论著

文章编号:1000-5404(2005)03-0196-04

小鼠肝脏特异的微 RNA 在 HeLa 细胞中的转染与表达

孙建国[1],廖荣霞[2],陈正堂[1],周建新[2] (第三军医大学:[1]新桥医院全军肿瘤治疗中心,重庆 400037,[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察 miR-122 在 HeLa 细胞内表达情况。**方法** 将构建的 miR-122 真核表达质粒 pAVU6+27-mir122 以电穿孔法转染 HeLa 细胞,经 G418 筛选获得稳定转染的细胞克隆,通过 Northern 杂交和点杂交验证 miR-122 在 HeLa 细胞中的表达。**结果** 阳性转染细胞与小鼠肝脏细胞 Northern 杂交及斑点杂交均出现放射自显影,而转染空质粒的 HeLa 细胞则无放射显影。**结论** miR-122 在 HeLa 细胞中获得正确表达。

关键词: 微 RNA;小干涉 RNA;非编码 RNA;真核表达

中图法分类号: R322.47; R394-33; R737.33 **文献标识码:** A

Gene transfection and expression of murine liver-specific microRNA in HeLa cell line

SUN Jian-guo[1], LIAO Rong-xia[2], CHEN Zheng-tang[1], ZHOU Jian-xin[2] ([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express miR-122 in HeLa cells. **Methods** pAVU6+27-mir122, an eukaryotic expression vector of miR-122, was transfected into HeLa cell line by electroporation. G418-resistant clones were screened for cell clones with stable transfection. Northern blotting and dot blotting were used to detect miR-122 expression in the transfected HeLa cells. **Results** Northern blot and dot blot analyses demonstrate miR-122 expression in both transfected HeLa cells and murine hepatocytes, but miR-122 expression was not found in HeLa cells transfected with pAVU6+27. **Conclusion** The expression of miR-122 in HeLa cells may provide the basis for further studies of its targets and biological functions.

Key words: microRNA; small interfering RNA; non-coding RNA; eukaryotic expression

miRNA 的生物功能主要是调控发育时相转变及特定组织分化阶段转变,是生物体正常生长发育的重要调控分子。miRNA 表达不被翻译过程所阻滞,比典型的蛋白质表达迅速;而且它不引起靶 mRNA 降解,使翻译控制具有更大的灵活性[1]。因此,miRNA 作为一类古老而崭新的基因调控分子备受关注,其作用靶点分析和生物功能研究是目前的首要任务。

我们构建了小鼠肝脏特异的微 RNA(miR-122)的真核表达载体 pAVU6+27-mir122[2],基因转染人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞并经 G418 筛选抗性克隆后,Northern 杂交及斑点杂交表明,在 HeLa 细胞中成功表达了 miR-122。

基金项目: 国家自然科学基金资助面上项目(30200282, 30400241)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200282, 30400241)

作者简介: 孙建国(1972-),男,四川省资阳市人,博士,主治医师,主要从事肺癌生物治疗及小分子 RNA 调控机制方面的研究。电话:(023)68752672

通讯作者: 陈正堂,电话:(023)68755626,E-mail: zhengtangchen@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-09-16;**修回日期:** 2004-12-08

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞株和试剂

pAVU6+27 质粒由美国 Michigan 大学生物化学系 David Engelke 博士惠赠;PCR 引物以及 DNA 探针由大连 Takara 生物有限公司合成;Tripure、尼龙膜为 Roche 产品;质粒抽提试剂盒、PCR 试剂盒由 Promega 公司生产;T4 多聚核苷酸激酶为 NewEngland 产品;PCR 仪、分光光度计、电穿孔仪、核酸分子杂交炉为 BioRad 公司产品;HeLa 细胞株由中科院上海细胞研究所引进;RPMI1640 培养基及小牛血清购自 Hyclone 公司;γ-^{32}P-ATP 购自北京亚辉生物公司;常规生物化学试剂购自华美生物工程公司。

