· 实验技术及其应用 ·

亚砷酸钠诱导反式剪接体 ts – TIMP2 增强 A549 细胞活力的实验研究

路大艳[1],李舒婷[1],谭婧文[1],段何仙[2,3], 温鸿福[1],杨雪飞[1],
段婷芝[1],马虬宇[1],何越峰[1],蒋成兰[1]
1. 昆明医科大学云南省公共卫生与生物安全重点实验室暨公共卫生学院,云南 昆明 650500;
2. 中国科学院昆明动物研究所;3. 国家非人灵长类实验动物资源库

摘要:目的　探讨亚砷酸钠($NaAsO_2$)对 A549 细胞中反式剪接型基质金属蛋白酶组织抑制因子 2(trans – spliced tissue inhibitor of metalloproteinase 2, ts – TIMP2)表达的影响,并分析 ts – TIMP2 在砷暴露下对细胞活力的作用。**方法**　设计特异性引物扩增 ts – TIMP2,经 qRT – PCR,琼脂糖凝胶电泳以及 DNA 测序验证其特异性;通过 CCK – 8 法确定 $NaAsO_2$ 处理浓度和时间,qRT – PCR 检测 TIMP2 及 ts – TIMP2 的 mRNA 表达;构建 siRNA 干扰体系敲低 ts – TIMP2,并建立慢病毒过表达系统稳定表达 ts – TIMP2,结合 CCK – 8 法评估其对细胞活力的影响。**结果**　引物经 qRT – PCR,电泳以及测序显示可特异性扩增 ts – TIMP2。CCK – 8 显示 $NaAsO_2$ 抑制 A549 细胞活力,IC_{50}由为 48.48 μM;TIMP2 基因 mRNA 表达水平在 30、45 μM $NaAsO_2$ 处理下显著上调($P<0.01$),ts – TIMP2 基因 mRNA 表达水平仅在 45 μM 时显著升高($P<0.05$),呈浓度依赖性。敲低 ts – TIMP2 使细胞活力下降 13.18%($P<0.01$),联合 $NaAsO_2$ 处理,细胞活力进一步显著降低($P<0.01$);相反,过表达 ts – TIMP2 使细胞活力提升 24.66%($P<0.01$),ts – TIMP2 过表达同时联合 $NaAsO_2$ 作用时,细胞活力仍高于 $NaAsO_2$ 作用的对照组($P<0.05$)。**结论**　$NaAsO_2$ 可诱导反式剪接体 ts – TIMP2 表达,进而增强 A549 细胞活力。

关键词:无机砷;ts – TIMP2;A549 细胞;细胞活力
中图分类号:R995　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1003 – 8507(2026)10 – 1907 – 07
DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202511397

Sodiumarsenite induces the trans – spliced TIMP2(ts – TIMP2) to enhance viability in A549 cells: an experimental study

LU Da – yan*, LI Shu – ting, TAN Jing – wen, DUAN He – xian, WEN Hong – fu, YANG Xue – fei, DUAN Ting – zhi, MA Qiu – yu, HE Yue – feng, JIANG Cheng – lan
* *Yunnan Key Laboratory of Public Health and Biosafety, School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan* 650500, *China*

Abstract: Objective　To investigate the effect of sodium arsenite($NaAsO_2$) exposure on the expression of trans – spliced tissue inhibitor of metalloproteinase 2(ts – TIMP2) in A549 cells and to analyze the role of ts – TIMP2 in arsenic – induced cell viability. **Methods**　Specific primers were designed to amplify ts – TIMP2, and their specificity was validated via qRT – PCR, agarose gel electrophoresis, and DNA sequencing. CCK – 8 assays were used to determine appropriate $NaAsO_2$ concentrations and exposure duration. mRNA levels of TIMP2 and ts – TIMP2 were quantified by qRT – PCR. siRNA – mediated knockdown and lentiviral overexpression systems(carrying GFP and 3 × Flag tags) were established to modulate ts – TIMP2 expression, and CCK – 8 assays were performed to assess cell viability under various conditions. **Results**　The results from all three methods confirmed the specific amplification of ts – TIMP2 by these primers. $NaAsO_2$ reduced A549 cell viability in a dose – dependent manner, with an IC_{50} of 48.48 μM. TIMP2 mRNA was significantly upregulated at 30 and 45 μM $NaAsO_2$($P<0.01$), while ts – TIMP2 expression increased significantly only at 45 μM($P<0.05$), indicating concentration – dependent regulation. Knockdown of ts – TIMP2 decreased cell viability by 13.18% compared to the negative control($P<0.01$), co – treatment with $NaAsO_2$ further significantly suppressed cell viability($P<0.01$). Conversely, ts – TIMP2 overexpression enhanced cell

基金项目:云南省科技厅基础研究专项 – 面上项目(202401AT070177);云南省创新团队(202405AS350016);昆明医科大学环境与职业砷暴露致癌研究科技创新团队项目(CXTD202201);云南省贺争鸣专家工作站(202305AF150160)
作者简介:路大艳(2002—),女,硕士在读;研究方向:劳动与环境卫生
通信作者:蒋成兰与何越峰为共同通信作者。蒋成兰,E – mail:jiangchenglan@kmmu.edu.cn;何越峰,E – mail:heyuefeng@kmmu.edu.cn

viability by 24.66% ($P<0.01$) and maintained significantly higher viability than the $NaAsO_2$ – only group even under co – treatment conditions ($P<0.05$). **Conclusion** Sodium arsenite ($NaAsO_2$) can induce the expression of trans – spliced TIMP2 (ts – TIMP2), thereby enhancing the viability of A549 cells.

