

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.31.016

## miR-424 慢病毒表达载体的构建及其对宫颈癌细胞增殖的影响\*

李 清, 杨宇馨, 戴 楠, 代晓燕, 任 涛, 王 东, 卿 毅<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心, 重庆 400042)

**摘要:**目的 构建 hsa-miR-424 基因慢病毒表达载体, 并鉴定 miR-424 在细胞内表达水平, 研究 hsa-miR-424 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响。方法 以人基因组 DNA 为模板, 设计合成 miR-424 的上下游引物, PCR 扩增目的片段, 回收产物将其连入 pMD18T 载体中, 进行测序。再以 pMD18T-miR424 为模板进行 PCR 扩增, 将其中表达 pMD18T-miR424 的结构经酶切后插入 pLentis-CMV-GFP-MCS-PGK-PURO 载体, 构建成 pLentis-CMV-GFP-miR424-PGK-PURO, 在 293T 细胞中与 pSPAX2、pMD2.G 包装产生所需的慢病毒, 再用含慢病毒的上清液感染 HeLa 细胞。结果 miR-424 基因与慢病毒载体连接成功, 测序结果证明了插入到质粒载体中的 miR-424 前体序列完全正确, 成功构建 pLentis-CMV-GFP-miR424 重组慢病毒载体, 用其感染宫颈癌 HeLa 细胞后上调 miR-424 的表达近 60 倍。采用 MTT 法检测增殖结果提示: 感染 miR-424 慢病毒的宫颈癌 HeLa 细胞株均存在细胞增殖减慢。结论 成功的构建了 miR-424 慢病毒载体, 建立了高效稳定表达 miR-424 的细胞株, 并用含慢病毒的上清液感染宫颈癌 HeLa 细胞, 成功抑制了 HeLa 细胞的增殖, 为后续相关的研究奠定了良好的基础。

关键词: HeLa 细胞; 细胞增殖; miR-424; 慢病毒表达载体

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)31-4165-04

## Construction of the lentivirus vector containing the miR-424 gene and its influence on proliferation of cervical cancer cell line\*

Li Qing, Yang Yuxin, Dai Nan, Dai Xiaoyan, Ren Tao, Wang Dong, Qing Yi<sup>△</sup>

(Cancer Center, Research Institute of Surgery, Daping Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To construct the lentivirus vector containing the hsa-miR-424 gene, and identify the expression level of miR-424 in cells. Research the influence of hsa-miR-424 on proliferation of cervical cancer HeLa cell line. **Methods** Using the human genomic DNA as template to design the upper and lower primers for synthesis of miR-424, and amplifying the target fragment by polymerase chain reaction (PCR). Recover the products and conduct sequencing after connecting it into the pMD18T vector. Amplify the product by PCR template as pMD18T-miR424, and insert the fragment expressing pMD18T-miR424 into the vector of pLentis-CMV-GFP-MCS-PGK-PURO after enzyme cutting to construct the pLentis-CMV-GFP-miR424-PGK-PURO. Package the compound with pMD2.G and pSPAX2 in 293T cell to produce the lentivirus, and using the supernatant containing lentivirus to infect the HeLa cell line. **Results** The sequencing result proved the sequence of miR-424 in plasmid vector was correct, which proved the construction of lentivirus was successful and the target lentivirus was obtained. The expression of miR-424 almost rise 60 times after infected the cervical cancer HeLa cell by the carrier. The result of MTT method suggested; the cervical cancer HeLa cell lines have slowed proliferation with infection miR-424 lentivirus. **Conclusion** The miR-424 lentivirus vector was constructed successfully and the high efficacy expression miR-424 cell line was established and stable. The cervical cancer HeLa cell were infected with the supernatant containing lentivirus, inhibited the proliferation of HeLa cell successfully, and laid a good foundation for subsequent research.

