

鸡卵清提取液诱导293T细胞高表达tRFs&tiRNAs 分子及细胞功能验证

阮光萍 姚翔 何洁 莫平 王凯 杨再玲 庞荣清 朱向情 潘兴华*

¹解放军联勤保障部队第920医院基础医学实验室, 昆明 650032;

²干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室, 昆明 650032;

³云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 昆明 650032)

摘要 tRNA源性片段(tRNA-derived fragments, tRFs)和tRNA源性应激诱导RNAs(tRNA-derived stress-induced RNAs, tiRNAs)是tRNAs的衍生片段,属于短的非编码RNA家族,通过转录、翻译、信号通路等途径参与复杂的生物反应。该文旨在验证鸡卵清提取液诱导293T细胞后升高的3个tRFs&tiRNAs分子的细胞功能。将293T细胞加于6孔板中,3个孔加普通培养基,3个孔加50%鸡卵清提取液的培养基,共培养3天。对照组3个样本和诱导组3个样本进行高通量测序检测tRFs&tiRNAs分子在两组中的差异表达。经检测验证诱导后的细胞有3个tRFs&tiRNAs分子稳定升高。这3个分子上调表达有统计学意义。合成这3个分子转染293T细胞, WB检测多能因子OCT4和NANOG的变化,定量PCR检测多能基因OCT4和NANOG的变化和端粒的相对表达量,流式检测多能因子OCT4和NANOG的变化。同时检测这3个分子转染293T细胞后细胞增殖、细胞凋亡和细胞周期的变化情况。结果表明,3个分子转染293T细胞后, WB检测到多能因子OCT4和NANOG表达对比未转染细胞明显升高,定量PCR检测多能基因OCT4和NANOG相对表达量对比未转染细胞明显升高,端粒对比未转染细胞明显增长。流式检测到多能因子OCT4和NANOG阳性表达细胞对比未转染细胞明显增多。这3个分子转染293T细胞后细胞活性增强,细胞凋亡减少,细胞周期也发生了一定的改变。该研究证明了这3个分子过表达可促进293T细胞多能因子OCT4和NANOG表达升高,促进端粒增长,使细胞年轻化。同时这3个分子过表达可使细胞活性增强,细胞凋亡减少。

关键词 tRFs&tiRNAs分子; 293T细胞; 差异表达; 转染; 细胞功能; 验证

Chicken Egg White Extract Induces High Expression of tRFs&tiRNAs Molecules in 293T Cells and Its Cell Function Verification

RUAN Guangping, YAO Xiang, HE Jie, MO Ping, WANG Kai, YANG Zailing,

PANG Rongqing, ZHU Xiangqing, PAN Xinghua*

¹Basic Medical Laboratory of 920th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Kunming 650032, China;

²The Integrated Engineering laboratory of Cell Biological Medicine of State and Regions, Kunming 650032, China;

³The Transfer Medicine Key Laboratory of Cell Therapy Technology of Yunnan Province, Kunming 650032, China)

收稿日期: 2021-08-04 接受日期: 2021-09-10

云南省科技计划项目重大科技专项(批准号: 2018ZF007)、云南省重点项目(批准号: 2018FA041、202101AS070039)、云南省面上项目(批准号: 202101AT070212)、国家自然科学基金(批准号: 31970515)和中国人民解放军联勤保障部队第920医院院管课题(批准号: 2019YGB17、2019YGA05)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13888073603, E-mail: xinghuapan@aliyun.com

Received: August 4, 2021 Accepted: September 10, 2021

This work was supported by Grants from Yunnan Science and Technology Plan Project Major Science and Technology Project (Grant No.2018ZF007), the Yunnan Province Applied Basic Research Program Key Project (Grant No.2018FA041, 202101AS070039), the Yunnan General Project (Grant No.202101AT070212), National Natural Science Foundation (Grant No.31970515), and the 920th Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force In-hospital Technology Plan (Grant No.2019YGB17, 2019YGA05)

*Corresponding author. Tel: +86-13888073603, E-mail: xinghuapan@aliyun.com

Abstract tRFs (tRNA-derived fragments) and tiRNAs (tRNA-derived stress-induced RNAs) are derived fragments of tRNAs, which belong to the short non-coding RNA family and participate in complex biological reactions by transcription, translation and signaling pathways. To verify the cell function of the three tRFs&tiRNAs molecules raised after the chicken egg white extract induces 293T cells. 293T cells were added to a 6-well plate, among which 3 wells added with ordinary medium, and 3 wells added with 50% chicken egg white extract medium, and cultured for 3 days. Three samples in the control group and three samples in the induction group were subjected to high-throughput sequencing to detect the differential expression of tRFs&tiRNAs molecules in the two groups. It was verified by testing that the induced cells had 3 tRFs&tiRNAs molecules steadily increasing. The up-regulated expression of these 3 molecules is statistically significant. These three molecules were synthesized and transfected into 293T cells. The changes of pluripotency factors OCT4 and NANOG were detected by WB. The changes of pluripotency genes *OCT4* and *NANOG* and the relative expression of telomeres were detected by quantitative PCR, and the expression variety of pluripotency factors OCT4 and NANOG were detected by flow cytometry. Simultaneously detect the changes of cell proliferation, apoptosis and cell cycle after transfection of these three molecules into 293T cells. The results indicated after the 3 molecules were transfected into 293T cells; the expression of pluripotent factors OCT4 and NANOG was significantly higher than that of untransfected cells detected by WB, and the relative expression levels of pluripotent genes *OCT4* and *NANOG* were significantly higher than that of untransfected cells detected by quantitative PCR. Telomeres are significantly increased compared with untransfected cells. Flow cytometry detected a significant increase in cells expressing pluripotency factors OCT4 and NANOG compared with untransfected cells. After these 3 molecules were transfected into 293T cells, cell viability increased, cell apoptosis decreased, and cell cycle changed to a certain extent. It was proved that the overexpression of these 3 molecules could promote the increase of the expression of pluripotent factors OCT4 and NANOG in 293T cells, promote the growth of telomeres, and make cells younger. At the same time, overexpression of these 3 molecules can increase cell viability and decrease cell apoptosis.