Keywords: Inorganic arsenic; ts – TIMP2; A549 cells; Cell viability

基质金属蛋白酶组织抑制因子 2(tissue inhibitor of metalloproteinases 2, TIMP2)作为一种内源性的金属蛋白酶抑制分子,参与调控神经系统、心血管系统、肿瘤发生发展以及肾脏疾病等多个生物学过程[1-4]。研究表明,长期砷暴露可上调小鼠肝组织中 TIMP2 mRNA 的表达,进而促进肝纤维化进程[5];与此一致,亚砷酸钠在大耳兔模型中呈剂量依赖性地上调肝组织 TIMP2 mRNA 表达[6];此外,另有研究指出高脂饮食能进一步协同增强砷诱导的 TIMP2 过表达,从而加剧肝纤维化进程[7]。研究表明,反式剪接(trans – splicing, TS)作为一种非经典的 RNA 加工方式,能将两个或两个以上前体 mRNA(pre – mRNA)分子的外显子连接,形成反式剪接 RNA(trans – spliced RNA, ts – RNA)[8-9]。反式剪接主要可分为两种类型:仅存在于低等真核生物中的 SL(Spliced – leader) – 型,以及存在于脊椎动物中的非 SL – 型(包括同一基因座来源的基因内反式剪接和不同基因来源的基因间反式剪接)[8]。反式剪接可能在调控基因表达、产生多样性蛋白质等方面发挥重要作用[10-11]。这类 ts – RNA 是具有重要生物学功能的分子,它们既可以编码产生具有新功能的融合蛋白或调控性非编码 RNA,也能通过竞争性消耗亲本基因的 pre – mRNA 来影响其正常表达,在细胞活力和生长、信号转导乃至疾病发生中扮演关键角色[8,12]。

研究显示,TIMP2 基因可通过基因内反式剪接产生 ts – TIMP2 异构体[13]。然而,其具体的生物学功能至今仍未被阐明。此外,慢性砷暴露是有效的 RNA 剪接干扰剂,可诱导全基因组水平的异常可变剪接,并直接参与皮肤癌等肿瘤的发生发展[14-15]。但现有研究聚焦于经典的顺式剪接过程,砷暴露是否以及如何影响反式剪接这一特殊机制,目前尚缺乏直接证据。因此,深入研究亚砷酸钠是否诱导 ts – TIMP2 的表达,并解析其在肺上皮细胞(如 A549)活力调控中的作用,将为阐明砷的毒理机制开辟新的视角。

鉴于此,本研究旨在探讨亚砷酸钠(sodium arsenite, $NaAsO_2$)暴露对人非小细胞肺癌 A549 细胞中 ts – TIMP2 表达的影响,并深入分析 ts – TIMP2 在砷暴露背景下对细胞活力的调控作用,并探讨其作为砷毒性效应生物标志物的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 试剂:RPMI – 1640 培养液、胎牛血清(上海达特希尔生物科技有限公司);青霉素 – 链霉素混合液(北京华越洋生物技术有限公司);PBS、胰蛋白酶消化液、蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂混合物(通用型,100 ×)和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);RNA Isolate 提取试剂盒(南京诺唯赞生物技术股份有限公司);HiFiScript cDNA Synthesis Kit、DL500 DNA Marker(江苏康为世纪生物科技有限公司);$NaAsO_2$(成都西亚试剂公司);常规琼脂糖试剂(BIOWEST 公司);RFect 小核酸转染试剂(常州百代生物科技有限公司);siRNA 、慢病毒过表达 RNA (上海吉玛制药技术有限公司);CCK – 8(美国 MCE 公司);TIMP2 兔单抗、β 肌动蛋白(Actin)、Flag 标签抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);Omni – ECL™化学发光检测试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司)。

本研究使用的重点仪器和设备包括:二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific, 3111);倒置显微镜(Motic, AE2000 – T);基因扩增仪(杭州博日科技股份有限公司,TC – 96/G/H(b)B);实时荧光定量 PCR 仪(杭州米欧仪器有限公司,PR – 96Q);台式高速微型离心机(Shanghai Techcomp Bio – equipment Ltd, Velocity15R Pro);研究级倒置荧光显微镜(Nikon, Eclipse Ts2R);凝胶成像分析系统(Bio – Rad Laboratories Inc, Universal Hood II);多功能酶标仪(BioTek Instruments Inc, H1M);超灵敏多功能成像仪(GE Healthcare Bio – Sciences AB, Amersham Imager 680)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 人肺腺癌细胞系 A549 细胞由中国科学院昆明动物研究所惠赠。采用含 10.0% 胎牛血清和 1.0% 青霉素 – 链霉素混合液的 RPMI – 1640 完全培养液,于 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中进行细胞培养,每 2 ~ 3 天传代一次(0.25% 胰酶消化 2 ~ 3 min)。

