文章编号:1000-5404(2014)24-2455-04

论著

miR-499a在肝癌细胞中的表达及其靶基因的研究

张靖南,曹漪伊,王 丹,吴 婷,熊冬梅,黄爱龙,汤 华 (400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病与分子生物学重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨HBV、miR-499a及CFLAR在肝癌细胞中的关系。**方法** 通过实时定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测miR-499a在有HBV复制的肝癌细胞中的表达;通过Real-time PCR、双荧光素酶报告系统、Western-blot证明CFLAR是否为miR-499a的靶基因。**结果** miR-499a在HepG2.2.15细胞中的表达高于HepG2细胞,在Ad-HBV-HepG2细胞中的表达高于Ad-GFP-HepG2细胞;过表达miR-499a之后在mRNA和蛋白水平发现CFLAR表达降低,抑制miR-499a表达之后在mRNA和蛋白水平发现CFLAR表达升高;miR-499a通过与CFLAR的3'UTR作用来抑制其表达;HBV在mRNA水平降低CFLAR的表达。**结论** 在肝癌细胞中HBV上调miR-499a的表达,CFLAR是miR-499a的靶基因。

[关键词] HBV;miR-499a;CFLAR;HCC
[中图法分类号] R394-33;R394.3;735.7 [文献标志码] A

Expression of miR-499a and its target gene CFLAR in cultured hepatoma cells

Zhang Jingnan, Cao Yiyi, Wang Dan, Wu Ting, Xiong Dongmei, Huang Ailong, Tang Hua (Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the relationship among hepatitis B virus (HBV), miR-499a and CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR) in hepatoma cells. **Methods** Quantitative RT-PCR was used to determine the expression of miR-499a in HepG2.2.15 cells with HBV replication. Quantitative RT-PCR, Western blotting and dual-luciferase reporter assay were performed to investigate whether CFLAR was the target gene of miR-499a. **Results** The miR-499a expression was up-regulated in the HepG2.2.15 cells and the Ad-HBV-HepG2 cells as compared to the control groups, HepG2 cells and Ad-GFP-HepG2 cells, respectively. The qRT-PCR and Western blot analysis revealed that the CFLAR expression at mRNA and protein levels was down-regulated when miR-499a was over-expressed, and was up-regulated when miR-499a expression was inhibited in SMMC7721 cells. MiR-499a inhibited CFLAR expression by specifically targeting its mRNA 3'UTR. **Conclusion** HBV up-regulates miR-499a expression in hepatoma cells, and CFLAR is the target gene of miR-499a.

[**Key words**] hepatitis B virus; miR-499a; CASP8 and FADD-like apoptosis regulator; hepatoma cells

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2010BB5359). Corresponding author: Tang Hua, Tel: 86-23-68486780, E-mail: tanghua86162003@aliyun.com)

肝细胞肝癌(HCC)是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,HBV感染是HCC发生的主要致病因素,但是HBV影响HCC发生、发展的机制尚不是很清楚。microRNA(miRNA)一类长度为20~25个核苷酸,广泛存在于真核生物中的单链非编码小分子RNA,通过与miRNA序列特异性的碱基互补配对调控基因的表达[1]。miRNA表达水平的异常与人类肿瘤密切相关,近年来许多研究证明,miRNA广泛参与细胞发育的各个阶段中,包括细胞的增殖、凋亡和分化等[2-5],有研究证实miR-122,miR-21、miR-101等miRNA与HCC

[基金项目] 重庆市自然科学基金(2010BB5359)
[通信作者] 汤 华,E-mail:tanghua86162003@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1614.025.html(2014-11-06)

的发展密切相关,这些 miRNA 通过与靶基因的结合从而对细胞增殖、侵袭、迁移、细胞周期产生影响进而参与肿瘤的发展过程[6-8]。

CFLAR(CASP8 and FADD-like apoptosis regulator)是一个与 caspase 结构相似的细胞凋亡调节基因,与 caspase-8、caspase-10 相比缺少两个半胱氨酸的残基结构[9],在乳腺癌中将 CFLAR 进行基因敲除之后乳腺癌细胞功能发生改变[10],CFLAR 调节的细胞凋亡可能与转录因子 NF-kappaB 有关[11]。

