

• 论 著 •

miR-122 靶向调控 RhoA 基因影响乙型肝炎病毒复制与表达的机制研究*

马红¹, 李莉¹, 周丽君^{2△}

1. 乌鲁木齐市中医医院检验科, 新疆乌鲁木齐 830000; 2. 乌鲁木齐市血液中心检验科, 新疆乌鲁木齐 830000

摘要:目的 探讨 miR-122 通过调控小 G 蛋白超家族成员 RhoA 基因对隐匿性乙型肝炎病毒(HBV)复制与表达的影响及其作用机制。方法 实时荧光定量 PCR 测定 HBV(+)与 HBV(-)的肝癌患者组织、HepG2 细胞与 HepG2.2.15 细胞中 miR-122 表达差异,实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测 HBV(+)与 HBV(-)的肝癌患者组织、HepG2 细胞与 HepG2.2.15 细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白的表达差异;按照实验分组将 pEGFP-C1-miR-122 与 pcDNA3.0-V14RhoA 转染至 HepG2.2.15 细胞,实时荧光定量 PCR 测定 miR-122 与 RhoA mRNA 表达,Western Blot 检测 RhoA 蛋白表达;生物信息学方法预测 miR-122 与 RhoA 基因的靶向结合位点,构建野生型 RhoA 3'非翻译区(3'UTR)和突变型 RhoA 3'UTR 双荧光素酶表达载体,检测细胞荧光素酶活性变化;酶联免疫吸附试验测定细胞培养上清液中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)与乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)水平,实时荧光定量 PCR 检测细胞培养上清液中 HBV DNA 水平,Western Blot 检测细胞内 Rho 相关蛋白激酶(ROCK)-1 与 ROCK-2 相对表达水平。结果 相较于 HBV(-)肝癌患者组织,HBV(+)肝癌患者组织中 miR-122 表达下调,RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平上调($P < 0.05$);与 HepG2 细胞比较,HepG2.2.15 细胞中 miR-122 表达也下调,RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平上调($P < 0.05$)。经预测发现 RhoA mRNA 3'UTR 与 miR-122 在特定区域存在碱基互补现象,miR-122 mimic 和 RhoA 3'UTR WT 重组质粒共转染的细胞中相对荧光素酶活性降低($P < 0.05$)。此外,过表达 miR-122 的 HepG2.2.15 细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平下调($P < 0.05$)。与空白组比较,miR-122 组 HepG2.2.15 细胞培养上清液 HBsAg 与 HBeAg 水平均降低,HBV DNA 表达降低,ROCK-1 与 ROCK-2 表达均上调($P < 0.05$);而 V14RhoA 组 HBsAg 与 HBeAg 水平则高于空白组,HBV DNA 表达升高,ROCK-1 与 ROCK-2 表达均上调($P < 0.05$)。结论 miRNA-122 可通过下调 RhoA 基因表达抑制 HBV 的复制和表达,其机制可能与抑制 Rho/ROCK 信号通路激活有关。

关键词:乙型肝炎病毒; RhoA; miR-122; HepG2.2.15 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.06.008

中图法分类号:R512.63

文章编号:1673-4130(2023)06-0677-06

文献标志码:A

Study on the mechanism of miR-122 targeted regulation of RhoA gene affecting the replication and expression of hepatitis B virus*

MA Hong¹, LI Li¹, ZHOU Lijun^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Urumqi Traditional Chinese Medicine Hospital, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Urumqi Blood Center, Urumqi, Xinjiang 830000, China

Abstract: Objective To explore the effect of miR-122 on the replication and expression of occult hepatitis B virus (HBV) and its mechanism by regulating RhoA gene, a member of the small G protein superfamily. **Methods** Real-time fluorescent quantitative PCR was used to determine the expression differences of miR-122 in HBV(+) and HBV(-) liver cancer patient tissues, HepG2 cells and HepG2.2.15 cells. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western Blot detected differences in the expression of RhoA mRNA and RhoA protein in HBV(+) and HBV(-) liver cancer patient tissues, HepG2 cells and HepG2.2.15 cells; According to the experimental grouping, pEGFP-C1-miR-122 and pcDNA3.0-V14RhoA were transfected into HepG2.2.15 cells, Real-time fluorescent quantitative PCR measured the expression of miR-122 and RhoA mRNA, and Western Blot detected the expression of RhoA protein; Bioinformatics methods predicted the targeted binding site of miR-122 and RhoA gene, and constructed wild-type RhoA 3'UTR and mutant RhoA 3'UTR dual lucif-