Keywords tRFs&tiRNAs molecule; 293T cells; differential expression; transfection; cell function; verification

在特定条件下, tRNA发生切割, 产生功能性小RNA片段tRNA源性片段(tRNA-derived fragments, tRFs), 主要包括两类——tRFs与tiRNAs。tRFs和tiRNAs是一类广泛存在于真核及原核转录组中的小非编码RNA分子, 同目前研究的热点分子miRNA、circRNA等一样, 虽然发现较早(1977年), 但其重要性在相当长一段时间内被人们所忽略, 而近期tRFs&tiRNAs重要功能已在国际顶尖杂志相继被报道^[1]。tRFs&tiRNAs广泛存在于各种组织细胞中, 具有稳定性, 同时其表达具有高度的组织特异性、疾病特异性和时序特异性等, 作为生物标志物的理想分子, 在临床疾病的分子诊断领域具有重要的研究价值和广阔的应用前景^[2]。近期研究发现, tRFs&tiRNAs在肿瘤、获得性代谢疾病和神经系统疾病中具有重要的调控功能, 其调控方式也趋多样化, 比如影响蛋白翻译、类似miRNA沉默基

因表达和竞争结合重要蛋白等, 调控方式的多样化预示着tRFs&tiRNAs功能极其强大, 其基础研究及临床应用价值犹如一座亟待开发的宝库^[3]。因此, tRF&tiRNA成为近年来研究的热点^[4]。

tRNA与转录组密码子的匹配度是影响翻译效率和准确性的关键性因素之一。tRNAs及其来源片段在胁迫信号转导和自适性翻译中发挥着核心作用。增殖、分化和凋亡等细胞生理过程都需要特定的tRNA。此外, 许多研究表明tRNA在肿瘤、2型糖尿病、亨廷顿症以及病毒感染等疾病的发生发展中起着重要的调控作用^[4-5]。相关研究表明, 50%的鸡卵清提取液诱导293T细胞后, OCT4和NANOG表达量增加, 定量PCR结果表明端粒增长^[6]。本研究合成3个稳定升高的tRFs&tiRNAs分子, 将其转染至293T细胞, 研究3个分子对细胞功能的影响, 为将来这3个分子进一步应用到细胞生物学领域奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

试剂包括: 胎牛血清(货号C04001-100, 以色列BI公司生产, 昆明泽浩科技有限公司代理)、鸡卵清提取液(自制)、293T细胞(中国科学院昆明细胞库), 培养基为含10%胎牛血清的DMEM-F12。

1.2 仪器

仪器包括: BIO-RAD伯乐Powerpac HV高压电泳仪(美国, 伯乐)、分光光度计(上海谱元仪器有限公司)、自动凝胶切割器(85-0002-01, 世联博研北京科技有限公司)、Illumina Miseq高通量测序仪(美国, 宜曼达)、流式细胞仪(型号Attune NxT, 美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 鸡卵清提取液制备 取5个鸡蛋, 无菌分离卵清和卵黄, 卵清按照1:1比例加入裂解液, 充分搅匀, 冻于-20 °C, 反复冻融3次后, 2000 r/min离心20 min, 取上清液, 4 °C保存。裂解液配方: 50 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂、100 mmol/L HEPES(pH8.2)、1 mmol/L二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、0.1 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF)和蛋白酶抑制剂。由此得到的提取液为鸡卵清提取液。在提取过程中注意无菌操作, 获得的鸡卵清提取液即可用于细胞培养。

1.3.2 293T细胞的诱导 293T细胞加于6孔板中, 3个孔加普通培养基作为对照组, 3个孔加50%鸡卵清提取液的培养基作为诱导组, 共培养3天。将两组细胞($n=3$)进行tRFs&tiRNAs高通量测序。

1.3.3 tRFs&tiRNAs分子测序 将诱导组和对

照组分别提取RNA, 进行高通量测序检测两组tRFs&tiRNAs分子的表达差异, 通过高通量数据分析, 获得6个样本的聚类图、主成分分析图和散点图。检测诱导组与对照组相比表达水平显著升高的tRFs&tiRNAs分子。

1.3.4 定量PCR验证 分子重编程后共有207个分子显著升高, 经过对差异倍数(fold change, FC)值大于2、 P 值小于0.05、每百万碱基数(counts per million, CPM)值较大的分子进行筛选, 同时考虑分子长度和分子亚型, 共挑选了4个显著升高的分子进行PCR验证。分子长度选20 bp左右的, 不选择14 bp以下和35 bp以上的, 以便后续做过表达分析。定量PCR验证步骤如下: 首先用TRIzol试剂(Invitrogen life technologies)提取样本RNA, 然后进行反转录合成cDNA, 用到的试剂如下: rtStar™ tRF&tiRNA Pretreatment Kit (Cat# AS-FS-005, Arraystar), rtStar™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (3' and 5' adaptor) (Cat# AS-FS-003, Arraystar)。最后进行荧光定量PCR, 用到的试剂如下: 2× PCR master mix(Arraystar) (表1)。

1.3.5 稳定升高的tRFs&tiRNAs分子转染 待细胞贴壁生长且状态良好, 细胞密度达到50%左右可以转染单链RNA。(1) 稀释RNA模仿物(mimic): 用120 μL 1× riboFECT™ CP Buffer稀释5 μL 50 μmol/L miRNA mimic, 轻轻混匀。混合液制备: 加入12 μL riboFECT™ CP Reagent, 轻轻吹打混匀, 室温孵育0~15 min(注: 请勿振荡, 溶液可能会有浑浊, 但不会影响转染); (2) 混合液可室温放置一段时间, 但不宜超过24 h。将riboFECT™ CP混合液加入到细胞培

