

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.008

miR-146a 在 HepG2. 2. 15 细胞中对 c-Myc 基因表达影响的研究*

谢聪^{1,2},任广立^{1△},许蔓春¹,张卫云³,张速林³,蔡启茵¹,林永敏¹

(1. 广州军区广州总医院儿科 510010; 2. 广州中医药大学 510405;

3. 广州军区广州总医院检验科 510010)

[摘要] **目的** 构建 has-miR-146a 真核过表达载体 pmR-146a, 探究其在 HepG2. 2. 15 肝癌细胞中对 c-Myc 基因的表达调控作用。**方法** PCR 扩增 has-miR-146a 的前体基因片段(pre-has-miR-146a), 双酶切后连接到 pmR-mCherry 载体上, 通过菌落 PCR、双酶切和测序验证重组载体的准确性; 将重组载体转染到 HepG2. 2. 15 肝癌细胞中作为实验组, 同时设空载体组(转染 pmR-mCherry 空质粒组), 空白组(转染试剂 Lipofectamino 2000+PBS), 24, 48 h 后观察载体荧光蛋白表达量, qPCR 检测各组细胞 has-miR-146a 表达情况; 转染 24, 48 h 后 qPCR 检测 c-Myc 基因 mRNA 表达量, 48 h 后 Western blot 检测 c-Myc 蛋白表达水平。**结果** 经菌落 PCR、双酶切和测序证实, pre-has-miR-146a 基因片段插入 pmR-mCherry 载体中; 实验组和空载体组转染 24、48 h 荧光显微镜观察可见强荧光, 与非荧光条件下作对比, 转染效率在 50%~60%; 实验组 has-miR-146a 表达量明显高于空载体组和空白组($P<0.01$); 转染 24, 48 h 后实验组细胞 c-Myc 基因 mRNA 表达量较空载体组和空白组低($P<0.05$); 转染 48 h 后, 蛋白表达量较空载体组和空白组低($P<0.01$)。**结论** 成功构建 has-miR-146a 真核过表达载体 pmR-has-146a, 该重组载体可稳定表达 has-miR-146a; has-miR-146a 可以下调 c-Myc 癌基因的表达, 可以作为治疗原发性肝癌的潜在靶点之一。

[关键词] has-miR-146a; c-Myc; 乙型肝炎相关肿瘤**[中图分类号]** R725.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)17-2330-04

Effect of miR-146a on c-Myc gene expression in HepG2. 2. 15 cells*

Xie Cong^{1,2}, Ren Guangli^{1△}, Xu Manchun¹, Zhang Weiyun³, Zhang Sulin³, Cai Qiyin¹, Lin Yongmin¹

(1. Department of Pediatrics, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou,

Guangdong 510010, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China;

3. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou General Hospital of Guangzhou

Military Region, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

[Abstract] **Objective** To construct the has-miR-146a eukaryotic overexpression vector pmR-146a and to explore its effect on the expression of c-Myc gene in HepG2. 2. 15 cells. **Methods** The has-miR-146a precursor gene fragment pre-has-miR-146a was amplified by PCR, then connected to the pmR-mCherry plasmid vector after double enzyme digestion, the accuracy of recombinant vector was verified by colony PCR, double enzyme digestion and sequencing; then the recombinant vector was transfected into HepG2. 2. 15 cells as the experimental group, meanwhile the empty vector group (transfecting pmR-mCherry empty plasmid group) and blank group (transfecting reagent lip2000+PBS), then the fluorescent protein expression amount was observed under the fluorescence microscopy at 24, 48 h; the expression of has-miR-146a was evaluated by qPCR; at 24, 48 h after transfection, the expression levels of c-Myc gene mRNA were detected by qPCR, and the c-Myc protein expression level after 48 h was detected by Western blot. **Results** The colony PCR, double enzyme digestion and sequencing verified that the pre-has-miR-146a gene fragment was inserted into the pmR-mCherry vector; at 24, 48 h after transfection in the experimental group and empty vector group, intracellular strong fluorescence was seen by fluorescent microscope, the transfection efficiency was at 50%-60% contrasting without fluorescence; the has-miR-146a expression level in the experimental group was significantly higher than that in the empty vector group and blank group ($P<0.01$); the c-Myc mRNA expression at 24, 48 h after transfection was significantly lower than that in the empty vector group and blank group ($P<0.05$); the protein expression amount at 48 h after transfection was lower than that in the empty vector group and blank group ($P<0.01$). **Conclusion** The pmR-146a eukaryotic overexpression vector is successfully constructed, this recombinant vector can express miR-146a stably; miR-146a can down-regulate c-Myc cancer gene expression, which can serve as one of potential targets for treating hepatocellular carcinoma.

