

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 R351 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)16-3008-04

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 using PCR, and 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 one of mir-122 targeted molecules CAT-1 was validated by Western blot in pGCSIL-GFP-miR-122 HepG2 cells. **Results:** pGCSIL-GFP-of miR-122 was confirmed by sequencing analysis, indicating that Mir-122 lentiviral expression vector was successfully constructed. miR-122 expression in the lentiviral mir-122 infected cell line was significantly increased comparing to the parent cell line HepG2. **Conclusion:** Flow cytometry based on GFP fluorescence filter purification, also shows the infection rate of more than 90%. Inhibited the expression of its target molecules was confirmed by Western blot.

Key words: MicroRNA; Mir-122; Lentiviral vector; Stable transfection; HepG2 cells

Chinese Library Classification(CLC): R351 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3008-04

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'-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^[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、心血管疾病、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^[8,10,12]。本研究成功构建 mir-122 慢病毒表达载体，并建立过表达 mir-122 的稳定转染细胞系，为其功能及作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

* 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 2012-03-09 接受日期 2012-03-30)

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 Gbico 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,DH5 α 、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

1.2.1.1 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'-GGGCC-CGCTCTAGACTCGAGATATTTGCATGTCGCTATGTG,反向引物 mir-122-R 5'-CGCGGCCGCCTAATGGATCCAAAAAAG-GCACAGTCGAGGCTGATC 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。

1.2.1.2 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 α ,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。

1.2.1.3 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 1×10^9 TU/ml。

1.2.2 HepG2 细胞的感染及 qPCR 鉴定 mir-122 表达

1.2.2.1 mir-122 慢病毒的包装和滴度测定 数生长期的 HepG2 细胞接种于 48 孔板,细胞数 2×10^4 /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。

1.2.2.2 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 LightCycler480 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($\Delta\Delta Ct$)进行数据分析。

1.2.3 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

Cytokerafin 18 免疫对 pGCSIL-GFP-miR-122 病毒载体与 pGCSIL-GFP 病毒空载体感染的 HepG2 细胞表达 miR-122 差异,使用 qPCR 相对定量的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对检测结果进行计算,得 $2^{-\Delta\Delta CT}=50.2$ 。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

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)。

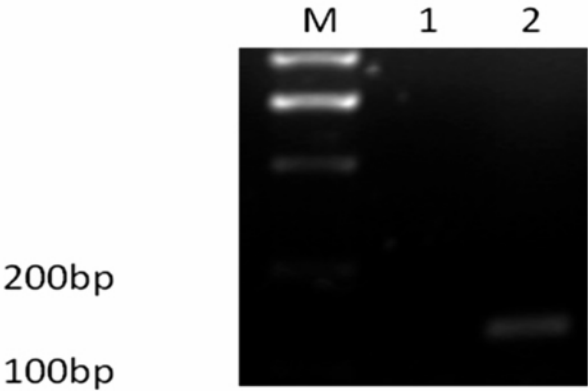


图 1 慢病毒载体 pGCSIL-GFP-miR-122 双酶切鉴定
Fig.1 Cells transfected with lentiviral empty vector 2 cells transfected with 122 lentiviral vector
M :DL2000OM arker 2000 Up, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100bp

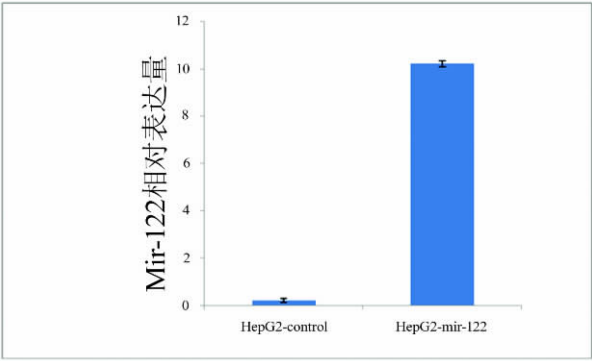


图 2 qPCR 检测转染 mir-122 慢病毒载体组转染病毒空载体组 mir-122 表达量比较
Fig. 2 Result of qPCR :The mir-122 expression levels were higher in mir-122 lentiviral vector group VS empty vector control group