Key words: HeLa cells; cell proliferation; miR-424; lentivirus expression plasmid

miRNA 是一类由 19~24 个碱基组成的小分子非编码调控的内源性单链 RNA, 与 mRNA 的 3' 非翻译区结合, 以降 mRNA 或抑制其翻译, 从而在转录后水平负性调节靶 mRNA 的表达<sup>[1]</sup>。miRNA 广泛存在于各种生物体内, 对细胞周期调节、生长、发育、凋亡等过程发挥重要的作用; 不仅影响了生物体的生长发育, 并与多种人类疾病的发生密切相关<sup>[2]</sup>。目前已鉴定的人类 miRNA 有数千种, 调控数千种靶 mRNA。近年来一些研究证实, 某些 miRNA 参与肿瘤的发生、发展过程, 具有抑癌基因或者癌基因的功能<sup>[3-4]</sup>。同时, 与越来越复杂的蛋白网络相比, miRNA 作为一种新的强有力的工具, 在肿瘤诊断、

疗效预测和治疗靶点确定等研究中更具有独特优势。早期的研究表明, miR-424 可以作为一个潜在的肿瘤抑制基因表达谱<sup>[5-7]</sup>。例如, 1 项研究表明 miR-424 表达的异常下降, 伴随着对慢性淋巴细胞的致癌基因 PLAG1 强有力的抑制<sup>[8]</sup>。然而, 有报道指出在 EB 病毒感染有关的 B 细胞淋巴瘤、舌鳞状细胞癌与结肠癌中 miR-424 表达却增高<sup>[9-11]</sup>。经一些研究发现, miR-424 在宫颈癌组织中也呈特异性低表达, 同时在宫颈癌放疗耐受细胞株中显著下调。本研究旨在构建 miR-424 慢病毒质粒载体, 并初步探索 miR-424 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖情况的调控, 为下一步探讨 miR-424 在宫颈癌放疗抵抗中的作用机

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81101993, 81001000)。 作者简介: 李清(1988-), 在读硕士, 主要从事 DNA 损伤与修复及肿瘤靶向治疗工作。 △ 通讯作者, Tel: 13018369120; E-mail: qywxbb@hotmail.com。

表 1 引物序列

引物	碱基序列
※ miR424 Forward	TTG TTC CAA GAT TCA TCC TCA GGG GA
※ miR424 Reverse	TCT CCT CGA CTC GCA CCG CCT AT
※ U6 Forward	CTC GCT TCG GCA GCA CA
※ U6 Reverse	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
hmiR424 Forward <i>EcoR</i> I	CGG GAATTC ATT CAT CCT CAG GGG AAA AA
hmiR424 Reverse <i>Xho</i> I :	ACC CTC GAG ACT ACA GCC CTG CTG CG

※:实时荧光定量 PCR(RT-PCR)使用引物。

制及建立稳定高效的 HeLa 细胞株打好基础。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 人宫颈癌细胞株 HeLa、293T 细胞、DH5 $\alpha$ 、慢病毒表达载体 pMD18T、辅助包装载体 pMD2. G、pSPAX2(本实验室保存);DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;限制性内切酶购自 New England 公司;DNA 连接酶购自 Promega 公司;DNA 聚合酶、T 载体试剂盒、SYBR premix Ex Taq II、DNA marker (500~12 000)均购自 Takara 公司;TRIzol 来源于 Invitrogen 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 引物序列** 所用引物由 Invitrogen 公司设计合成,根据 miR Base 数据库获得 miR-424 基因的前体序列,应用 Primer 5.0 软件设计合成引物(引物的上下游分别含有 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点),见表 1。以人基因组 DNA 为模板扩增,反应程序:98  $^{\circ}$ C 2 min,98  $^{\circ}$ C 10 s,58  $^{\circ}$ C 20 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环。对扩增产物回收,将其与 pMD18T 载体连接,进行测序。PCR 扩增 pMD18T-miR424,载体质粒为 pLentis-CMV-GFP-MCS-PGK-PURO,37  $^{\circ}$ C 酶切扩增产物和载体质粒。酶切产物连接体系:酶切回收载体 DNA 2  $\mu$ L、酶切 PCR 产物 2  $\mu$ L、DNA 连接酶缓冲液 1  $\mu$ L、DNA 连接酶 0.5  $\mu$ L、dd H<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ L,16  $^{\circ}$ C 连接过夜,转化细菌。挑取阳性克隆,使用 Omega 公司质粒提取试剂盒提取质粒,37  $^{\circ}$ C 酶切 4 h,经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,鉴定正确的克隆进行下一步实验。

