

# miR-122 表达载体的构建及其对 Bcl-xL, Bcl-2 基因的抑制作用

殷杰<sup>1</sup>, 杨晓燕<sup>1</sup>, 虞佳<sup>1</sup>, 李倩<sup>2</sup>, 向琼<sup>1</sup>, 唐惠芳<sup>3</sup>, 雷小勇<sup>1</sup>

(1. 南华大学药物药理研究所, 湖南衡阳 421001; 2. 南华大学附属第二医院药剂科;  
3. 南华大学附属第一医院心内科)

**摘要:** **目的** 构建 miR-122 真核表达载体并检测其表达对 BEL-7402/5-FU 细胞中耐药相关基因 Bcl-xL, Bcl-2 基因表型的作用。 **方法** 人工合成 miR-122 成熟 cDNA 序列, 以质粒载体 pSilencer 3.1-H1 neo 为母本, 构建 miR-122 真核表达载体, 空载体作为对照, 利用脂质体 2000 和 G418 筛选稳转至 BEL-7402/5-FU 细胞中。其中转染 miR-122 载体的细胞为 miR-122 转染组, 转染空载体的细胞为空载体转染组, 通过实时荧光定量 RT-PCR 检测未转染组、转染空载体组和 miR-122 转染组细胞中 miR-122 表达水平。验证 miR-122 载体是否在细胞中稳定表达。并通过实时荧光定量 RT-PCR 检测未转染组、空载体转染组和 miR-122 转染组中耐药相关基因 Bcl-xL, Bcl-2 的基因表达情况。 **结果** miR-122 真核表达载体在 BEL-7402/5-FU 细胞中稳定表达, 与未转染组和空载体转染组比较, miR-122 转染组中 Bcl-xL, Bcl-2 的基因表达水平显著降低。 **结论** miR-122 可下调耐药相关基因 Bcl-xL, Bcl-2 的基因表达, MiR-122 是降低 BEL-7402/5-FU 细胞的 5-氟尿嘧啶药物敏感性影响的潜在因素。

**关键词:** miRNA; miR-122; BEL-7402/5-FU; Bcl-xL; Bcl-2; 耐药

**中图分类号:** Q7 **文献标识码:** A

## The miR-122 Expression Vector Construction and the Down-regulation of Bcl-xL, Bcl-2 Gene Expression

YIN Jie, YANG Xiaoyan, YU Jia, et al

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To construct the miR-122 expression vector and examine the effect of miR-122 expression on Bcl-xL, Bcl-2 drug resistance genes expression in BEL-7402/5-FU cells. **Methods** The miR-122 mature sequences were composited manually and inserted into the pSilencer 3.1-H1 neo Eukaryotic expression vector, which was the construction of miR-122 expression vector. And the empty vector was as a negative control. The vectors were transfected into BEL-7402/5-FU cells by liposome and screened by G418. The miR-122 transfectant is the cells where the miR-122 vector was transfected, and the empty vector transfectant is the cells where the empty vector was transfected. The miR-122 expression were detected in untreated cells, miR-122 and empty vector transfectants by Real time fluorescent quantitative RT-PCR to validation of miR-122 stable expression in BEL-7402/5-FU cells. The Bcl-xL, Bcl-2 mRNA expression were detected in untreated cells, miR-122 and empty vector transfectants by Real time fluorescent quantitative RT-PCR. **Results** miR-122 expression vector can stably express in BEL-7402/5-FU cells. Compared with empty vector transfectants or untreated cells, Bcl-2 and Bcl-xL mRNA expression in miR-122 transfectants were obviously decreased. **Conclusion** These results showed that miR-122 have down-regulated Bcl-2 and Bcl-xL gene expression. It will facilitate further studies of the functions of miR-122 in the drug resistance mechanism of hepatocellular carcinoma to 5-FU.

**Key words:** miRNA; miR-122; pSilencer 3.1-H1 neo; Bcl-xL; Bcl-2; drug resistance

收稿日期: 2012-09-05

基金项目: 国家自然科学基金(30900625); 湖南省教育厅项目(08A059); 国家自然科学基金(30900625); 湖南省教育厅项目(08A059); 湖南省重点学科药理学资助。

作者简介: 殷杰, 硕士研究生, 实验师, 研究方向: 肿瘤药理, E-mail: dragon\_wing@126.com. 通讯作者雷小勇, 博士, 教授, 硕士生导师, E-mail: lei\_xiaoyong@yahoo.com.cn.