表1 定量PCR使用引物列表

Table 1 List of primers used in quantitative PCR

基因 Gene	序列(5'→3') sequence (5'→3')	预期扩增产物长度/bp Expected amplified product length /bp
<i>U6</i> (internal reference)	Upstream: GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T Downstream: CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT	89
tRF-18-S5S8R6D2	Upstream: CGA TCG TCA CGT CGG GGT Downstream: GTG TGC TCT TCC GAT CTT GGT G	40
tRF-16-K87965D	Upstream: TTC TAC AGT CCG ACG ATC CC Downstream: TTC CGA TCT GGT GCC GAA AC	43
tRF-17-K879652	Upstream: GTT CTA CAG TCC GAC GAT CCC Downstream: CTT CCG ATC TTG GTG CCG AA	46
tRF-22-WD8YQ84V2	Upstream: GAT CTC GAC TCC TGG CTG G Downstream: TGC TCT TCC GAT CTT GGC GA	44

表2 SYBR Green荧光定量PCR引物设计
Table 2 SYBR Green fluorescent quantitative PCR primer design

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	预期扩增产物长度/bp Expected amplified product length /bp
<i>OCT4</i>	Upstream: CCG AAA GAG AAA GCG AAC C Downstream: CCC TGA GAA AGG AGA CCC A	235
<i>NANOG</i>	Upstream: ACC TAT GCC TGT GAT TTG TGG G Downstream: ACC TTG TCT TCC TTT TTT GCG A	290
<i>TEL</i>	Upstream: TCA AGT GGG CTG AAA ATG AGT T Downstream: AGG GTG GAA GAA TGG TGA AAA A	185

培养基中, 轻轻混匀。

1.3.6 Western blot检测多能因子OCT4和NANOG的变化 细胞总蛋白的提取与变性, 所有的操作均在冰上进行。根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。电泳、转膜、孵育抗体及显影。每个样品上样30 μg, 用120 V的电压电泳, 直到溴酚蓝跑到距离玻璃板下端1 cm的位置, 结束电泳。转膜后均用5%的脱脂奶粉室温封闭30 min。将切下的膜在对应一抗(1:100)中室温孵育60 min后, 用TBST洗至无脱脂奶粉。随后, 室温孵育二抗(1:5 000) 60 min后, TBST洗3次, 每次5 min。随后, 即可进行显影。

1.3.7 定量PCR检测多能基因OCT4和NANOG的变化和端粒的相对表达量 细胞加入1 mL TRIzol行总RNA的提取, RNA逆转录反应为cDNA, 定量PCR检测多能基因OCT4和NANOG的变化和端粒的相对表达量, 通过GenBank基因数据库搜索对应的完整序列, 用Primer 5.0软件设计相应的引物。引物设计如表2所示。

1.3.8 流式检测多能因子OCT4和NANOG的变化 细胞弃上清液, 加PBS洗2次, 加入0.5 mL胰酶消化细胞, 待细胞相互分离变圆后加完全培养基终止消化, 吹打成单个细胞悬液, 收集细胞悬液于离心管中, 300 ×g离心5 min, 加PBS清洗1次。弃上清液, 细胞沉淀加入300 μL 1× Cytifix/Cytoperm破膜剂固定细胞, 2~8 °C避光放置30~40 min。加入1 mL 1× Perm/Wash, 混匀, 离心, 弃上清并涡旋, 重复此步骤, 加入50 μL Perm/Wash和胞内抗体(按照上述分组加入抗体), 混匀后2~8 °C避光放置40~50 min。加入1 mL Perm/Wash, 300 ×g离心5 min, 弃上清液并涡旋, 重复步骤1次。加入350 μL预冷的染色缓冲液上机即可。

1.3.9 CCK8比色法检测细胞活力 将3组转染过单链RNA的293T及正常的293T 4个模型组的细胞消

化下来, 用细胞计数板计数, 然后将细胞每孔2 000个铺于96孔板中, 每组设置3个复孔, 铺4个板, 分别在24、48、72、96 h检测(D)值。在读值2 h之前, 将每孔培养基吸去100 μL, 加入10 μL的CCK-8。2 h后用酶标仪测定波长在450 nm处的吸光度(D)值。

1.3.10 采用PE Annexin V/7-AAD双标法检测各组细胞的凋亡情况 将细胞用胰酶消化, 用PBS洗涤2次, 加100 μL Annexin V Binding Buffer (1×)将细胞悬起, 加10 μL 7-AAD和5 μL Annexin V-PE, 常温避光孵育15 min, 最后加入200 μL 1× 连结缓冲液, 立即上机检测。

1.3.11 采用PI/RNase检测各组293T细胞的周期情况 将细胞消化后, 收集到EP管中, 用PBS洗涤2次, 再加入750 μL的PBS将细胞悬起, 补加250 μL的无水乙醇, 在-20 °C冰箱固定2 h。固定完后, 从冰箱取出, 500 ×g离心5 min, 弃上清液, 加PBS洗涤, 300 ×g离心5 min, 加250 μL PI/RNase染色缓冲液, 常温避光15 min后上机检测细胞周期。

1.3.12 统计学分析方法 用SPSS17.0软件分析, 数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不同处理组间对比用One-Way ANOVA, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组和诱导组293T细胞tRFs&tiRNAs分子测序结果

