

MIR-122 慢病毒表达载体构建及稳定转染 HepG2 细胞系 *

张旭 于芳 聂勇战 唐红卫[△] 梁琳琳 陈蕊蕊

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 构建人 mir-122 慢病毒表达载体, 感染肝癌细胞 HepG2, 建立稳定表达 mir-122 的 HepG2 细胞系。方法: 以人 has-mir-122 成熟序列, 设计并合成引物, 采用 PCR 的方法扩增目的基因, 并连接到慢病毒表达质粒 pGCSIL-GFP(含绿色荧光蛋白 GFP 基因)中。对重组质粒进行双酶切鉴定后, 进行 mir-122 基因慢病毒(pGCSIL-GFP-miR-122)的包装及病毒滴度测定, 用构建好的慢病毒表达载体感染 HepG2 细胞, qPCR 检测感染后细胞中 MIR-122 的变化。通过流式细胞仪检测荧光蛋白 GFP, western blot 检测 mir-122 靶分子 CAT-1, 验证 pGCSIL-GFP-miR-122 在 HepG2 细胞中的表达效果。结果 pGCSIL-GFP-miR-122 经双酶切分析及测序, 插入序列正确。qPCR 检测显示转入病毒后 mir-122 在细胞中的表达显著提高。表明 mir-122 慢病毒表达载体构建成功。流式细胞仪根据 GFP 荧光筛选纯化感染后细胞, 感染率达 90%以上。Western blot 显示 mir-122 明显抑制其靶分子表达。进一步验证 pGCSIL-GFP-miR-122 在细胞中的稳定表达。结论 成功构建 mir-122 慢病毒表达载体, 并建立稳定表达的细胞系, 为研究 mir-122 在人体所起的作用及功能机制打下基础。

关键词 microRNA; mir-122; 慢病毒表达载体; 稳定转染; HepG2 细胞

中图分类号 Q75, Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 10-1849-04

Construction of Lentiviral Vector of miR-122 and Establishment of Its Stable Transfected HepG2 Cell Line*

ZHANG Xu, YU Fang, NIE Yong-zhan, TANG Hong-wei^A, LIANG Lin-lin, CHEN Rui-rui

(Xijing Hospital of Digestive Disease & State Key of Laboratory of Cancer Biology, Forth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To construct human lentiviral vector of mir-122, and establish a new hepatoma sub cell line of HepG2 stabilized infected with mir-122 virus. **Methods:** Primers were designed and synthesized according to the human has-mir-122 precursor sequence. miR-122 was amplified by using PCR, and then it was connected to the lentiviral expression plasmid pGCSIL-GFP. Lentiviral vector of mir-122 (pGCSIL-GFP-miR-122) was constructed. After infection of HepG2 cells with the miR-122 lentiviral vector, miR-122 expression was confirmed by qPCR and fluorescent protein GFP expression using FACS. Expression of mir-122 targeted molecules CAT-1 was validated by Western blot in pGCSIL-GFP-miR-122 HepG2 cells. **Results:** pGCSIL-GFP-miR-122 was confirmed by sequencing analysis, which indicated that mir-122 lentiviral expression vector was successfully constructed. miR-122 expression in the lentiviral mir-122 infected cell line increased significantly compared with that in the parent cell line HepG2. Flow cytometry based on GFP fluorescence filter purification, also showed the infection rate of more than 90%. Inhibited the expression of its target molecules was confirmed by Western blot. **Conclusion:** mir-122 lentiviral expression vector was successfully constructed and a stable expression cell lines was established, laying the foundation for the further study of the role and mechanism of mir-122 in humans.

