

sTREM-1、SPA 和 sICAM-1 异常升高可有效辅助诊断和评价支原体肺炎的肺功能及预后,值得推广研究。

参考文献

- [1] 关志东. 小儿肺炎支原体肺炎的临床诊治进展[J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(20): 8-9.
- [2] 卓娜, 高美先. 新生儿肺炎支原体感染临床分析[J]. 内蒙古医科大学学报, 2012, 34(1): 21-23.
- [3] 支原体肺炎患儿免疫功能变化与临床意义研究[D]. 山东: 山东省医学科学院, 2010.
- [4] 郭健玉, 曹登成. CRP、sTREM-1、TNF- α 在小儿支原体肺炎中的临床价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016(1): 62-64.
- [5] CHEN Z, ZHAO X, ZHANG X, et al. Increased concentrations of soluble B7-H3 and interleukin 36 in bronchoalveolar lavage fluid of children with mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Bmc Infectious Diseases, 2016, 16(1): 212.
- [6] 农光民. 肺炎支原体肺炎临床及影像学特点[J]. 中国实用儿科杂志, 2015(3): 173-176.
- [7] 兰学立, 李海潮, 阙呈立, 等. 经支气管镜肺活检在特发性间质性肺炎中的诊断价值[C]// 中华医学会全国间质性肺病暨弥漫性泛细支气管炎学术会议. 2010.
- [8] 杨扬, 王宋平. 降钙素原的临床应用及研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2016, 36(6): 471-474.
- 短篇论著 •
- [9] 薛垒喜, 陈建荣, 陶一江. 降钙素原检测及临床应用的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2013, 33(14): 1069-1073.
- [10] 邢亚威, 王星冀. 髓系细胞触发受体-1 的研究现状[J]. 河北医药, 2011, 33(15): 2340-2341.
- [11] 叶俏霞. sTREM-1 在检测慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者细菌性感染中的作用[J]. 广东医学院学报, 2012, 30(4): 398-399.
- [12] 卢惠伦, 游世伦, 李立波. 可溶性髓样细胞触发受体-1 在慢性阻塞性肺疾病患者下呼吸道细菌感染中的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(13): 2123-2125.
- [13] KUSANOVIC J P, ROMERO R, CHAIWORAPONGSA T, et al. Amniotic fluid sTREM-1 in normal pregnancy, spontaneous parturition at term and preterm, and intra-amniotic infection/inflammation. [J]. J Maternal-Fetal Med, 2010, 23(1): 34-47.
- [14] 外源性肺泡表面活性物质对重度烧伤复合伤大鼠急性肺损伤的疗效研究[D]. 天津医科大学, 2015.
- [15] 顾超, 刘元顺, 吕云, 等. II 型肺泡上皮细胞凋亡在肺气肿大鼠肺功能下降中的作用研究[J]. 浙江临床医学, 2017, 19(9): 1585-1587.
- [16] 朱向东, 张峰, 魏灵妙, 等. 肿瘤坏死因子- α 、细胞间黏附分子-1 与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征及高血压[C]// 中国转化医学和整合医学学术交流会(上海站). 2015.

(收稿日期: 2019-05-10 修回日期: 2019-09-18)

反义寡核苷酸 AMO-miR-224 在肝癌中的实验研究

王琪¹, 王楠^{2△}, 林琳²

(1. 大连市妇幼保健院检验科, 辽宁大连 116033; 2. 大连医科大学附属第一医院检验科, 辽宁大连 116011)

摘要: 目的 检测并比较 microRNA(miRNA)-224 在 SMMC-7721 细胞(肝癌细胞)与正常细胞(张氏肝细胞)中的表达情况。并设计反义寡核苷酸(针对 miRNA-224、AMO-miR-224), 以明确 AMO-miR-224 对 SMMC-7721 细胞功能及活性的影响, 并探究其具体机制。方法 培养 SMMC-7721 细胞与张氏肝细胞; 检测 SMMC-7721 发生凋亡的情况; 荧光定量 PCR(qPCR)检测细胞中 miRNA-224 的水平变化。结果 SMMC-7721 细胞内 miRNA-224 的表达水平是张氏肝细胞的 9.54 倍; 采用水平为 0.3 μ mol/L 的 AMO-miR-224 作用 48 h, 有明显的抑制效果, 适合下一步的实验; 同样的条件下, AMO-miR-224 能够促进细胞的凋亡, 且 qPCR 检测 AMO-miR-224 作用细胞后, AMO 组与随机对照组相比, 目的基因 miRNA-224 水平表达下调。结论 miRNA-224 在 SMMC-7721 中表达水平较高, AMO-miR-224 可对 SMMC-7721 的生长起到明显抑制作用, 并且可以检测到凋亡的发生, 可降低 SMMC-7721 中 miRNA-224 的表达水平。