FC值大于1.5的tRFs&tiRNAs分子标为红色, 共207个; FC值小于0.66的分子标为绿色, 共180个(图1)。

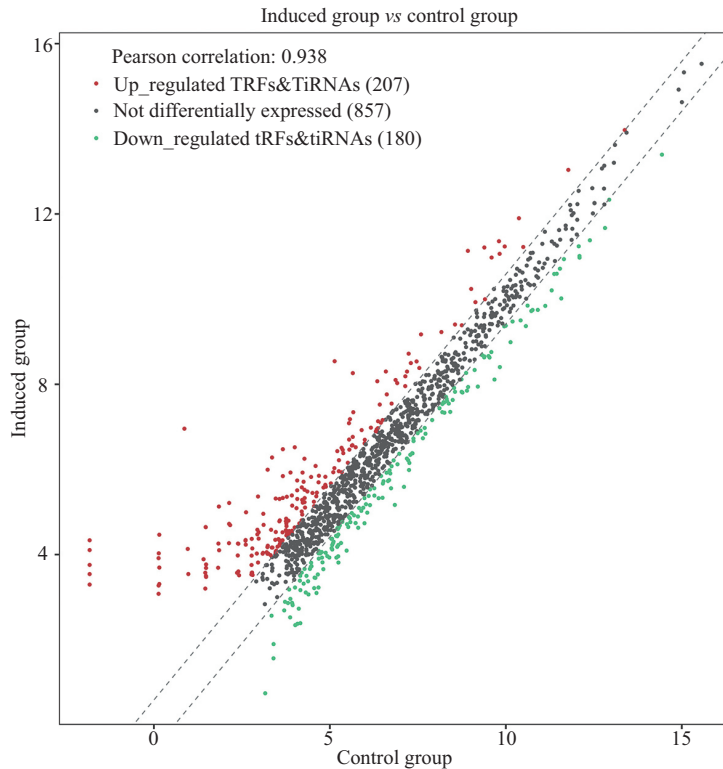
2.2 PCR验证

经过对FC值、P值、CPM值进行筛选, 同时考虑分子长度和分子亚型, 最终挑选了4个上调的分子进行PCR验证, 3个分子稳定上调, 另1个分子验证后

并没有稳定上调(表3和表4)。

经检测诱导组与对照组相比有3个tRFs&tiRNAs分子稳定升高。高通量测序结果经过分析,上调的

3个分子是 tRF-16-K87965D(5'-CCC GGG TTT CGG CAC C-3')、tRF-17-K879652(5'-CCC GGG TTT CGG CAC CA-3')和 tRF-22-WD8YQ84V2(5'-TCG ACT



FC值大于1.5的tRFs&tiRNAs分子标为红色,共207个;FC值小于0.66的分子标为绿色,共180个;中间部分为差异表达不够显著的分子,共857个,标为黑色,此部分分子因差异倍数不够大而被剔除掉。

A total of 207 tRFs&tiRNAs molecules with $FC > 1.5$ were marked in red; a total of 180 molecules with $FC < 0.66$ were marked in green; the middle part was molecules with insufficient differential expression, totaling 857, marked in black, this part of molecule were removed because the FC was not large enough.

图1 对照组和诱导组tRFs&tiRNAs分子上调和下调的散点图

Fig.1 Scatter plots of the up-regulation and down-regulation of tRFs&tiRNAs molecules in the control group and the induced group

表3 挑选的4个上调分子

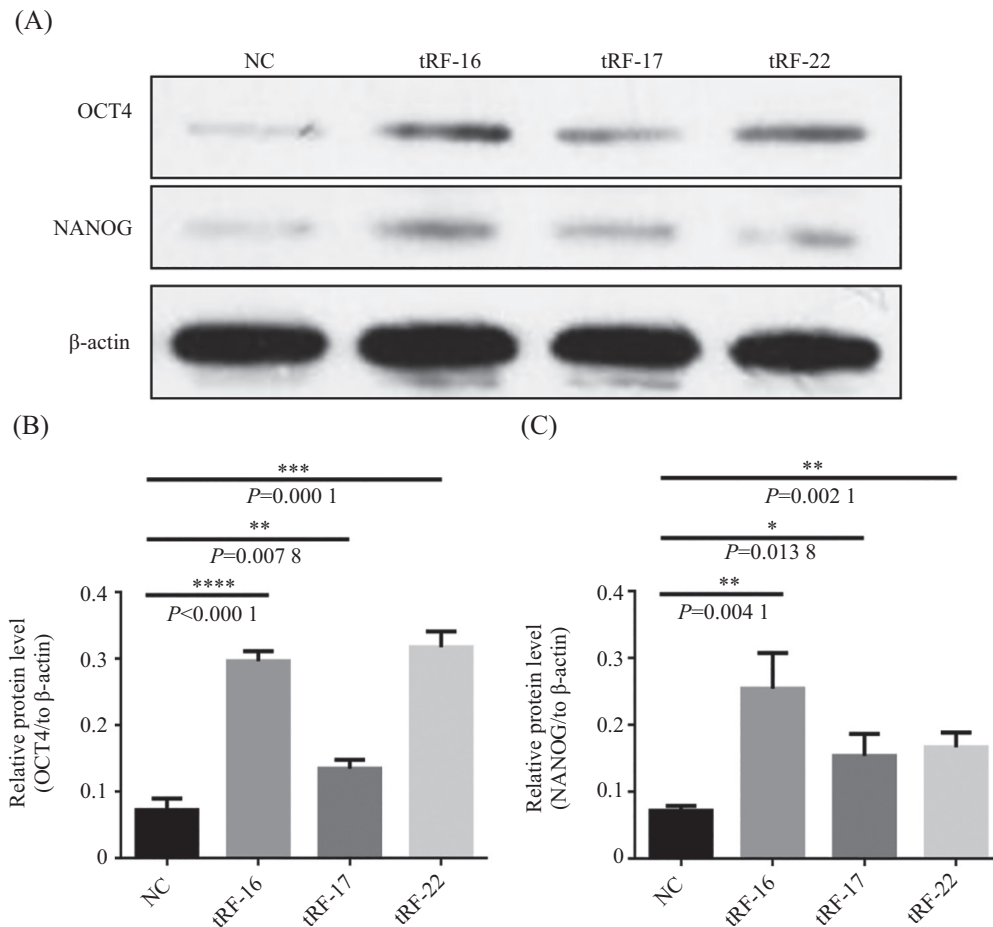
Table 3 Four up-regulated molecules selected

项目 Term	上调分子名称 Up-regulated molecular name			
MINTbase-ID	tRF-18-S5S8R6D2	tRF-16-K87965D	tRF-17-K879652	tRF-22-WD8YQ84V2
tRF-ID	tRF-Trp-CCA-023	tRF-Phe-GAA-111	tRF-Phe-GAA-001	tRF-Arg-ACG-016
Fold change	1.257 052245	2.789 414397	2.335 557162	1.525 864736
P value	0.256 440389	2.786 59 $\times 10^{-9}$	5.155 71 $\times 10^{-9}$	0.048327049