[Key words] has-miR-146a; c-Myc; HVB related hepatocellular carcinoma

微小 RNA(miRNA)是一类长度约 22 nt 的内源性非编码 RNA, 是真核生物转录后的重要调控方式, 除广泛参与细胞增

* 基金项目: 广东省科技项目(2013B031800009); 广东省广州市科技计划项目(201607010123)。 作者简介: 谢聪(1987-), 在读硕士研究生, 主要从事儿科病毒感染性疾病研究。 △ 通信作者, E-mail: guangli ren@hotmail.com。

生、分化、凋亡、造血、炎症等正常生理过程,还在肿瘤发生转移、心脑血管疾病、风湿免疫性疾病等方面发挥相当的作用^[1-4],为诊治相关疾病提供了新思路、突破点。近年来发现 miR-146a 是在先天性免疫及肿瘤发生、转移等发挥着一定作用。c-Myc 基因是早期发现的癌基因之一,在肿瘤细胞的分化、增殖、抑制凋亡的功能中起到重要的作用^[5-7]。本研究采用 HepG2.2.15 肝癌细胞作为研究载体,研究 miR-146a 对 c-Myc 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 pMR-mcherry 质粒、HepG2.2.15 细胞、DH5 α 由本实验室保存;miR-146a 普通 PCR 引物、c-Myc 和 GAPDH 基因 qPCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成(中国上海);miR-146a(生产批号:N1009)、U6 逆转录的 qPCR 引物(生产批号:2131)购于广州锐博生物有限公司(中国广州);DNA 提取试剂盒(生产批号:00332640)购自 Thermo 公司(立陶宛);脂质体 Lipofectamine2000(生产批号:1734961)、Trizol(生产批号:14216)购于 Invitrogen 公司(美国加州;立陶宛),逆转录试剂盒(生产批号 AK3702)及 qPCR SYBR GREEN mix 试剂盒(生产批号 AK8103)于大连宝生物公司(中国大连)。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 pMR-146a 过表达载体 在线查找 miRBase 及 Genebank 数据库 has-miR-146a(MI0000477)序列及其上下游各 250 bp 序列,采用 Oligo7.37 软件设计 Pri-miR-146a PCR 扩增引物:Forward 为 5'-TCG AAA GCT TAC CAG GCT TTT CAC TCT TGT;Reverse 为 5'-TCG AGG ATC CGC CTT CTG TCT CCA GTC TTC C(5' 前面 4 个碱基 TCGA 为保护碱基,AAGCTT 为 *Hind* III 酶切位点;GGATCC 为 *Bam*H I 酶切位点),扩增片段为 264 bp。选用 thermoDNA 提取试剂盒提取 HepG2.2.15 细胞基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 pri-miR-146a 序列,反应条件为:94 °C 2 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s(35 个循环);72 °C 10 min。PCR 产物 1% 琼脂糖电泳切胶回收纯化,PCR 纯化产物及 pMR-mcherry 质粒选用 *Hind* III、*Bam*H I 内切酶双酶切,经 PCR/DNA 纯化试剂盒纯化后,将二者用 T4 连接酶在 16 °C 过夜链接(PCR 产物与质粒物质的量比为 6:1)。第 2 天将连接产物转化到 DH5 α 感受态细菌内,在浓度为 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基中进行筛选。24~48 h 内挑选阳性菌进行扩大培养后进行菌落 PCR 及提取质粒双酶切,将菌落 PCR 及双酶切阳性的细菌送去 Invitrogen 公司测序以最终验证。

