

miR-29 表达载体的构建 及在 HBV 相关肝癌中靶基因的初步鉴定

王春梅¹ 刘玉刚² 白 波¹

(¹ 济宁医学院泰山学者实验室, 山东 济宁 272067; ² 山东大学医学院病理生理学研究所, 山东 济南 250012)

摘 要 **目的** 通过构建 miR-29 的表达载体以及 HBV 相关肝癌中靶基因的初步鉴定, 为探讨 miR-29 和其靶基因在 HBV 相关肝癌发生、发展中的作用奠定基础。**方法** 利用生物信息学方法预测 miR-29 的靶基因, RT-PCR 方法检测靶基因在肝癌细胞系及相应临床标本中的表达变化; 构建 miR-29 及其靶基因的表达载体, 利用双荧光报告检测方法检测 miR-29 与靶基因的靶向关系。**结果** 成功构建 miR-29 及其靶基因核表达载体, 分别命名为 pS-miR-29a, pS-miR-29b, pS-miR-29c 及 pGL3-TUBB2A; 靶基因 TUBB2A 在 HBV 相关肝癌中表达明显上调。**结论** TUBB2A 为 miR-29 的直接靶基因, 本研究为下一步研究 miR-29 及其靶基因 TUBB2A 在 HBV 相关肝癌发生、发展中的作用奠定基础。

关键词 microRNAs; miR-29; 肝癌(HCC); 乙型肝炎病毒(HBV); TUBB2A

中图分类号: R37 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2012)08-243-05

Construction of miR-29 expression plasmid and preliminary identification of target in HBV-related HCC

WANG Chun-mei, LIU Yu-guang, BAI Bo

(Taishan Scholar Laboratory of Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding, single-stranded RNA molecules and play important roles at the post-transcriptional level by imperfect base-pairing with 3'- untranslated regions (3'-UTR) of target mRNAs. In a preliminary study, we found that microRNA-29 (miR-29) was significantly down-regulated in HBV-related HCC cell lines and HBV transgenic mice compared with their corresponding controls. **Methods** To further study the functions of miR-29, we amplified the precursors of human miR-29 (miR-29a, miR-29b and miR-29c) gene by polymerase chain reaction (PCR) from the HepG2 genomic DNA, and then constructed miR-29 expression vectors pS-miR-29a, pS-miR-29b and pS-miR-29c. We combined the results from computational predictions, mRNA assays, gene chips and dual luciferase assays to identify the target of miR-29. **Results** The results indicated that miR-29c directly targeted TUBB2A (tubulin, beta 2A), which were significantly upregulated in HepG2.2.15 cells compared with HepG2 cells as well as in HBV-related HCC tissue compared with NT. **Conclusion** The results would facilitate further studies of the functions of miR-29 and target genes during HBV infection and carcinogenesis of HCC.

Key words: MicroRNA; Hepatocellular carcinoma (HCC); Hepatitis B virus (HBV); MiR-29; TUBB2A

microRNAs(miRNAs)是一类普遍存在于真核生物中的非编码的内源性小 RNA 分子,它通过与互补或部分互补的靶基因的 mRNA 的 3'-UTR (3'非编码区)相互作用,使 mRNA 降解或介导其转译抑制,从而在基因表达调控中发挥重要作用^[1]。研究表明,miRNA 通过在转录或翻译水平调节相关基因表达,参与发育、增殖、分化、凋亡等

多种生物学过程^[2-3]。

近年来的研究发现,在肺癌组织中,miR-29 表达下调,其中 miR-29 的表达与 DNMT3A 和 DNMT3B 呈负相关,它可以直接靶定 DNMT3A 和 DNMT3B。在胆管癌中 miR-29 的表达被抑制^[4],进一步的研究表明,Mcl-1 在胆管癌细胞的抗凋亡过程中起着重要作用,胆管癌细胞中 miR-29 的表