MiRNA (microRNA) 是一类广泛存在于真核生物长度为 21-25nt 的非蛋白质编码小 RNA。它们以序列特异性方式调节基因表达,在发育、凋亡、代谢方面都起着不容忽视的作用,从而受到广泛关注<sup>[1]</sup>,并且与肿瘤等多种疾病的发生、发展密切相关<sup>[2-3]</sup>。其通过与靶 mRNA 3' 非翻译区 (3'-UTRs) 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<sup>[4]</sup>,不完全配对时将抑制靶基因的翻译。

MiR-122 是肝脏特异性的,它在肝脏的表达丰度很高,占肝脏总 miRNA 的 70% 以上,其位于 18 号染色体上,定位于 18q21.31.<sup>[5-7]</sup>。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,丙肝病毒 (hepatitis C virus, HCV) 的细胞内复制和肿瘤发生等密切相关<sup>[8-10]</sup>。本研究成功构建了 miR-122 的表达载体,为进一步研究 miR-122 参与肝癌耐药机制提供一个很好的途径<sup>[11]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株和细胞

质粒载体 pSilencer 3.1-H1 neo 由中山大学肿瘤研究所获赠<sup>[11]</sup>,JM109 大肠杆菌菌株、BEL-7402/5-FU 细胞由本实验室保存。

### 1.2 试剂

限制性内切酶 BamHI 和 Hind III、Solution I 连接酶、ExTaq 酶购自大连宝生物公司;质粒提取试剂盒,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibico 公司;Trizol 和脂质体 lipofectamine TM2000 购自 Invitrogen 公司;ABI Taq-Man microRNA assays 购自 ABI 公司。

### 1.3 miRNA 表达载体的构建

1.3.1 目的片段的扩增 依据 Sanger miRBase 数据库收录的 miRNA 数据,找到 has-miR-122 的成熟序列(序列号 19583),由于 miR-122 成熟序列片段短,故人工合成 miR-122 成熟序列并在其上游加入 BamHI 酶切位点,下游加入 Hind III 酶切位点,方便与真核表达载体结合扩增产物的正义链为 GATCC TGGAGTGTGACAATGGTGTGTTGA,反义链为 AGCT-TCAAACACCATTTGTCACACTCCAG,总长度为 28 bps。下划线为酶切位点,上游引物的酶切位点为 BamHI,下游为 Hind III,序列为大连宝生物合成。

1.3.2 表达载体的连接测序及序列分析 将质粒

pSilencer3.1-H1 neo 经 BamHI 和 Hind III 双酶切,并回收。取 10  $\mu$ L 的人工合成的 miR-122 双链 cDNA 与 5  $\mu$ L pSilencer3.1-H1 neo 线性片段混合,加入 1  $\mu$ L T4 DNA 连接酶,2  $\mu$ L 10  $\times$  缓冲液,16  $^{\circ}$ C 过夜。连接产物转化 JM109 大肠杆菌后,取 100  $\mu$ L 转化产物涂板于含 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LA 平板上,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。随机挑取单个菌落做涂板扩增,将菌液一部分做双酶切鉴定。另一方面将单克隆菌液做 DNA 测序鉴定。构建成功的重组载体命名为 pSilencer 3.1-miR 122,阴性对照载体命名为 pSilencer 3.1-H1neo-control。

### 1.4 细胞培养和转染

BEL-7402/5-FU 是肝癌贴壁细胞,用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,并含有 100  $\mu$ g/mL 链霉素,100  $\mu$ g/mL 青霉素的双抗,培养条件为 5% 二氧化碳,37  $^{\circ}$ C 培养。转染前 1 天将细胞接入 24 孔培养板,24 h 内细胞生长密度达到 60% ~ 80% 左右即可转染,参照脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000。取对数生长期细胞接种于 24 孔板,每孔  $1.0 \times 10^5$  个细胞,细胞生长至占培养孔 90% ~ 95% 时进行转染。首先弃去旧培养基,用无血清培养液洗涤细胞一次,加 500  $\mu$ L Opt i -MEM1 (转染优化培养基) 培养液培养细胞。制备 miRNA/Lipofectamine 复合物,24 孔培养板每孔试剂用量如下:稀释 2  $\mu$ L Lipofectamin2000 至 50  $\mu$ L Opt1-MEM1 中,充分混匀,室温放置 5 min;再用 50  $\mu$ L Opt1-MEM1 稀释 0.8  $\mu$ g 质粒载体,将两种混合物轻轻混合混匀,再室温放置 15 ~ 20 min 即得到 miRNA/Lipofectamine2000 复合物。将 miRNA/Lipofectamine2000 复合物滴入到 24 孔培养板孔中,tip 头轻轻吹打混匀。37  $^{\circ}$ C 培养箱培育 4 h 后,每孔加入 1 mL 新鲜的正常含培养基。转染 48 h 后,将细胞经胰酶消化后由 24 孔板移入 25 mL 培养瓶内(每孔一瓶),并加含 G418 800  $\mu$ g/mL 的培养基筛选阳性克隆,筛选期间每 2 ~ 3 天更换一次培养基,15 天后挑出阳性克隆,扩增培养,常规换液传代,扩增过程中维持 G418 浓度 400  $\mu$ g/mL。