Key words: microRNA; mir-122; Lentiviral vector; Stable transfection; HepG2 cells

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1849-04

前言

MicroRNA(miRNA)为一类非编码的小分子 RNA, 是哺乳动物基因组中最为丰富的调节基因之一^[1-3]。其通过与靶 mRNA 3' 非翻译区 (3' - U TRs) 完全或非完全结合使之降解或者抑制其翻译, 从而在转录后水平降低相关靶基因蛋白质的表达^[4]。随着对 miRNA 功能的研究, 逐渐证明了 miRNA 不止参

与细胞发育、分化、凋亡等生理过程^[5,7,9], 并在病毒的感染、心血管病、肿瘤的形成等病理过程中发挥重要作用^[5]。miR-122 是一种只在肝脏中特异性表达的 MicroRNA, 其表达量占肝细胞总 miRNA 量的 70%^[6,7]。目前研究发现, miR-122 参与了肝脏不同阶段的发育, 同时还与肝脏的脂质代谢, HCV 的细胞内复制和肿瘤发生等密切相关^[8,10,11]。本研究成功构建 mir-122 慢病毒表达载体, 并建立过表达 mir-122 的稳定细胞系, 为其功能及作

* 基金项目 国家自然科学基金项目(30770959)

作者简介 张旭(1982-), 医学硕士, 研究方向 microRNA 与 HBV 相关肝癌作用的研究。

电话: 13759941812

[△]通讯作者 唐红卫, E-mail: moshouchang8@126.com

(收稿日期 2012-02-03 接受日期 2012-02-28)

用机制的研究打下了良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

病毒载体 pGCSIL-GFP、包装质粒 pHelper 1.0、pHelper 2.0、polybrene 于上海吉凯公司购买、LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、Xho I、BamHI 限制性内切酶于 NEB 公司购买,胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司,质粒提取试剂盒,琼脂糖凝胶回收试剂盒,miR-122 qPCR 引物试剂盒为 TaKaRa 公司产品,CA T-1 抗体购自美国 Abcam 公司,HRP 标记 IgG 购自北京中杉试剂公司,ECL 化学发光试剂购自 Bio-RAD 公司,DH5a 肝癌 HepG2 细胞由本实验室提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 mir-122 慢病毒表达载体构建 (i) 引物设计与目的片段的扩增 从 Sanger microRNA 序列数据库(miRBase)中搜索得到 mir-122 成熟序列交由上海吉凯生物有限公司进行引物合成。正向引物 mir-122-F 5'-GGGCCGCTCTAGACTCGA-GATATTTGCATGTCGCTATGTG,反向引物 mir-122-R: 5'-CGCGGCCGCCTAATGGATCCAAAAAAGGCACAGTCGAG-GCTGATC,酶切位点为下划线区,正向引物酶切位点为 Xho I,反向引物酶切位点为 BamHI。以含有待扩增序列的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,25 μ l 反应体系。其中 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ l, mir-122-F 1 μ l, mir-122-R 1 μ l, Taq DNA polymerase 0.25 μ l, (10mmol/L) dNTPs 0.25 μ l, Nuclease free water 18 μ l。PCR 反应条件 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 循环 95 $^{\circ}$ C 变性 20s 67 $^{\circ}$ C 退火 20s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延长 3min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

(2) mir-122 慢病毒表达载体 pGCSIL-GFP-miR-122 的构建及鉴定 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分离纯化,回收目的片段。对所得片段进行 XhoI+BamHI 酶切,并与慢病毒表达载体 pGCSIL-GFP 质粒连接,连接反应条件为:酶切后的产物 1 μ l, pGCSIL-GFP 质粒载体 1 μ l, Nuclease free water 6 μ l 10 $\times$ Ligase Buffer 1 μ l, T4 DNA 连接酶 1 μ l, 22 $^{\circ}$ C 水浴反应过夜。连接产物转化感受态细胞 DH5, 挑选单克隆菌落接种,恒温(37 $^{\circ}$ C)摇床培养过夜。取菌液送 Invitrogen 公司测序。用质粒提取试剂盒提取质粒,XhoI+BamHI 酶切鉴定。