* 基金项目:乌鲁木齐市卫生健康委科技计划项目(202016)。

作者简介:马红,女,主管技师,主要从事医学检验方面研究。△ 通信作者,E-mail:250674354@qq.com。

erase expression vectors, and detected the changes in cellular luciferase activity. Enzyme-linked immunosorbent assay measured the content of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B e antigen (HBeAg) in the cell culture supernatant. Real-time fluorescent quantitative PCR detected the level of HBV DNA in the cell culture supernatant, Western Blot detected the expression protein levels of Rho-associated protein kinase (ROCK)-1 and ROCK-2 in the cells. **Results** Compared with the tissues of HBV(-) liver cancer patients, the expression of miR-122 was down-regulated and the expression of RhoA mRNA and RhoA protein were up-regulated in the tissues of HBV(+) liver cancer patients ($P < 0.05$). Compared with HepG2 cells, the expression of miR-122 in HepG2. 2. 15 cells was also down-regulated, and the expression of RhoA mRNA and RhoA protein were up-regulated ($P < 0.05$). It is predicted that RhoA mRNA 3'UTR and miR-122 had base complementation in specific regions, and the relative luciferase activity of cells co-transfected with miR-122 mimic and RhoA 3'UTR WT recombinant plasmid was reduced ($P < 0.05$). In addition, the of RhoA mRNA and RhoA protein was down-regulated in HepG2. 2. 15 cells overexpressing miR-122 ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the contents of HBsAg and HBeAg in the supernatant of HepG2. 2. 15 cell culture in the miR-122 group were reduced, HBV DNA expression was reduced, and the protein expression levels of ROCK-1 and ROCK-2 were up-regulated ($P < 0.05$). The HBsAg and HbeAg contents of the V14RhoA group were higher than those of the blank group, HBV DNA expression increased, and the protein expression levels of ROCK-1 and ROCK-2 were also up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** miRNA-122 can inhibit the replication and expression of HBV by down-regulating the expression of the RhoA gene. The mechanism may be related to the inhibition of the activation of the Rho/ROCK signaling pathway.

Key words: hepatitis B virus; RhoA; miR-122; HepG2. 2. 15 cells

乙型肝炎病毒(HBV)是一种逆转录病毒,通过前基因组 RNA 逆转录复制 DNA。HBV 感染可引起急性或慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌等多种肝脏病及其并发症的发生,严重危及人类健康^[1]。据统计每年约有 686 000 人死于该疾病的并发症^[2]。目前,随着新型抗病毒药物的研究与开发,可以实现对 HBV 的抑制,然而一旦停止药物抑制治疗,病毒载量反弹会导致疾病复发^[3],如何从感染个体中彻底消除 HBV 仍然是临床治疗中面临的关键问题。微小 RNA(miRNA)是一类长度为 21~24 个核苷酸的非编码功能性小 RNA,通过诱导翻译抑制或 mRNA 降解来调节互补靶基因的表达。miRNA 在多种细胞过程中发挥重要作用,包括病毒-宿主相互作用。与其宿主一样,许多人类和动物病毒可以编码 miRNA,并在调控病毒生命周期及病毒-宿主相互作用的过程中发挥重要作用^[4]。miR-122 属于肝脏特异性 miRNA,在调节肝脏分化与功能维持中均起着关键作用^[5]。已有研究表明,miR-122 对 HBV 和丙型肝炎病毒(HCV)的病毒复制有不同的调节作用,miR-122 可阻断 HBV 复制,而 HBV 也可抑制 miR-122 表达,两者的这种相互作用关系为治疗 HBV 感染的研究提供了潜在方案^[6]。Ras 同源基因家族成员 RhoA 基因是细胞骨架组织的特征调节因子,能够影响肿瘤细胞的运动、迁移与侵袭等过程,且该蛋白的过度表达与肿瘤转移和(或)不良预后呈正相关^[7-8]。本研究拟以 HBV HepG2. 2. 15 细胞为研究对象,采用分子生物学技术方法检测模型中患者与细胞 miR-122、RhoA 基因表

