论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0044-05

筛选调节 HBV 增殖和 HBsAg 产生的宿主细胞的 miRNA

章广玲[1,2],王梅梅[1],朱丽华[1,2],熊亚南[1],李怡璇[2],刘 民[2],汤 华[2],袁丽杰[1] (063000 河北 唐山,河北联合大学基础医学院病原生物学教研室[1];300070 天津,天津医科大学天津市生命科学中心实验室[2])

[摘要] **目的** 筛选调节乙型肝炎病毒(HBV)增殖和乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)产生的宿主细胞的 miRNA。**方法** 用328种 miRNA 的反义链转染 HepG2 2.2.15 细胞,72 h 收获上清,MTS 检测细胞的增殖活性,ELISA 检测表面抗原和 e 抗原的表达水平,实时定量 PCR 检测其中 HBV DNA 的拷贝数。构建筛选到的 miRNA 的过表达载体,转染 HepG2 2.2.15 细胞,也分别用 MTS、ELISA 和实时定量 PCR 进行检测。**结果** miR-199a-3pASO、miR-210ASO 和 miR-185ASO 促进了 HBsAg 产生和 HBV 增殖($P<0.05$);miR-199a-3p、miR-210、miR-185 的过表达,分别抑制了 HBsAg 的产生和 HBV 的增殖($P<0.05$);miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的 ASO 转染组与对照组相比,分别降低了细胞内 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的表达水平($P<0.05$);miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的过表达载体转染组与对照组相比,分别增加了细胞内 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的表达水平($P<0.05$)。**结论** 在没有对细胞的增殖活性产生影响的情况下,miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 抑制了 HBV 表面抗原的产生和 HBV 的增殖,miRNA 作为病毒与宿主细胞相互作用中的调节因子,在 HBV 的生命活动周期中具有重要作用。

[关键词] miRNA;乙型肝炎病毒;乙型肝炎病毒表面抗原

[中图法分类号] R392-33;R373.21;R392.2 [文献标志码] A

Screening host cell miRNA regulating HBV proliferation and HBsAg expression

Zhang Guangling[1,2], Wang Meimei[1], Zhu Lihua[1,2], Xiong Yanan[1], Li Yixuan[2], Liu Min[2], Tang Hua[2], Yuan Lijie[1] ([1]Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medicine, Hebei United University, Tangshan, Hebei Province, 063000; [2]Tianjin Central Laboratory of Life Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China)

[**Abstract**] **Objective** To screen out miRNAs that regulate HBsAg expression, HBeAg expression and proliferation of HBV in HepG2 2.2.15 cells, and to provide evidences for interaction between host cell's miRNAs and HBV. **Methods** Three hundred and twenty eight antisense oligonucleotides of miRNAs were used to inhibit expressions of endogenous miRNAs. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time PCR were performed on culture supernatant, which was harvested from HepG2 2.2.15 cells at 72 h after transfection with miRNA ASOs, to detect expressions of HBsAg and HBeAg and copy number of HBV DNA, respectively. Cell proliferation assay (MTS) was used at the same time. **Results** Three miRNAs, including miR-199a-3pASO, miR-210ASO and miR-185ASO, promoted HBsAg expression and HBV proliferation ($P<0.05$). Overexpression of miR-199a-3p, miR-210 and miR-185 inhibited HBsAg expression and HBV proliferation ($P<0.05$). Compared with those of the control group, HepG2 2.2.15 cells transfected with miR-199a-3pASO, miR-210ASO and miR-185ASO showed a decreased level of miR-199a-3p, miR-210 and miR-185, respectively ($P<0.05$). Cells transfected with miR-199a-3p, miR-210 and miR-185 showed an increased levels of miR-199a-3p, miR-210 and miR-185 compared with those of the control group ($P<0.05$). **Conclusion** miR-199a-3p, miR-210 and miR-185 inhibit HBsAg expression and HBV proliferation without inhibition of cell proliferation. miRNA, which regulates the interaction between host cell's miRNAs and HBV replication, plays an important role in HBV proliferation.