1.2 pAVU6+27-mir122 质粒载体的构建

重组载体的构建参照文献[2],依据 GenBank 中 miR-122 序列以及编码基因序列[3],合成两段寡核苷酸片段,mir-122-1 在 5′端悬垂 *Sal* Ⅰ酶切位点,3′端含转录终止序列(polyT);mir-122-2 在 5′端悬垂 *Xba* Ⅰ酶切位点。

mir-122-1: 5′-tcgacgagctgtggagtgtcgaaatggtgtttgtgtccaaactatcaaacgccatttcaacactaaatagctttttt-3′

mir-122-2：5′-ctagaaaaaagctatttagtgttgaaatggcgtttgatagtttggacacaaacaccatttcgacactccacagctcg-3′

mir122 前体寡核苷酸片段退火形成双链结构后，与线性化空载体 pAVU6 + 27（*Sal* Ⅰ/*Xba* Ⅰ）连接，挑取阳性克隆进行 *Hin*dⅢ/*Bam*HⅠ双酶切鉴定，酶切分析正确的克隆进一步测序证实，获得 miR-122 表达载体 pAVU6 + 27-mir122。

1.3　pAVU6 + 27-mir122 转染人宫颈癌 HeLa 细胞株

1.3.1　电穿孔方法转染　　HeLa 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中培养，取对数生长期 1×10^7 细胞，磷酸盐缓冲液（PBS）吹洗两遍，用 780 μl 的 PBS 重悬，加入 pAVU6 + 27-mir122 质粒 20 μg（约 20 μl），冰上放置 5 min，置电穿孔仪电击转染，转染后，冰上继续孵育 10 min，然后放入 2 个 100 ml 培养瓶培养。

1.3.2　电穿孔设置　　电容：975 μF，电压：220 V，电阻：∞，电穿孔杯：0.4 cm。转染 48 h 后按 1∶10 传代，加 400 μg/ml G418 进行筛选，每 2～3 天换液 1 次，直至出现抗性克隆（约 3 周），有限稀释法挑取单克隆扩增培养。同时设未转染空白对照组及 pAVU6 + 27 空载体转染阴性对照组。定期重复进行 G418 筛选，建立稳定表达 miR-122 的 HeLa 细胞模型。

1.4　PCR 法扩增 *neo* 基因验证 pAVU6 + 27-mir122 整合到 HeLa 细胞染色体

基因组 DNA 的抽提：转染细胞经 G418 筛选后，取 1×10^7 对数生长期细胞，加入 1 ml 含 RNA 酶和蛋白酶 K 的消化液（配方参见《分子克隆》），56 ℃消化过夜，经 3 次酚∶氯仿∶异戊醇抽提后，用 0.3 mol/L 的醋酸钠和无水乙醇沉淀 DNA，加适量无核酶三蒸水溶解，－20 ℃存放备用。

依据 GenBank 中 *neo* 基因序列（U13862），采用 Primer Premier 5.0 设计 PCR 引物：上游引物（P1）：5′-ATTCGGCTATGACTGGGCACAACA-3′；下游引物（P2）：5′-GAGCAAGGTGAGATGACAGGAGAT-3′。拟扩增片段长度为 268 bp。PCR 体系：10 × PCR buffer 5 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 8 μl，2.5 mmol/L dNTP 8 μl，10 μmol/L P1 1 μl，10 μmol/L P2 1 μl，1 μg/μl DNA 模板 1 μl，*Taq* DNA 聚合酶 1 μl，无核酶三蒸水补足 50 μl。PCR 条件：94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，30 cycles，72 ℃ 7 min。

1.5　Northern blot 和 Dot blot

1.5.1　总 RNA 提取　　采用 TriPure 法提取细胞总 RNA，具体方法参照说明书进行。小鼠肝脏总 RNA 为阳性对照，转染空载体 pAVU6 + 27 的 HeLa 细胞总 RNA 为阴性对照。

