论著

文章编号:1000-5404(2007)22-2128-03

HBV整合引起HepG2细胞microRNA表达谱变化分析

韩俊峰[1],阮志华[2],张 蓓[1],吴玉章[1] (第三军医大学:[1]基础医学部全军免疫学研究所,[2]西南医院肿瘤科,重庆 400038)

提 要:目的 分析HBV整合后引起的肝细胞microRNA表达谱的变化情况。**方法** 利用microRNA芯片,以稳定表达HBV的HepG2.2.15细胞为HBV感染模型,以HepG2细胞为对照,分析二者microRNA表达谱的异同,得到因HBV感染而产生变化的microRNA;并用定量PCR技术来验证结果的可靠性。**结果** 通过microRNA芯片分析和定量PCR验证,HBV感染后可使hsa-miR-30a-5p、hsa-miR-24、hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7f和hsa-miR-23b 6种microRNA下调,使hsa-miR-194、hsa-miR-200a和hsa-miR-345 3种microRNA上调。**结论** HBV整合后,可引起肝脏细胞microRNA表达谱变化。

关键词:microRNA芯片;HBV;microRNA

中图法分类号:R322.47;R394.3;R512.620.2 **文献标识码**:A

Differential microRNA expression profile of HepG2 cells induced by HBV integration

HAN Jun-feng[1], RUAN Zhi-hua[2], ZHANG Bei[1], WU Yu-zhang[1] ([1]Institute of Immunology, College of Medicine, [2]Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the differential expressions of microRNA after HBV integration. Methods A human microRNA microarray was used to analyze the microRNA expression profile in HepG2.2.15 cell line, a novel model of HBV infection. HepG2 cells served as a mock control. Then the microRNA with differential expression were proved using real-time PCR. Results HBV infection induced 6 microRNA down-regulated (hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-24, hsa-let-7a, hsa-let-7c, hsa-let-7f and hsa-miR-23b) and 3 microRNA up-regulated (hsa-miR-194, hsa-miR-200a and hsa-miR-345). Conclusion HBV integration can induce the changes of microRNA expression profile in hepatocytes.

Key words: microRNA microarray; HBV; microRNA.

microRNA是一类21~23 nt长的非编码单链小分子RNA,是由pri-RNA分子经过剪切形成的70~90个碱基大小、具有发卡结构单链RNA的前体(pre-miRNA),再经Dicer酶加工生成[1]。microRNA广泛存在于真核生物中,迄今为止在人体中已经发现了数百种microRNA分子。microRNA通过与mRNA的3′端非编码区相互作用,在基因表达调控中发挥重要作用。研究表明,人类基因中至少有1/3受到microRNA的调控[2]。最近研究表明,许多病毒感染宿主细胞后,可使宿主细胞中的microRNA表达谱发生变化,达到调控宿主细胞内基因表达的目的,使宿主细胞内环境更有利于病毒的繁殖、复制[3]。但HBV感染后,肝细胞内microRNA发生的变化还不是很清楚。本研究借助于人microRNA芯片技术,探讨HBV感染引起的肝细胞microRNA表达谱变化情况,为进一步阐明乙型肝炎的致病机制及其防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

HepG2细胞和HepG2.2.15细胞均购自ATCC,HepG2.2.15细胞是在HepG2细胞的基因组中整合了完整的HBV基因组,能持续转录和翻译HBV基因,产生病毒抗原和病毒颗粒。HepG2.2.15、HepG2细胞培养选用含10%胎牛血清(HyClone)和RPMI1640培养液(Gibco)。HepG2.2.15细胞选用含相同血清浓度的培养液,另外加入终浓度为380 μg/ml的G418(Sigma)。上述两种细胞均在37 ℃含5% CO_2的孵箱中培养。

1.2 细胞总RNA的提取

按照Trizol(Invitrogen)说明书,提取对数生长期的HepG2细胞和HepG2.2.15细胞的总RNA。紫外分光光度计测定吸光度值$D(260)$和$D(280)$,对总RNA进行定量;并计算$D(260)/D(280)$值,结合甲醛变性凝胶电泳,分析RNA质量。