[**Key words**] miRNA; hepatitis B virus; hepatitis B surface antigen

Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin (09JCZDJC17500). Corresponding author: Tang Hua, Tel: 86-22-23542503

[基金项目] 天津市自然科学基金(09JCZDJC17500)

[通信作者] 汤 华,电话:(022)23542503

细胞微小 RNA(microRNA, miRNA)的发现不仅影响了生物学方面的研究,而且揭示了一个崭新的转录后基因调节机制[1]。到目前为止,已经确定了几个人类致病性病毒编码的 miRNA 的潜在功能[2-3],而人类的 miRNA 可能对病毒的进化和组织亲嗜性有所影响[4-5]。对 miRNA 功能越来越多的了解,为理解病毒感染机制,以及病毒如何建立潜伏感染,逃避宿主天然免疫和适应性免疫,提供了新的视野。在病毒感染过程中,miRNA 功能的研究可能也会为治疗病毒诱导的疾病提出新的治疗方法。为此,我们用 328 种 miRNA 的反义链转染 HepG2 2.2.15 细胞,筛选影响 HBV 的增殖和表面抗原产生的人类 miRNA, 为研究 HBV 和 miRNA 之间的相互作用及作用机制奠定初步的实验依据,为今后开发抗 HBV 增殖的药物或手段奠定新的分子基础或靶位点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞系

脂质体 Oligofectamine Reagent 和 Lipofectamine 2000 转染试剂和无血清培养基 Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司;各种限制性内切酶和 T_4 DNA 连接酶以及 PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司;Trizol 购自上海生工生物工程技术服务有限公司;小量质粒抽提试剂盒、胶回收纯化试剂盒购自 Omega 公司;大量提取质粒 DNA 用 Qiagen 的 Tip-100 试剂盒;MTS(Sigma,美国);miRNAs ASO 由美国 Sigma 公司合成;HepG2 2.2.15 细胞由天津医科大学生命科学中心实验室提供;质粒 pcDNA3.1(+)由天津医科大学生命科学中心实验室提供。

1.2 HepG2 2.2.15 细胞培养及 miRNAs 反义链、miRNA 过表达质粒转染

HepG2 2.2.15 细胞的培养基为含 20% FBS、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 MEM-α,细胞于 37 ℃,5% CO_2 的细胞培养箱中生长。转染前 1 d,胰酶消化细胞并计数(8 000 ~ 11 000)/100 μl 每孔铺板。分别取 miRNAs 反义链(ASO)和 LacZ 或者 miRNA 的过表达载体及对照,分别按 Invitrogen 公司 Oligofectamine Reagent 和 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书配制转染试剂/DNA 混合液。按每孔 0.3 μl Oligofectamine Reagent 试剂、30 pmol ASO 或者 0.3 μg 质粒及 90 μl 无血清培养基 Opti-MEM 配制,混匀后加入 96 孔板中,置 37 ℃、5 % CO_2 孵箱中培养 72 h。实验在同等条件下重复 3 次。

1.3 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 过表达质粒的构建

在 Rfam 上查到 miR-199a-3p、miR-210、miR-185 前体序列,以及在人类基因组上的编码位点,通过 NCBI 提供的 GenBank 数据库在线检索上述 3 个 miRNA 前体所在基因组的基因序列,下载后用 Primer Premier 5 引物分析设计软件,设计特异性的引物。见表 1。

表 1 扩增 miR-199a-3p、miR-210、miR-185 前体序列的引物

miRNA	基因位点	引物序列	产物长度(bp)
miR-199a-3p	19: 10789102 - 10789172 [-]	上游 5′-GAGATCTTGAGCCCAGAAGCCACGATC-3′ 下游 5′-CGGAATTCGCCACCCTCTTAGATGCC-3′	611
miR-210	11: 558089 - 558198 [-]	上游 5′-GGAGATCTGACCAGGTCATTTGCATAC-3′ 下游 5′-GGGAATTCGATATGACCACACCTGTG-3′	440
miR-185	22: 18400662 - 18400743 [+]	上游 5′-CGGGATCCAAAAGGACAAGGACT-3′ 下游 5′-GGAATTCTACACGTAGGACAGACAG-3′	582

以 HEK293 细胞的基因组为模板,常规 PCR,扩增 miRNA 的前体序列。酶切后连入 pcDNA3.1(+)。分别命名为 pcDNA3.1(+)/pri-miR-199a-3p、pcDNA3.1(+)/pri-miR-210、pcDNA3.1(+)/pri-miR-185。