(3) mir-122 慢病毒的包装和滴度测定 将 pGCSIL-GFP-miR-122 载体,及辅助元件 pHelper 1.0, pHelper 2.0 混合,按照 Invitrogen 公司 Lipofectamine2000 说明书共转染 293T 细胞,转染后 8 小时换为完全培养基,培养 48 小时后,收集 293T 细胞上清。以 4000 转每分钟离心 15 分钟,出去细胞碎屑,以 0.45 μ m 滤器过滤上清液,得到慢病毒原液。使用逐孔稀释法测定病毒滴度。滴度测定前一天,以每孔 5×10^3 个细胞,体积 100 μ l,接种 293T 细胞到 96 孔板。感染前,准备 8 个无菌 Ep 管,每管中加入 90 μ l 新鲜完全培养基(DMEM 高糖+10%血清,无双抗),取待测定的病毒原液 10 μ l 加入到第一管中,混均后,从中取 10 μ l 加入到第二管中混均,后从第二个管中取 10 μ l 加入到第三个管中,继续相同操作直到最后一管。选取所需细胞孔并在培养板上做标记,弃去原孔中 90 μ l 培养液,加入各 Ep 管中稀释好的 90 μ l 病毒溶液。于 37 $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳培养箱中培养,48 小时加入新鲜培养基 100 μ l,之后 24 小时,更换孔

中液体为新鲜培养基 150 μ l。96 小时后,观察荧光表达情况,以最后两个孔计算病毒原液滴度,计算公式:病毒滴度(TU/ml) = GFP 阳性细胞数 / 稀释倍数,本次构建病毒滴度为 1×10^8 TU/ml。

1.2.2 HepG2 细胞的感染及 qPCR 鉴定 mir-122 表达 (i) mir-122 慢病毒的包装和滴度测定 将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 48 孔板,细胞计数调整细胞浓度为 2×10^4 个/ml。培养细胞密度达到 80%时进行病毒感染,稀释病毒滴度为 1×10^8 TU/ml, MOL=100。弃去细胞上清,加入重组慢病毒 pGCSIL-GFP-miR-122 混合液(无血清培养基 (170 μ l) + pGCSIL-GFP-miR-122 (20 μ l) + Polybrene (10 μ l, 5 μ g/ml)), 同时设立慢病毒空载体组(无血清培养基 (170 μ l) + 慢病毒空载体 pGCSIL-GFP 20 μ l (滴度为 1×10^8 TU/ml) + Polybrene (50 μ l, 5 μ g/ml))。8 小时后更换细胞上清为新鲜培养基,培养细胞并扩增至 25cm 培养皿,细胞消化,800rpm 离心重悬,用流式细胞仪筛选 GFP 荧光阳性细胞。

(2) qPCR 检测 mir-122 的表达 将流式细胞仪筛选所得 HepG2-mir-122 细胞培养扩增,荧光显微镜观察,收集细胞提取总 RNA。qPCR 检测 mir-122 表达水平,采用 takela 公司 qRT-PCR 试剂盒。首先以总 RNA 反转录生成 cDNA (包括 mir-122, 慢病毒空载体及内参 U6), 以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 扩增,扩增过程及数据分析均由 Roche 公司 Light-Cycler480 qPCR 仪完成。每个样品均设 3 个复孔,重复实验 3 次,应用相对定量法($\Delta\Delta C_t$) 进行数据分析。

(3) WESTER BLOT 检测 mir-122 靶分子 CAT-1 的表达 消化离心转染后的 HepG2 细胞,4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤,800rpm 离心两次收集细胞,加入裂解液(RIPA+PMSF, 比例为 100:1),吹打数次,超声 3 次,每次 10 秒。于 4 $^{\circ}$ C、10000r/min 收集上清,加入 1/4 上清体积上样缓冲液,并于 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 10min。12% SDS-PAGE 电泳,转膜于 NC 膜。10%脱脂奶粉室温封闭 1h,加入鼠抗人 CAT-1 抗体(1:2000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 4 次,每次 5min。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (1:2000),室温孵育 1h, TBST 洗膜,用 ECL 法, Bio-RAD 公司 Molecular Imager 机上显影。

2 结果

2.1 慢病毒载体 pGCSIL-GFP-miR-122 的酶切鉴定与测序

在目的基因引物两端设计了 XhoI+BamHI 酶切位点,PCR 的方法扩增产物酶切后,与载体 pGCSIL-GFP 连接,用 XhoI+BamHI 酶切阳性克隆和空载体,在阳性克隆中可见到一条 100bp 左右的条带(图 1),而空载体未见。说明目的基因 mir-122 已经插入到质粒载体 pGCSIL-GFP 中。将酶切鉴定正确的菌液送至公司测序,结果符合设计要求。