1.2.2 HepG2.2.15 细胞培养及 pMR-146a 重组载体转染 HepG2.2.15 细胞培养在 10% FBS 的 DMEM 高糖培养液,置于 5% CO₂ 37 °C 培养箱内培养。细胞稳定传代 3 代后,接种到 6 孔板中,每孔细胞密度为 6 \times 10⁵ 个,接种 24 h 后(细胞密度约为 80%)进行质粒转染^[8],分为实验组(Lipofectamine2000 5 μ L+pMR-146a 重组质粒 4 μ g+2.5 mL DMEM 高糖培养基)、空载体组(Lipofectamine2000 5 μ L+2.5 mL DMEM 高糖培养基)、空白组(Lipofectamine2000 5 μ L+4 μ L PBS+2.5 mL DMEM 高糖培养基)。转染后 6 h 细胞换液,加 10% FBS 的 DMEM 高糖培养液继续培养。转染后 24、48 h 进行荧光显微镜观察来评估转染效率。

1.2.3 miR-146a qPCR 相对定量 转染 24、48 h 后,用 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA,琼脂糖电泳及 NanoDrop 2000 进行 RNA 纯度及完整性鉴定后,采用广州锐博公司设计的 miR-146a-5p 特异性 RT-PCR 茎环引物进行逆转录及 qPCR,选用 U6 为内参,反应条件为 95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s 共 40 个循环;melt(65~95 °C, rising by 1 °C each step)以检测 qPCR 产物特异性。选用双标曲相对定量法进行各组 miR-146a 表达量的分析。

1.2.4 qPCR 检测 c-Myc 基因 mRNA 表达水平 在转染后 24、48 h 采用 Trizol 法提取各组总 RNA,以总 RNA 为模板,逆转录成 cDNA 后,进行 qPCR 检测。c-Myc 引物为 Forward: 5'-TCG AAT CCC GGA GTT GGA AAA CAA T-3', Reverse: 5'-TCG ATC CGC AAC AAG TCC TCT TCA G-3';内参为 GAPDH Forward: 5'-GCT CTC TGC TCC TCC TGT-3'; Reverse: 5'-ATG AGT CCT TCC ACG-3'。反应条件均为:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s(收集绿色荧光信号),40 个循环;溶解曲线:从 65~95 °C。结果采用双标曲进行相对定量分析。

1.2.5 Western blot 检测 c-Myc 蛋白表达水平 在转染后 48 h 提取各组蛋白,BCA 法测量蛋白浓度,100 °C 5 min 变性后进行 SDS-PAGE 电泳,Bio-rad 半干转自聚偏氟乙烯(PVDF)膜(转膜条件为 25 v 1 A 30 min),5%脱脂奶粉封闭 2 h,TBS-0.1%Tween20 洗膜(10 min \times 3 次),以浓度 1:1 000 的一抗 4 °C 过夜封闭、TBS-0.1%Tween20 洗膜(10 min \times 3 次)、1:3 000 二抗 37 °C 封闭 1 h,TBS-0.1%Tween20 洗膜(10 min \times 3 次)后滴加 ECL 发光液在 MiniChemiT_M 迷你型化学发光成像仪进行显影,ImageJ 进行灰度分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间采用 LSD 分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒菌落 PCR、双酶切及测序验证 重组质粒经菌落 PCR 后电泳在约 250 bp 处见条带,重组质粒采用 *Hind* III、*Bam*H I 双酶切后可见质粒大片段及插入基因的小片段(约 250 Bp),然后送往 Invitrogen 公司测序(图 1),将结果在 Pubmed 的 BLAST 进行序列比对,与 146a 序列 100% 相符,pmR-146a 重组载体构建成功。