表4 定量PCR验证结果

Table 4 Quantitative PCR verification results

MINTbase-ID	tRF-22-WD8YQ84V2	tRF-16-K87965D	tRF-17-K879652	tRF-18-S5S8R6D2
tRF-ID	tRF-Arg-ACG-016	tRF-Phe-GAA-111	tRF-Phe-GAA-001	tRF-Trp-CCA-023
Fold change	3.34 \pm 1.28	3.12 \pm 0.50	1.51 \pm 0.29	0.87 \pm 0.23
P value	0.001 645	0.000 015	0.015 683	0.256



A: 转染3个分子后细胞的WB结果。B: OCT4相对表达量。C: NANOG相对表达量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

A: WB results of cells transfected with 3 molecules. B: relative expression level of OCT4. C: the relative expression of NANOG. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

图2 细胞转染后WB检测OCT4和NANOG表达

Fig.2 WB detection of OCT4 and NANOG expression after cell transfection

CCT GGC TGG CTC GCC A-5')。

2.3 WB检测多能因子OCT4和NANOG表达

与对照组比较, RF-16、tRF-17、tRF-22转染的293T细胞, 多能因子OCT4和NANOG相对表达量都明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图2)。其中tRF-16升高最明显($P<0.01$)。

2.4 定量PCR检测多能基因OCT4和NANOG相对表达量

定量PCR检测OCT4和NANOG相对表达量(与未转染细胞相比)明显升高, 端粒对比未转染细胞明显增长(图3)。用定量PCR的方法检测端粒的相对长度, 发现转染3个分子后, 端粒的相对长度增长了, 差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.5 流式检测多能因子OCT4和NANOG阳性表达情况

与对照组比较, tRF-16、tRF-17、tRF-22转染的

293T细胞, 多能因子OCT4和NANOG表达水平升高, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4和表5)。流式检测表明, 多能因子OCT4和NANOG阳性表达细胞明显增多(图4)。

2.6 CCK8比色法检测细胞增殖活力

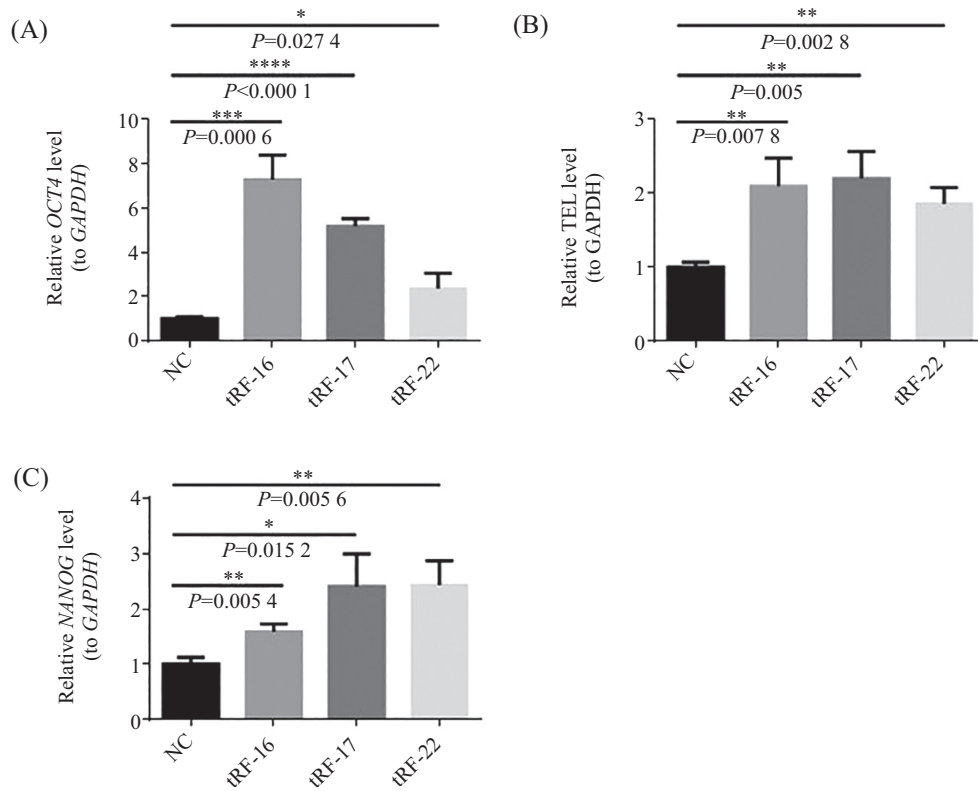
转染3个分子后, 细胞增殖活性增强, 而转染tRF-16后细胞增殖活性最强($P<0.01$)(图5)。转染tRF-17和tRF-22后, 细胞增殖明显增加($P<0.05$)。

2.7 PE Annexin V/7-AAD双标法检测各组细胞的凋亡情况

转染3个分子后, 细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义(图6)。与对照组比较, 转染tRF-16、tRF-17、tRF-22后细胞凋亡率降低($P<0.01$)(表6)。

2.8 PI/RNase检测各组293T细胞的细胞周期情况

与对照组比较, G_0/G_1 百分比降低, 转染tRF-16



A: *OCT4*相对表达量。B: 端粒相对长度。C: *NANOG*相对表达量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

A: relative expression of *OCT4*. B: relative length of telomeres. C: the relative expression of *NANOG*. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图3 细胞转染后定量PCR检测多能基因*OCT4*和*NANOG*相对表达量

Fig.3 The relative expression of pluripotent genes *OCT4* and *NANOG* was detected by quantitative PCR after cell transfection