达上调会降低 Mcl-1 的表达从而导致细胞耐药性的降低^[5]。在慢性白血病中, miR-29 表达下调, miR-29 作用于 TCL1A (T-cell leukemia/lymphoma 1A) 基因, 低表达 miR-29 与慢性淋巴性白血病预后差有关^[6]。但是这些研究均没有涉及 miR-29 在 HBV 相关肝癌中的研究。

本研究构建了 miR-29 表达载体, 为深入研究 miR-29 和其靶基因 TUBB2A 在 HBV 相关肝癌发生发展中的作用奠定了基础, 并且可为研究其他小分子 RNA 提供技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞和细胞培养: HepG2 肝癌细胞株, 本实验室保存。将该细胞培养于含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基内, 呈贴壁生长于 25cm² 的一次性培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 条件下, 2~3d 经 0.25% 胰蛋白酶消化传代 1 次。HepG2.2.15 肝癌细胞株, 整合有 4 个拷贝的 HBV 基因组, 可完成病毒的复制和抗原合成, 产生完整的 Dane's 颗粒。HepG2.2.15 肝癌细胞株购自 ATCC, 细胞传代培养于含有 10% 胎牛血清, 380 μg/ml G418 的 MEM 完全培养基中, 在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱内培养。HepG2.2.15 细胞在培养瓶内呈单层贴壁生长, 约每 3~4d 经 0.25% 胰蛋白酶消化传代 1 次。

组织: 22 对 HBV 肝癌组织与癌旁组织取自山东大学省立医院肝胆外科, 手术切除新鲜的肝癌 (T) 和癌旁组织 (N) 后, 保存于 -80℃ 备用。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学预测 miR-29 的靶基因 通过生物信息学方法, 利用网上数据库 (TargetScan: <http://www.targetscan.org/>; Pictar: <http://pictar.bio.nyu.edu/>; miRanda: <http://microrna.sanger.ac.uk/>) 对 miR-29 可能调控的靶基因进行预测, 对结果综合分析, 通过基因功能注释与文献检索, 挑选相关的靶基因, 并利用 RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) 预测 miRNA 与靶基因的二级结构。

1.2.2 miR-29 真核表达载体的构建 首先依据 Sanger miRBase 数据库收录的 miRNA 数据, 根据 pri-miR-29 序列设计引物, 并在引物 5' 端分别悬垂内切酶 BamH I 和 Hind III 的酶切位点及保护碱基 (引物序列见表 1), 引物均由北京华大公司合成。

然后进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 纯化回收后, 与经相同酶切的载体 pSilencer3.1-H1neo 连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5α, 然后挑选阳性克隆, 分别进行 PCR 扩增, 酶切和测序验证, 获得正确的 has-miR-29 表达载体。

1.2.3 RT-PCR 检测 miR-29 靶基因在 mRNA 水平的表达 Trizol 法分别提取肝癌细胞系 HepG2 和 HepG2.2.15 与临床标本的总 RNA。紫外吸收测定法和甲醛变性电泳检测总 RNA 的浓度和纯度。

利用 ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒 (TOYOBO) 将所提总 RNA 进行 cDNA 的合成。反应体系 (20 μl) 如下: 总 RNA 100pg-1 μg, 5× 反转录反应缓冲液 4 μL, 反转录酶 1 μL, Oligo (dT) 1 μL, DEPC 水补足到 20 μL。将上述体系混匀, PCR 仪上进行反转录, 反应条件: 37℃ 15min, 98℃ 5min, 4℃ 保存。

PCR 反应体系 (20 μL) 如下: 2× PCR Buffer 10 μL, 10 μM 上游引物 0.4 μL, 10 μM 下游引物 0.4 μL, cDNA 1 μL, DEPC 水 8.2 μL。PCR 反应条件: 94℃ 2min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 40s, 30 个循环; 72℃ 5min, 4℃ 保存。同时以 β-actin 为靶基因的内参对照。