1.5.2　DNA 探针　　以 miR122 的反向互补 DNA 序列（5′-acaaacaccattgtcacactcca-3′）为探针[4]。

1.5.3　探针标记　　采用放射性标记法。依次加入下列物质：10 pmol DNA 探针、10 × T4 激酶缓冲液 10 μl、50 pmol/L ^{32}P-ATP［比活性 111 000 MBq/(mmol·L)］，T4 多聚核苷酸激酶 10 U，最后加三蒸水至 20 μl。充分混匀后置 37 ℃水浴 1.5 h。用乙酸铵和乙醇沉淀后备用。

1.5.4　Northern 杂交　　参照文献[5]。取 50 μg RNA 点样，用 15% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离，紫外光下观察 RNA 样品的纯度和完整性，毛细管转移法将核酸转印到尼龙膜上，晾干，经 80 ℃烘烤 2 h 固定。加入 ^{32}P 标记的寡核苷酸探针，50 ℃杂交过夜。洗膜后，－70 ℃经 48 h 放射自显影。

1.5.5　斑点杂交　　将 RNA 样品直接反复多次点样于尼龙膜上，晾干，经 80 ℃烘烤 2 h 固定。杂交过程同 Northern 杂交。

2　结果

2.1　pAVU6 + 27-mir122 转染 HeLa 细胞

G418 筛选 12 d 后，空白对照组细胞全部死亡，实验组和阴性对照组均有存活，并形成稳定克隆（图 1）。挑取实验组单克隆生长细胞进行扩增、传代培养，冻存备用。

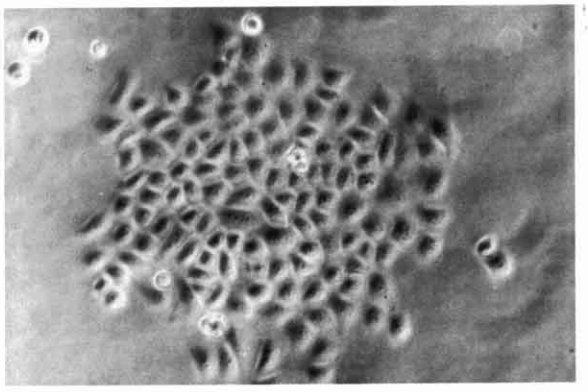
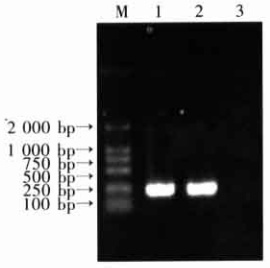


图 1　转染后呈克隆生长的 HeLa 细胞　（倒置显微镜 × 200）

Fig 1　HeLa cell clone after transfection　（Invert microscope × 200）

2.2　pAVU6 + 27-mir122 整合到 HeLa 细胞染色体

neo 基因 PCR 检测结果（图 2）显示，重组质粒 pAVU6 + 27-mir122 和空质粒 pAVU6 + 27 转染并筛选后 HeLa 细胞均表达 *neo* 基因，传代 2 个月后仍能检测到 *neo* 基因表达，而未经过基因转染的 HeLa 细胞则不表达 *neo* 基因，表明 pAVU6 + 27-mir122 整合到 HeLa 细胞染色体。



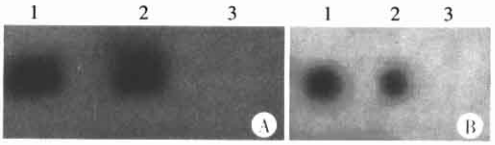
M：DNA marker；1：HeLa/pAVU6 + 27-miR122；2：HeLa/pAVU6 + 27；3：HeLa