基金项目:国家自然科学基金青年基金(30400385)
Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars(30400385)

作者简介:韩俊峰(1978-),男,山东省济宁市人,博士研究生,讲师,主要从事乙型肝炎发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68752236

通讯作者:吴玉章,电话:(023)68752236,E-mail:wuyuzhang@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-09-24;**修回日期**:2007-10-18

1.3　芯片分析差异表达的 microRNA

本实验中采用丹麦 Exiqon 公司的 8.1 版 microRNA 芯片。该芯片采用基于 Exiqon 专利技术的含锁定核苷酸（locked nucleic acids，LNA）捕获探针，可极大增强探针与互补的靶 DNA 或 RNA 的亲和活力，能够高灵敏、高特异性的检测 microRNA 的表达，能准确检测样品中所有 microRNA 的表达水平[4]。同时，每张芯片对同一样品重复 4 次检测，进一步提高了芯片的可靠性。Exiqon 公司的 microRNA 芯片附着有 1 500 个 microRNA 精确配对的探针、对照探针以及错配探针，可以检测 Sanger miRBase 数据库 8.1 版中所有人、小鼠、大鼠和其他物种的 microRNA。本实验中，我们以稳定表达 HBV 的 HepG2.2.15 细胞作为实验组，以 HepG2 细胞作为对照组，分别取 5 μg 总 RNA，利用 miRCURYTM Array Labelling kit（Ambion）标记 Cy3 荧光，然后进行芯片杂交，杂交后的芯片使用 Genepix 4000B 进行图像扫描，采用 Genepix Pro 6.0 软件进行数据分析，以芯片中的内对照荧光值为参照，分别计算实验组和对照组标准值。

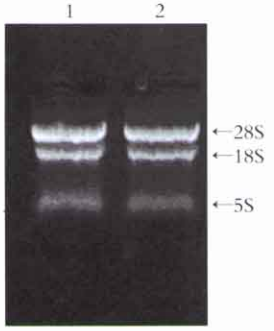
1.4　定量 PCR 验证差异表达的 microRNA

为了进一步验证芯片结果的可靠性，利用 miR-qRT-PCR 定量 PCR 试剂盒（Applied Biosystems），以 U6 作为内参照，对差异表达的 microRNA 分子进行实时定量 PCR 验证。实验中所用引物均由 Applied Biosystems 公司提供，整个反应参照试剂盒说明书进行。逆转录反应：取总 RNA 2 ng 为初始模板，反应体系为 10 μl；反应条件：37 ℃ 1 h。定量 PCR 反应：取 2 μl 逆转录产物为模板，反应体系为 20 μl，每个检测指标做 2 个复孔；反应条件为：95 ℃，2 min；95 ℃，15 s；60 ℃，30 s；40 个循环。最终所得数据用 2-ΔΔCT 公式分析[5]，判定待检分子的上调、下调及其幅度。

2　结果

2.1　细胞总 RNA 质量检测

为了检测 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞的总 RNA 能否满足后续芯片实验的需要，我们通过紫外分光光度计测定 $D(260)/D(280)$ 值，观察甲醛变性电泳带型来分析总 RNA 质量。紫外分光光度计检测结果表明，HepG2 细胞总 RNA $D(260)/D(280)$ 值为 1.86，HepG2.2.15 细胞总 RNA $D(260)/D(280)$ 值为 1.8；电泳结果提示 18S 和 28S 条带均清晰可见，且亮度比为 1∶2（图 1）。因此，实验结果均提示来自 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞的总 RNA 有较好的质量，能满足 microRNA 后续芯片实验的需要。