达差异,再通过进一步的验证实验来初步探讨 miR-122 在 HBV 复制与表达中的调控作用,为 HBV 的分子发病机制与诊治研究提供实验与理论依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2022 年 1—10 月于乌鲁木齐市中医医院收治的 HBV 高复制(+)与 HBV 低复制(-)肝癌患者各 16 例作为研究对象,年龄 18~55 岁,平均(40.54±3.73)岁。本研究获得医院伦理委员会审批通过。

1.2 仪器与试剂 胎牛血清、青-链霉素双抗液和 DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司,Trizol 试剂和 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒购于日本 Takara 公司,TaqMan MicroRNA assay 试剂盒购于北京百奥莱博生物公司,Lipofectamine2000 转染试剂盒购于美国 Invitrogen 公司,细胞裂解液、考马斯亮蓝蛋白浓度测定试剂盒和增强化学发光法超敏发光液购于上海碧云天生物研究所,PVDF 膜美国 Millipore 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒上海翌圣生物科技公司,乙型肝炎表面抗原(HBsAg)与乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)检测试剂盒购于北京万泰生物公司,RhoA 抗体、Rho 相关蛋白激酶(ROCK)-1 抗体、ROCK-2 抗体、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶标记二抗购于英国 Abcam 公司。真核表达载体 pEGFP-C1-miR-122 和 RhoA 基因过表达质粒载体 pcDNA3.0-V14RhoA 均由北京奥科生物技术公司构建,野生型 pLuc-RhoA-3'UTR WT 和突变型

pLuc-RhoA-3'UTR MUT 重组质粒、miR-122 mimic 和阴性对照 miR-NC 及引物序列均有上海生工生物工程股份有限公司设计构建与合成。HepG2 细胞和 HepG2. 2. 15 细胞购于中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR 测定组织与细胞中 miR-122、RhoA 基因表达 按 Trizol 试剂说明书提取 HBV 高复制(+)与 HBV 低复制(-)肝癌患者肝组织或 HepG2. 2. 15 细胞、HepG2 细胞和经转染处理的 HepG2. 2. 15 细胞的总 RNA, 微量核酸测定仪检测总 RNA 浓度与纯度。取 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.1 的样品进行逆转录反应, 合成 cDNA, 利用 TaqMan MicroRNA assay 试剂盒测定 miR-122 相对表达水平, 并使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒检测 RhoAmRNA 相对表达水平, 具体步骤严格按照试剂盒说明书进行, 分别以 U6 和 GAPDH 作为 miR-122 与 RhoA 基因的内参基因, 运用 Primer Premier 5.0 软件来设计引物, miR-122: 上游 5'-TGGAGTGTGACAATGGTG-3', 下游 5'-GTGCAGGGTCCGAGG-3'; U6: 上游 5'-CTCGCTTCGCGCAGCACACA-3', 下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; RhoA: 上游 5'-ACGTGCCCTCCTCATCGTCTT-3', 下游 5'-TCTTCCTGCCCTGCTGTCT-3'; GAPDH: 上游 5'-CAGCCTTTCCTTTCTTTGGGGTTTGG-3', 下游 5'-TGTTTTTGGCATAGAGGTCTTTAG-3'。扩增结束后, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-122 和 RhoA 基因的相对表达水平, $\Delta Ct = \text{实验组}/\text{对照组}(\text{靶基因 Ct 值} - \text{内参基因 Ct 值})$, $\Delta\Delta Ct = \text{实验组 } \Delta Ct - \text{对照组 } \Delta Ct$ 。

1.3.2 细胞培养与转染 冻存的 HepG2. 2. 15 细胞在 37 °C 水浴融化, 以 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 添加含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素双抗液的 DMEM 培养基, 吹打悬浮细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞铺满瓶壁 80% 以上时进行常规传代。将对数生长期的细胞接种到 6 孔板内, 细胞密度为 2×10^5 /孔, 在培养箱过夜培养后进行转染。实验分组设置与处理如下: 空白组(正常培养的 HepG2. 2. 15 细胞)、miR-NC 组(细胞转染 pEGFP-C1-NC)、miR-122 组(细胞转染 pEGFP-C1-miR-122)、V14RhoA 组(细胞转染 pcDNA3. 0-V14RhoA)、miR-122+V14RhoA 组(细胞转染 pEGFP-C1-miR-122 与 pcDNA3. 0-V14RhoA), 根据转染试剂 Lipofectamine2000 试剂盒说明书操作, 其中, 脂质体与质粒的比例设为 3:1。转染后, 收集各组细胞进行后续研究。