图 2　*neo* 基因在转染后 HeLa 细胞中的表达

Fig 2　*neo* gene expression in transfected HeLa cells

2.3　Northern 杂交和斑点杂交

取转染后细胞提取总 RNA，进行 Northern blot 和 Dot blot，小鼠肝脏和 pAVU6 + 27-mir122 转染 HeLa 细胞为阳性反应，而转染空载体 pAVU6 + 27 的 HeLa 细胞为阴性结果（图 3），表明 miR122 在 HeLa 细胞中成功表达。



A: By Northern blot; B: By Dot blot; 1: Liver of mouse; 2: HeLa/pAVU6 + 27-miR122; 3: HeLa/pAVU6 + 27

图3 miR-122在HeLa细胞中的表达

Fig 3 miR-122 expression in transfected HeLa cells

3 讨论

自2001年发现miRNA是一类调控基因表达及生长发育的小分子RNA家族以来,miRNA的研究得到了广泛的开展,研究显示,miRNA序列、结构、丰度和表达方式的多样性,使其可能作为蛋白编码mRNA的调节子,对基因表达、细胞周期调控乃至个体发育产生深远和复杂的影响,miRNA可能在基因表达调控领域起着超乎预料的重要作用。

目前已经发现数百种miRNA序列,面临的首要任务就是研究其作用靶点和生物功能。植物中miRNA靶点预测很简单,与miRNA基本完全配对的mRNA被证明就是其作用靶点[6]。然而,在线虫、果蝇、以及脊椎动物中,采用类似的方法则不行,因为miRNA碱基配对几率并不比随机序列高。复杂的计算机软件预测方法已经在果蝇及哺乳动物中应运而生[7~9],如TargetScan程序已经在哺乳动物中预测了400多个靶点,大多数为转录调控相关的因子,其预测原则为:与miRNA的5′端特别是第2~8个碱基相匹配、碱基配对的数量和配对能力在一定范围的mRNA序列可能为miRNA作用靶点。该方法通过分析已知的miRNA及其作用靶点的严格测试,表明大多数为真实靶点,约31%假阳性。下一步的工作需要验证这些预测的靶点,为探讨miRNA确切具体的生物功能奠定基础。采用分子克隆和基因转染的方法来实现miRNA的表达,从而验证mRNA靶点的真实性并探讨其生物功能无疑具有重要的意义。

Chen[10]采用含pol-Ⅱ启动子的载体构建了miR-1表达载体,用含H1 pol-Ⅲ启动子的载体构建了miR-130表达载体,均在HeLa细胞中获得组成性表达。Zeng等[11,12]将miRNA前体结构插入表达载体RNA聚合酶Ⅲ启动子下游,构建miR-21和miR-30表达载体,稳定转染人体细胞后获得了特定miRNA的表达,并成功下调靶蛋白表达水平,为miRNA靶点验证和功能研究提供了先例。

由于miRNA与小干涉RNA(small interfering RNA, siRNA)同属于小分子调控性非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)家族成员,二者具有非常相似的序列长度和加工方式,却有不同的作用机制和生物功能。siRNA为约22 nt的双链RNA(dsRNA),由*Dicer*酶(RNA酶Ⅲ样蛋白)剪切长序列双链RNA而来,通过与完全互补配对的靶mRNA结合并降解之,从而阻断蛋白质合成;miRNA为约22 nt的单链RNA,其编码基因位于蛋白质编码基因间,初始转录物形成60~80 nt的茎-环状前体,经*Dicer*酶剪切茎-环单臂产生,通过与靶mRNA的3′非翻译区(3′-UTR)不完全互补配对,抑制蛋白质翻译过程而不降解靶mRNA[1]。体内和体外实验表明,siRNA和miRNA两条途径相互交叉,不完全配对的siRNA能起到miRNA的作用[13],而完全配对的miRNA序列又能起到siRNA的功能[12],由于siRNA表达载体的成熟和广泛使用,并证明其有非常良好的表达效率,采用siRNA表达载体来获得miRNA的表达,将有助于miRNA的研究和发展。