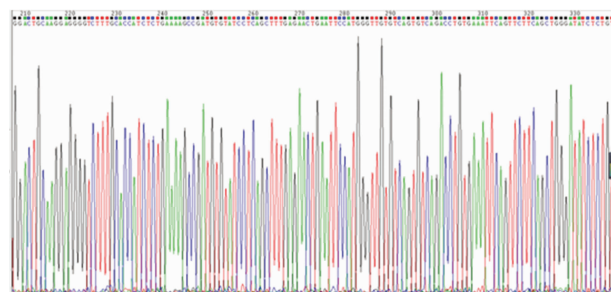


图 1 测序结果

2.2 转染 24、48 h 后荧光显微镜下观察载体荧光蛋白表达结果 转染组细胞形态正常,pmR-146a 组及空载体组观察到红色荧光,空白组没有荧光,见图 2。通过白光下的细胞对比,转染效率为 50%~60%。

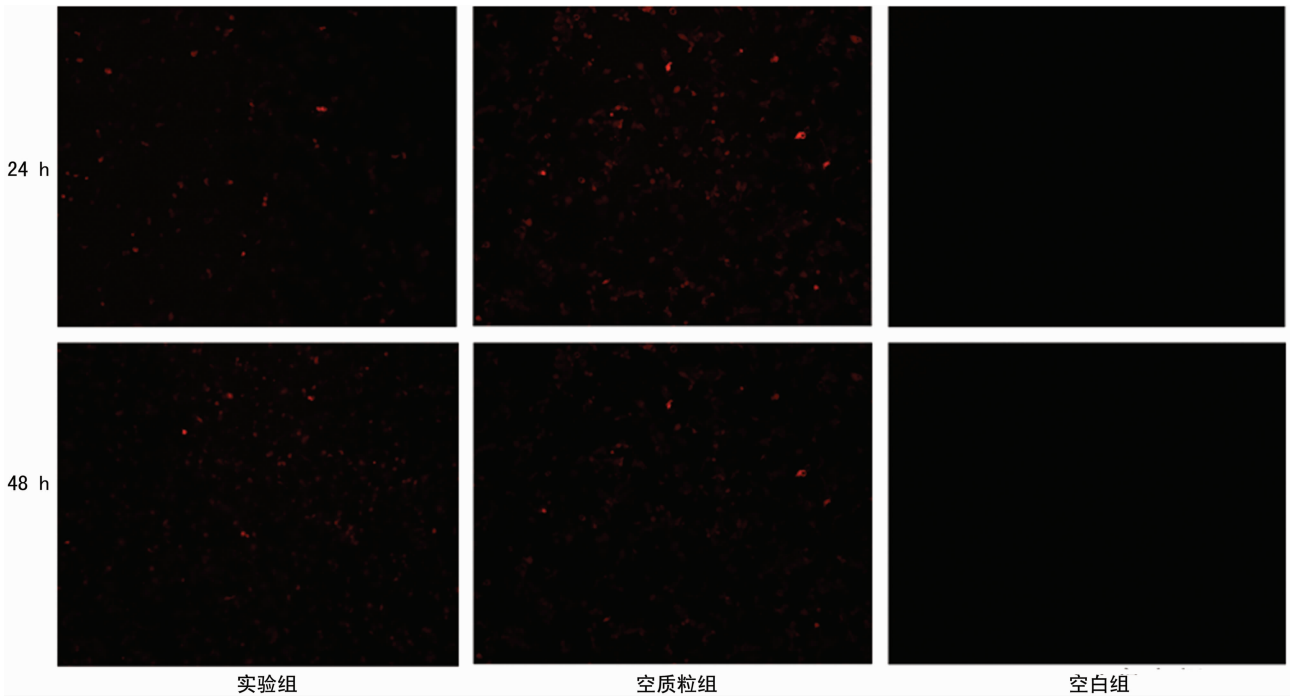


图2 转染 24、48 h 后荧光表达情况 ($\times 100$)

2.3 qPCR 检测 miR-146a 表达量 以空白组 24 h miR-146a 相对表达量校正后, 24、48 h 中空载体组和空白组表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而实验组 miR-146a 表达量明显高于空白组和空载体组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。