1.4 MTS

分别转染 328 种人类细胞的 miRNA ASO,转染后 72 h,吸出上清后,每孔加入培养液 100 μl,每孔加 MTS 20 μl(MTS:PMS 为19:1),置 37 ℃ 5% CO_2 孵箱继续培养 2 h。取出培养板,UQuant 分光光度计测波长为 490 nm 和 630 nm 的各孔光密度值[D(490) 和 D(630)]。将[实验孔 D(490) - 空白孔 D(490)]/[LacZ 孔 D(490) - 空白孔 D(490)]作为标准化后的数据。

1.5 ELISA

分别转染 328 种人类细胞的 miRNA ASO,转染后 72 h,吸出上清后,按照试剂盒的说明书进行操作。结果用酶标仪 UQuant 分光光度计测波长为 450 nm 和 630 nm 的各孔光密度值。将[实验孔 D(450) - 空白孔 D(450)]/[LacZ 孔 D(450) - 空白孔 D(450)]作为标准化后的数据。

1.6 Real-time PCR

转染后 72 h,吸出的上清按照 Diagnostic Kit for Quantification of Hepatitis B virus DNA (PCR-Fluorescence Probing)试剂盒的说明书进行操作,数据的收集由 ABI 7500 定量 PCR 仪自带软件完成。通过软件可以计算出所有标准品和样本的阈值循环(Ct),并且根据标准品 Ct 值绘制出标准曲线,由标准曲线计算出样品的起始拷贝数 $Co = 10^{(Ct-Intercept)/slope}$。同时,检测 miRNA ASO 或者 miRNA 过表达载体转染后该细胞中该 miRNA 的表达水平。

1.7 统计学方法

数据均以对照组为 1 进行标准化,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。标准化后的数据应用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185ASO 分别促进 HBV 的增殖和 HBsAg 的产生

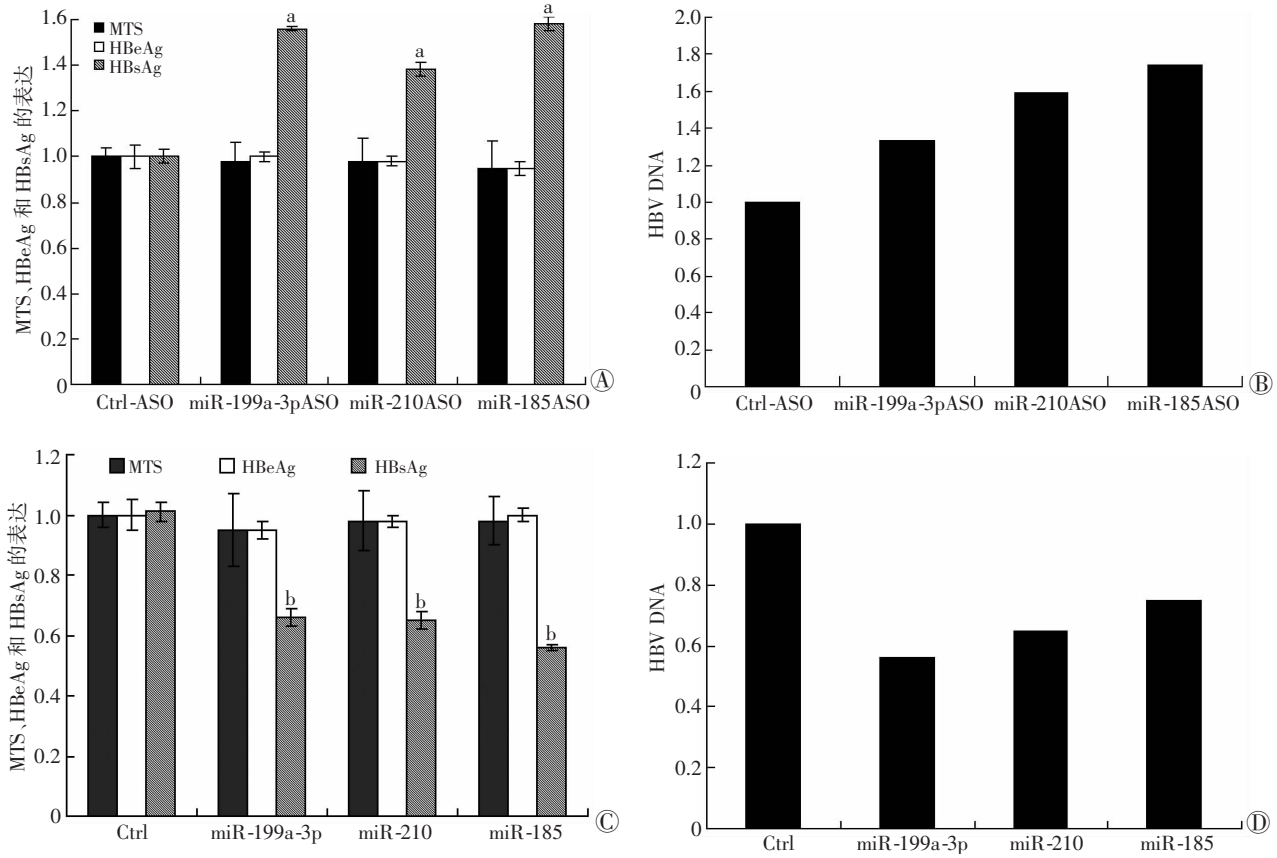
为了筛选调节 HBV 增殖的人类细胞的 miRNA,该研究分别将 328 种人类细胞的 miRNA ASO 转染 HepG2 2.2.15 细胞,经 MTS 和 ELISA 检测,其中 miR-199a-3pASO、miR-210ASO 和 miR-185ASO 促进了 HBsAg 产生和 HBV 增殖。实验筛选的结果没有发现对细胞的增殖和 HBeAg 产生有明显影响的miRNA。见图 1A、B。