pAVU6+27是美国Michigan大学生物化学系David Engelke博士研制的siRNA表达载体[14],带有RNA聚合酶Ⅲ启动子U6,可将插入其下游的小片段核酸序列转录为小分子RNA,并在转录终止位点(polyT)的作用下精确终止转录。本实验结果表明,pAVU6+27同样适用于miRNA的表达研究,通过将小鼠肝脏细胞特异的miR-122编码基因构建到pAVU6+27上,通过基因转染在HeLa细胞中获得了miR-122的表达。该实验为进一步研究miR-122作用靶点及确切生物功能提供了有力的工具,为研究miR-122加工、成熟、稳定、核转移机制提供了良好的细胞模型,也为广泛开展其它miRNA的研究提供了良好的思路。

miR-122是小鼠肝脏细胞中特异表达的一种miRNA,在其它组织细胞中不表达。通过同源性检索发现,在人类基因组中存在miR-122的编码基因,但并不在人类组织中表达。文献[3,4]报道,miR-122具有两种相似的RNA序列,分别是miR-122a(AJ459769 uggaguguga-caaugguguuugu)和miR-122b(AJ459770uggagugugacaauggu guuuga),其功能不明,可能与小鼠肝脏某些特异功能相关,或者与小鼠肝脏生长发育相关,其作用靶点以及两种序列之间的功能差异目前尚少见报道。我们合成的miR-122前体基因序列,重组质粒经基因转染后,理论上能够转录出两种miRNA,采用的寡核苷酸探针是miR122a的反向互补序列,在小鼠肝脏及重组质粒转染后HeLa细胞总RNA中可检出放射显影条带。

虽然转染后细胞并没有明显的形态变化,生长增

殖也无明显改变，但进一步的实验需要完善，其靶点验证后，尚有大量工作要完善，有针对性的检测细胞生长、增殖、细胞周期、抗药性、抗放射性等特性的指标检测有待完成。

参考文献：

[1] 廖荣霞，周建新. 微 RNA 研究进展[J]. 生命的化学，2002，22(4)：324－326.

[2] 廖荣霞，孙建国，陈正堂，等. 小鼠肝脏特异的微 RNA 真核表达载体的构建及鉴定[J]. 重庆医学，2004，33(7)：965－967.

[3] Griffiths J S. The microRNA registry[J]. Nucleic Acids Res，2004，32，Database issue：D109－D111.

[4] LagosQuintana M，Rauhut R，Yalcin A，*et al*. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. Curr Biol，2002，12(9)：735－739.

[5] 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.

[6] Rhoades M W，Reinhart B J，Lim L P，*et al*. Prediction of plant microRNA targets[J]. Cell，2002，110(4)：513－520.

[7] Stark A，Brennecke J，Russell R B，*et al*. Identification of Drosophila microRNA targets[J]. PLoS Biol，2003，1(3)：E60.

[8] Enright A J，John B，Gaul U，*et al*. MicroRNA targets in Drosophila[J]. Genome Biol，2003，5(1)：R1.

[9] Lewis B P，Shih I H，Jones-Rhoades M W，*et al*. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. Cell，2003，115(7)：787－798.

[10] Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development[J]. Science，2004，303(5666)：2022－2025.

[11] Zeng Y，Cullen B R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells[J]. RNA，2003，9(1)：112－123.

[12] Zeng Y，Wagner E J，Cullen B R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells[J]. Mol Cell，2002，9(6)：1327－1333.

[13] Doench J G，Petersen C P，Sharp P A. siRNAs can function as miRNAs[J]. Genes Dev，2003，17(4)：438－442.

[14] Paul C P，Good P D，Winer I，*et al*. Effective expression of small interfering RNA in human cells[J]. Nat Biotechnol，2002，20(5)：505－508.