1.3.3 Western Blot 检测 RhoA 蛋白、ROCK-1 及 ROCK-2 表达 收集各组细胞, PBS 清洗后加入细胞裂解液, 冰上静置 30 min, 获取上清液, 考马斯亮蓝法

测定蛋白浓度。配置 10% 浓度十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶, 取等量蛋白加入到泳道进行上样, 经电泳分离和转膜后, 将含有目的蛋白的膜与 5% 脱脂奶粉于室温下共封闭 1 h。加入稀释的 RhoA 抗体(1:1 000)、ROCK-1 抗体(1:1 000)及 ROCK-2 抗体(1:1 000), 4 °C 摇床上孵育过夜。次日, 弃原液, TBST 洗涤, 加入对应稀释的二抗(1:5 000), 室温下再孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤, 增强化学发光法显色, 凝胶紫外系统摄取蛋白条带图, Image J 图像处理软件进行灰度扫描检测各条带, 结果分析以 GAPDH 为内参照, 计算目的蛋白的表达。

1.3.4 miR-122 与 RhoA 基因靶向结合位点预测 通过生物信息学软件 microRNA. org(<http://www.microRNA.org/microRNA/home.do>) 和 RNAhybrid(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnaHybrid/>) 预测 miR-122 与 RhoAmRNA 的 3'UTR 是否存在靶向结合位点。

1.3.5 双荧光素酶报告基因系统检测实验验证 miR-122 与 RhoA 基因靶向关系 根据预测的 miR-122 与 RhoA 3'UTR 结合靶位点序列设计启动子片段, 扩增基因片段后, 经酶切处理, 将该片段插入荧光素酶报告基因质粒, 经过克隆筛选、测序检测等步骤, 构建野生型 pLuc-RhoA-3'UTR WT 和突变型 pLuc-RhoA-3'UTR MUT 两种重组质粒。将对数生长期的 HepG2 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 24 孔板中, 采用 Lipofactamine 2000 分别将 miR-122 mimic 或对应阴性对照 miR-NC 联合质粒载体转染到细胞, 置于细胞培养箱中转染 48 h, PBS 清洗细胞后加入裂解液裂解, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒并根据说明书操作检测各组细胞荧光素酶活性。

1.3.6 酶联免疫吸附试验法检测 HBsAg 和 HBeAg 水平 收集各组细胞转染后的培养上清液, 酶联免疫吸附试验法检测 HBsAg 和 HBeAg 水平, 严格按各测定试剂盒说明操作, 分别加入样品和试剂, 利用酶标仪进行检测, 结束后计算各组细胞培养上清液中 HbsAg 和 HbeAg 水平。

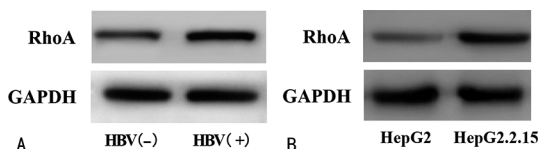
1.3.7 实时荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 水平 收集各组细胞转染后的培养上清液进行实时荧光定量 PCR, 检测 HBV-DNA 水平, 反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 预变性 20 s, 60 °C 退火 30 s, 循环 40 次。以 β -actin 作为内参基因, 使用引物序列为 HBV DNA: 上游 5'-ACCGACCTTGAGGCATACTT-3', 下游 5'-GCCTACAGCCTCCTAGTACA-3'; β -actin: 上游 5'-CACACCCGCCACCAGTTCG-3', 下游 5'-GTCCTTCTGACCCATTCCCACC-3'。反应结束后, 由定量系统中 SDS 软件分析计算出各组细胞培养上清液中的 HBV 拷贝数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数