关键词: miRNA-224; 反义寡核苷酸; 实时荧光定量 PCR; 细胞生长; SMMC-7721

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.03.031

文章编号: 1673-4130(2020)03-0371-04

中图法分类号: R735.7; R446

文献标识码: B

microRNA(miRNA)是一类保守进化的内源性

非编码小分子 RNA, 长度约为 22 个核苷酸, 在细胞

△ 通信作者, E-mail: wangnanlab@163.com。

本文引用格式: 王琪, 王楠, 林琳. 反义寡核苷酸 AMO-miR-224 在肝癌中的实验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(3): 371-374.

中可以起到重要的调节作用^[1-2]。miRNA 最早是在研究线虫突变体遗传时发现的,lin-4 可对线虫的发育起到延缓作用^[3]。REINHART 等^[4]随后又在线虫中发现了 let-7。而 let-7 基因及其靶基因的突变均可以使线虫在发育过程中形态改变。

人们目前发现了约 3 000 个 miRNA^[5],与人类相关的 miRNA 为 332 个。MURAKAMI 等^[6]通过对癌旁组织与肝癌组织中 miRNA 的表达情况进行分析,发现 miR-18、pre-miR-18 和 miR-22 在癌组织中存在高表达。国内也基于基因芯片技术对肝癌细胞中 miRNA 的表达情况进行分析,发现了高表达的 miRNA-224^[7]。

本实验设计了与肝癌相关 miRNA-224 的反义寡核苷酸(AMO-miR-224),通过实验确定 AMO-miR-224 在肝癌细胞中起到的作用。反义技术基于碱基互补原理,用特定互补的 DNA 或 RNA 或其化学修饰产物,阻断蛋白的转录翻译,使得该基因不能正常表达。本研究假设:miRNA-224 可能在 SMMC-7721 的生长凋亡过程起到重要作用,随即将反义寡核苷酸转染进细胞,观察转染后肿瘤细胞生物学活性的改变。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞株购自中国辽宁师范大学生命科学院;胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;1640 培养基购自美国 Hyclone 公司。

1.2 仪器与试剂 针对 miRNA-224 的反义寡核苷酸,dNTP 和 RNaseFree H₂O 购自美国 Takara 公司;0.25%胰酶-0.02%乙二胺四乙酸细胞消化液购自美国 Gibco 公司;LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司;Rnase Inhibitor 购自美国 Promega 公司;凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;Hairpin-itTM-miRNAs 购自美国 Gimma 有限公司。

1.3 设计反义寡核苷酸序列 根据 MiRBase 官网提供的 miRNA 基因序列,设计相应的反义寡核苷酸序列,随后使用 BLAST 软件进行分析确认,同时找到一条随机合适的对照序列^[8],miRNA-224: 5'-CAA GUC ACU AGU GGU UCC GUU-3'(21 bp);AMO-miR-224: 5'-AAC GGA ACC ACT AGT GAC TTG-3'(2 bp);随机对照序列: 5'-ATT AGC GAC GAT GGT GUG GTA-3'(21 bp)。由中国大连宝生物公司对以上的序列进行合成,全硫代修饰,PAGE 纯化。

1.4 荧光定量 PCR(qPCR)检测 培养 SMMC-7721 与张氏肝细胞,取对数生长期细胞,离心去上清后,使用试剂提取 RNA。使用 Hairpin-itTM miRNAs qPCR 试剂盒检测 miRNA-224 的表达情况。

1.5 建立 AMO-miR-224 作用于 SMMC-7721 的细胞模型 取对数生长期 SMMC-7721 细胞,在 24 孔板

内以 4×10^4 cells/mL 的水平接种,每组均做 3 次重复孔。待细胞贴壁后,去除上清,使用含 LipofectamineTM2000-AMO 的 RPMI-1640 培养液,进行转染(6 h)。