实验时,将 A549 细胞以 1.0×10^5 cells/孔接种于 6 孔板,培养 24 h 待其完全贴壁(融合度约 50% ~ 60%),更换新鲜完全培养基,分别加入终浓度为 15、30、45 μM 的亚砷酸钠($NaAsO_2$)处理 48 h;对照组加入等体积不含药物的完全培养基。处理结束时,对照组细胞融合度达 80% ~ 90%,未见明显接触抑制。弃去培养液,用预冷 PBS 洗涤两次,按 TRIzol 法提取总 RNA 用于后续实验。

1.2.2 提取总 RNA 与逆转录　按照试剂说明书,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。使用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,所有样本的 260/280 比值均介于 1.9 至 2.1 之间,利用逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,在冰上配置 20 μl 的反应体系。逆转录反应条件:25 ℃预孵育 10 min,42 ℃孵育 60 min,80 ℃加热 10 min 以灭活逆转录酶;反应结束后,cDNA 产物于 -20 ℃保存备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR　实时荧光定量 PCR 实验用的系统为 LightCycler® 96 系统,以 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参基因. 引物序列为(5'→3'):β-actin 正向 GCCGAGGACTTTGATTGCAC,反向 TGGACTTGGGAGAGGACTGG;ts-TIMP2 引物 1 正向 GGAATATCTCATTGCAGTGATCA,反向 AGAGGGTGATGTGCATCTT;ts-TIMP2 引物 2 正向 CGTTTTGCAATGCAGATGTA,反向 TTGGCCCTGATCACTGCAA;合成公司为上海吉玛制药技术有限公司。PCR 反应条件如下:95 ℃变性 30 s;60 ℃退火 30 s;72 ℃ 延伸 30 s;循环 40 次。定量分析方法为 $2^{-\triangle\triangle ct}$,实验进行 3 次重复。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳及 DNA 测序分析　取 8 μl PCR 产物,通过 3% 琼脂糖凝胶电泳进行分析,电泳选用 DL500 DNA Marker,电泳条件为 100 v 30 min,最后利用凝胶成像分析系统捕获图像。

PCR 扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳验证后,委托上海捷瑞生物工程有限公司进行双向 Sanger 测序。所得序列使用 Chromas 软件进行校对和比对分析,序列准确性通过双向测序结果相互验证。

1.2.5 转染 siRNA 片段　将处于对数生长期的 A549 细胞以每孔 1 800 个的密度接种于 96 孔板,使用 RPMI-1640 完全培养液常规培养 19 h。随后,使用 RFect 小核酸转染试剂进行 siRNA 片段转染。转染后 24 h,使用 RPMI-1640 完全培养液更换孔内培养液 (200 μl/孔),继续培养 48 h 后检测细胞活力。

在进行 siRNA 干扰与砷的联合实验时,转染后 24 h,每孔加入 200 μl 含终浓度为 40 μM $NaAsO_2$ 的 RPMI-1640 完全培养液,处理 48 h 后进行检测。ts-TIMP2 的 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成,序列为(5'→3'):NC 正向 UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT,反向 ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT;Si-ts-TIMP 正向 CAUUGCAGUGAUCAGGGCCdTdT,反向 GGCCCUGAUCACUGCAAUGdTdT。

1.2.6 慢病毒过表达　含 ts-TIMP2 全长 CDS 序列(873 bp)的慢病毒过表达载体由上海吉玛制药技术有限公司构建,载体上含 GFP 及 3×的 Flag 标签。为评估感染效率,本研究在实验中于病毒感染后 72 h(即换液后 48 h)通过荧光显微镜观察 GFP 表达情况,随机选取不少于 3 个视野(20×物镜),结合明场图像计数 GFP 阳性细胞与总细胞数,计算阳性比例。三次独立实验结果显示,平均感染效率为 88.3% ± 5.0%。

以每孔 1.0×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板,接种 19 h 后进行病毒感染,病毒感染 24 h 后用完全培养液换液,孵育 48 h 后用蛋白免疫印迹检测 ts-TIMP2 基因过表达后的效果;空载慢病毒作为阴性对照。

将 A549 细胞(对数生长期)按每孔 1 500 个的密度接种于 96 孔板,同样是接种 19 h 后进行病毒感染,病毒感染 24 h 后用完全培养液换液,与 $NaAsO_2$ 的联合处理的方式同前,终浓度为 40 μM,孵育 48 h 后进行后续细胞活力检测。

1.2.7 CCK-8 法检测 A549 细胞活力　96 孔板细胞接板以及相关操作如前所述,测定时吸走原液每孔加 20 μl cck8 溶液和 80 μl 完全培养液混匀,于恒温培养箱孵育 20 min 后用多功能酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值。每次处理重复 3 次,结果表示为对照组的百分比,细胞存活率 =(实验组吸光度值 - 空白组吸光度值)/(对照组吸光度值 - 空白组吸光度值),对照组细胞活力调整为 100%。