### 1.5 RT-PCR 检测转染后 miR-122 表达水平检测

转染 48 h 后,实时荧光定量 RT-PCR 检测各组细胞 miR-122 表达量的差异。利用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国) 分别提取各组细胞的总 RNA,利用 Invitrogen 公司的 miRNA cDNA 合成试剂盒将总 RNA 转录为 cDNA,利用 Gene Copoeia 的试剂盒在 ABI7000 PCR 仪上进行 real-time PCR。反应体系

(20  $\mu$ L) 如下: 2  $\times$  反应缓冲液 10  $\mu$ L, 特异引物 0.4  $\mu$ L, 通用引物 0.4  $\mu$ L, 25  $\mu$ mol/L ROX 0.4  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 双蒸水 6.8  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环。收集 60  $^{\circ}$ C 时的荧光信号。

### 1.6 RT-PCR 检测未转染组, 空载体转染组和 miR-122 转染组中 Bcl-2, Bcl-xL 的 mRNA 表达

为了检测 miR-122 在 miR-122 载体转染前后的表达情况, 将 pSilencer 3.1-miR-122 载体和 pSilencer 3.1-H1 neo 空载体转染至 BEL-7402/5-FU 细胞中, 提取未转染组, 空载体转染组和 miR-122 转染组细胞的总 RNA, 紫外吸收法检测未转染组, 空载体转染组和 miR-122 转染组中的总 RNA 的浓度和纯度, 跑胶检测样本情况。Bcl-xL 的正义链为 5'-CAC-CACATCCTCCGTC-CA-3' 和反义链 5'-AACCCTTC-CATACCTGCCA-3' 扩增产物 225 bps, 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 10 s; 59  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 40 个循环; Bcl-2 的正义链为 5'-TGGATGTTCTGTGCCT-GTAAAC-3' 和反义链 5'-TGATGCGGAAGTCAC-CGAAA-3', 扩增产物 571 bps, 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 10 s; 59  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 40 个循环; 内参 GAPDH 的正义链为 5'-AAG-AAGGTGGTGAAGCAG-GC-3' 和反义链为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 扩增产物为 203 bps, 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 10 s, 59  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 35 个循环。

## 2 结 果

### 2.1 miR-122 表达载体的酶切鉴定及测序

将 miR-122 序列插入到 pSilencer 3.1-H1 neo 载体的 BamHI 和 HindIII 之间, 并在带氨卞的抗性片板上长出菌落, 并划单克隆保种。并将菌液送至上海生工测序结果如下 miR-122 成熟序列: UGGAGU-GUGACAAUGGUGUUUG 全长 28 bps, 从图 1 可以看到 miR-122 成熟序列插入至 pSilencer 3.1-H1 neo 载体上(118 ~ 139 bps 之间)。

### 2.2 miR-122 转染细胞后 miR-122 的表达

用紫外吸收法测定未转染组、空载体转染组和 miR-122 转染组细胞 OD 值(optical density 的简称, 吸光度), 检测总 RNA 纯度及其浓度(表 1), 实时荧光定量 PCR 技术检测 miR-122 转染组、空载体转染组和未转染组中 miR-122 表达水平, 实验结果显示 miR-122 转染组分别与未转染组、空载体转染组

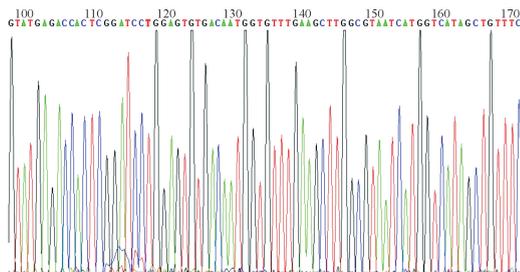


图 1 miR-122 结合 pSilencer 3.1-H1 neo 载体测序图

比较, miR-122 表达水平明显增高, 差异均有显著性( $P < 0.05$ , 图 2)。即 miR-122 载体在 BEL-7402/5-FU 细胞中有表达。

表 1 3 组和空载体转染组细胞总 RNA 浓度和纯度比较

组别	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	浓度 (ng/ $\mu$ L)
未转染组	46.509	23.261	2	1 860.37
空载体组	51.643	26.399	1.96	2 065.71
miR-122 转染组	43.229	21.508	2.01	1 729.15

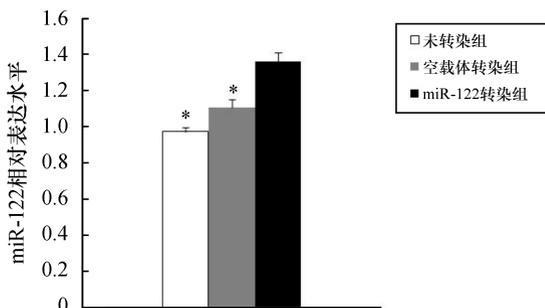


图 2 miR-122 转染组、空载体转染组和未转染组的 miR-122 表达 与 miR-122 转染组比较, \*  $P < 0.05$  ( $n = 3$ )