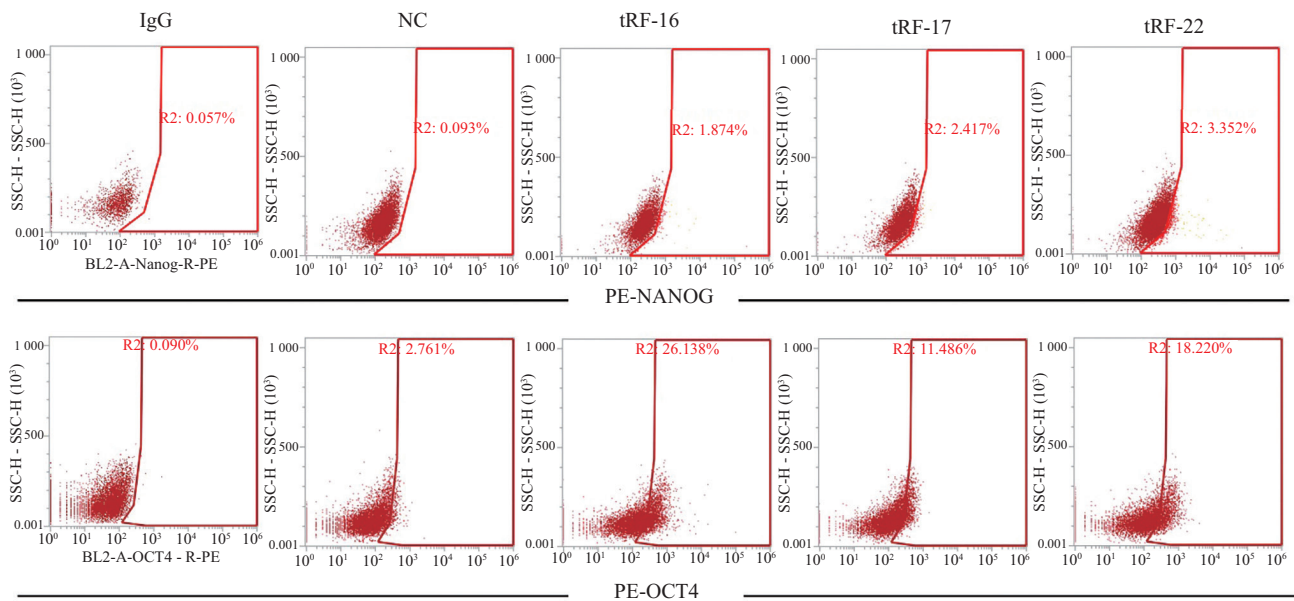


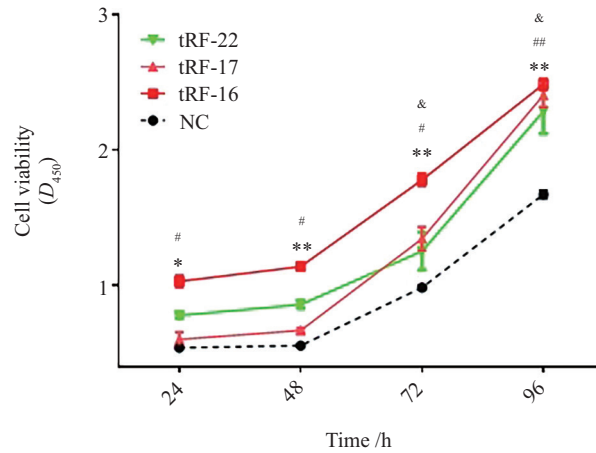
图4 细胞转染后流式检测多能因子*OCT4*和*NANOG*阳性表达

Fig.4 The positive expression of pluripotent factors *OCT4* and *NANOG* was detected by flow cytometry after cell transfection

表5 流式检测多能因子OCT4和NANOG阳性表达

Table 5 Flow cytometry detected the positive expression of pluripotency factors OCT4 and NANOG

分组 Groups	OCT4	P值对比NC组 P value compared with NC group	NANOG	P值对比NC组 P value compared with NC group
NC	2.760 00±0.040 42		0.102 000±0.004 933	
tRF-16	26.400 00±1.242 00	<0.000 1	1.838 000±0.088 450	<0.000 1
tRF-17	11.890 00±0.293 50	<0.000 1	2.142 000±0.160 800	0.000 2
tRF-22	19.790 00±1.028 00	<0.000 1	3.351 000±0.057 740	<0.000 1



*P<0.05, **P<0.01, tRF-16与NC组比较; #P<0.05, ##P<0.01, tRF-22与NC组比较; &P<0.05, tRF-17与NC组比较。

*P<0.05, ##P<0.01 tRF-16 compared with NC group; #P<0.05, **P<0.01 tRF-22 compared with NC group; &P<0.05 tRF-17 compared with NC group.

图5 CCK8比色法检测细胞活力

Fig.5 CCK8 colorimetric method to detect cell viability

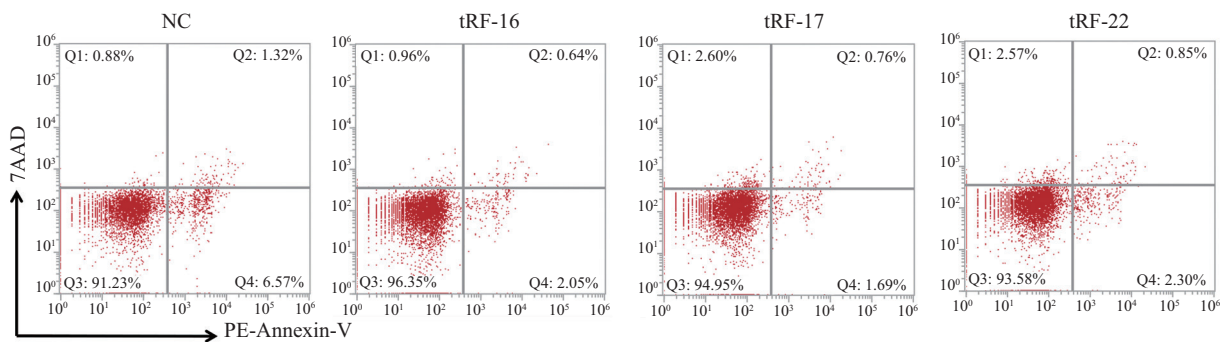


图6 PE Annexin V/7-AAD双标法检测各组细胞的凋亡情况

Fig.6 PE Annexin V/7-AAD double-labeling method was used to detect the apoptosis of cells in each group

表6 细胞转染后PE Annexin V/7-AAD双标法检测各组细胞的凋亡情况

Table 6 PE Annexin V/7-AAD double-labeling method to detect cell apoptosis in each group after cell transfection

分组 Groups	凋亡率/% Apoptosis /%	P值对比NC组 P value compared with NC group
NC	7.732 00±0.389 70	
tRF-16	2.650 00±0.090 00	0.000 2
tRF-17	2.473 00±0.073 67	0.000 2
tRF-22	3.117 00±0.436 90	0.001 4

n=3.