1.6 SMMC-7721 细胞的凋亡情况及 AMO-miR-224 对 SMMC-7721 的最佳作用水平与作用时间 流式细胞仪检测 AMO-miR-224 作用后 SMMC-7721 细胞的凋亡情况及台盼蓝拒染法筛选 AMO-miR-224 对 SMMC-7721 的最佳作用水平与作用时间。实验设计 3 组:AMO-miR-224 组、随机对照组、空白对照组,每组 AMO-miR-224 的水平为分别为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.60 μ mol/L,空白对照组加入与药物同体积的 1640 培养基。分别培养 24、48、72 h 后取出一定量的细胞悬液,计数各组的活细胞数(台盼蓝拒染法),重复 3 次实验,计算出平均值后进行进一步分析。从而确定后续实验所需要的最佳作用水平和时间。后续实验仍设计 3 组。所选取的 AMO-miR-224 水平为 0.3 μ mol/L,培养时间为 48 h。流式细胞仪检测细胞凋亡情况,重复 3 次。

1.7 qPCR 检测经 AMO-miR-224 作用后 SMMC-7721 细胞 miRNA-224 的水平变化 仍使用终水平为 0.3 μ mol/L 的 AMO-miR-224,培养 48 h。提取细胞的总 RNA。qPCR 检测各组 miRNA-224 的表达情况。

1.8 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,各实验组早晚期凋亡与死亡细胞的百分比数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

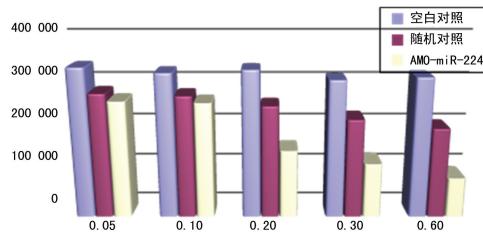
2.1 SMMC-7721 与张氏肝细胞中 miRNA-224 的表达情况 目的基因 miRNA-224 在 SMMC-7721 细胞中表达量(管家基因 U6 校正后)为 22.42,而在张氏肝细胞表达量(校正后)为 2.35,SMMC-7721 中目的基因 miRNA-224 的表达量为张氏肝细胞的 9.54 倍,即 miRNA-224 在 SMMC-7721 细胞表达高于张氏肝细胞。见表 1。

表 1 目的基因 miRNA-224 相对表达量

项目	管家基因 U6		目的基因 miRNA-224	
	定量结果 平均值	定量结果 平均值	U6 校正值	相对表达量(7721/ 张氏肝细胞)
			7721 细胞	张氏细胞
7721 细胞	1 751	39 260	22.42	9.54
张氏细胞	9 731	22 880	2.35	1.00

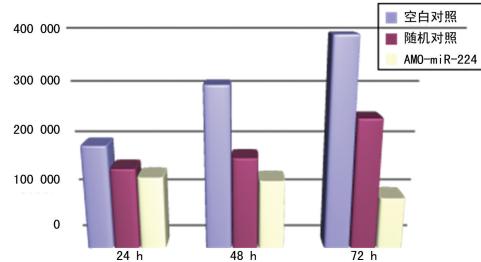
2.2 AMO-miR-224 对 SMMC-7721 的最佳作用水平与作用时间 作用水平在 0.2 μ mol/L 时出现对细胞的抑制,当水平为 0.6 μ mol/L 时较多细胞漂浮,形

态不完整,表面随 AMO-miR-224 水平的增加,细胞发生凋亡增加,高水平时死亡数明显增加,呈现明显的量效关系,最终选择的 AMO-miR-224 的最佳作用水平为 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 。终水平为 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 的 AMO-miR-224 转染 SMMC-7721 48 h 后开始抑制细胞生长,细胞凋亡率明显增加,因此,选择 48 h 为后续实验的作用时间,且随时间增加死亡细胞增多,呈现出显著的时效关系。见图 1、2。