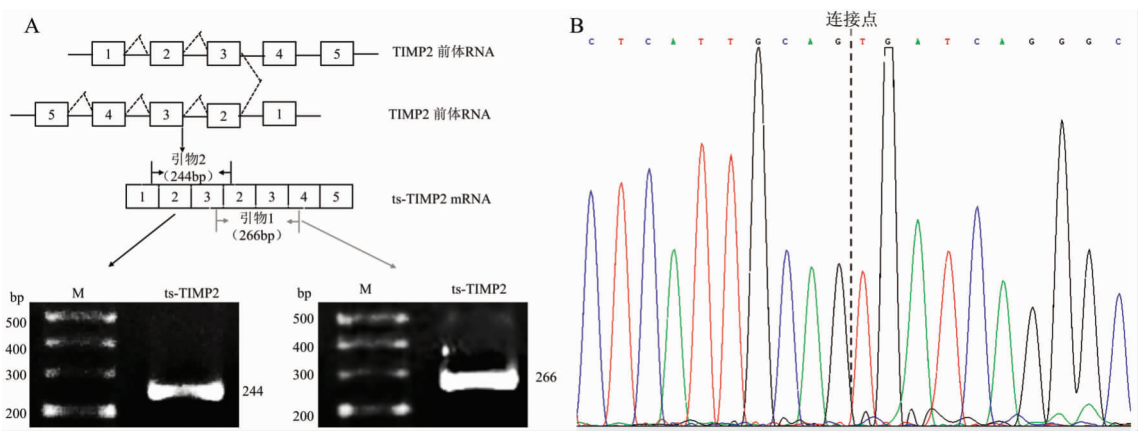
1.2.8 蛋白免疫印迹　使用含有蛋白酶抑制剂的 IP 细胞裂解液对过表达细胞进行裂解,并通过离心提取总蛋白。用 BCA 法测定蛋白浓度后,进行 SDS-PAGE 电泳分离。随后以 200 mA 电流在湿转装置中转膜 2.5 h,将目标蛋白(TIMP2)及内参蛋白(β-actin)转移至 PVDF 膜上。将膜用无蛋白快速封闭液在室温下封闭 30 min,之后分别孵育目的蛋白抗体 TIMP2(1∶1 000)和内参抗体 β-actin(1∶2 000),4 ℃过夜。次日,使用 TBST 缓冲液洗涤膜 4 次,每次 5 min。根据一抗来源选择相应的二抗,室温孵育 2 h,再次按照相同条件洗膜。最后使用化学发光底物显影,并采集图像。采用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析,计算其相对表达水平。计算方法为:目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值。

1.2.9 统计学分析　绘图使用 GraphPad Prism 9.3.0 软件,采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,组间比较使用两独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结　果

2.1 ts-TIMP2 在 A549 细胞中可被特异性扩增　ts-TIMP2 源自同一 TIMP2 基因的反式剪接,即基因内的反式剪接。ts-TIMP2 较 TIMP2 额外包含外显子 2

和外显子 3，ts－TIMP2 全长 3 862 bp，比 TIMP2 多 210 bp。本研究在外显子 3 和外显子 2 交接的位置设计了两对引物。引物 1 和引物 2 扩增的产物长度分别为 266 bp 和 244 bp，ts－TIMP2 引物 1 扩增序列测序结果：GGAATATCTCATTGCAGTGATCAGGGCCAAAGCGGTCAGTGAGAAGGAAGTGGACTCTGGAAACGACATTTATGGCAACCCTATCAAGAGGATCCAGTATGAGATCAAGCAGATAAAGATGTTCAAAGGGCCTGAGAAGGATATAGAGTTTATCTACACGGCCCCCTCCTCGGCAGTGTGTGGGGTCTCGCTGGACGTTGGAGGAAAGAAGGAATATCTCATTGCAGGAAAGGCCGAGGGGGACGGCAAGATGCACATCACCCTCT；ts－TIMP2 引物 2 扩增序列测序结果：CGTTTTGCAATGCAGATGTAGTGATCAGGGCCAAAGCGGTCAGTGAGAAGGAAGTGGACTCTGGAAACGACATTTATGGCAACCCTATCAAGAGGATCCAGTATGAGATCAAGCAGATAAAGATGTTCAAAGGGCCTGAGAAGGATATAGAGTTTATCTACACGGCCCCCTCCTCGGCAGTGTGTGGGGTCTCGCTGGACGTTGGAGGAAAGAAGGAATATCTCATTGCAGTGATCAGGGCCAA；琼脂糖凝胶电泳以及测序结果如图 1 所示。

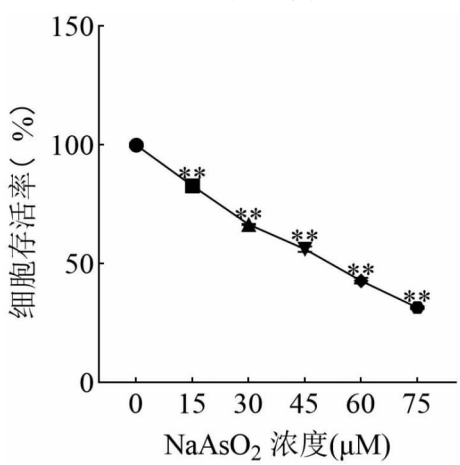


注：A，ts－TIMP2 mRNA 结构模式图及凝胶电泳结果图。下方凝胶电泳结果显示，利用两对特异性引物（预期产物分别为 266 bp 和 244 bp）在 A549 细胞中均成功扩增出单一目的条带。M：DNA 分子量标准。B，扩增产物的 Sanger 测序峰图。图中虚线标示了 ts－TIMP2 特有的外显子连接点，序列结果证实了该转录本的真实存在及引物的特异性。