据分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间数据比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同组织及细胞中 miR-122 和 RhoA mRNA、RhoA 蛋白表达比较 实时荧光定量 PCR 结果显示,HBV(+)肝癌患者临床样本中 miR-122 相对表达水平(0.37 ± 0.03)显著低于 HBV(-)肝癌患者临床样本中 miR-122 相对表达水平(1.00 ± 0.08),差异有统计学意义($P < 0.05$);HepG2.2.15 细胞中 miR-122 相对表达水平(0.29 ± 0.02)也显著低于 HepG2 细胞中 miR-122 相对表达水平(1.00 ± 0.06),差异有统计学意义($P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测结果显示,与 HBV(-)肝癌患者临床样本中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 1.00 ± 0.07 、 0.38 ± 0.04)比较,HBV(+)肝癌患者临床样本中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 3.01 ± 0.28 、 0.86 ± 0.08)显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);HepG2.2.15 细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 2.81 ± 0.26 、 0.83 ± 0.07)显著高于 HepG2 细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 1.00 ± 0.04 、 0.22 ± 0.02),差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:A 表示 HBV(-)、HBV(+)肝癌患者临床样本中 RhoA 蛋白表达;B 表示 HepG2 细胞、HepG2.2.15 细胞中 RhoA 蛋白表达。

图 1 不同组织与细胞中 RhoA 蛋白表达

2.2 转染后各组细胞 miR-122 和 RhoA mRNA、RhoA 蛋白表达比较 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,与空白组和 miR-NC 组(依次为 1.00 ± 0.05 、 1.02 ± 0.05)比较,miR-122 组 HepG2.2.15 细胞中 miR-122 相对表达水平(3.03 ± 0.29)显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),表示 miR-122 成功转染至 HepG2.2.15 细胞。实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测结果显示,与空白组 HepG2.2.15 细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 1.00 ± 0.03 、 0.72 ± 0.06)比较,miR-122 组 HepG2.2.15 细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 0.34 ± 0.03 、 0.26 ± 0.02)显著下调,而 V14RhoA 组细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 4.12 ± 0.40 、 2.16 ± 0.22)显著上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$);相较于 V14RhoA 组 HepG2.2.15 细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 4.12 ± 0.40 、

2.16 ± 0.22),miR-122 + V14RhoA 组 HepG2.2.15 细胞中 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白相对表达水平(依次为 0.59 ± 0.04 、 0.33 ± 0.03)显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

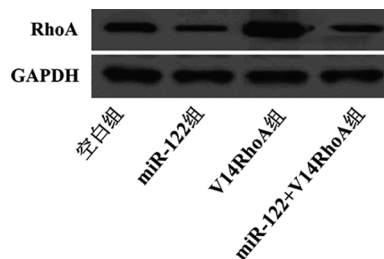


图 2 各组 HepG2.2.15 细胞中 RhoA 蛋白表达

2.3 miR-122 与 RhoA 基因靶向关系预测及验证结果 通过生物信息学软件 microRNA.org 和 RNA-hybrid 预测发现,RhoA 基因是 miR-122 的潜在靶标,RhoA mRNA 3'UTR 与 miR-122 在特定区域存在碱基互补现象,见图 3;为进一步确定 miR-122 是否直接靶向 RhoA 3'UTR,通过双荧光素酶报告基因检测实验发现,与阴性对照 miR-NC 相比,将 miR-122 mimic 和 RhoA 3'UTR WT 重组质粒共转染的细胞中相对荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$)。

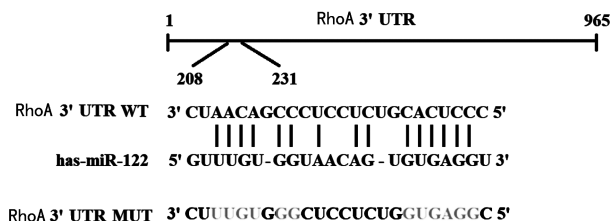


图 3 miR-122 与 RhoA 基因靶向结合位点预测

2.4 各组细胞培养上清液中 HBsAg 和 HBeAg 水平比较 酶联免疫吸附试验检测结果显示,与空白组细胞培养上清液 HBsAg 与 HBeAg 的水平(依次为 32.76 ± 3.18 、 121.95 ± 10.41)比较,miR-122 组细胞培养上清液 HBsAg 与 HBeAg 水平(依次为 6.05 ± 0.61 、 34.71 ± 3.45)显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);V14RhoA 组 HBsAg 与 HBeAg 水平(依次为 55.28 ± 5.49 、 176.45 ± 15.69)显著高于空白组(依次为 32.76 ± 3.18 、 121.95 ± 10.41),差异有统计学意义($P < 0.05$);此外,miR-122 + V14RhoA 组中 HBsAg 与 HBeAg 水平(依次为 17.43 ± 1.66 、 70.09 ± 7.02)均显著低于 V14RhoA 组(依次为 55.28 ± 5.49 、 176.45 ± 15.69),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 各组细胞培养上清液 HBV DNA 复制水平比较 实时荧光定量 PCR 检测结果显示,miR-122 组细胞培养上清液中 HBV DNA 表达[(0.59 ± 0.05) $\times 10^5$]显著低于空白组[(3.89 ± 0.36) $\times 10^5$],差异有统计学意义($P < 0.05$);V14RhoA 组 HBV DNA 表达[(5.18 ± 0.50) $\times 10^5$]显著高于空白组[($3.89 \pm$