2.2 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 分别过表达抑制 HBV 的增殖和 HBsAg 的产生

通过分别转染 328 种人类细胞的 miRNA ASO，筛选到 miR-199a-3pASO、miR-210ASO 和 miR-185ASO 促进了 HBsAg 产生和 HBV 增殖。为了进一步验证 2.1 中筛选到的 3 个 miRNA 对乙型肝炎病毒增殖的调节作用，分别构建了 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 过表达载体，转染 HepG2 2.2.15 细胞后，MTS 检测细胞的增殖活性，ELISA 检测转染后培养上清中 HBsAg 和 HBeAg 的表达水平，Real-time PCR 检测转染后上清中 HBV DNA 的拷贝数。结果 miR-199a-3p、miR-210、miR-185 的过表达，分别抑制了 HBsAg 的产生和 HBV 的增殖。见图 1C、D。

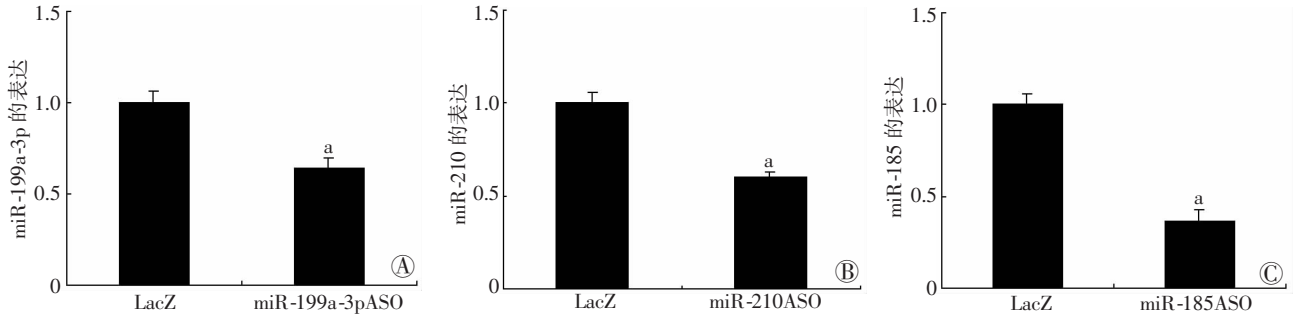
2.3 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的 ASO 分别降低细胞内 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的表达水平

miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 在肝脏肿瘤组织中均有高水平的表达（http://vita.mbc.nctu.edu.tw/mirna_tissue.php）。miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的 ASO 与对照组分别转染 HepG2 2.2.15 细胞，转染后 72 h，提取细胞总 RNA，Real-time PCR 检测 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的水平。实时定量 PCR 结果显示，miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的 ASO 转染组与对照组相比，分别降低了细胞内 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的表达水平。见图 2。