表7 细胞转染后PI/Rnase检测各组293T细胞的周期情况

Table 7 PI/Rnase detection of the cycle of 293T cells in each group after cell transfection

细胞周期 Cell cycle	NC	tRF-16	tRF-17	tRF-22	P值对比NC组 P value compared with NC group
G ₀ /G ₁	48.123±0.211	44.367±0.783	44.000±0.903	45.093±0.874	P<0.01
S	38.573±0.428	48.113±0.593	47.003±0.121	35.457±0.624	P<0.01
G ₂ /M	14.357±0.317	6.863±0.406	10.783±0.394	20.183±1.042	P<0.01

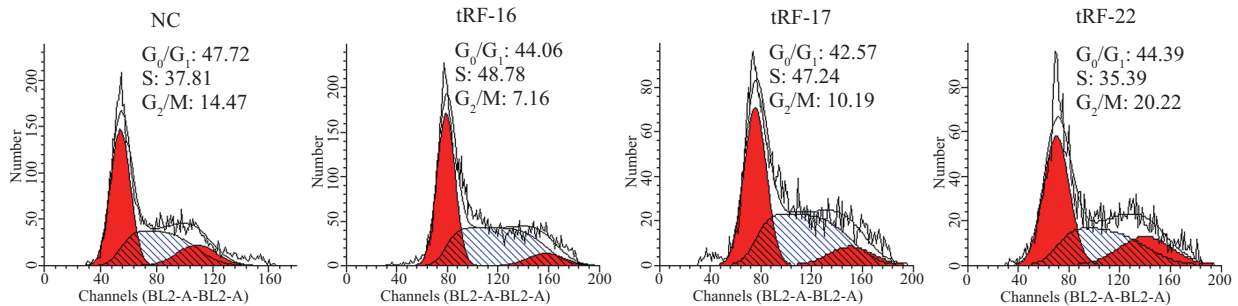


图7 PI/Rnase检测各组293T细胞的周期情况

Fig.7 PI/Rnase detection of the cycle of 293T cells in each group

和tRF-17后细胞的S期显著增加, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)(表7和图7)。

3 讨论

tRFs是一种非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA), 长度为14~35 nt。tRFs源自前体tRNA(pre-tRNA)或成熟tRNA, 有如下几种主要类型: tRF-1、tRF-2、tRF-3、tRF-5和i-tRF, 其在生命进程中具有调节基因表达、抑制蛋白质翻译等作用, 并且在肿瘤诊治中也可充当生物标志物、治疗靶点等^[5,7]。原先认为, tRNA在完成其转运使命后便发生降解, 然而, 越来越多的研究表明, tRFs仅是在tRNA二级结构的不同位点进行切割而得的产物, 而且还是病理以及生理过程中具有调节性的重要的非编码RNA^[8]。

tRFs与tiRNAs属于大多数生物体中存在的短的非编码RNA家族, 于20世纪70年代在癌症患者的尿液中首次被发现, 当时就被提议为致癌分子^[9], 但在随后的几十年中, 对于其在癌症进展中的作用机制一直没有实质性的研究进展^[10]。然而, 近几年研究表明, tRFs与tiRNAs在基因组和染色体水平的基因调控中起着重要的作用, 从而调控肿瘤的发生和发展^[11-15]。tRFs不仅可以发挥生物标志物的功能, 而且还具有开发癌症靶向治疗的新可能^[16]。

tRFs&tiRNAs通过调控基因表达与基因沉默、调节细胞增殖与凋亡、调节翻译等方式在人

类肿瘤中发挥重要作用。tRFs&tiRNAs组织特异性、高度丰富且稳定、广泛存在的特征使其在肿瘤领域的研究中具有明显优势^[17]。tRFs&tiRNAs与miRNA(microRNA)具有相似的功能^[18]。tRFs&tiRNAs可以通过与miRNA相似的方式发挥生物学功能^[19]。tRFs&tiRNAs组织特异性、高度丰富而稳定、广泛存在的特征使其能够在多种肿瘤样本中被检测到, 在新型生物标志物的探索和开发上具有巨大优势。尽管tRFs&tiRNAs研究取得了一些重要进展, 并成为一个新的热点, 然而tRFs&tiRNAs研究仍处于早期阶段, 并存在许多需要解决的问题^[20]。

这些研究都表明, tRFs&tiRNAs是调控分子, 是用于肿瘤诊断和治疗的新型生物学标记。然而tRFs&tiRNAs在体细胞重编程中的作用还没有人研究过。

我们将标准的体细胞株293T细胞加于6孔板中, 3个孔加普通培养基, 3个孔加50%鸡卵清提取液的培养基, 共培养3天, 检测两组细胞tRFs&tiRNAs分子的差异。共测到207个分子重编程后发生上调, 180个分子重编程后发生下调, 经过对FC值、P值、CPM值进行筛选, 同时考虑分子长度和分子亚型, 最终挑选了4个分子进行PCR验证。验证后有3个分子稳定上调, 另1个分子验证后并没有稳定上调, 所以验证结果只显示了3个。经定量PCR验证, 3个分子稳定上调。我们合成了这3个分子, 并转染293T细胞后,

WB的结果表明3个分子转染的293T细胞, 多能因子OCT4和NANOG表达都明显升高(与未转染的细胞相比), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。定量PCR检测多能基因OCT4和NANOG相对表达量明显升高(与未转染的细胞相比), 端粒对比未转染的细胞明显增长。qPCR的检测结果表明, 3个tRFs分子转染的293T细胞, 多能基因OCT4和NANOG相对表达量都明显升高(与未转染的细胞相比), 端粒明显增长(与未转染的细胞相比), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。WB和qPCR的检测结果趋势基本一致。虽然3个tRFs分子转染后, 多能因子表达增加的统计学意义稍有差别, 但总的趋势是多能因子表达的增加。流式检测到多能因子OCT4和NANOG阳性表达细胞明显增多。同时细胞的增殖活性、细胞凋亡和细胞周期都发生了有意义的改变。