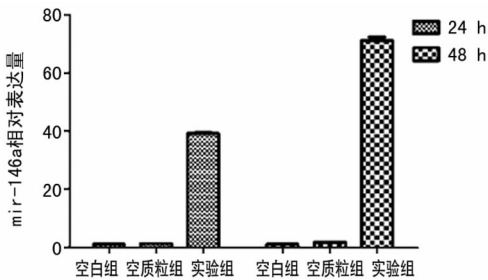


图3 各组细胞 miR-146a 相对表达情况

2.4 qPCR 检测 c-Myc 基因 mRNA 表达量 采用双标曲法, 转染 24、48 h 后, 空载体组与空白组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 实验组在转染 24、48 h 后, 表达均较空载体组及空白组下降 ($P < 0.05$), 见图 4。

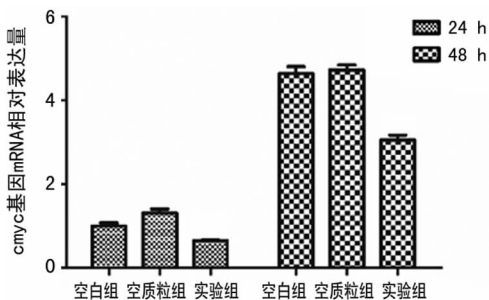


图4 各组细胞 c-Myc mRNA 表达情况

2.5 Western blot 检测 c-Myc 蛋白表达量 Western blot 显示, 转染 48 h 后, 空载体组与空白组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而实验组在转染 48 h 后, 表达均较空载体组及空白组下降 ($P < 0.01$), 见图 5。

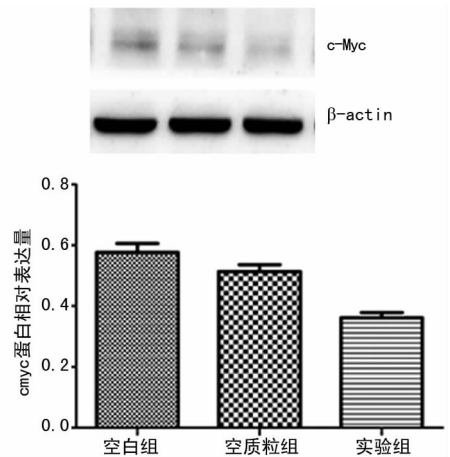


图5 各组细胞 c-Myc 蛋白表达情况

3 讨论

本实验通过构建 miR-146a 真核过表达载体, 转染入 HepG2.2.15 细胞内, 发现其可以抑制 c-Myc 基因的表达, 起到抑制肿瘤的作用, 可以作为潜在原发性肝癌的治疗靶点。人类基因组包括两种 miR-146, 分别为 146a 及 146b, 其中 miR-146a 位于 5 号染色体上。目前研究发现 miR-146a 在免疫系统及肿瘤中均发挥着重要作用。Taganov 等^[9]发现 NF- κ B 是 miR-146a 启动子区的一个结合位点, 故 miR-146a 的生成依赖于 NF- κ B。当细菌感染后, 脂多糖 (LPS) 刺激 NF- κ B 的表达, 上调 miR-146a。同时其发现 miR-146a 作用于 TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) 及 IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase 1)。上调的 miR-146a 导致 TRAF6 和 IRAK1 下调, 进而使 IL1 及 TNF 的表达下降, 抑制免疫反应。Nahid 等^[10]采用 LPS 刺激 THP-1 细胞, 导致 miR-146a 上调, 同时在 LPS 介导的免疫耐受模型中, miR-146a 是惟一升高的 microRNA, 而采用 miR-146a 抑制物, 则不能导致 THP-1 细胞免疫耐受, 由此可见, miR-146a 对于 LPS 导致的免疫耐受起到重要的作用。