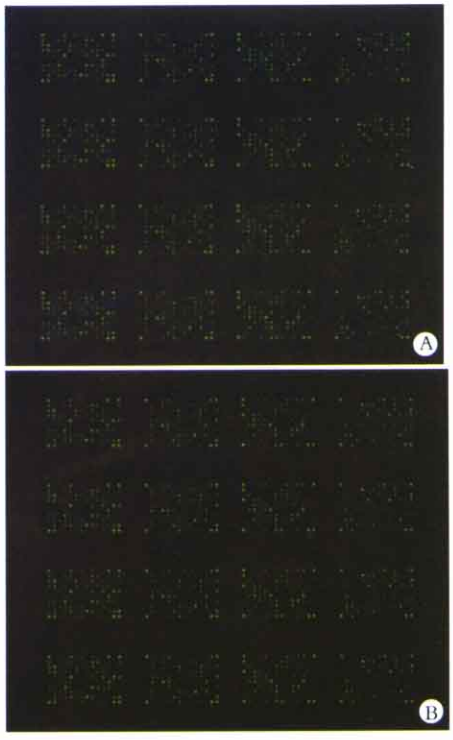


1：HepG2 细胞；2：HepG2.2.15 细胞

图 1　HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞的总 RNA 电泳图

2.2　芯片检测结果

来自 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞的总 RNA 经 Cy3 荧光标记后，同 microRNA 芯片进行杂交。使用 Genepix 4000B 对杂交后的芯片进行图像扫描，结果如图 2 所示。通过 Genepix Pro 6.0 分析所得数据，我们得到上调或下调超过 2 倍的显著差异表达的 microRNA：其中显著上调 microRNA 分子有 3 个，分别为 hsa-miR-194、hsa-miR-200a 和 hsa-miR-345；显著下调的 microRNA 分子有 6 个，分别为 hsa-miR-30a-5p、hsa-miR-24、hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7f 和 hsa-miR-23b。



A：HepG2 细胞；B：HepG2.2.15 细胞

图 2　Cy3 标记的总 RNA 与 microRNA 芯片杂交图

2.3　定量 PCR 分析

分别以来自 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞的 cDNA 分子为模板，利用 miR-qRT-PCR 定量 PCR 试剂盒，进行 Taqman 探针荧光定量 PCR。结果见表 1，提示定量 PCR 结果与芯片结果趋势一致，表明芯片结果是可靠的。

表 1　定量 PCR 检测差异表达的 microRNA

microRNA 分子		芯片结果	定量 PCR 结果
上调的 microRNA	hsa-miR-194	2.0	5.0
	hsa-miR-200a	2.8	10.6
	hsa-miR-345	2.0	6.1
下调的 microRNA	hsa-miR-30a-5p	2.0	2.2
	hsa-miR-24	2.1	5.5
	hsa-let-7a	3.4	4.9
	hsa-let-7c	3.0	4.0
	hsa-let-7f	2.2	3.2
	hsa-miR-23b	2.0	4.7

芯片结果为实验组标准值/对照组标准值；定量 PCR 结果通过 2-ΔΔCT 公式计算得到

3 讨论

microRNA是一类非编码的小RNA分子，有5′端磷酸基和3′端羟基，定位于RNA前体的3′端或5′端。自第1个microRNA（lin-4和let-7）分子在线虫中被发现[6]以来，迄今为止已在包括人类、果蝇、植物等多种生物物种中鉴别出超过3 500种microRNA分子[7]。目前越来越多的研究表明，microRNA通过与靶基因的相互作用，调控着人类至少1/3基因的表达，在生理和病理过程中均具有重要作用[2]。

有研究者推测包括病毒在内的一些感染性疾病，可能通过改变宿主细胞内的特定microRNA的表达，进而调控宿主细胞中特定基因的表达，使宿主细胞内环境更有利于病毒的复制、传播，有利于病毒逃逸宿主的免疫系统[3]。例如，在HIV感染HeLa细胞的实验中发现，HIV病毒感染可以使HeLa细胞的hsa-microRNA表达谱发生改变，可以使hsa-miR-193、hsa-miR-148b、hsa-miR-16、hsa-miR-221等多种microRNA下调，使有利于HIV病毒在HeLa细胞内生存的基因表达上调[8]。因此，从某种程度上讲，探索病毒与宿主细胞的相互作用，研究病毒感染对宿主细胞microRNA表达谱的影响，有利于阐明病毒感染性疾病的致病机制，对这类疾病的防治也具有指导意义。