取 10 μL PCR 扩增产物, 加 2 μL 6× 上样缓冲液, 充分混匀。分别上样于 1.2% 含 EB 的琼脂糖凝胶, 同时上样 DNA 分子量 Marker 2000 用于标定 DNA 片段大小。100V 恒压电泳 30min, 在凝胶扫描仪上观察结果并拍像记录。

表 1 靶基因与 miRNA 引物序列

	Forward primer	Reverse primer
TUBB2A-1	5'-cttgccagatcttcagac-3'	5'-gagagtggttcagctggaag-3'
β-actin	5'-acactgtgccatctacgagggg-3'	5'-atgatggagttgaaggtatgttctgtgat-3'
TUBB2A-2	5'-tggtaccatggacgagatggagttca-3'	5'-gcagatctggagttccacatcattacatca-3'
MiR-29a	5'-ataggatcccgacctctgtgacctcta-3'	5'-cgcaagcttaccatgcaattcagggtca-3'
MiR-29b	5'-ataggatcccgacctctgtgacctcta-3'	5'-cgcaagcttctctcccaaaccaacaa-3'
MiR-29c	5'-catggatctcgacacatcagctgtctc-3'	5'-gcaagcttctctgttttccccatcata-3'

1.2.4 靶基因 TUBB2A 表达载体的构建 依据 GenBank 中靶基因 TUBB2A 的基因序列, 选取包含与 has-miR-29 匹配的一段序列设计引物, 并在引物 5' 端分别悬垂内切酶 KpnI 和 BglIII 的酶切位点及保护碱基 (引物序列见表 1), 引物均由北京华大公司合成。然后进行 PCR 扩增, 对扩增产物

和载体 pGL3 control 分别进行双酶切,酶切后进行连接,连接产物转化后挑选阳性克隆,也分别进行 PCR 扩增,酶切和测序验证,最后获得正确的表达载体。

1.2.5 双荧光报告的检测 为筛选能够与 miRNA 有直接调控作用的靶基因,将能够在真核细胞中表达 miRNA 的质粒与靶基因的荧光素酶报告基因共转染 HepG2,通过报告基因表达水平,检测 miRNA 与靶基因的相互作用。

转染前一天,HepG2 单细胞悬液以 1.5×10^5 个/孔的浓度接种于 24 孔培养板,细胞达 85%~90% 时进行转染。质粒的转染严格按照 Lipofect-mineTM 2000 说明书进行。报告质粒的转染:每孔用 450ng 质粒总量,其中 pS-miR-29 用 300ng,荧光报告质粒 100ng 和对照质粒 50ng。

双荧光素酶报告系统的检测,采用 Promega 的 Dual-luciferase 荧光素酶报告基因检测系统,按试剂盒说明操作,简要过程如下:转染 HepG2 细胞 24h 后用 PBS 洗 1 遍细胞,然后每孔加被动裂解液 100 μ L 震荡 20min,吸取裂解液到 1.5ml 离心管中 12000rpm 离心 20min,取 30 μ L 裂解产物用

荧光测量仪测定 Firefly 荧光和 Renilla 荧光。分析检查得到 Firefly 荧光素酶和 Renilla 荧光素酶的荧光值,用 Renilla 荧光素酶荧光值对 Firefly 荧光素酶荧光值进行归一化。每组实验至少重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学分析

所有的转染实验均设 3 个复孔,每个实验重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 5.0. 统计学软件进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 miR-29 相应靶基因的筛选

通过生物信息学预测 miR-29 的靶基因,靶基因的预测主要以基因的 mRNA 3'UTR 存在与目标 miRNA 的同源序列,各不同的预测算法可能在每个要求的严谨度上存在细微差别,因此预测的靶基因可能不尽相同。我们通过对多个网站预测结果进行综合分析,并结合前期已经取得的 miRNA 表达谱和基因芯片数据(未发表),初步预测 miR-29 的靶基因为 TUBB2A,预测结果见表 2。