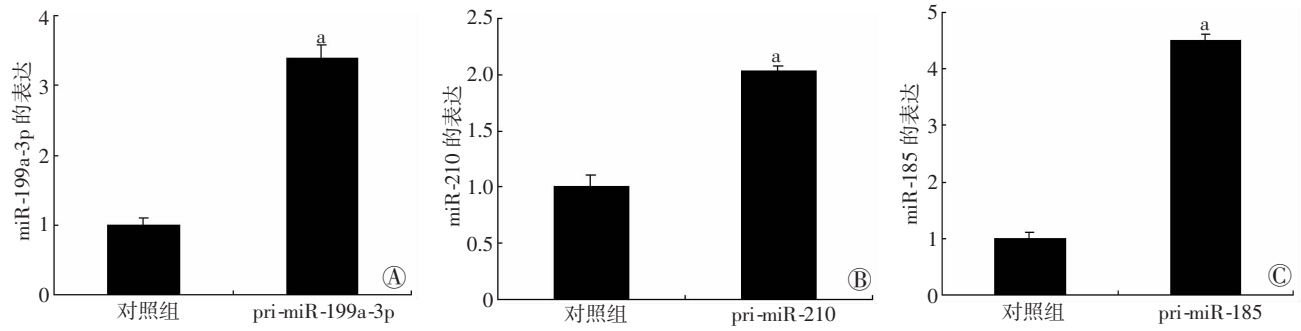
A：ASO 转染后 ELISA 和 MTS 结果；B：ASO 转染后 Real-time PCR 结果；C：过表达后 ELISA 和 MTS 结果；D：过表达后 Real-time PCR 结果　a：$P<0.05$，与 Ctrl-ASO 组比较；b：$P<0.05$，与 Ctrl 组比较

图 1　miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 对 HBV 增殖和 HBsAg 产生的影响



a：$P<0.05$，与 LacZ 对照组比较

图 2　miR-199a-3p（A）、miR-210（B）和 miR-185（C）的 ASO 转染组与对照组的实时定量 PCR 结果



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 miR-199a-3p(A)、miR-210(B)和 miR-185(C)的过表达载体转染组与对照组的实时定量 PCR 结果

2.4 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的过表达分别增加细胞内 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的表达水平

pcDNA3.1(+)/pri-miR-199a-3p, pcDNA3.1(+)/pri-miR-210、pcDNA3.1(+)/pri-miR-185 与对照组分别转染 HepG2 2.2.15 细胞,转染后 72 h,提取细胞总 RNA,Real-time PCR 检测 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的水平。实时定量 PCR 结果显示,miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的过表达载体转染组与对照组相比,分别增加了细胞内 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的表达水平。见图 3。

3 讨论

细胞 microRNA 的发现不仅影响了生物学方面的研究,而且揭示了一个崭新的转录后基因调节机制[1]。近几年用系统克隆小 RNA 和计算机的方法,在多种生物系统中发现了数千种 miRNA[6-7]。

EB 病毒(EBV)编码的第 1 个病毒 miRNA 的发现使得 miRNA 的研究进入到一个全新的领域[2,8]。在感染细胞中病毒可能利用 miRNA,影响整套基因从而诱导一个更适合病毒增殖的环境。尤其,一些潜伏感染的病毒,如 EBV[2,8],miRNA 导致原凋亡基因、细胞周期控制基因和免疫调节相关基因的下调导致宿主细胞更不易死亡或不易被免疫系统发现,利于它们的长期潜伏感染。此外,某些人类 miRNA 可以调节病毒的复制,miR32 负向调节 PFV-1 的复制[9],肝组织特异性 miR-122 正向调节 HCV 病毒的复制[5],提示 miRNA 与病毒的相互作用是普遍存在的[10-11]。现已发现多种病毒编码的 miRNA,例如,猿猴空泡病毒(simian virus 40,SV40)编码的 vmiRNA 有效下调一组基因表达[12],逃避宿主细胞的细胞免疫;HSV-1 miR-LAT 通过下调功能上与 TGF-β 通路相连的转化生长因子(transforming growth factor,TGF)β1 和 SMAD3 表达,实施抗凋亡效应[13];而 EBV 编码的 miR-BART2 以及 SV40 编码的 miRNA 也靶定同源的病毒自身的序列导致病毒本身的复制减弱[2];这些提示病毒也利用 miRNA 这一基因调控的基本模式,对宿主和/或病毒基因实施调控,从而影响病毒复制和感染过程。总之,病毒和 miRNA 之间的相互作用及作用机制极其复杂。