**1.2.2 慢病毒载体的包装与感染** 转染前 24 h,用胰酶消化对数期生长的 293T 细胞,计数后将密度  $5 \times 10^5$  细胞铺入 6 孔培养板中,培养体积为 2 mL,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。24 h 后观察细胞状态,若状态良好,则进行转染。在培养板中加入氯喹至终浓度 25  $\mu$ mol/L,取 1 只试管,加入灭菌水及以下质粒(pMD2. G 1.5  $\mu$ g,pSPAX2 4.5  $\mu$ g,pLentis-CMV-GFP-MCS-PGK-PURO 或 pLentis-CMV-GFP-miR424-PGK-PURO 6.0  $\mu$ g),总体积为 328.5  $\mu$ L,然后加入 2 mol/L CaCl<sub>2</sub> 46.5  $\mu$ L,混匀,最后再加入 375  $\mu$ L 2 $\times$ HBS,边滴加边振荡,滴加完毕后,尽快将混合物加入到细胞培养皿中,轻轻摇晃混匀。转染 12 h 后换为新鲜培养基 2 mL,48 h 后观察细胞状态并收集上清液,500 g 离心 10 min,然后将上清液用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤,-70  $^{\circ}$ C 保存。用病毒液转染 293T 细胞,50  $\mu$ L 感染 72 h,确认病毒成功构建,取构建成功的病毒液感染 HeLa 细胞。

**1.2.3 运用 RT-PCR 检测慢病毒感染宫颈癌细胞后 miR-424 的表达** 用包装获得的慢病毒液感染宫颈癌 HeLa 细胞,24 h

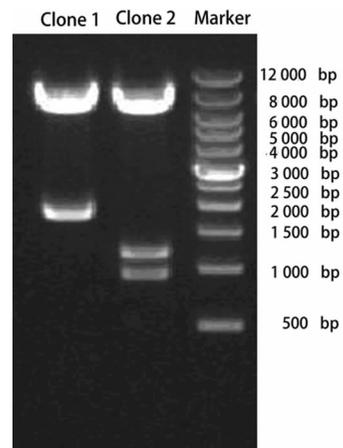
后换为新鲜培养基,扩大培养至 6 孔板,用荧光显微镜观察 GFP 的表达;当感染率超过 50% 时,可用适宜浓度的 puromycin 进行筛选。感染 5 d 后,选择 3~5 个孔用荧光显微镜观察表达 GFP 的细胞的平均数,再用其平均数与总细胞的平均数的比值,估计出慢病毒的转染效率。收集细胞,采用 RT-PCR 检测 miR-424 的表达,反应程序:95  $^{\circ}$ C 20 s,95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 20 s,70  $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环。实验数据采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算,上述实验重复 4 次。

**1.2.4 MTT 检测各细胞株增殖结果** 调整细胞悬液密度为  $1 \times 10^4$  个/mL,将细胞悬液加入到 96 孔板,每孔加 200  $\mu$ L,细胞株在 1 块 96 孔板上接种 5 孔,另外设置 1 个孔作为对照,共需接种 6 块板。对接种的细胞常规培养,每隔 2 d 换 1 次液,每日在固定时间处理一块培养板,每孔加入 MTT 20  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后,每孔加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜(DMSO),振荡 10 min,再用酶联免疫仪选择 490 nm 对吸光度(A)值进行测定,最后取 5 个孔平均值,制作增殖曲线。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,组间两样本均数比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-424 的扩增** 以人基因组作模板,使用 Takara 公司的 Extaq 聚合酶进行扩增反应,DNA 测序证明扩增片段的序列与 miRBase 数据库获得 miR-424 基因的前体序列完全一致(序列未列出)。