表 2 靶基因与 miR-29 的预测

predicted consequential pairing of target region(top)and miRNA(bottom)			seed match	context score	Pct
Position 75-81 of TUBB2A 3' UTR	5'	.UCUACUUGUAAACUAUGGUGCUC..	7mer-m8	-0.23	0.44
hsa-miR-29a	3'	AUUGGCUAAAGUCUACCACGAU			
Position 75-81 of TUBB2A 3' UTR	5'	.UCUACUUGUAAACUAUGGUGCUC..	7mer-m8	-0.23	0.44
hsa-miR-29b	3'	UUGUGACUAAAGUUUACCACGAU			
Position 75-81 of TUBB2A 3' UTR	5'	.UCUACUUGUAAACUAUGGUGCUC..	7mer-m8	-0.23	0.44
hsa-miR-29c	3'	AUUGGCUAAAGUUUACCACGAU			

2.2 TUBB2A 在细胞及临床标本中的表达变化

HBV 肝癌细胞模系 HepG2.2.15 中,靶基因 TUBB2A 的表达明显上升(如图 1);进一步分析 HBV 感染的人肝癌组织及癌旁的临床标本,发现靶基因 TUBB2A 表达同样上升(如图 2),这与前期基因芯片的结果一致(未发表)。

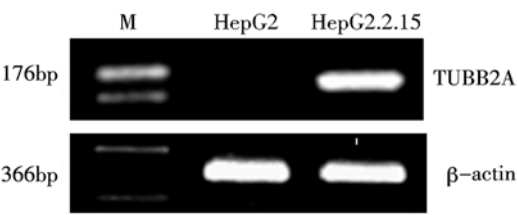


图 1 RT-PCR 检测靶基因 TUBB2A 在肝癌细胞系中的表达
M:DNA Marker DL2000 N:癌旁组织 T:癌组织



图 2 RT-PCR 检测靶基因 TUBB2A 在临床标本中的表达
M:DNA Marker DL2000 N:癌旁组织 T:癌组织

2.3 miR-29 表达载体的构建与鉴定

利用 pSilencer3.1-H1 neo vector 分别构建 miR-29a,b,c 的表达载体,表达载体分别进行 PCR 扩增,酶切和测序鉴定。经鉴定,构建的 miRNA 表达载体均正确,分别命名为 pS-miR-29a, pS-miR-29b 和 pS-miR-29c。酶切结果见图 3。

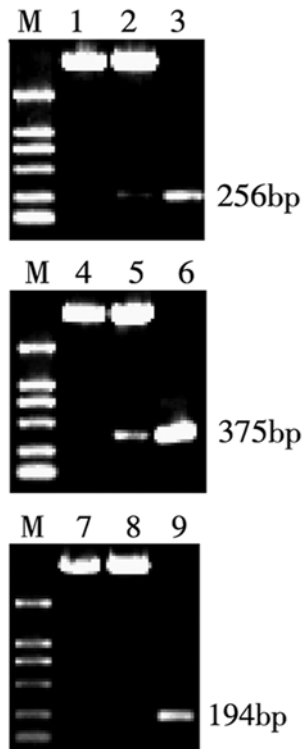


图3 pS-miR29 重组质粒的双酶切图谱

M: Marker DL2000 1、4、7: pSilencer3.1 质粒 2: pS-miR29a 质粒
5: pS-miR29b 质粒 8: pS-miR29c 质粒 3、6、9: 目的片段

2.4 靶基因表达载体的构建与鉴定

利用 PGL3 vector 构建靶基因 TUBB2A 的表达载体,重组载体分别进行 PCR 扩增,酶切和测序鉴定。经鉴定,构建的靶基因表达载体均正确,命名为 pGL3-TUBB2A。测序结果见图 4。