$0.36) \times 10^5$], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); miR-122+V14RhoA 组 HBV DNA 表达 $[(3.92 \pm 0.37) \times 10^5]$ 显著低于 V14RhoA 组 $[(5.18 \pm 0.50) \times 10^5]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 各组细胞 Rho/ROCK 信号通路相关蛋白表达比较 Western Blot 检测结果显示, 与空白组细胞 ROCK-1、ROCK-2 相对表达水平 (依次为 0.73 ± 0.06 、 0.57 ± 0.05) 比较, miR-122 组细胞 ROCK-1、ROCK-2 相对表达水平 (依次为 0.18 ± 0.01 、 0.20 ± 0.02) 显著下调; V14RhoA 组细胞 ROCK-1、ROCK-2 相对表达水平 (依次为 1.21 ± 0.11 、 1.87 ± 0.15) 显著上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 V14RhoA 组 (依次为 1.21 ± 0.11 、 1.77 ± 0.15) 比较, miR-122+V14RhoA 组细胞 ROCK-1、ROCK-2 相对表达水平 (依次为 0.73 ± 0.07 、 0.64 ± 0.05) 显著下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

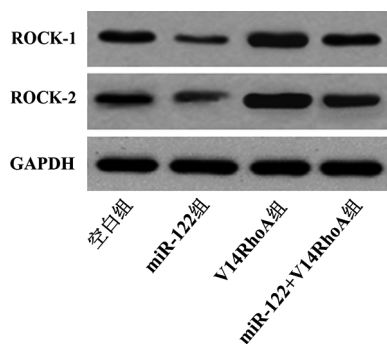


图 4 各组细胞 ROCK-1、ROCK-2 表达

3 讨论

HBV 是慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的主要驱动因素, 与未感染 HBV 的个体相比, HBV 感染者患肝癌的风险大约增加了 100 倍^[9]。且由于该病毒潜伏期长, 很容易发展成持续性感染。HBV 可转录为 4 个转录本, 即 3.5 kb、2.4 kb、2.1 kb 和 0.7 kb, 包括 4 个重叠的开放阅读框: S、P、C 和 X, 分别能够编码 HBsAg、HBV DNA 聚合酶 (HBV DNA Pol)、乙型肝炎核心抗原和 HBeAg 及 HBV X 基因编码的 X 蛋白 (HBx); 3.5 kb 转录物的一个子集即前基因组 pgRNA 被 DNA 聚合酶包装到核心颗粒中, 并作为通过逆转录合成 DNA 的模板, 以子代病毒粒子形式被包裹起来并从细胞中分泌或释放^[2]。一旦感染肝细胞后, HBV 可建立复制周期长期存在于细胞核中。尽管多年来诊断技术取得了重大进展, 但如何准确又方便地诊断 HBV 仍然是一项临床挑战, 此外, 由于缺乏对该病毒的有效治愈方法, 因此探索 HBV 的发病机制至关重要。

病毒-宿主细胞分子的相互作用是决定病毒感染期间感染状态的关键过程。研究表明, 病毒编码的 miRNA 是细胞和病毒转录的关键调节因子, 并且可能在调节细胞或病毒本身的基因表达谱中发挥作