2.2 qPCR 鉴定感染细胞中 miR-122 表达

使用 RT-qPCR 对 pGCSIL-GFP-miR-122 病毒载体与 pGCSIL-GFP 病毒空载体感染的 HepG2 细胞检测其表达 miR-122 的差异,用 qPCR 相对定量的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对检测结果进行计算,得 $2^{-\Delta\Delta C_t}=50.2$ 。表示 pGCSIL-GFP-122 载体感染细胞后 miR-122 表达水平升高了近 50 倍。如图 2 所示。

2.3 病毒感染细胞荧光筛选

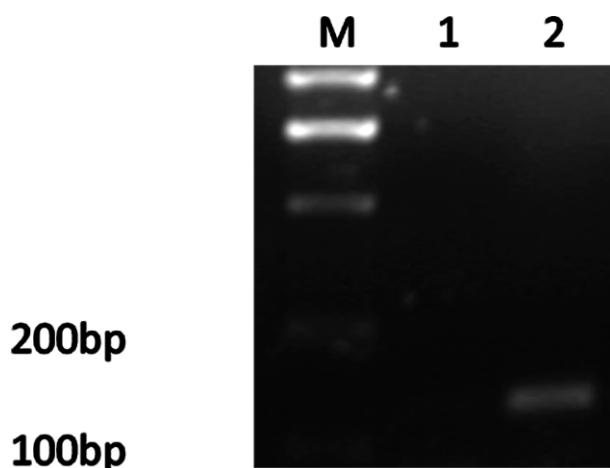


图1 慢病毒载体 pGCSIL-GFP-miR-122 双酶切鉴定

1 转染慢病毒空载体细胞 2 转染 122 慢病毒载体细胞

M DL2000 Marker 2 000 Up,1 000 bp,750 bp,500 bp,250bp,100bp

Fig. 1 The result of lentiviral vector pGCSIL-GFP-miR-122 pairs of restriction endonuclease

1:cells transfected with lentiviral empty vector;2:cells transfected with 122 lentiviral vector

M: DL2000 Marker:2 000 Up,1 000 bp,750 bp,500 bp,250 bp,100bp

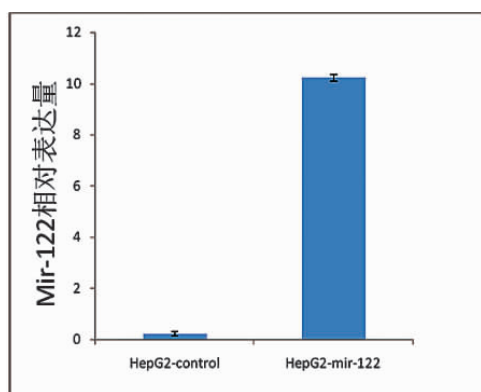


图2 qPCR 检测转染 miR-122 慢病毒载体组转染病毒空载体组 miR-122 表达量比较

结果可见 miR-122 含量在转染病毒组远高于转染空载体组

Fig. 2 The expression levels of miR-122 in miR-122 lentiviral vector group and empty vector control group detected by qPCR. Result of qPCR The miR-122 expression levels were higher in miR-122 lentiviral vector group VS empty vector control group

给药由于病毒载体质粒具有 GFP 荧光标记,应用流式细胞仪以 GFP 荧光作为标志,进行细胞提纯筛选。用荧光显微镜观察筛选后扩增细胞,可见感染 miR-122 慢病毒的 HepG2 细胞内有绿色荧光表达,荧光表达率达 90%以上(图 3)。

2.4 Western blot 检测 Mir-122 靶分子 CAT-1 检测降低

通过 Western blot 检测病毒感染细胞 HepG2 中 miR-122 靶分子 CAT-1 的表达,结果显示,miR-122 靶分子 CAT-1 在稳转 miR-122 细胞中表达水平明显下降,证明 miR-122 在细胞中过量表达,并抑制 CAT-1 活性(图 4)。