在肿瘤的方面,前面已叙述 miR-146a 与 NF- κ B 的关系,而 NF- κ B 在肿瘤细胞的生成及转移发生重要的作用。Bhaumik 等^[11]发现在乳腺癌发现 miR-146a 可以通过 NF- κ B 的活性减少而抑制乳腺癌细胞的转移。Li 等^[12]也发现 miR-146a 通过下调 EGFR、MTA-2、IRAK-1、NF- κ B 而降低胰腺癌的侵袭和转移能力而在宫颈癌中,Wang 等^[13]发现 miR-146a 作为癌基因促使宫颈癌的发生。曾长青等^[14]通过临床的结肠癌的标本发现,miR-146a 作为癌基因促进结肠癌的发生及转移,可见 miR-146a 在不同的肿瘤中扮演者不同的角色。

c-Myc 是重要的原癌基因,参与细胞增殖、抑制凋亡等重要过程^[15-16],其异常表达可促进原发性肝癌等多种癌症的发生。有研究发现,在成神经细胞瘤中,RNAi 可以通过新的信号通路 PCTK1/CDK 调控 c-Myc 的表达^[17]。前人研究发现,NF- κ B 可以促进 c-Myc 介导的肝癌形成过程加速^[18]。本研究发现,miR-146a 可以下调 c-Myc 的表达。考虑其原因可能是 miR-146a 下调 NF- κ B 的表达,导致 c-Myc 的蛋白表达下调。但不排除非 miR-146a-NF- κ B-c-Myc 途径。这需后续进一步的研究以证实:若阻断 miR-146a-NF- κ B 途径,c-Myc 蛋白未见下调,可以证明是通过 miR-146a-NF- κ B-c-Myc 途径,反之则不是;同时敲除 miR-146a,反向验证 c-Myc 表达情况。

参考文献

[1] 沃森,贝克. 基因的分子生物学[M]. 6 版. 北京:科学出版社,2009:639-647.

[2] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR; siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs[J]. Cell, 2001, 107(3):297-307.

[3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2):281-297.

[4] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006):350.

[5] 谭立军,沈忠英,汤雪明,等. 原癌基因 c-myc 与肿瘤[J]. 汕头大学医学院学报, 1999, 12(3):71-73.

[6] 徐媛辉,唐丹凤,潘小玲,等. 原癌基因 c-Myc 的生物学功能及在卵泡发育中的作用[J]. 南昌大学学报, 2010, 50(11):97-101.

[7] Sun L, Song L, Wan Q, et al. c-Myc-mediated activation of serine biosynthesis pathway is critical for cancer progression under nutrient deprivation conditions [J]. Cell Res,

2015, 25(4):429-444.

[8] 萨姆布鲁克,拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2001:1276-1281.

[9] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappa B-dependent induction of microRNAmiR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. PNAS, 2006, 103(33):12481-12486.

[10] Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, et al. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance implication in innate immunity[J]. J Biol Chem, 2009, 284(50):34590-34599.

[11] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. Expression of microRNA-146 suppresses NF-[kappa]B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells[J]. Oncogene, 2008, 27(42):5643-5647.

[12] Li Y, Vandenboom TG, Wang Z, et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. [J]. Cancer Research, 2010, 70(4):1486-1495.

[13] 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.

[14] 曾长青, 黄良祥, 郑羽, 等. miR-146a 在结肠癌中的表达意义[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(3):396-400.

[15] Ding X, Zhou X, Jiang B, et al. Triptolide suppresses proliferation, hypoxia-inducible factor-1 α and c-Myc expression in pancreatic cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3):4508-4513.

[16] 邓景岳, 毕明刚. 影响原癌基因 c-Myc 作用因素的研究进展[J]. 肿瘤, 2009, 29(12):1176-1179.

[17] Cwiek P, Leni Z, Salm F, et al. RNA interference screening identifies a novel role for PCTK1/CDK16 in medulloblastoma with c-Myc amplification[J]. Oncotarget, 2015, 6(1):116-129.

[18] Cavin LG, Wang F, Factor VM, et al. Transforming growth factor-alpha inhibits the intrinsic pathway of c-Myc-induced apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in murine hepatocellular carcinomas. [J]. Mol Cancer Res, 2005, 3(7):403-412.

(收稿日期:2017-01-12 修回日期:2017-03-16)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的涉及人的生物医学研究论文,作者应说明所在用的试验程序是否经过伦理审查委员会(单位性的、地区性的或国家性的)评估,注明批准号。涉及患者(受试者)的应签订知情同意书。

《重庆医学》编辑部