** $P < 0.01$

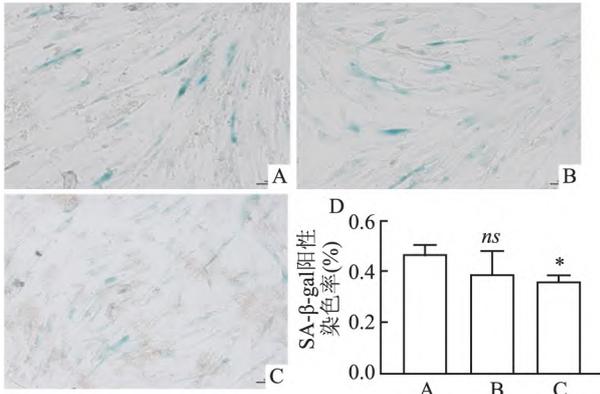


图5 SA-β-gal 染色检测过表达 hsa_circ_0007113 对 IMR90 细胞衰老的影响 SPX200

A: 对照组; B: 空载体组; C: 过表达环状 RNA hsa_circ_0007113 组; D: 各组定量分析图; 与对照组比较: * P < 0.05

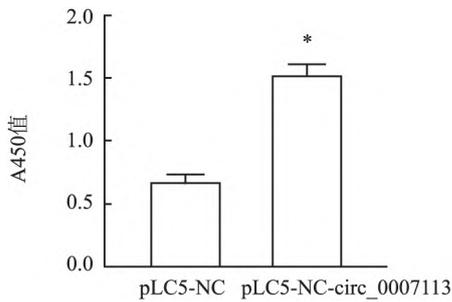


图6 CCK8 法检测 pLC5_circ_0007113 过表达对 IMR90 细胞增殖的作用

与对照组比较: * P < 0.05

3 讨论

蛋白酶体降解途径在细胞周期和细胞免疫反应等众多细胞过程中起着重要作用。不适当的泛素介导的蛋白质降解与衰老也有密切关联。USP 3 是泛素特异性蛋白酶家族的成员之一。USP3 能够去泛素化并稳定 p53 ,同时促进正常细胞转化^[9] ,有研究发现其环状 RNA ,circUSP3 的表达量与衰老有明显联系。还有报道发现一种 E3 泛素连接酶 ,Parkin 具有潜在的抗衰老的作用^[10]。E3 泛素连接酶 ,能够使一系列其底物蛋白泛素化并通过蛋白酶体进行降解 ,多年来的实验研究发现可能正是由于 E3 泛素连接酶基因的突变或异常 ,导致其底物蛋白的非正常累积 ,对细胞产生极大的毒性 ,最终导致细胞的死亡 ,这可能是细胞衰老的原因之一 ,因此研究 E3 泛素连接酶 HERC4 及其所产生的环状 RNA 的性质对于揭秘衰老有着重要的意义。

目前 ,对于泛素连接酶 HERC4 所产生的环状

RNA 仅被检测出 ,并没有详细报道 ,因此本文在实验室的前期 Arraystar 芯片筛选的与衰老相关的环状 RNA 中 ,最先关注了来源于 HERC4 基因的环状 RNA hsa_circ_0007113 ,同时研究分析了环状 RNA hsa_circ_0007113 的基本特征以及成功构建了 hsa_circ_0007113 的过表达载体。通过数据库比对 ,hsa_circ_0007113 是由 HERC4(NM_022079) 的 19、20、21、22、23 号外显子经过反向剪接而成 ,剪切点前后的序列分别是 AG 和 GT ,这正符合环状 RNA 产生的剪切规律。经过对 hsa_circ_0007113 反向剪切位点的测序验证 ,说明 hsa_circ_0007113 确实首尾相接(首 AGCAGGTTCGTTG、尾 GCAGGTGTTTCG) ,成环正确。经过对 hsa_circ_0007113 全长序列的扩增及测序验证 ,说明成功构建了过表达的环状 RNA ,pLC5-ciR (+) hsa_circ_0007113 ,并在 HEK293T 细胞中高效表达。

在确定 hsa_circ_0007113 成功过表达后 ,本研究进一步通过转染将 hsa_circ_0007113 过表达载体和空载体转染至 IMR90 细胞中 ,研究其对细胞的衰老过程和增殖的影响 ,结果显示 ,过表达 hsa_circ_0007113 后 ,细胞的增殖增加 抑制了衰老。

近年来 ,在多种组织和细胞系中发现了许多的环状 RNA ,而对于 circRNA 的研究热点主要集中在肿瘤领域^[11-12] ,在衰老及衰老引起的疾病中的研究较少 ,目前仅有少量与衰老相关的环状 RNA 的研究 ,如 Circ-Foxo3、CircPVT1 CircCCNB1 在衰老的过程中发挥一定的调控作用^[13-15]。本研究发现了一个来源于 HERC4 基因的环状 RNA 的新的功能 ,在人肺成纤维细胞中进行了功能验证 ,并证实了其 与衰老的关系 ,其具体分子机制有待进一步探讨。环状 RNA 的作用机制 ,目前最常见的是作为“miRNA 海绵”的吸附体 ,通过 Ago2 与 miRNA 竞争性结合 ,调控基因表达 ,经过生物信息学分析 ,hsa_circ_0007113 与 miRNA-515-3p、miRNA-519 存在作用靶点(MREs) ,而这 2 个 miRNA 是 P53/P21 衰老通路的重要因子 ,课题组将进一步研究其功能。