HBV 是嗜肝 DNA 病毒,是引起病毒性肝炎的主要病原体之一,引起急慢性乙型肝炎和肝细胞癌,由 HBV 感染而导致的肝硬化和肝细胞癌每年引起约 100 万人的死亡。虽然现在有预防性的疫苗,目前的疫苗生产仍不能满足全部需要,即使能够普遍接种,现有的乙型肝炎患者及带毒者的治疗仍然是一个严重的问题,况且疫苗的推广使用及免疫效果等方面尚存在许多问题,乙型肝炎的治疗至今尚无良策。因此,急需找到治疗这种持续性感染的方法。新近出现的 miRNA,作为一种转录后基因调节机制,提供了一种直接针对序列的特异性的 RNA 降解方式[1]。有研究表明,乙型肝炎病毒核心蛋白编码区域编码一个候选的 miRNA 前体[14],经过网站预测的方法,没有发现与该 miRNA 种子序列互补的细胞的 mRNA,认为该病毒的 miRNA 没有影响细胞基因的表达[14]。这提示我们,miRNA 参与了 HBV 感染过程,那么宿主细胞的 miRNA 是否参与了 HBV 感染过程,在其中又扮演了什么角色? 国内外尚少见相关的报道。为了检测了细胞产生的 miRNA 对乙型肝炎病毒的基因表达和复制的影响,我们用 328 种 miRNA 的反义链转染 HepG2 2.2.15 细胞,72 h 收获上清,MTS 检测细胞的增殖活性,ELISA 检测表面抗原和 e 抗原的表达水平,实时定量 PCR 检测其中 HBV DNA 的拷贝数。结果提示,在 328 中人类细胞编码的 miRNAs 中,miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 抑制了 HBV 的增殖和 HBsAg 产生。同时构建筛选到的 miRNA 的过表达载体,转染 HepG2 2.2.15 细胞,也分别用 MTS,ELISA 和实时定量 PCR 进行检测。验证了 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 对 HBV 的增殖和 HBsAg 产生的抑制作用。究竟这几个 miRNA 通过什么样的机制抑制了病毒的增殖,有待于进一步找到它们的靶基因,并将 miR-199a-3p、miR-210 和 miR-185 的功能与它们各自靶基因功能联系起来。该项研究为理解 HBV 和 miRNA 之间的相互作用及作用机制奠定初步的实验依据,可能为今后开发抗 HBV 增殖的药物或手段提供新的分子基础或靶位点。

参考文献：

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

[2] Cai X, Schafer A, Lu S, *et al*. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed[J]. PLoS Pathog, 2006, 2(3): e23.

[3] Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, *et al*. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5 [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(2): 666-675.

[4] Triboulet R, Mari B, Lin Y L, *et al*. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication[J]. Science, 2007, 315(5818): 1579-1582.

[5] Jopling C L, Yi M, Lancaster A M, *et al*. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liveR-specific MicroRNA[J]. Science, 2005, 309(5740): 1577-1581.

[6] Berezikov E, Guryev V, van-de-Belt J, *et al*. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. Cell, 2005, 120(1): 21-24.

[7] Xie X, Lu J, Kulbokas E J, *et al*. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3′ UTRs by comparison of several mammals[J]. Nature, 2005, 434(7031): 338-345.

[8] Pfeffer S, Zavolan M, Grasser F A, *et al*. Identification of virus-encoded microRNAs[J]. Science, 2004, 304(5671): 734-736.

[9] Lecellier C H, Dunoyer P, Arar K, *et al*. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells[J]. Science, 2005, 308(5721): 557-560.

[10] Sullivan C S, Ganem D. MicroRNAs and viral infection[J]. Mol Cell, 2005, 20(1): 3-7.