图 1 ts－TIMP2 在 A549 细胞中可被特异性扩增

Fig. 1 Specific amplification of ts－TIMP2 in A549 cells

2.2 不同浓度 $NaAsO_2$ 对 A549 细胞存活率的影响 与 0 组相比，随着 $NaAsO_2$ 处理浓度的增加，A549 细胞的存活率降低（$P<0.01$，图 2），且当 $NaAsO_2$ 为 48.48 μM 时，细胞存活率为 50%，因此，在此后的实验中，选择 15、30、45 μM 为实验浓度。



注：与 0 组相比，＊＊：$P<0.01$，下同。

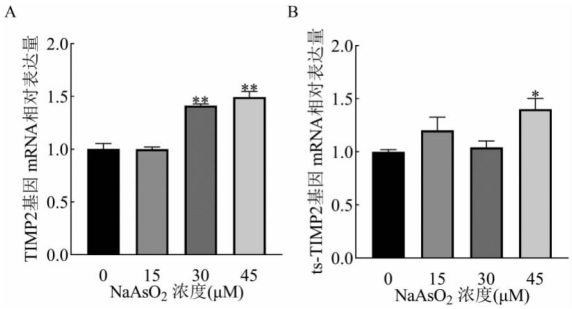
图 2 不同浓度 $NaAsO_2$ 对 A549 细胞存活率的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of $NaAsO_2$ on the viability of A549 cells

2.3 不同浓度 $NaAsO_2$ 处理 A549 细胞 TIMP2 及 ts－TIMP2 mRNA 的表达 与 0 组相比，30 和 45 μM 组 A549 细胞中 TIMP2 mRNA 表达水平上调，差异具有统计学意义（$P<0.01$，图 3A）；与 0 组相比，15、30、45 μM 组 A549 细胞中 ts－TIMP2 mRNA 表达水平上调，且 45 μM 组与对照组之间差异具有统计学意义（$P<0.05$，图 3B）。

2.4 A549 细胞 siRNA 敲低 ts－TIMP2 效率验证 使用 qRT－PCR 法检测 ts－TIMP2 mRNA 表达。图 4 结果表明，与对照组相比，敲低组的 ts－TIMP2 mRNA 相对表达水平显著降低（$P<0.01$），而 TIMP2 转录本的表达未发生明显变化，说明 A549 细胞中 ts－TIMP2 特异性敲低成功。

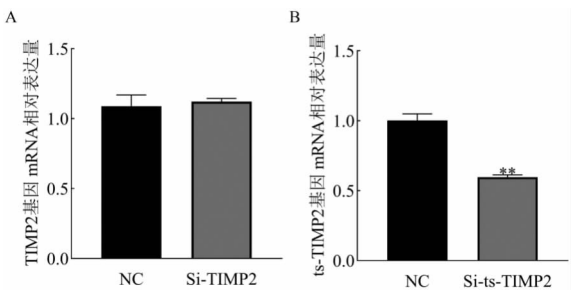
2.5 敲低 ts－TIMP2 基因对 $NaAsO_2$ 处理前后 A549 细胞活力的影响 CCK8 检测结果表明（图 5），与 NC 组相比，单独敲低 ts－TIMP2，A549 细胞活力下降 13.18%（$P<0.01$）；若在敲低 ts－TIMP2 的同时又联



注：A，不同浓度 $NaAsO_2$ 处理 A549 细胞后 TIMP2 mRNA 表达水平；B，不同浓度 $NaAsO_2$ 处理 A549 细胞后 ts－TIMP2 mRNA 表达水平，*：$P<0.05$，下同。

图 3　不同浓度 $NaAsO_2$ 处理 A549 细胞后 TIMP2 及 ts－TIMP2 mRNA 表达水平

Fig. 3　Effects of varying $NaAsO_2$ concentrations on TIMP2 and ts－TIMP2 mRNA expression in A549 cells



注：A，敲低 ts－TIMP2 后 A549 细胞中 TIMP2 基因 mRNA 的相对表达量；B，敲低 ts－TIMP2 后 A549 细胞中 ts－TIMP2 基因 mRNA 的相对表达量。

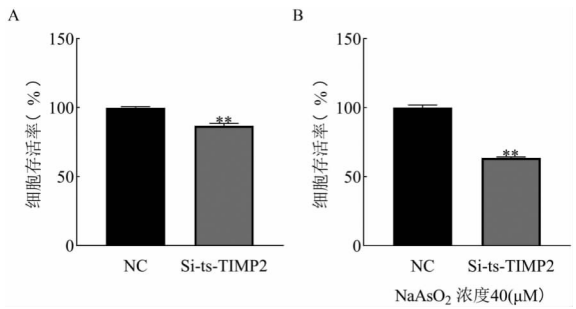
图 4　A549 细胞 siRNA 干扰 ts－TIMP2 效率

Fig. 4　Efficiency of siRNA interference targeting ts－TIMP2 in A549 cells

合 $NaAsO_2$ 作用，细胞活力则下降更多（$P<0.01$）。表明敲低 ts－TIMP2 和 $NaAsO_2$ 联合处理在抑制 A549 细胞活力中发挥协同作用。