ATAGGTACCCATGGACGAGATGGAGTTCACCGAGGCCGA
GAGCAACATGAACGACCTGGTGTCCGAGTACCAGCAGTA
CCAGGACGCCACGGCCGACGAACAAGGGGAGTTCGAGGA
GGAGGAGGGCGAGGACGAGGCTTAAAACTTCTCAGATC
AATCGTGCATCCTTAGTGAAGTCTGTGTCTCAAGCA
TGGTCTTTCTACTTGTAACTATGGTGTCTCAGTTTGGC
TCTGTTAGAAATTCACACTGTTGATGTAATGATGTGGA
ACTCCAGATCTGCGAT

2.5 双荧光报告的检测结果

在 HepG2 细胞中,共转染 pS-miR-29 与 pGL3-TUBB2A 后,荧光素酶的表达比对照组降低了 2 倍多,说明 miR-29 抑制了报告系统的荧光素酶的表达,TUBB2A 分别是 miR-29 的直接靶基因,见图 5。

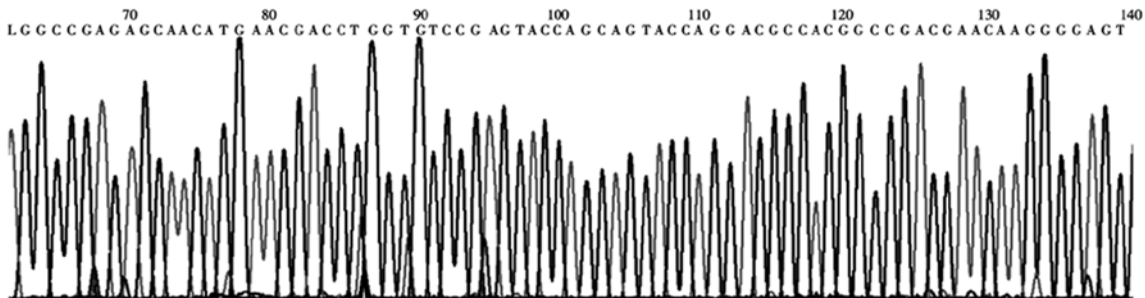


图4 pGL3-TUBB2A3 重组质粒的测序图谱

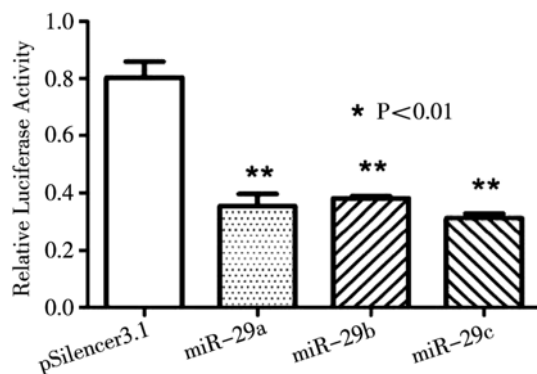


图5 靶基因 TUBB2A 与 miR-29 的双荧光报告分析

3 讨论

近年来,miRNA 的生物学功能研究是一热点,但只有少部分 miRNA 的生物学功能得到了阐明。目前,在 miRNA 研究实验中较为常用的制备 miRNAs 的方法,主要通过真核表达载体、体外转录以及直接合成 3 种方法。由于 RNA 本身容易受 RNA 酶污染而降解,合成成本昂贵、使用次数有限,及直接转染序列只可用着瞬时转染研究,不能获得稳定表达的细胞模型等缺点,使得后两种方法的应用有限,而且含表达载体的菌株可长期保存并大量扩增,为今后的研究提供了极大的方便。越来越多的研究采用构建能表达 miRNA 的重组载

体来进行 miRNA 的体内体外研究^[7-9]。本研究成功地构建了能表达 miR-29a、b 和 c 的重组质粒,分别命名为 pS-miR-29a、pS-miR-29b 和 pS-miR-29c。此方法简便、快捷,为下一步研究 miR-29 在肝癌发生和发展中的生物学功能奠定了基础。

