

• 论 著 •

miRNA-146a 真核表达载体的构建及其对肿瘤细胞恶性增殖的影响

罗婷婷¹, 陈彦², 文阳安³

(1. 重庆市妇幼保健院检验科 400013; 2. 西南大学医院, 重庆 400715;

3. 重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

摘要:目的 构建 miRNA-146a 真核表达质粒, 探讨其在宫颈癌 HeLa 细胞株中的表达及对 HeLa 细胞恶性表型的影响。

方法 人工合成 miRNA-146a 基因序列, 将 miRNA-146a 基因克隆到的真核表达载体 pGeneSil-1 中, 构建成重组质粒 pGeneSil-miR-146a。将 miRNA-146a 重组表达载体瞬时转染宫颈癌 HeLa 细胞株, 通过荧光定量聚合酶链反应法 (PCR) 检测 miRNA-146a 在转录水平的表达。通过 MTT 法检测 miRNA-146a 对细胞增殖的影响, 通过流式细胞术检测细胞周期的变化。**结果** 经酶切和测序鉴定, 证明重组质粒 pGeneSil-miR-146a 构建成功。重组质粒转染 HeLa 细胞后, 荧光定量 PCR 证明能有效表达 miRNA-146a。MTT 检测结果显示转染 miRNA-146a 后的 HeLa 细胞活细胞数目明显增多。流式细胞术细胞周期检测结果表明转染 miRNA-146a 后的 HeLa 细胞 S 期细胞数明显增多。**结论** 成功构建了 miRNA-146a 基因真核表达载体 pGeneSil-miR-146a, 转染宫颈癌 HeLa 细胞株后能有效表达 miRNA-146a, miRNA-146a 基因表达可以促进 HeLa 细胞的增殖。

关键词: 宫颈癌; 细胞增殖; miR-146a

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 09. 006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)09-0934-02

Construction of miRNA-146a expression vector and its effect on tumor cell malignant phenotype

Luo Tingting¹, Chen Yan², Wen Yang'an³

(1. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Care Hospital of Chongqing, Chongqing

400013, China; 2. Hospital of Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Department of Laboratory

Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct microRNA-146a (miR-146a) expression vector and explore the effect of miR-146a on the malignant phenotype of cervical cancer HeLa cell line. **Methods** miR-146a sequence was synthesized and cloned into pGeneSil-1 to construct recombinant plasmid pGeneSil-miR-146a. Recombinant plasmid was transfected into HeLa cell and detected for transcription level by real-time PCR. MTT and flow cytometry were used to detect cell proliferation and cell cycle of HeLa cells. **Results** Recombinant plasmid pGeneSil-miR-146a was successfully constructed and miR-146a was detected by real-time PCR in HeLa cells transfected with recombinant plasmid. MTT and flow cytometry assay showed that miR-146a has proliferative effect on HeLa cells. **Conclusion** miR-146a expression vector was constructed and the expression of miR-146a in HeLa cell could promote cell proliferation.

Key words: uterine cervical neoplasms; cell proliferation; miR-146a

宫颈癌(cervical cancer)是最常见的妇科恶性肿瘤,占女性生殖系统癌症的半数以上,其死亡率占妇女癌症的首位。近年来,出现了许多针对宫颈癌基质方面的研究^[1]。微小 RNA(miRNA)是一类分布广泛的非编码蛋白质 RNA。成熟的 miRNA 通过与靶 mRNA 3' 端非翻译区(3'-untranslated region, 3' UTR)结合,降解 mRNA 或抑制 mRNA 的翻译达到下调目的基因的目的^[2]。miRNA 广泛存在于动植物细胞中,通过调控基因表达,参与生命过程中一系列的重要进程。研究发现,miRNA 在人类的多种疾病,如肿瘤的病理过程中发挥重要作用^[3-4]。miRNA 的表达与多种肿瘤相关,它可以通过抑制癌基因或者抑癌基因的表达在肿瘤发生和发展过程中发挥作用。本研究拟构建 miRNA-146a 基因真核表达载体 pGeneSil-miR-146a,转染宫颈癌 HeLa 细胞株后观察其在细胞中的表达和功能,为进一步研究 miRNA-146a 在肿瘤发生和发展中的作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 宫颈癌细胞株 HeLa,大肠杆菌 DH5 α 由本室保存,pGeneSil-1 载体购自武汉晶赛公司;Trizol 试剂、质粒抽提试剂盒和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶、聚合酶链反应(PCR)试剂盒购

于大连宝生物工程公司;逆转录酶试剂盒购自 Promega 公司;1640 培养基、胎牛血清购于 HyClone 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 miRNA-146 基因合成及载体构建 根据 miRNA-146 基因序列设计正义和反义 DNA 序列,正义序列为:5'-cgt agg ctg atg gct gca ctc tga gaa ctg aat tcc atg ggt ttt gag tct gaa tca aac cca tgg aat tca gtt ctc aaa ctg cgg acc aaa cat ggc ag-3';反义序列为:5'- ctg cca tgt ttg gtc cgc agt ttg aga act gaa ttc cat ggg ttt gat tca gac tca aaa ccc atg gaa ttc agt tct cag agt gca gcc atc agc cta cg-3'。两端分别加上 BamH I/Hind III 酶切位点。将合成的 DNA 单链经退火后形成双链 DNA 序列。pGeneSil-1 质粒经 BamH I/Hind III 双酶切后电泳回收酶切产物。酶切后的质粒与 DNA 片段通过 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物用氯化钙方法转化大肠杆菌 DH5 α ,菌落 PCR 方法筛选阳性菌落,提取质粒进行双酶切鉴定,并送测序。测序正确的载体命名为 pGeneSil-miR-146a。