注:纵坐标为细胞存活数。

图 1 不同水平 AMO 对细胞的生长抑制作用



注:纵坐标为细胞存活数。

图 2 不同时间 AMO 对细胞的生长抑制作用

2.3 最佳作用水平与最佳作用时间的 AMO-miR-224 转染 SMMC-7721 对细胞形态的影响 SMMC-7721 细胞为贴壁生长的长梭形,细胞界限清晰。转染后细胞的胞质出现空泡(脂质体形成),同时细胞出现皱缩,胞质颗粒增多,细胞碎片化等细胞死亡的表现。当水平为 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞逐渐死亡,胞质量下降,细胞轮廓不清。见图 3。

2.4 流式细胞仪检测 AMO-miR-224 作用后 SMMC-7721 细胞的凋亡情况 水平为 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 的 AMO-miR-224 作用于 SMMC-7721 细胞 48 h 后,AMO-miR-224 组与随机对照组相比,细胞发生凋亡的比率都有明显的升高(包括早期凋亡与晚期凋亡),说明 AMO-miR-224 可抑制 miRNA-224 的表达,促进 SMMC-7721 细胞的凋亡。见表 2。

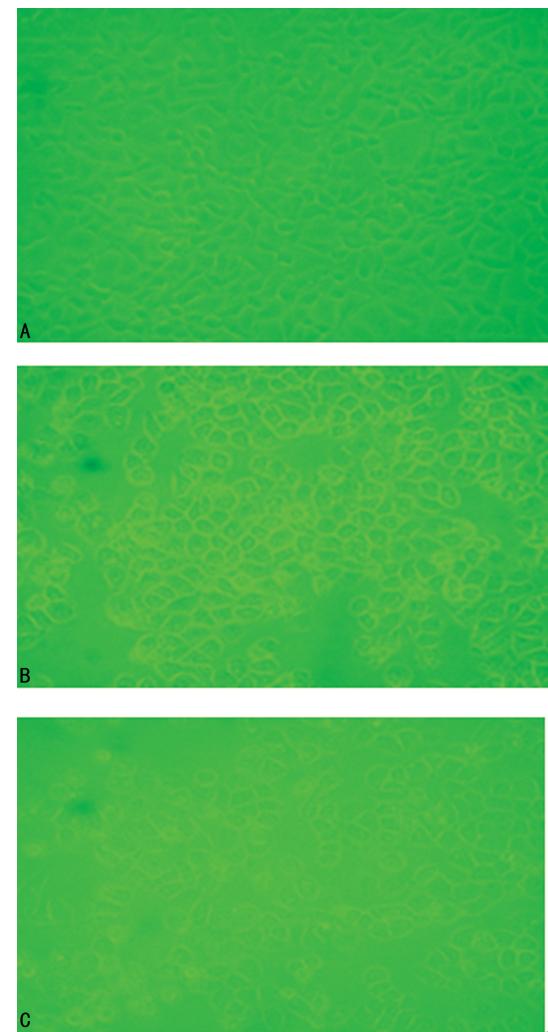
2.5 qPCR 检测经 AMO-miR-224 作用后 SMMC-7721 细胞 miRNA-224 的水平变化 经 AMO-miR-224 作用后,AMO 组细胞中 miRNA-224 表达量(U6 校正后)为 0.29,而随机对照组细胞(U6 校正后)为 4.11,随机对照组中 miRNA-224 的表达量为 AMO 组的 14.17 倍。即与随机对照组相比,miRNA-224 在 AMO 组细胞中的表达是下调的,反义寡核苷酸转

染细胞后,使细胞 miRNA-224 表达下调,其后续所产生的对细胞的作用也受到抑制。见表 3。

表 2 AMO-miR-224($0.3 \mu\text{mol/L}$)作用 SMMC-7721 后细胞凋亡比率($\bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡	晚期凋亡	死亡细胞
空白对照组	3.40 ± 1.03	3.65 ± 0.35	0.73 ± 0.17
随机对照组	2.83 ± 0.35	3.25 ± 0.15	0.71 ± 0.09
AMO-miR-224	$44.77 \pm 0.35^*$	$7.69 \pm 0.53^*$	0.63 ± 0.08

注:AMO-miR-224 组与随机对照组比较, $^* P < 0.05$ 。



注: A 表示正常 SMMC-7721 细胞形态; B 表示转染后 SMMC-7721 细胞形态; C 表示水平为 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 时细胞形态。