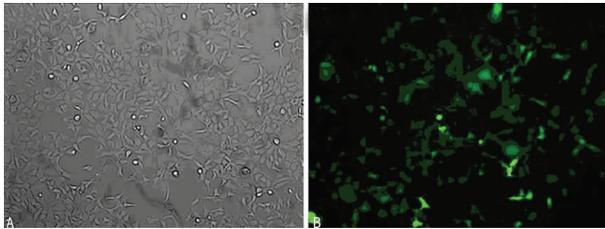


Clone1:非目的克隆;Clone2:目的克隆;Marker:标记物。

图 1 构建的载体中的酶切位点

**2.2 重组慢病毒质粒载体的酶切测序鉴定** 选取酶切鉴定正

确的克隆 pLentis-CMV-GFP-miR424-PGK-PURO 重组质粒的阳性克隆的 PCR 产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 经测序证实 Clone2 序列正确, 构建的载体中有 3 个 *Pst* I 的酶切位点, 分别位于 6 457 bp、1 168 bp、915 bp, 见图 1。



A: 对照; B: 质粒 pLentis-CMV-GFP-miR424-PGK-PURO 转染 293T 细胞 48 h 后的绿色荧光表达 (×100)。

图 2 质粒对细胞的转染效率

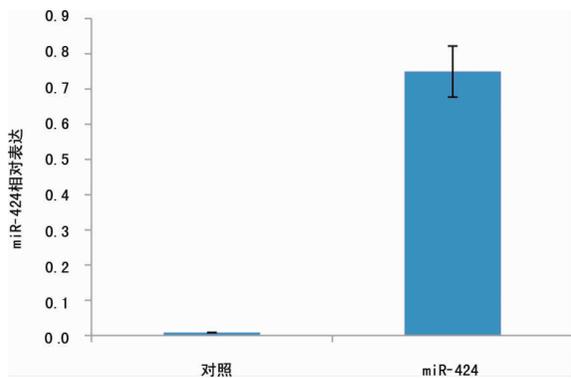
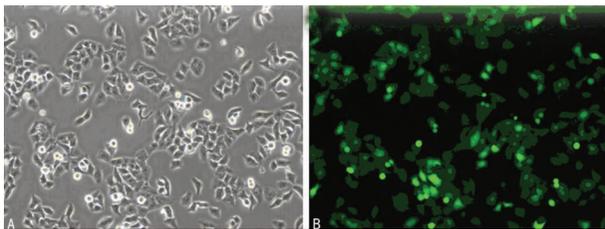


图 3 293T 细胞转染后 miR-424 的表达水平



A: 对照; B: miR-424 慢病毒上清液对宫颈癌 HeLa 细胞的转染效率 (48 h, ×100)