用^[10]。许多细胞内 miRNA 通过与 HBV 转录本的直接相互作用来调节 HBV 复制, 从而影响 HBV 生命周期。FANG 等^[11]研究表明, miR-155 表达与慢性乙型肝炎患者的 T 细胞活化呈正相关, 并且是 HBV 感染中免疫活化和疾病进展的潜在生物标志物; FAN 等^[12]研究发现, HBV 感染的肝细胞癌患者血清中 miR-185 水平显著高于 HBV 未感染的肝细胞癌患者, 并通过体外研究说明了 miR-185 通过靶向肝细胞癌细胞中 ETS 转录因子 ELK1 的表达从而抑制 HBV 表面抗原基因启动子的活性与 HBV 复制; PRATEDRAT 等^[13]研究揭示了 miR-223-3p 与肝细胞癌肿瘤大小及巴塞罗那分期呈负相关, 并在 HBV 相关肝细胞癌患者中水平降低。目前, 关于 miR-122 在 HBV 感染中的研究也已有报道, 已知与健康志愿者相比, 慢性乙型肝炎患者的血清中 miR-122 表达升高至 1.5 倍, 而 miR-122 在 HBV 相关肝细胞癌患者中表达却明显降低^[6]; miR122 能够与 HBV 前基因组 RNA 的双顺反子 mRNA 的高度保守区域结合, 而该区域编码 HBV 聚合酶和核心蛋白, 从而抑制 HBV 基因的表达和复制^[14]。此外, 还证实了 miR-122 表达增加可以通过调节细胞周期蛋白 G₁ 进而介导 P53 活性来减弱 HBV 复制^[15]。本研究检测结果同样显示, miR-122 在 HBV 感染的肝癌患者组织中的表达明显低于 HBV 未感染的肝癌患者组织, 且 HepG2.2.15 细胞中 miR-122 的表达水平也低于 HepG2 细胞。HepG2.2.15 细胞是将含 HBV DNA 基因重组质粒导入 HepG2 细胞, 使其能够在体外稳定复制 HBV DNA, 并分泌 HBsAg 和 HBeAg 至细胞培养上清液中, 目前已成为体外 HBV 复制研究的理想模型^[16]。本研究结果显示, 过表达 miR-122 能够降低细胞培养上清液中 HBsAg 与 HBeAg 水平, 并抑制 HBV DNA 表达, 这一结果进一步验证说明了 miR-122 在 HBV 感染的肝癌中可能发挥抑制 HBV DNA 复制与表达的作用。

众所周知, miRNA 通过调节靶基因的表达发挥相关作用。为了进一步揭示 miR-122 如何抑制 HBV DNA 复制的分子机制, 经实验检测发现, HBV 感染的肝癌患者组织及 HepG2.2.15 细胞中 RhoA mRNA 与 RhoA 蛋白均显示为表达上调, 从而猜想 miR-122 可能通过靶向调控 RhoA 基因影响 HBV 的复制过程。通过生物信息学预测到 miR-122 与 RhoA mRNA 3'UTR 在特定区域存在碱基互补, 双荧光素酶报告基因实验进一步验证了两者靶向关系。此外, 在 HepG2.2.15 细胞中过表达 miR-122 后发现 RhoA mRNA 与 RhoA 蛋白表达水平明显下调, 由此推测, 过表达 miR-122 能够通过靶向下调 RhoA 基因的表达从而抑制 HBV DNA 复制。RhoA 蛋白作为 Rho 家族中的一个小 GTPase 蛋白, 在健康人体组织、胚

胎组织及包括干细胞在内的所有组织中均有表达。此外, RhoA 基因参与多种细胞作用过程, 如细胞生长与转化、细胞骨架调节、大多肌动蛋白应力纤维形成及肌球蛋白收缩等^[7]。ROCK 是 RhoA 蛋白的下游效应子, 包括 ROCK-1 和 ROCK-2 两种亚型, 在接收 RhoA 蛋白的活化信号后, 介导下游一系列磷酸化或去磷酸化反应, 进而控制细胞行为^[17]。由此可见, Rho/ROCK 信号通路与细胞的生长、分化、迁移和发育等密切相关, 该途径的失调与不同种类的疾病发生发展有关, 异常激活后参与多种类型的癌症及其他一些疾病, 包括神经性障碍、糖尿病、哮喘、高血压和骨关节炎^[18-21]。在本研究中, HepG2. 2. 15 细胞中 RhoA 蛋白显示为激活状态, ROCK-1 和 ROCK-2 相对表达水平也均上调; 而过表达 miR-122 后发现细胞中 RhoA 蛋白及其下游分子 ROCK-1 和 ROCK-2 相对表达水平降低; 说明该途径受到抑制, 推测这可能也是 miR-122 调控 HBV DNA 复制与表达的作用机制。