2.6　ts－TIMP2 基因在 A549 细胞中的过表达　图 6A，GFP 结果显示细胞转染成功。图 6B，Flag 蛋白图显示 ts－TIMP2 大小约 35 kd；所用 TIMP2 抗体与 ts－TIMP2 含有相同肽段，该抗体可同时检测 TIMP2 和 ts－TIMP2，WB 结果显示 ts－TIMP2 过表达成功。图 6C，左图表示 Flag 蛋白相对表达量在过表达组显著高于对照组（$P<0.01$），右图表示 ts－TIMP2 总蛋白相对表达量在过表达组同样显著高于对照组（$P<0.01$）。这些结果共同显示：Flag 标记成功示踪外源表达蛋白，ts－TIMP2 基因在 A549 细胞中实现有效过表达。

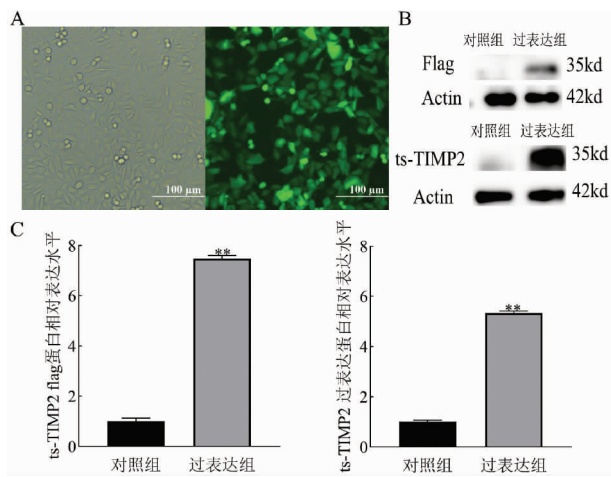
2.7　过表达 ts－TIMP2 基因对 $NaAsO_2$ 处理前后 A549 细胞活力的影响　图 7，CCK8 检测结果表明，与对照组相比，单独过表达 ts－TIMP2，A549 细胞存活率上升 24.66%（$P<0.01$）；与亚砷酸钠作用的对照组相比，在亚砷酸钠处理下又过表达 ts－TIMP2，A549 细胞存活率上升 12.05%（$P<0.05$），表明 ts－TIMP2 可增强 A549 细胞在 $NaAsO_2$ 暴露下的细胞活力。



注：A，单独敲低 ts－TIMP2 A549 细胞存活率；B，敲低 ts－TIMP2 联合 $NaAsO_2$ 处理 A549 细胞存活率。

图 5　CCK8 法检测敲低 ts－TIMP2 后 $NaAsO_2$ 处理前后 A549 细胞活力变化

Fig. 5　CCK－8 assay detecting changes in A549 cell viability before and after sodium arsenite treatment following ts－TIMP2 knockdown



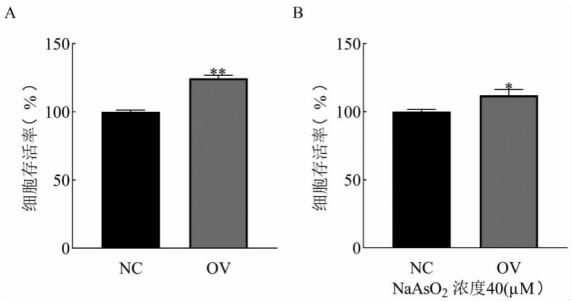
注：A，荧光显微镜观察荧光标记的慢病毒转染结果；B，ts－TIMP2 过表达蛋白变化；C，ts－TIMP2 蛋白的相对表达水平。

图 6　慢病毒转染效率及 ts－TIMP2 过表达对 A549 细胞蛋白表达的影响

Fig. 6　Lentiviral transduction efficiency and the effect of ts－TIMP2 overexpression on protein expression in A549 cells

3　讨　论

本研究首次将反式剪接异构体 ts－TIMP2 与环境砷暴露相关联，揭示其在亚砷酸钠诱导下显著上



注：A，单独过表达 ts－TIMP2 A549 细胞存活率；B，过表达 ts－TIMP2 联合 $NaAsO_2$ 处理 A549 细胞存活率。

图 7 CCK8 法检测过表达 ts－TIMP2 基因前后亚砷酸钠处理前后 A549 细胞活力变化

Fig. 7 CCK－8 assay of A549 cell viability following sodium arsenite treatment and ts－TIMP2 overexpression

调，并发挥促细胞存活作用。因此，ts－TIMP2 可能作为砷相关健康风险的潜在分子标志物。实验表明，敲低 ts－TIMP2 会降低 A549 细胞的活力，且与亚砷酸钠联用时，显著加剧了细胞活力的丧失；反之，过表达 ts－TIMP2 则能提升细胞活力，并在砷暴露条件下维持较高存活水平。正反证据一致支持亚砷酸钠诱导 ts－TIMP2 表达，而该反式剪接异构体通过增强细胞活力介导对砷毒性的适应性应答。