本研究首次将环状 RNA hsa_circ_0007113 的序列连入 pLC5 真核表达载体 ,利用脂质体转染 HEK293T 细胞 ,成功地使 pLC5-ciR (+) hsa_circ_0007113 在 HEK 293T 细胞中 转录表达 ,并在 IMR90 细胞中进行了初步的功能验证。证实了其 与衰老的关系。因此 ,为后续研究 hsa_circ_0007113 的功能和机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Uyar B, Palmer D, Kowald A, et al. Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence [J]. *Ageing Res Rev* 2020 19: 101156.
- [2] Campisi J, Robert L. Cell senescence: role in aging and age-related diseases [J]. *Interdiscip Top Gerontol* 2014 39: 45–61.
- [3] 张红丽, 冯定庆, 凌斌等. 沉默 Pw12 表达对子宫颈癌细胞增殖和衰老的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2015 50(5): 589–93.
- [4] Ou H L, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process [J]. *Blood* 2018 131(5): 488–95.
- [5] Abdelmohsen K, Gorospe M. Noncoding RNA control of cellular senescence [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2015 6(6): 615–29.
- [6] Munk R, Panda A C, Grammatikakis I, et al. Senescence-Associated MicroRNAs [J]. *Int Rev Cell Mol Biol* 2017 334: 177–205.
- [7] Sun X, Sun B, Cui M, et al. HERC4 exerts an anti-tumor role through destabilizing the oncoprotein Smo [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2019 513(4): 1013–8.
- [8] Xu Y, Ji K, Wu M, et al. A miRNA-HERC4 pathway promotes breast tumorigenesis by inactivating tumor suppressor LATS1 [J]. *Protein Cell* 2019 10(8): 595–605.
- [9] Fu S, Shao S, Wang L, et al. USP3 stabilizes p53 protein through its deubiquitinase activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2017 492(2): 178–83.
- [10] Buhlman L M. Parkin loss-of-function pathology: Premature neuronal senescence induced by high levels of reactive oxygen species? [J]. *Mech Ageing Dev* 2017 161(Pt A): 112–20.
- [11] Su M, Xiao Y, Ma J, et al. Circular RNAs in Cancer: emerging functions in hallmarks, stemness, resistance and roles as potential biomarkers [J]. *Mol Cancer* 2019 18(1): 90.
- [12] Lou J, Hao Y, Lin K, et al. Circular RNA CDR1as disrupts the p53/MDM2 complex to inhibit Gliomagenesis [J]. *Mol Cancer* 2020 19(1): 138.
- [13] Panda A C, Grammatikakis I, Kim K M, et al. Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1 [J]. *Nucleic Acids Res* 2017 45(7): 4021–35.
- [14] Yu A Q, Wang Z X, Wu W, et al. Circular RNA CircCCNB1 sponges micro RNA-449a to inhibit cellular senescence by targeting CCNE2 [J]. *Ageing (Albany NY)* 2019 11(22): 10220–41.
- [15] Cai H, Li Y, Niringiyumukiza J D, et al. Circular RNA involvement in aging: an emerging player with great potential [J]. *Mech Ageing Dev* 2019 178: 16–24.

Over-expression of circRNA ubiquitin ligase E3 (circHERC4/hsa_circ_0007113) inhibits cell senescence

Li Hualing¹, Yang Di¹, Wei Junjie¹, Chen Zhangyue¹, Chen Juping²

(¹Dept of Biochemistry and molecular biology, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001;

²Dept of Dermatology, Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225001)

Abstract Objective To investigate the relationship between the ubiquitin ligase E3 circRNA (circHERC4/ hsa_circ_0007113) and the senescence in Human embryonic lung fibroblasts (IMR-90) cells. **Methods** The whole gene sequence of circHERC4 was obtained from circBase database and cloned into circRNA expression vector pLC5-ciR. The recombinant pLC5-ciR (+) hsa_circ_0007113 was constructed in vitro. The recombinant plasmid was identified by PCR, enzyme digestion and sequencing. The recombinant plasmid was transfected into HEK293T and IMR90 cells with liposome 2000 transfection reagent. The expression of circHERC4 in normal cells, empty vector group and recombinant vector group was detected by RT-PCR, and the senescence of cells was detected by SA-β-Gal staining. Cell proliferation was detected by CCK-8 method. **Results** The overexpression vector of circHERC4 was successfully constructed by correct sequencing, and circHERC4 could be efficiently transfected in HEK293T cells. Compared with the control group, the positive rate of SA-β-Gal staining in the recombinant vector group decreased ($P < 0.05$), and the proliferation rate of cells increased ($P < 0.05$). Overexpression of circHERC4 could improve the proliferation and inhibit the senescence in IMR90 cells. **Conclusion** It suggests that circHERC4 has potential function of anti-senescence, which lays a foundation for further study on the function of circHERC4.

Key words circRNA; senescence; ubiquitin ligase 4 circRNA (circHERC4 hsa_circ_0007113); human embryonic lung fibroblasts cells (IMR-90)