（编辑　陈聪连）

（上接 195 页）

使血红蛋白变性而致溶血，同时使血红蛋白失去与 O_2 结合的能力，造成组织细胞缺氧，也称为血液性缺氧。它的特点是[1]：主动脉氧分压正常，血红蛋白氧饱和度降低（贫血性缺氧除外），动静脉血氧差小于正常，故 PaO_2 正常，不出现肺通气增加，使砷对全身各组织器官，如肺、心、中枢神经、肝肾、胃肠道、骨髓和肌肉有较强的毒性，造成多器官功能损害。

本组 4 例患者均有不同程度的急性溶血临床表现，这与吸入有害气体砷化氢的量有关系。其中 2 例病人因吸入较多的砷化氢气体，临床表现较重，均发生多器官功能损害。砷化氢中毒的机制[2]除了使血红蛋白变性外，肿对含巯基的还原型谷胱甘肽有极强的亲和力，使红细胞内产生的 H_2O_2 等氧自由基不能及时排除，肿还可抑制红细胞过氧化氢酶，使过氧化氢酶蓄积，均可导致红细胞膜脂质过氧化，破坏其膜的稳定性，引起溶血。高浓度吸入砷化氢可在数分钟内引起死亡。

砷化氢中毒的临床表现以溶血为主。本组病例均有不同程度的溶血，其中 1 例出现严重得多器官损害，致使肝、肾、骨髓及心脏功能障碍。目前急性砷化氢中毒的治疗仍以对症支持治疗为主，且重症病人都采用换血或血透疗法，换血治疗有效，但需要量较多，至少要达到全身血液的 1/2 以上，这易发生严重的输血反应。由于砷化氢 95%～99% 与血红蛋白结合，仅有 1%～5% 以原形由肺排出，血液透析也不能很好地解决组织细胞氧。在 2ATA 压力下吸氧，每 100 毫升动脉血溶解氧气为 4.2 ml，是常压下的 14 倍；每 100 毫升静脉血溶解氧 4.0 ml，而常压下仅为 0.2 ml，因此，即使没有血红蛋白，仅靠溶解氧也能满足机体氧的需要，这样就可迅速纠正缺氧状态，中断恶性循环，使机体逐渐恢复正常的新陈代谢。2ATA 下动脉氧分压为 182 kPa，而常压下仅为 13 kPa，这就为氧气置换出与血红蛋白结合的砷化氢创造了有利条件，恢复血红蛋白携带运输氧气的能力，同时促进红细胞膜的修复，减轻砷化氢引起的溶血状况，改善全身组织器官功能的恢复。砷化氢中毒所引起的缺氧，使有氧代谢减慢，无氧酵解旺盛，细胞内 ATP 减少，酸性物质增多，细胞膜上的 Na^+、Cl^-、Ca^{2+} 及 H_2O 增多，引起细胞内水肿，缺氧若不改善，可加重组织细胞的损害造成细胞组织间水肿，高压氧下，组织细胞缺氧得到迅速的改善，可有效地控制肺水肿和脑水肿，同时因缺氧造成的肾脏、肝脏和心脏等重要脏器的功能得到迅速的改善。高压氧下，血脑屏障的通透性提高，有利于药物进入脑内，促进脑细胞功能的恢复。从本组 4 例患者的治疗情况来看，没有 1 例留下后遗症，复查各项指标均正常，且在院治疗时间缩短，肝肾功能恢复好，溶血控制快，没有出现脑水肿及肺水肿。

急性砷化氢中毒治疗原则是尽快脱离中毒现场，积极采取综合治疗措施，保护重要脏器功能，尽早实施高压氧治疗。越早越好，危重病人可在呼吸机或监护仪的帮助下进行高压氧治疗。

关键词：急性砷化氢中毒；高压氧；综合治疗

中图法分类号：R459.6　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 李温仁，倪国坛. 高压氧医学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1998. 439－463.

[2] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 第 11 版. 北京：人民卫生出版社，2001. 782－783.

（编辑　龙　亮）