更重要的是，ts－TIMP2 的应激诱导特性及其明确的促存活功能，为其作为功能性反式剪接产物提供了有力支持。不同于经典的顺式剪接，反式剪接可通过连接不同基因组座位的基因外显子，生成具有调控功能的新转录本[16]。这种机制可能使细胞能够重编程基因表达，以响应微环境变化。这一观点已有实验证据支持，研究表明乳腺癌细胞中经基因间 mRNA 反式剪接产生的 ADIPOR2::FAM72B 嵌合转录本，作为新型致癌驱动因子促进肿瘤细胞增殖和迁移[17]，这提示反式剪接可能在应激条件下通过激活沉默的编码潜能促进细胞适应性存活。本研究首次揭示 ts－TIMP2 在无机砷暴露下特异性上调并介导细胞保护作用，为反式剪接在环境应激响应中的功能性角色提供了新证据。

然而，必须谨慎看待 ts－TIMP2 促存活作用的生物学后果。从急性细胞保护角度看，其可能通过维持线粒体功能或抑制凋亡通路发挥保护效应[18－19]；但从肿瘤预防视角审视，砷是明确的人类肺致癌物，其毒性部分源于诱导 DNA 损伤和氧化应激[20－21]。若 ts－TIMP2 的活力增强效应使携带 DNA 损伤的细胞得以存活并增殖，则可能间接促进恶性转化，此时所谓的“保护”反而成为癌变风险的帮凶。

本研究存在若干重要局限。首先，所有功能实验均在 A549 细胞系中完成，难以代表正常肺上皮细胞的生理响应。其次，目前缺乏体内数据，尚不清楚 ts－TIMP2 在砷暴露动物模型或人群肺组织中是否同样被诱导。最后，其分子机制尚未阐明。

综上，尽管本研究仍受限于单一细胞模型、缺乏体内验证及机制细节尚不明确，但其结果为理解环境毒物如何通过非经典转录调控影响细胞命运提供了新视角。未来需在原代肺上皮细胞、类器官、动物模型及人群队列中进一步验证 ts－TIMP2 的生物学功能与临床价值，以科学评估其作为生物标志物或干预靶点的可行性与安全性。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Ferreira AC, Hemmer BM, Philippi SM, et al. Neuronal TIMP2 regulates hippocampus－dependent plasticity and extracellular matrix complexity[J]. Molecular Psychiatry, 2023, 28(9): 3943－3954.

[2] Aminuddin A, Samah N, Vijakumaran U, et al. Unveiling TIMPs: A systematic review of their role as biomarkers in atherosclerosis and coronary artery disease[J]. DISEASES, 2024, 12(8): 177.

[3] 李辉，张丽娜，宋瑞佳，等. 微小 RNA－221 靶向组织金属蛋白酶抑制因子 2 介导 Akt/mTOR 信号通路对非小细胞肺癌移植瘤小鼠模型的影响[J]. 解剖学报，2022，53(6)：754－761.
Li H, Zhang LN, Song RJ, et al. Effect of microRNA－221 targeting tissue inhibitor of metalloproteinase－2 to mediate Akt/mTOR signaling pathway on non－small cell lung cancer transplanted tumor mouse model[J]. Acta Anatomica Sinica, 2022, 53(6): 754－761. (In Chinese)

[4] Xu DX, Yu HC, Pang JJ, et al. TIMP2 promotes AKI－CKD transition by inducing tubular maladaptive repair and cell senescence via targeting Wnt/β－catenin signalling[J]. Clinical and Translational Medicine, 2026, 16(2): e70605.

[5] 欧兵，吴君，李玲，等. 促肝纤维化因子在水砷暴露小鼠肝组织中表达[J]. 中国公共卫生，2008，24(2)：254－256.
Ou B, Wu J, Li L, et al. Expression of MMP－8、TIMP－2、Col－Ⅰ、Col－Ⅲ mRNA in hepatic tissue in drinking Arsenic exposed mice[J]. Chinese Journal of Public Health, 2008, 24(2): 254－256. (In Chinese)

[6] 马艳，符文慧，牛姜水，等. 亚砷酸钠对大耳兔肝脏基质组织金属蛋白酶抑制因子－2 和转化生长因子－β1mRNA 表达的影响[J]. 环境与健康杂志，2013，30(8)：662－665.
Ma Y, Fu WH, Niu JS, etal. Effects of Sodium arsenite on expression of matrix metalloproteinase inhibitor－2 (TIMP－2) and transforming growth factor－beta 1 (TGF－β1) mRNA in rabbit liver[J]. Journal of Environment and Health, 2013, 30(8): 662－665. (In Chinese)

[7] Vahedi H, Pourmotahari F, Oroojan AA, et al. A high－fat diet exacerbates Arsenic toxicity in various organs. A systematic review of toxicity and mechanism[J]. Current Research in Toxicology, 2025, 9: 100250.

[8] 荆晓燕，张彩霞，宋艳芳，等. 反式剪接及其在哺乳动物中的作用[J]. 畜牧兽医学报，2018，49(10)：2070－2079.
Jing XY, Zhang CX, Song YF, et al. Trans－splicing and Its

Roles in Mammals[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2018, 49(10): 2070 – 2079. (In Chinese)

[9] Pitolli C, Marini A, Sette C, et al. Non – Canonical splicing and its implications in brain physiology and cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2811.

[10] Ceballos – Pérez G, Gómez – Liñán C, Sánchez – Luque FJ, et al. DRBD3 regulates long non – coding RNA abundance and cryptic splice site selection in trypanosomes[J]. CMLS – Cellular and Molecular Life Sciences, 2025, 82(1): 386.