HBV能否通过影响肝细胞内microRNA分子的表达，进而达到控制肝细胞内特定基因表达的目的，目前还不清楚。在本研究中，我们借助于Exiqon公司8.1版的microRNA微阵列芯片，以整合HBV全基因组、能分泌HBV病毒颗粒的HepG2.2.15细胞作为HBV感染的细胞模型，分析HBV感染引起的肝细胞microRNA表达谱的变化，结果表明，HBV感染能引起肝细胞内microRNA表达谱发生改变，能引起hsa-miR-30a-5p、hsa-miR-24、hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7f和hsa-miR-23b 6种microRNA显著下调，使hsa-miR-194、hsa-miR-200a和hsa-miR-345 3种microRNA显著上调。我们通过荧光定量PCR对上述结果进行进一步验证，也到相同的结论。在后续的实验中，我们将进一步验证在乙型肝炎患者的肝脏标本中是否也有类似microRNA的变化情况；在此基础之上，借助于生物信息学工具，预测这些差异表达microRNA的靶基因，并进行验证，以期阐明这些差异表达的microRNA在HBV致病过程中的作用。

参考文献：

[1] Bartel D P. microRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[2] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.

[3] Qi P, Han J X, Lu Y Q, *et al*. Virus-encoded microRNAs: future therapeutic targets? [J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(6): 411-419.

[4] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, *et al*. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)[J]. RNA, 2006, 12(5): 913-920.

[5] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[6] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.

[7] Griffiths-Jones S, Grocock R J, van-Dongen S, *et al*. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Database issue): D140-D144.

[8] 孙建国，廖荣霞，陈正堂，等. 小鼠肝脏特异的微RNA在HeLa细胞中的转染与表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(3)：196-199.

（编辑 栾 嘉）

（上接2127页）

似，实验室病原学诊断对组织胞浆菌菌体与黑热病利杜体形态不易鉴别，常致误诊。因此对不明原因发热、肝脾肿大、三系降低、抗生素治疗无效的患者，在除外常见病的基础上，应当考虑本病的可能，进而行骨髓涂片检查。由于该病患者的骨髓真菌培养阳性率不高，因此仔细检查首次涂片显得尤为重要，对骨髓片要反复仔细寻找组织胞浆菌孢子及典型表现，避免延误病情。

治疗上主要是抗真菌治疗，两性霉素B、氟康唑、伊曲康唑等都是治疗本病的有效药物，鉴于两性霉素B的毒副作用大，本例予以氟康唑与大蒜素联合治疗亦起到了较好的疗效。大多数患者抗真菌治疗7 d后，体温即可下降，肝功等出现好转；若患者予抗真菌治疗7 d后，症状缓解不明显，可将氟康唑换用伊曲康唑抗真菌治疗也能起到较好的疗效。抗真菌治疗的疗程较长，本例患者给予氟康唑400 mg/d静脉滴注，抗真菌治疗20 d后，改为口服三维康200 mg/d，口服2个月后停药，患者症状完全缓解，实验室指标正常，病情未反复，故抗真菌治疗疗程一定要足够，一般为2~3个月。

关键词： 播散型；组织；胞浆菌病

中图法分类号： R519.8 **文献标识码：** B

参考文献：

[1] 陈建斌，韩 凤，潘 建，等. 7例播散型组织胞浆菌病临床分析[J]. 重庆医科大学学报，2005，30(2)：318-319

[2] 任在跃，吴 涛，刘爱民，等. 播散型组织胞浆菌病1例[J]. 西部医学，2004，16(3)：211.

（编辑 栾 嘉）