3 讨论

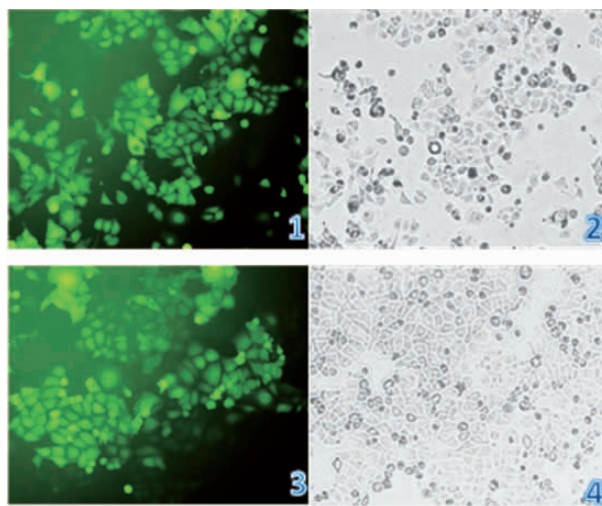


图3 荧光显微镜下观察 GFP 荧光

(注:1,2 为 HepG2 转 122 病毒载体组 3,4 为 HepG2 转病毒空载体组; 1,3 为绿色荧光 2,4 为白光,均为× 200)

Fig. 3 GFP fluorescence in Fluorescence microscopy

(1,2: HepG2 transfected mir-122 virus vector group; 3, 4: HepG2 transfected empty vector control group; 1, 3: Green fluorescence 2, 4: White fluorescence, × 200)

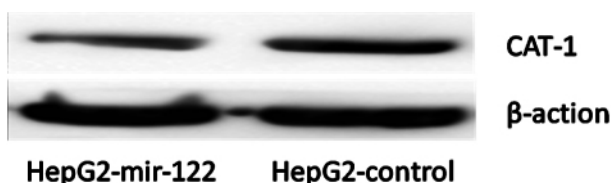


图4 western blot 检测 CAT-1 表达变化

Fig. 4 The changes of CAT-1 expression were detected by western blot

miRNA 在肝脏相关疾病发生发展中的功能研究,已经成为目前肝脏研究领域的热点前沿。部分 miRNA 还被证实与肝病的预后和治疗等紧密相关。因此,分析 miRNA 的表达变化及相关影响,对肝病患者的早期诊断和提高疗效具有重要意义。

Mir-122 是肝脏中表达丰度最高的 miRNA,自从发现以来就成为人们的关注热点。人们通过对 miR-122 与肝脏关系的研究发现,miR-122 的作用不止贯穿于肝脏的生长、发育、代谢功能的发挥,也参与了肝功能异常以及癌变的过程。人们通过生物信息学分析等手段,确定了其在体内的一些靶基因,其中 CAT-1 (即氨基酸转运体 -1) 为 miR-122 的直接作用靶点,并且和 miR-122 的表达量呈负相关。CAT-1 为一种氨基酸转运体,对于生物应激条件下的生存是重要的存在,当氨基酸应用正常的情况下,它可利用氨基酸使停滞生长的细胞在短时间内恢复生长,当将小鼠 CAT-1 基因人为的敲除后,其出生后即刻死亡^[12],在小鼠胚胎的整个发育期中,miR-122 呈现逐步上升趋势,CAT-1 则呈现相反的走向,由此显示,miR-122 可能通过与 CAT-1 的调节互动而对肝脏的生长发育产生影响^[13]。调节脂肪代谢为肝脏主要的生理功能之一,人为降低 miR-122 的表达会使肝脂肪变有所改善、胆固醇的合成量明显降低,这个结果推测,miR-122 参与肝脏对脂肪代谢的调节^[14]。在对肝癌的研究中,发现在所有的肝癌细胞系中 miR-122 均呈现低表达^[15],并且

上调 mir-122 的表达量可以明显抑制肿瘤细胞的迁徙、增殖等细胞功能,这说明 mir-122 与肝肿瘤的转移、浸润等密切相关,并且具有作为肝癌诊断、治疗的生物标志的潜力^[15,16]。最近的研究中,确定了 mir-122 可以促进 HCV 病毒的复制,故其可能成为抗 HCV 治疗的靶点,如今已经进入临床研究阶段^[17]。HBV 是引起肝癌最常见的原因之一,目前已经证明 mir-122 可以降低血清中乙肝表面抗原和表面抗体的表达^[18],但其具体的作用方式及机制还未经阐明。