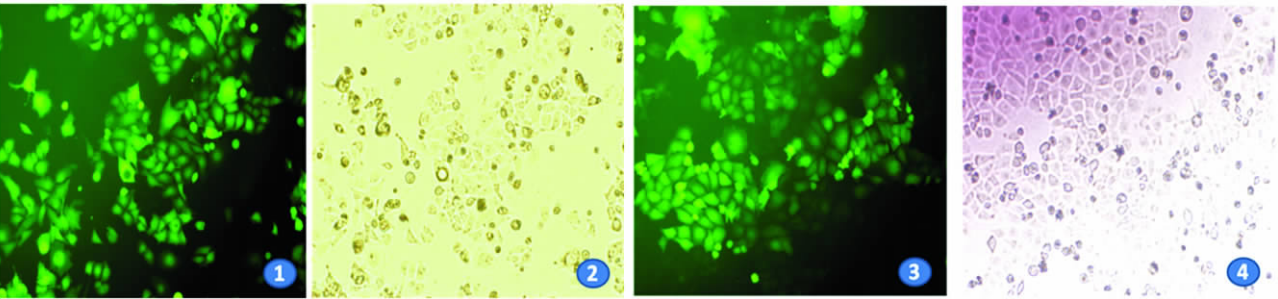


图 3 荧光显微镜下观察 GFP 荧光
(注 :1,2 为 HepG2 转 122 病毒载体组 3,4 为 HepG2 转病毒空载体组 ;1,3 为绿色荧光 2,4 为白光 均为 x200)
Fig.3 GFP fluorescence in Fluorescence microscopy

(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 , x200)

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

肾毒性的病理机制有两通过 Western blot 检测病毒感染细胞 HepG2 中 mir-122 靶分子的表达^[10,11],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)。

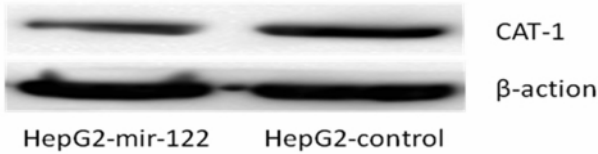


图 4 Western blot 检测 CAT-1 表达变化
Fig. 4 The changes of CAT-1 expression were detected by western blot

3 讨论

目前目前 ,miRNA 在肝脏相关疾病发生发展中的功能研究 ,已经成为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 ,已有的研究说明 mir-122 在正常及病变的肝脏中均发挥重要作用 ,但具体的

功能机制还需进一步探索。

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^[13]。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。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 ,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。Wester 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^[11]。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

- astum or SUPPressors and ontogenes[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 Biof*, 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] Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting [J]. *Cell*, 2006,3: 87-98
- [12] Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, et al. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer[J]. *Expert Opin Biol*, 2007,7:1009-1019
- [13] Bhattacharyya 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

(上接第 3003 页)

- [8] Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2001, 1538(2-3):162-171
- [9] Kleinz MJ, Davenport A P. Emerging roles of apelin in biology and medicine[J]. *Pharmacology & therapeutics*, 2005, 107(2):198-211
- [10] Zarkesh-esfahani H, Pockley A G, Wu Z, et al. Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha [J]. *J Immunol*, 2004, 172(3):1809-1814
- [11] Balasubramanian V, Shukla R, Murugaiyan G, et al. Mouse recombinant leptin protects human hepatoma HepG2 against apoptosis, TNF-alpha response and oxidative stress induced by the hepatotoxin-ethanol [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1770 (8): 1136-1144
- [12] Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice[J]. *Hepatology*, 2004, 40(1):177-184
- [13] Foussal C, Lairez O, Calise D, et al. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy[J]. *FEBS letters*, 2010, 584(11):2363-2370
- [14] Hung WW, Hsieh TJ, Lin T, et al. Blockade of the renin-angiotensin system ameliorates apelin production in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Cardiovascular drugs and therapy sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 2011, 25(1):3-12
- [15] Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, et al. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons [J]. *Experimental cell research*, 2010, 316(11):1773-1783