综上所述, 本研究结果表明 miR-122 能够通过靶向下调 RhoA 基因表达来抑制 HBV DNA 复制与表达, 该过程涉及对 Rho/ROCK 信号通路激活的阻断作用, 这为 miRNA 治疗 HBV 感染提供了理论依据。但本研究仅从体外水平上对此进行了实验研究, 针对 miR-122 在机体内对 HBV 复制与表达的抑制机制需后续深入探究。

参考文献

- [1] NGUYEN M H, WONG G, GANE E, et al. Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy[J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33(2): e00046.
- [2] WARD H, TANG L, POONIA B, et al. Treatment of hepatitis B virus: an update[J]. Future Microbiol, 2016, 11(12): 1581-1597.
- [3] TSUKUDA S, WATASHI K. Hepatitis B virus biology and life cycle[J]. Antiviral Res, 2020, 182(1): 104925.
- [4] YANG X, LI H, SUN H, et al. Hepatitis B virus-encoded microRNA controls viral replication[J]. J Virol, 2017, 91(10): e01919.
- [5] THAKRAL S, GHOSHAL K. MiR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir[J]. Curr Gene Ther, 2015, 15(2): 142-150.
- [6] SONG K, HAN C, DASH S, et al. MiR-122 in hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection[J]. World J Hepatol, 2015, 7(3): 498-506.
- [7] MOOSE D L, KROG B L, KIM T H, et al. Cancer cells resist mechanical destruction in circulation via RhoA/Actomyosin-dependent mechano-adaptation [J]. Cell Rep, 2020, 30(11): 3864-3874.
- [8] CHENG I K, TSANG B C, LAI K P, et al. GEF-H1 overexpression in hepatocellular carcinoma promotes cell motility via activation of RhoA signalling[J]. J Pathol, 2012, 228(4): 575-585.
- [9] D'SOUZA S, LAU K C, COFFIN C S, et al. Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(38): 5759-5783.
- [10] SARTORIUS K, AN P, WINKLER C, et al. The epigenetic modulation of cancer and immune pathways in Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: the influence of HBx and miRNA dysregulation[J]. Front Immunol, 2021, 12(1): 661204.
- [11] FANG J, ZHUGE L, RAO H, et al. Increased levels of miR-155 are related to higher T-cell activation in the peripheral blood of patients with chronic Hepatitis B[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2019, 23(2): 118-123.
- [12] FAN H X, FENG Y J, ZHAO X P, et al. MiR-185-5p suppresses HBV gene expression by targeting ELK1 in hepatoma carcinoma cells[J]. Life Sci, 2018, 213(1): 9-17.
- [13] PRATEDRAT P, CHUAYPEN N, NIMSAMER P, et al. Diagnostic and prognostic roles of circulating miRNA-223-3p in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0232211.
- [14] CHEN Y, SHEN A, RIDER P J, et al. A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication[J]. FASEB J, 2011, 25(12): 4511-4521.
- [15] WANG S, QIU L, YAN X, et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G₁-modulated P53 activity[J]. Hepatology, 2012, 55(3): 730-741.
- [16] 彭彬, 许桂丹, 韦武均, 等. 针对 HBVpreS1、preS2 编码链的反基因锁核酸对 HepG2. 2. 15 细胞的抗病毒效果[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(21): 3106-3109.
- [17] KIMURA T, HORIKOSHI Y, KURIYAGAWA C, et al. Rho/ROCK pathway and noncoding RNAs: implications in ischemic stroke and spinal cord injury[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11573.
- [18] GUTEKUNST C, TUNG J K, MCDOUGAL M E, et al. C3 transferase gene therapy for continuous RhoA inhibition[J]. Neuroscience, 2016, 339(1): 308-318.
- [19] 陈琪, 贾瑞丹, 陈霏霏, 等. Rho/ROCK 信号通路与神经可塑性[J]. 生命的化学, 2019, 39(1): 159-164.
- [20] UEYAMA T. Rho-family small GTPases: from highly polarized sensory neurons to cancer cells[J]. Cells, 2019, 8(2): 92.
- [21] DENG Z, JIA Y, LIU H, et al. RhoA/ROCK pathway: implication in osteoarthritis and therapeutic targets[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 5324-5331.