对于 miRNA 的研究,一般是通过抑制表达和过表达两种方式进行,过表达的实现方式有两种:一为直接转染合成的 miRNA,二为利用载体(质粒载体,病毒载体)使其在细胞内表达^[19]。由于细胞内的 miRNA 容易被降解,不能实现稳定的 RNA 过表达,而质粒载体在哺乳动物细胞中的转染效率远低于病毒载体^[20],所以本研究应用慢病毒构建 mir-122 过表达载体,以实现细胞内的稳定转染。

本实验以人 has-mir-122 成熟序列设计引物,应用 PCR 的方法扩增酶切后插入到慢病毒载体 pGCSIL-GFP 中,经双酶切和测序鉴定正确并进行慢病毒包装及滴度的测定。用构建成功的 mir-122 慢病毒载体感染 HepG2 细胞,经 qPCR 检测感染后细胞中 mi-122 表达量明显升高。Western blot 测定感染细胞中 mir-122 靶基因 CAT-1 明显降低,而 HepG2 中 mir-122 呈低表达,靶基因 CAT-1 呈高表达^[20]。根据以上结果证明,本实验成功构建 mir-122 慢病毒表达载体,并建立 HepG2-miR-122 稳转细胞系,为今后 mi-122 的研究打下良好基础。

参考文献(References)

- [1] Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale [J]. Cancer Res, 2006, 66: 7390-7394
- [2] Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: micro-RNAs as tumor suppressors and oncogenes [J]. Oncogene, 2006, 25: 6188-6196
- [3] Pfeffer S, Voinnet O. Viruses, micro-RNAs and cancer [J]. Oncogene, 2006, 25: 6211-6219
- [4] Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation [J]. Oncogene, 2006, 25: 6163-6169
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [6] Triboulet R, Mari B, Lin Y L, et al. Suppression of microRNA silencing pathway by HIV-1 during virus replication [J]. Science, 2007, 315: 1579-1582
- [7] Eisenberg I, Alexander MS, Kunkel LM. miRNAs in normal and diseased skeletal muscle [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13: 2-11
- [8] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6: 857-866
- [9] Chang J, Nicolas E, Marks D, et al. miRNAs 122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT [J]. RNA Biol, 2004, 1: 106-113
- [10] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miRNAs-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver [J]. Hepatology, 2008, 48: 648-656
- [11] Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, et al. Regulatory mechanisms of micro RNAs involvement in cancer [J]. Expert Opin Biol, 2007, 7: 1009-1019
- [12] Hatzoglou M, Fernandez J, Yaman I, Closs E. Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter [J]. Annu Rev Nutr, 2004, 24: 377-399
- [13] Chang J, Nicolas E, Marks D, et al. Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may down regulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1 [J]. RNA Biol, 2004, 1(2): 106-113
- [14] Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNA in vivo with 'antagomirs' [J]. Nature, 2005, 438(7068): 685-689
- [15] Bhatta chary SN, Habermacher R, Martine U, et al. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress [J]. Cell, 2006, 125: 1111-1124
- [16] Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, Chau GY, Lin CW, Chen CM, Lin CD, Liao YL, Wang JL, Chau YP, Hsu MT, Hsiao M, Huang HD, Tsou AP. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2008, 47(3): 897-907
- [17] Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNA in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2008, 47(3): 897-907
- [18] Henke JI, Goergen D, Zheng J, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA [J]. EMBO J, 2008, 27(24): 3300-3310
- [19] Sjogren M H, Dusheiko G M, Kew M C, et al. Hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: correlation between IgM antibody to hepatitis B core antigen, hepatitis B e antigen, and hepatitis B DNA [J]. Am J Trop Med Hyg, 1988, 39(6): 582-585
- [20] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [21] Yi R, Qin Y, Macara IG, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs [J]. Genes Dev, 2003, 17(24): 3011-3016