图 3 细胞形态

表 3 3 组细胞目的基因 miRNA-224 的相对表达量情况

组别	管家基因 U6		目的基因 miRNA-224	
	定量结果 平均值	定量结果 平均值	U6 校正值	相对表达量(7721/ 张氏肝细胞)
空白对照	3 562	27 690	7.77	26.79
随机对照	921	3 792	4.11	14.17
AMO-miR-224	51 200	15 030	0.29	1.00

3 讨 论

本研究采用反义技术探讨 miRNA-224 在肝癌细胞中的作用。有研究者针对多种 miRNA(如 miRNA-194)设计了反义寡核苷酸,结果显示其设计的反义寡核苷酸有抑制小鼠不同组织中相应 miRNA 的表达的作用,表明可以利用相应 miRNA 的反义寡核苷酸抑制该 miRNA 的表达,从而研究使用反义寡核苷酸对 miRNA 在细胞生长、肿瘤发生等不同情况下起到的作用。

经 qPCR 实验证实,miRNA-224 在 SMMC-7721 肝癌细胞中有明显的高表达(为张氏肝细胞的 9.54 倍)。众所周知,SMMC-7721 是甲胎蛋白阳性的经典肝癌细胞株,被广泛应用于肝癌相关的研究当中,而张氏肝细胞为人源的正常肝细胞,结果表明,相比于正常肝细胞,miRNA-224 在肝癌细胞中高表达,国外文献中也有关于此类结果的相应报道^[6-7]。

本研究经台盼蓝拒染法实验从细胞水平上证实 AMO-miR-224 可以抑制肝癌细胞的生长。而流式细胞术的结果表明,当 AMO-miR-224 转染后,SMMC-7721 细胞与随机对照组(随机序列转染的 SMMC-7721 细胞)相比,发生凋亡的(包括早期、晚期凋亡)细胞的百分率都明显升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。该结果表明 miRNA-224 有促进肝癌细胞生长的作用。新加坡国立大学生物学研究所 WANG 等^[11]提出,miRNA-224 的靶基因是凋亡抑制因子-5 (API-5),miRNA-224 可能是通过影响 API-5 转录后的表达水平从而发挥作用,但具体机制还需要进一步的研究。

当正常细胞癌变时,细胞往往会对生长抑制信号不敏感,从而降低细胞凋亡的水平,获得了无限增殖能力^[10-11]。而本实验利用反义寡核苷酸的作用,AMO-miR-224 通过与 miRNA-224 结合,发挥反义技术从而抑制 miRNA-224 的作用,结果发现肿瘤细胞的增殖受到抑制,细胞凋亡,表明 miRNA-224 促进肝癌细胞的生长过程,从而推测 miRNA-224 在肝癌中可能发挥癌基因的作用。

本研究证明针对 miRNA-224 设计的反义寡核苷酸 AMO-miR-224 可以抑制 SMMC-7721 的生长,并且可以使肿瘤细胞发生凋亡,降低 SMMC-7721 细胞中 miRNA-224 的表达水平,为肝癌的诊断和治疗提

供一个新的靶点、思路^[12]。

参 考 文 献

- LAU N C, LIM L P, WEINSTEIN E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 858-862.
- LAI E C. MicroRNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation[J]. *Nat Genet*, 2002, 30(4): 363-364.
- HE L, HANNON G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522-531.
- REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.
- 李丽,徐位,李建勇.微小 RNA 与恶性增殖性疾病相关性的研究进展[J].中华血液学杂志,2007,28(4):282-284.
- MURAKAMI Y, YASUDA T, SAIGO K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues[J]. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2537-2545.
- 李琼,王阁,王中红,等. MicroRNA 在 HepG2 肝癌细胞表达差异谱的研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(20): 2024-2025.
- GRIFFITHS-JONES S, GROCOCK R J, VAN DONGEN S, et al. MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): 140-144.
- KRÜTZFELDT J, RAJEWSKY N, BRAICH R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'[J]. *Nature*, 2005, 438(768): 685-689.
- 李招权.微 RNA 在肿瘤研究中的意义[J].重庆医学, 2006, 35(19): 1803-1806.
- WANG Y, LEE A T, MA J Z, et al. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(19): 13205-13215.
- 马卓娅,汤华. microRNA 与肿瘤[J]. 生命的化学, 2006, 26(1): 2-5.

(收稿日期:2019-05-26 修回日期:2019-10-16)