生物信息学预测是 micRNA 功能研究重要方法,目前所发现和证实的 MicroRNA 靶基因均是以生物信息学预测为基础。但由于 MicroRNA 和靶基因之间的功能作用受到诸多因素的影响,目前生物信息学方法并不能准确判定 MicroRNA 和靶基因作用关系,还需要结合其他方面的资料和线索。荧光报告基因检测是初步确立 micRNA 对靶基因调控作用的常用方法。我们利用生物信息学和荧光报告检测系统初步确认了 miR-29 能够分别抑制融合 TUBB2A-3'UTR 报告基因的表达。

寻找 miRNA 靶基因并研究其调控功能,是目前研究 miRNA 的一个热点,这也为疾病的分子治疗提供了一个平台。已经发现若干 miRNA 通过调控基因的表达与慢性淋巴细胞性白血病、肺癌、乳腺癌、结肠癌高度相关。在肝癌中,miR-34a 通过靶向 CCND1 和 CDK6 的 3'-UTRs 来行使调控作用^[10]。miR-122a 表达下降导致细胞周期性蛋白 G1 的过度表达是 HCC 发病的重要病理机制^[11]。miR-21 可以直接调控抑癌基因 PTEN 的表达,影响其下游的磷酸激酶及基质金属蛋白酶,从而影响肝癌的增殖、转移和侵袭^[12]。本研究中我们综合利用生物信息学、microRNA 芯片、基因芯片以及双荧光报告系统证明在 HBV 相关肝癌中 TUBB2A 分别是 miR-29 的直接靶基因。本研究证实,在 HBV 相关肝癌中和 TUBB2A 的表达是上调的,这与 microRNA 芯片结果中 miR-29 的表达是下调相一致。根据 miRNA 沉默基因表达的原理,结合 miR-29 在肝癌细胞中的低表达,推断 miR-29 可能通过抑制 TUBB2A 基因在 HBV 相关 HCC 发生发展过程中起调控作用,但其机制还需进一步研究。

任何一个 miRNA 的靶基因一般不会只有一个,而每一个靶基因又可能和多个 miRNA 相互作用,组成错综复杂的调控网络。在实验过程中,我

们发现 TUBB2A 并不是 miR-29 唯一的直接靶基因,还存在其他靶基因。因此,预测和验证 miR-29 的其他靶基因对阐述 miR-29 在 HBV 相关肝癌中的作用是必不可少的。

参考文献:

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004,431(7006):350-355.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism,and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- [3] Lagos-Quintana M,Rauhut R,Lendeckel W,et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science,2001,294:853-858.
- [4] Mott JL,Kobayashi S,Bronk SF,et al. Mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis[J]. Oncogene,2007,26:6133-6140.
- [5] Kobayashi S,Werneburg NW,Bronk SF,et al. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt signaling pathway in cholangiocarcinoma cells[J]. Gastroenterology,2005,128:2054-2065.
- [6] Pekarsky Y,Santanam U,Cimmino A,et al. T cell expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181[J]. Cancer Res,2006,66:11590-11593.
- [7] 郝美君,张祯祯,张文露,等. MicroRNA122 真核表达载体的构建及在 HepG2 细胞中的表达与检测[J]. 生物技术通报,2008,6:144-146.
- [8] 刘惠龙,卞毅,丁凤菲,等. miR-16 表达载体的构建[J]. 中外医疗,2009,28(2):14-15.
- [9] Chen S,Ni M,Yu B,et al. Construction and identification of a human liver specific microRNA eukaryotic expression vector [J]. Cell Mol Immunol,2007,4(6):473-477.
- [10] Sun F,Fu HJ,Liu Q,et al. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest[J]. FEBS Lett,2008,582(10):1564-1568.
- [11] Gramantieri L,Ferracin M,Fornari F,et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res,2007,67(13):6092-6099.
- [12] Meng F,Henson R,Wehbe-Janek H,et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer[J]. Gastroenterology,2007,133(2):647-658.

(收稿日期 2012-06-03)