[11] Esau C, Davis S, Murray S F, *et al*. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting[J]. Cell Metab, 2006, 3(2): 87-98.

[12] Sullivan C S, Grundhoff A T, Tevethia S, *et al*. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells[J]. Nature, 2005, 435(7042): 682-686.

[13] Gupta A, Gartner J J, Sethupathy P, *et al*. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript[J]. Nature, 2006, 442(7098): 82-85.

[14] Jin W B, Wu F L, Kong D, *et al*. HBV-encoded microRNA candidate and its target[J]. Comput Biol Chem, 2007, 31(2): 124-126.

（**收稿**：2011-07-18；**修回**：2011-10-21）

（编辑　邓强庭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2012)01-0048-01

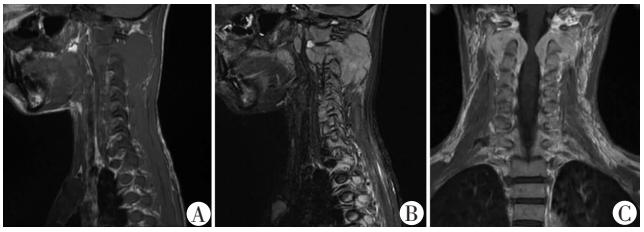
儿童颈部腺泡状横纹肌肉瘤1例

甘　慧，王文献，文　利　（400037 重庆，第三军医大学新桥医院放射科）

［**关键词**］　横纹肌肉瘤；磁共振成像；儿童
［**中图法分类号**］　R738.7　［**文献标志码**］　B

1　临床资料

患者，男性，14岁。因颈部外伤后颈部疼痛、活动受限3周于2011年5月21日入我院。查体：颈部僵直，压痛，颈部屈伸、旋转、侧屈活动受限，伴疼痛，双上肢肌力、肌张力正常，皮肤感觉及血运未见明显异常。外院X线片：寰枢椎向前脱位，颈椎生理曲度变直。入院后1周行物理治疗（颌枕带牵引），颈部疼痛有所缓解。颈椎MRI平扫及增强扫描示：颈2、3椎体后缘欠连续，平扫齿状突信号略显不均匀。颈2～4椎体平面椎体、附件旁及周围软组织内见不规则形片状异常信号，T_1WI呈低信号，T_2WI呈高信号，信号欠均匀，范围约5.3 cm×5.0 cm，边界欠清，与椎管、椎体分界不清，并沿椎间孔走行，向椎管内生长，自左右方向压迫颈髓致局部变形，增强扫描病变强化明显、信号较均匀。双侧椎间孔扩大，颈髓左右方向受压、变形，前后方向受压不明显，未见异常强化；颈椎椎体信号未见明显异常强化（图1）。颈后肌肉穿刺活检见弥漫性小细胞浸润，侵犯肌组织，肿瘤细胞呈“圆形”，胞浆偏少，部分呈嗜酸性红染，胞核异型性明显，核分裂易见（图2）。免疫组化染色：MyoD1（－），Desmin（＋），Myogenin（＋），CD99（＋），FLI-1（－），CK（－），Vim（＋）。诊断：（颈后肌肉）小细胞恶性肿瘤，考虑腺泡状横纹肌肉瘤。因患者病情较重，不建议手术，继续颈部制动，并转至肿瘤科化疗，治疗后颈部包块明显缩小，颈部活动受限情况好转。



A：矢状位MRI T_1WI；B：矢状位MRI T_2WI；C：冠状位MRI T_1WI增强扫描

图1　RMS颈椎MRI平扫及增强扫描表现

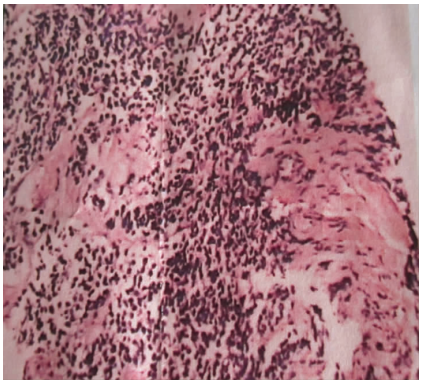


图2　RMS颈部病变穿刺活检病理学变化　（HE ×200）

［**通信作者**］　王文献，E-mail：wwx745866@yahoo.com.cn

（下转53页）