以前的研究表明, 人体细胞能通过外源表达少量的转录因子直接重编程为诱导性多能干细胞^[16], 然而外源因子的连续表达使得诱导性多能干细胞的安全性引起人们关注^[21]。研究者一直在寻找新的重编程的方法, 新方法有直接转染蛋白^[22], 小分子诱导^[18], 也有报道猪卵提取物能重编程体细胞^[23], 最近许多研究也表明动物的卵细胞有重编程体细胞的作用, 我们的研究表明鸡卵清提取液能诱导293T细胞发生重编程现象^[6], 在深入的实验中, 我们用不同终浓度的鸡卵清提取液诱导293T细胞, 结果表明50%终浓度的鸡卵清提取液诱导效率最高, 同时不影响细胞生长, 因此本文中我们用的就是50%终浓度的鸡卵清提取液。

我们在前面的研究中发现, 50%鸡卵清提取液共培养的细胞多能因子OCT4和NANOG表达会升高, 定量PCR检测到端粒增长, 体细胞逆向分化为多能干细胞^[6]。在这个研究中, 我们检测了诱导和未诱导两组细胞tRFs&tiRNAs分子的表达差异, 并进行了验证, 验证结果表明, 3个分子稳定上调, 将这3个分子转染293T细胞后, 检测到了细胞发生年轻化改变, 发生了重编程, 有转变为干细胞的趋势。这3个分子有望成为使细胞重编程的新分子。

参考文献 (References)

- [1] GOODARZI H, LIU X, NGUYEN H C, et al. Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 Displacement [J]. Cell, 2015, 161(4): 790-802.
- [2] GREEN D, FRASER W D, DALMAY T. Transfer RNA-derived small RNAs in the cancer transcriptome [J]. Pflugers Arch, 2016, 468(6): 1041-7.
- [3] ANDERSON P, IVANOV P. tRNA fragments in human health and disease [J]. FEBS Lett, 2014, 588(23): 4297-304.
- [4] OLVEDY M, SCARAVILLI M, HOOGSTRATE Y, et al. A comprehensive repertoire of tRNA-derived fragments in prostate cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 24766-77.
- [5] GEBETSBERGER J, ZYWICKI M, KUNZI A, et al. tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii* [J]. Archaea, 2012, 2012: 260909.
- [6] RUAN G P, YAO X, SHU J, et al. Chicken egg-white extracts promote OCT4 and NANOG expression and telomeres growth in 293T cells [J]. Cell Mol Biol, 2017, 63(7): 59-65.
- [7] BALATTI V, NIGITA G, VENEZIANO D, et al. tsRNA signatures in cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(30): 8071-6.
- [8] CASTNER J, AMIRI A, HUNTINGTON-MOSKOS L. Applying the NIEHS translational research framework (NIEHS-TRF) to map clinical environmental health research trajectories [J]. Nurs Outlook, 2020, 68(3): 301-12.
- [9] REESE T A, XIA J, JOHNSON L S, et al. Identification of novel microRNA-like molecules generated from herpesvirus and host tRNA transcripts [J]. J Virol, 2010, 84(19): 10344-53.
- [10] HEYER R, DORR M, JELLEN-RITTER A, et al. High throughput sequencing reveals a plethora of small RNAs including tRNA derived fragments in *Haloferax volcanii* [J]. RNA Biol, 2012, 9(7): 1011-8.
- [11] CHEN Q, YAN M, CAO Z, et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder [J]. Science, 2016, 351(6271): 397-400.
- [12] GUAN W, GAO Z, HUANG C, et al. The diagnostic value of serum DSA-TRF in hepatocellular carcinoma [J]. Glycoconj J, 2020, 37(2): 231-40.
- [13] KEAM S P, YOUNG P E, MCCORKINDALE A L, et al. The human Piwi protein Hiwi2 associates with tRNA-derived piRNAs in somatic cells [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(14): 8984-95.
- [14] MAUTE R L, SCHNEIDER C, SUMAZIN P, et al. tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(4): 1404-9.
- [15] ZHU J, CHENG M, ZHAO X. A tRNA-derived fragment (tRF-3001b) aggravates the development of nonalcoholic fatty liver disease by inhibiting autophagy [J]. Life Sci, 2020, 257: 118125.
- [16] CHEN Y, SHEN J. Mucosal immunity and tRNA, tRF, and tiRNA [J]. J Mol Med, 2021, 99(1): 47-56.
- [17] MENG L, JIANG L, CHEN J, et al. Transfer RNA-derived fragment tRF-28-QSZ34KRQ590K in plasma exosomes may be a potential biomarker for atopic dermatitis in pediatric patients [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(5): 489.
- [18] LI J, JIN L, GAO Y, et al. Low expression of tRF-Pro-CGG predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(5): e23742.
- [19] LUAN N, CHEN Y, LI Q, et al. TRF-20-M0NK5Y93 suppresses the metastasis of colon cancer cells by impairing the epithelial-to-mesenchymal transition through targeting Claudin-1 [J]. Am J

- Transl Res, 2021, 13(1): 124-42.
- [20] MA X, LIU C, KONG X, et al. Extensive profiling of the expressions of tRNAs and tRNA-derived fragments (tRFs) reveals the complexities of tRNA and tRF populations in plants [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(4): 495-511.
- [21] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72.
- [22] LUAN N, MU Y, MU J, et al. Dicer1 promotes colon cancer cell invasion and migration through modulation of tRF-20-ME-JB5Y13 expression under hypoxia [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 638244.
- [23] WU Y, YANG X, JIANG G, et al. 5'-tRF-GlyGCC: a tRNA-derived small RNA as a novel biomarker for colorectal cancer diagnosis [J]. *Genome Med*, 2021, 13(1): 20.