图 4 慢病毒上清液对宫颈癌 HeLa 细胞的转染效率

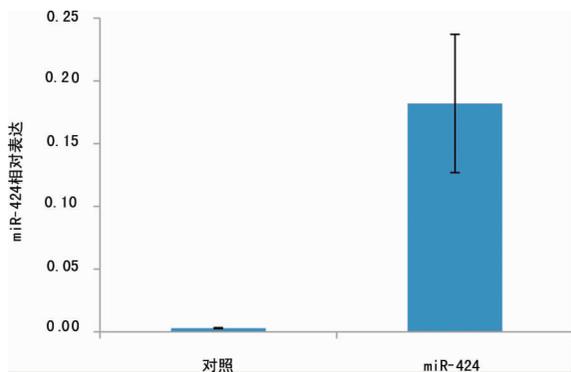


图 5 HeLa 细胞转染后 miR-424 的表达水平

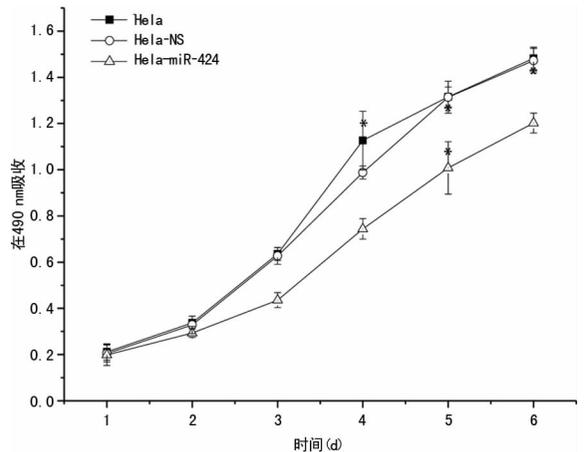
**2.3 质粒对 293T 细胞的转染效率** 鉴定构建的质粒 pLentis-CMV-GFP-miR424-PGK-PURO 对 293T 细胞的转染效率, 转染效率在 90% 以上 (图 2); 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  分析法计算, 转染 48 h 后 miR-424 的表达量提高了 45 倍, 见图 3。

**2.4 miR-424 慢病毒上清液对宫颈癌 HeLa 细胞的转染效率**

鉴定构建的慢病毒上清液对宫颈癌 HeLa 细胞的转染效率, 转染效率在 90% 以上 (图 4); 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  分析法计算, 病毒感染后 miR-424 的表达量上调近 60 倍, 见图 5。

**2.5 MTT 检测 HeLa 细胞的增殖结果**

采用 miR-424 慢病毒上清液转染的宫颈癌 HeLa 细胞, MTT 法检测增殖结果提示感染 miR-424 慢病毒的宫颈癌 HeLa 细胞株均存在细胞增殖明显减慢, 见图 6。



\*:  $P > 0.05$ , 与对照组比较。

图 6 MTT 检测 HeLa 细胞的增殖结果

**3 讨论**

宫颈癌是严重危害我国妇女健康的恶性肿瘤之一, 目前每年新增宫颈癌病例 130 000 余例、死亡 50 000 余例, 其发病率与病死率分别占我国妇科肿瘤的第一、第二位<sup>[12]</sup>。在基因调控网络中, miRNA 作为其调控的关键成分, 通过调控基因的表达, miRNA 广泛参与到对细胞死亡、分化、增殖及个体的发育等各种生命活动过程的调控。

Ghosh 等<sup>[13]</sup> 研究也表明, 在缺氧状态下, 冠状动脉内皮细胞中 miR-424 表达升高, 抑制 Cullin-2 蛋白表达, 降低 E3 连接酶的合成, 增加 HIF-1 $\alpha$ /HIF-2 $\alpha$  在内皮细胞的表达, 增强内皮细胞的增殖和迁移能力, 在心肌缺血、缺氧后改善血供重构和促进血管新生中发挥重要作用。近年一些研究也证实, miRNA 参与肿瘤的发生、发展。Chow 等<sup>[14]</sup> 发现, miR-424 在肾透明细胞癌中的表达远高于肾乳头状细胞癌。Wang 等<sup>[15]</sup> 在对宫颈癌 miRNA 表达谱的研究中发现 miR-424 在宫颈癌及 CIN 组织中呈低表达。Emmanue Labourier 将 miR-424 低表达作为诊断宫颈癌或 CIN 的指标之一, 并运用在其研发的用于宫颈癌的特异性 miRNA 芯片中, 因此 miR-424 可能是宫颈癌特异性 miRNA 标签。miR-424 可能通过下游某个靶基因, 如 CDC25A (细胞周期调控相关的基因) 等来抑制宫颈癌细胞增殖<sup>[16]</sup>。Xu 等<sup>[17]</sup> 研究发现, 恢复 miR-424 的表达将显著影响宫颈癌细胞生物学行为, 包括抑制扩散, 增强细胞凋亡。