[11] Hou SQ, Li G, Xu BB, et al. Trans – splicing facilitated by RNA pairing greatly expands sDscam isoform diversity but not homophilic binding specificity[J]. Sci Adv, 2022, 8(27): eabn9458.

[12] Mukherjee S, Mukherjee SB, Frenkel – Morgenstern M. Functional and regulatory impact of chimeric RNAs in human normal and cancer cells[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA, 2023, 14(5): e1777.

[13] Chen YC, Chen CY, Chiang TW, et al. Detecting intragenic trans – splicing events from non – co – linearly spliced junctions by hybrid sequencing[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(15): 7777 – 7797.

[14] Ferragut CA, Banerjee M, Al – Eryani L, et al. Temporal modulation of differential alternative splicing in HaCaT human keratinocyte cell line chronically exposed to Arsenic for up to 28 wk[J]. Environmental Health Perspectives, 2022, 130(1): 17011.

[15] Banerjee M, Scott JL, Lykoudi A, et al. Chronic Arsenic exposure and hsa – miR – 186 overexpression causes transcriptome – wide differential alternative splicing contributing to skin carcinogenesis in human HaCaT cell line[J]. Archives of Toxicology, 2025, 99(10): 3963 – 3977.

[16] Huang Y, Huang X, Zhang LH, et al. Chimeric RNA isoforms generated by diverse mechanisms from two C – type lectins modulate innate immunity in arthropods[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2025, 122(41): e2518148122.

[17] Patra G, Kim PS, Kutzner A, et al. The role of chimeric FAM72B transcripts generated by intergenic mRNA trans – splicing in breast cancer[J]. Functional & Integrative Genomics, 2025, 25(1): 260.

[18] Zhou M, Liu SQ, Wang YN, et al. AIF3 splicing variant elicits mitochondrial malfunction via the concurrent dysregulation of electron transport chain and glutathione – redox homeostasis[J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 1804.

[19] Shan M, Xiao M, Zhang L, et al. A unique chimeric RNA: ERCC1 – iASPP drives benzo[a]pyrene – induced lung carcinogenesis via dual coding and non – coding mechanisms[J]. Adv Sci(Weinh), 2026, 13(8): e07217.

[20] Speer RM, Zhou X, Volk LB, et al. Arsenic and cancer: Evidence and mechanisms[J]. Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.), 2023, 96: 151 – 202.

[21] Cooper KL, Liu R, Zhou XX. Particulate Arsenic trioxide induces higher DNA damage and reactive Oxygen species than soluble arsenite in lung epithelial cells[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2022, 457: 116320.

收稿日期:2025-11-25

(上接第 1865 页)

Xu XQ, Song KM, He YQ, et al. Policy analysis and implications of the allocation planning of medical insurance designated hospitals and pharmacies in China based on content analysis method[J]. Soft Science of Health, 2025, 39(10): 78 – 84. (In Chinese)

[18] 李灵灵,任君,李成英,等.青藏高寒区自然资本可持续利用时空分异特征及驱动因素 – – 以青海省为例[J/OL].干旱区地理:1 – 14 [2026 – 04 – 10]. https://link.cnki.net/urlid/65.1103.X.20251016.1341.001.

Li LL, Ren J, Li CY, et al. Spatiotemporal differentiation characteristics and driving factors of sustainable utilization of natural capital in the Qinghai – Tibet Alpine Region—Taking Qinghai Province as an example[J/OL]. Arid Land Geography: 1 – 14 [2026 – 04 – 10]. https://link.cnki.net/urlid/65.1103.X.20251016.1341.001. (In Chinese)

[19] 杨慧青.加快青海银发经济高质量发展对策研究[J].青海党的生活,2025,(2):64 – 72.

Yang HQ. Research on countermeasures for accelerating the high – quality development of silver economy in Qinghai[J]. Qinghai Party Life, 2025, (2): 64 – 72. (In Chinese)

[20] 刘晓.高质量发展:中国式现代化的必由之路[N].安徽科技报,2025 – 10 – 29(13).

Liu X. High – Quality development: The inevitable path to Chinese – Style modernization[N]. Science and Technology News, 2025 – 10 – 29(13). (In Chinese)

[21] 吴焱斌.习近平关于健康中国论述的理论意蕴、内在逻辑与实践创新[J].卫生法学,2025,33(6):132 – 143.

Wu YB. The theoretical implications, internal logic, and practical innovation of Xi Jinping's expositions on healthy China[J]. Health Law, 2025, 33(6): 132 – 143. (In Chinese)

[22] 王莉,生雅玮,邵岫,等.基于网络 DEA 模型的省际卫生资源配置效率分析[J].中国社会医学杂志,2024,41(6):753 – 757.

Wang L, Sheng YW, Shao S, et al. Analysis of the efficiency of provincial health resource allocation based on network DEA model[J]. Chinese Journal of Social Medicine, 2024, 41(6): 753 – 757. (In Chinese)

[23] 陈兵兵,盖迎春,宋忠航,等.祁连山地区生态质量时空变化及驱动力[J].Journal of Desert Research,2024,44(6):258 – 267.

Chen BB, Ge YC, Song ZH, et al. Spatiotemporal changes and driving forces of ecological quality in Qilian mountain area[J]. Journal of Desert Research, 2024, 44(6): 258 – 267. (In Chinese)

收稿日期:2025-11-18