### 2.3 未转染组、空载体转染组和 miR-122 转染组中 Bcl-2, Bcl-xL 的 mRNA 表达

miR-122 转染组分别与未转染组、空载体转染组比较, Bcl-xL, Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低, 差异有显著性( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ , 图 3)。miR-122 的升高对 Bcl-xL, Bcl-2 的 mRNA 表达水平变化起作用, 能够有效地下调 Bcl-xL, Bcl-2 的 mRNA 表达水平。

## 3 讨 论

随着分子生物学及生物信息学手段的不断发展, 目前, 在人类细胞中已经发现数百种 miRNA 基

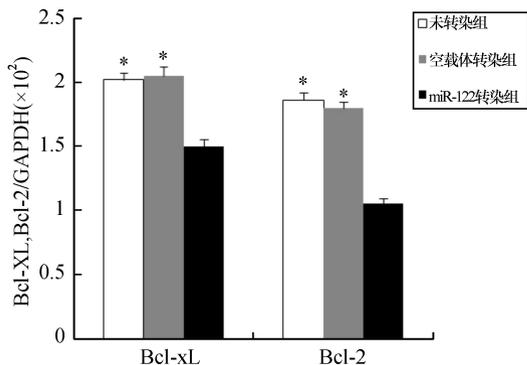


图3 MiR-122对BEL-7402/5-FU细胞Bcl-xL、Bcl-2的mRNA表达的影响 与miR-122转染组比较, \* $P < 0.05$  ( $n = 3$ )

因,但其功能研究还处于起始阶段,其中只有少数miRNA的功能得到了研究,而绝大部分的功能尚有待揭示<sup>[12]</sup>。

miR-122是肝脏特异性表达的miRNA,在胎肝中表达量很低,但在成人的肝细胞中每个细胞表达量达50 000拷贝以上<sup>[13]</sup>。目前研究miRNA的功能一般是通过抑制或过表达这两种手段来进行。而实现miRNA在细胞内的表达有2种方法:一是直接向细胞内转染合成miRNA分子;二是通过表达载体在细胞内表达的miRNA。本研究采取的是从人工合成的miRNA成熟片段,将其构建到表达载体从而表达出miRNA。这种方法所表达的miRNA更接近细胞内源的miRNA,为今后研究miRNA的功能提供了新的思路。

本研究成功构建了miR-122的表达载体,使用该载体过量表达miR-122的研究表明,miR-122能降低Bcl-xL、Bcl-2的mRNA表达量,而Bcl-xL、Bcl-2为Bcl-2基因家族成员之一,抗凋亡基因与耐药相关,miR-122通过调节某个或某些基因来间接下调Bcl-xL、Bcl-2基因的复制和表达,这一研究为Bcl-xL和Bcl-2基因作为靶基因的RNAi提供了实验依据,可望有效逆转肝癌化疗耐药,为肝癌的基因沉默治疗提供新的思路;但还需要进一步确定其逆转耐药的具体机制,并进行体内荷瘤动物实验,以确证Bcl-2和Bcl-xL为靶向的miR-122治疗肝癌、逆转肝癌化疗耐药的有效性,为miRNA用于临床打下实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Bartel DP. microRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals [J]. Nature, 2005, 434(7031): 338-345.
- [3] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.
- [4] Engels BM, Hutvagner G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation [J]. Oncogene, 2006, 25(46): 6188-6196.
- [5] Jopling CL, Norman KL, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122 [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006, 71: 369-376.
- [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(5818): 1579-1582.
- [7] Eisenberg I, Alexander MS, Kunkel LM. miRNAs in normal and diseased skeletal muscle [J]. Cell Mol Med, 2009, 13(1): 2-11.
- [8] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857-866.
- [9] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. miRNAs-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver [J]. Hepatol, 2008, 48(4): 648-656.
- [10] Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, et al. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer [J]. Expert Opin Biol, 2007, 7(7): 1009-1019.
- [11] 殷杰, 杨晓燕, 虞佳, 等. MiR-122上调野生p53蛋白增强BEL-7402/5-Fu细胞对5-氟尿嘧啶敏感性 [J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(6): 640-641.
- [12] Marsden PA. RNA interference as potential therapy-not so fast [J]. N Eng J Med, 2006, 355(9): 953-954.
- [13] Chang J, Nicolas E, Marks D, et al. Mir-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from the mRNA and may down regulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1 [J]. RNA Biology, 2004, 1(2): 106-113.

(此文编辑: 蒋湘莲)