本研究构建了 pLentis-CMV-GFP-miR424-PGK-PURO 慢病毒载体, 并用含慢病毒的上清液感染宫颈癌 HeLa 细胞, 成功抑制了宫颈癌 HeLa 细胞的增殖。然而在 miRNA 与肿瘤关系方面的研究, 还需解决很多关键问题。miRNA 的加工过程复杂有序并且受多种因素精密调控。尽管当前已初步明确了 miRNA 的加工过程中的某些重要步骤, 但其中一些具体的调

控因素、调控通路尚未研究清楚<sup>[18]</sup>。因此,还需在以后的研究中继续探索。

综上所述,本实验采用分子克隆技术成功构建了 miR-424 的慢病毒载体,并构建了基于宫颈癌 HeLa 细胞的高效转染系统,并证实了被 miR-424 慢病毒感染后的宫颈癌 HeLa 细胞株表现出增殖抑制,为下一步研究 miR-424 在宫颈癌中的作用靶点以及对其进行功能研究和体外实验奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259-269.
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [3] Lee JW, Choi CH, Bae DS, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2535-2542.
- [4] Fassan M, Baffa R, Palazzo JP, et al. MicroRNA expression profiling of male breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(4): R58.
- [5] Liu Q, Fu H, Sun F, et al. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(16): 5391-5404.
- [6] Forrest AR, Kanamori-Katayama M, Tomaru Y, et al. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation[J]. *Leukemia*, 2010, 24(2): 460-466.
- [7] Kawahigashi Y, Mishima T, Mizuguchi Y, et al. MicroRNA profiling of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines[J]. *J Nippon Med Sc*, 2009, 76(4): 188-197.
- [8] Pallasch CP, Patz M, Claus R et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Blood*, 2009, 114(15): 3255-3264.
- [9] Imig J, Motsch N, Zhu JY, et al. microRNA profiling in

Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoma[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(5): 1880-1893.

- [10] Rentoft M, Fahlen J, Coates PJ, et al. miRNA analysis of formalin-fixed squamous cell carcinomas of the tongue is affected by age of the samples [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(1): 61-69.
- [11] Wang YX, Zhang XY, Zhang BF, et al. Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis[J]. *J Dig Dis*, 2010, 11(1): 50-54.
- [12] 卿毅. 放射线抵抗宫颈癌细胞株 DNA 损伤修复基因表达谱的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2009.
- [13] Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(11): 4141-4154.
- [14] Chow TF, Mankaruos M, Scorilas A, et al. The miR-17-92 cluster is over expressed in and has an oncogenic effect on renal cell carcinoma[J]. *J Urol*, 2010, 183(2): 743-751.
- [15] Wang X, Tang S, Le SY et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2557.
- [16] Sarkar S, Dey BK, Dutta A. MiR-322/424 and-503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A[J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(13): 2138-2149.
- [17] Xu J, Li Y, Wang F, et al. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(8): 976-987.
- [18] 刘梅, 贺平, 罗志华, 等. MiRNA 与肿瘤[J]. *西部医学*, 2012, 24(5): 1022-1024.

(收稿日期: 2014-05-10 修回日期: 2014-07-22)

(上接第 4164 页)

- [10] Strunk J, Rumbaur C, Albrecht K, et al. Linking systemic angiogenic factors (VEGF, angiogenin, TIMP-2) and Doppler ultrasound to anti-inflammatory treatment in rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2013, 80(3): 270-273.
- [11] Oslejsková L, Grigorian M, Hulejová H, et al. Metastasis-inducing S100A4 protein is associated with the disease ac-

tivity of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*, 2009, 48(12): 1590-1594.

- [12] Erlandsson MC, Forslind K, Andersson SE, et al. Metastatin S100A4 is increased in proportion to radiographic damage in patients with RA[J]. *Rheumatology*, 2012, 51(5): 932-940.

(收稿日期: 2014-04-08 修回日期: 2014-07-22)

# 欢迎投稿

# 欢迎订閱