1.2.2 细胞培养及转染 宫颈癌细胞株 HeLa 用含有 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养基,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下常规培养。转染前一天铺 24 孔板,次日将质粒 pGeneSil-miR-146a

按转染试剂盒操作说明进行转染。48 h 后用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达,同时提取细胞总 RNA,进行 PCR 检测 miR-146a 表达情况。

1.2.3 实时荧光 PCR(real-time PCR)检测 miRNA-146a 表达 宫颈癌细胞株 HeLa 细胞在转染 pGeneSil-miR-146a 载体 48 h 后,用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,然后采用 QIAGEN 公司 microRNA real-time PCR 试剂盒进行检测。

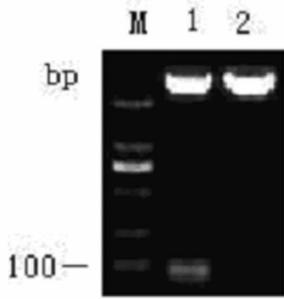
1.2.4 MTT 法检测细胞增殖情况 收集对数期 HeLa 细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加入 100 μ L,铺板使得测细胞调密度至 1 000~10 000 孔,2.5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵育,至细胞单层铺满孔底。瞬时转染 pGeneSil-miR-146a 质粒及对照质粒。3.5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h。每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h。终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷,置摇床上低速震荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测量各孔的 OD₄₉₀ 吸光值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 对数生长期细胞瞬时转染 pGeneSil-miR-146a 质粒及对照质粒,48 h 后收集细胞进行 PI 染色,通过流式细胞仪检测细胞内 DNA 含量,判断细胞周期变化。

1.3 统计学处理 样本均数比较采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析和 *t* 检验。

2 结 果

2.1 miRNA-146a 基因的合成及重组质粒的构建 通过退火合成了 miRNA-146a 基因。合成的 miRNA-146a 产物与经双酶切后真核表达载体 pGeneSil-1 进行连接得到重组质粒,并对重组载体进行双酶切鉴定,得到一条约 110 bp 的 DNA 片段(图 1),与理论预测值一致。经测序鉴定与公布的序列一致,重组载体命名为 pGeneSil-miR-146a。



M:DNA 20 bp 梯带;1:pGeneSil-miR-146a 经 *Bam*H I / *Hind* III 酶切后;2:pGeneSil-1 经 *Bam*H I / *Hind* III 酶切后。

图 1 重组质粒 pGeneSil-miRNA-146a 双酶切鉴定结果

2.2 real-time PCR 检测 miRNA-146a 基因表达 HeLa 细胞在转染 pGeneSil-miR-146a 载体 48 h 后,用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,逆转录后进行 real-time PCR 检测,结果显示转染了重组载体的 HeLa 细胞中成功扩增出了 miRNA-146a 基因。

2.3 miRNA-146a 表达对 HeLa 细胞增殖的影响 MTT 检测结果表明,转染 pGeneSil-miR-146a 载体 48 h 后,与转染对照载体的细胞相比其细胞活力明显增强(23.0%),两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 miRNA-146a 表达对 HeLa 细胞周期的影响 转染

pGeneSil-miR-146a 质粒及对照质粒后 48 h,收集细胞进行 PI 染色,通过流式细胞仪检测细胞内 DNA 含量,分析细胞周期中 S 期细胞数量。结果表明与转染对照载体的细胞相比,其 S 期细胞数明显增多,结果具有显著性差异。

3 讨 论

miRNA 在真核基因表达调控中有着广泛的作用,针对这些普遍存在的小分子的研究正在不断增加。miRNA 有可能作为参与调控基因表达的分子,因而在肿瘤发生和发展过程中具有重要意义^[5-6]。

miRNA-146a 是近年来逐渐开始研究的一个 miRNA,2006 年有研究者指出 miR-146a 的产生依赖于 NF- κ B,且可以负向调控 LPS-TLR4 信号通路,作用靶点为 TRAF-6 和 IRAK1。这篇报道掀起了 miRNA 与天然免疫的研究热潮,也使 miRNA-146a 跃升成为明星分子^[7]。随后关于 miRNA-146a 的研究逐渐增多,其与肿瘤关系的研究也逐渐成为热点。Wang 等^[8]的研究发现,miRNA-146a 的高表达也与宫颈癌相关。

本研究成功构建了 miRNA-146a 真核表达载体,体外转染人宫颈癌细胞 HeLa,将 miRNA-146a 基因导入肿瘤细胞内并检测到目的基因的表达,证实了本研究构建的重组质粒能够有效感染肿瘤细胞株,并表达目的基因。表达的 miRNA-146a 对宫颈癌细胞具有促进细胞增殖的作用,为进一步研究 miRNA 在肿瘤的发生和发展中的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘兆董. 宫颈癌微转移研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29 (6):525-529.
- [2] Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11 (3):228-234.
- [3] Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges[J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(10):775-789.
- [4] Kosik KS. MicroRNAs and cellular phenotypy[J]. Cell, 2010, 143 (1):21-26.
- [5] Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, et al. MicroRNAs the micro steering wheel of tumour metastases[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9 (4):293-302.
- [6] 刘禹, 姜晓峰. MicroRNA 与肿瘤的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(5):465-467.
- [7] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(33):12481-12486.
- [8] Wang XH, 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.

(收稿日期:2011-01-08)