文献[12-14]报道 HBV 可影响 miRNA 的表达,HBV 又可以通过调节 miRNA 诱导肝癌的发生。基因芯片结果显示多种 miRNA 在 HepG2 与 HepG2.2.15 细胞中有表达差异[15],并且我们发现 miR-499a 在 HepG2.2.15 细胞中的表达高于 HepG2 细胞,但 miR-499a 是否受 HBV 的调控进而在肝癌的发生、发展中起作用尚不清楚。本研究初步探讨了 HBV、miR-499a 与 CFLAR 之间在肝癌细胞中的调控关系,并揭示了 CFLAR 为 miR-499a 的靶基因,为以后深入研究 HBV 通过 miR-499a 途径引起肝癌的发生奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 肝癌细胞系 HepG2、表达 HBV 的 HepG2.2.15 细胞,SMMC-7721 均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Xho* Ⅰ、*Sal* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ,T_4 连接酶等购自 TaKaRa 公司,转染试剂 Lipofectamine 2000™ 购自美国 Lnvitrogen 公司,miRNA cDNA 第一链合成试剂盒和 miRNA qRT-PCR 检测试剂盒购自康为世纪公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 pTARGET-miR-499a:以 HepG2.2.15 细胞基因组 DNA 为模板扩增 miR-499a 基因片段,上游引物:5′-ACGACTCGAGCCCCATCTTCCAGAAGTCAC-3′,下游引物:5′-ATAAAGTCGACGACAGCGGACGAAGTGGGGCT-3′(划线部分为 *Xho* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ位点),PCR 片段与 pTARGET 质粒载体同时用 *Xho* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切处理,将酶切的所得片段纯化与 pTARGET 质粒载体连接构建 pTARGET-miR-499a 质粒。pGL3-control-wt CFLAR:以 HepG2.2.15 细胞基因组 DNA 为模板扩增 CFLAR 的 3'UTR 区域,上游引物:5′-GATCTAGATGAAGAGCCTGGCATACA-3′,下游引物:5′-ACTCTAGAGGAAGAGGAGGATTAGAG-3′(划线部分为 *Xba* Ⅰ位点)。PCR 片段与 pGL3-control 质粒载体用 *Xba* Ⅰ单酶切处理,将酶切的产物连接构建 pGL3-control-wt CFLAR。pGL3-control-mut CFLAR:以 pGL3-control-wt CFLAR 质粒为模板扩增 CFLAR 的 3'UTR 区域突变质粒,上游引物:5′- TAGCAAGCAATGAACAGCGAGCAAACTATTGTTGATA-3′(划线部分为突变位点),下游引物:5′-TATCAACAATAGTTTGCTCGCTGTTCATTGCTTGCTA-3′(划线部分为突变位点)。均由华大基因公司测序,结果正确(结果未显示)。

1.2.2 细胞培养 HepG2 与 HepG2.2.15 细胞采用含有 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)和 1% 的青霉素链霉素的 MEM(Hyclone 公司)中培养,SMMC-7721 细胞采用同样含血清和青霉素链霉素的 1640 培养基(Hyclone 公司)培养,细胞培养为 5% CO_2,37 ℃孵箱。

1.2.3 RNA 干扰 miR-499a 抑制剂序列 5′-AUCACAGACUUGCUGUGAUGUU-3′和 NC 序列 5′-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3′由 Invitrogen 公司设计和合成。

1.2.4 转染、总 RNA 抽提、逆转录和 qRT-PCR 将 HepG2、HepG2.2.15 和 SMMC7721 细胞大约 50% 的密度接种于 6 孔板,12h 之后用 Lipofectamine™2000 (Invitrogen)将 pTARGET,pTARGET-miR-499a 分别转染 SMMC7721 细胞,转染按照试剂 Lipofectamine 2000 kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)说明书操作。6 h 后换液,待细胞转染 48 h 之后,用 TRIzol(Invitrogen)提取总 RNA。用 PrimeScript® RT reagent 试剂盒 (TaKara)逆转录为 cDNA 检测靶基因 CFLAR;用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(康为世纪)逆转录合成加 A cDNA,qRT-PCR 检测 miRNA-499a。所用引物为:CFLAR-F:5′-AGAGTGCTGATGGCAGAGATTGGT-3′, CFLAR-R: 5′-TCTCCAACTCAACCACAAGGTCCA-3′,以 β-actin 为内参,上游引物:5′-CCTTCTACAATGAGCTGCGT-3′;下游引物:5′-CCTGGATAGCAACGTACATG-3′。miR-499a 检测使用下游引物为试剂盒自备的 Reverse primer,上游引物:5′-AACATCACAGCAAGTCTGTGCT-3′。qRT-PCR 实验均使用 IQTM5 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad,USA)进行检测。

1.2.5 Western blot 将细胞接种于培养皿中,转染 48 h 后提取细胞蛋白,PBS 缓冲液清洗 3 次,用 RIPA 强裂解液(以 100∶1 的比例加入 PMSF)处理细胞,冰上摇晃 30 min,13 000 × *g* 离心 30 min,取上清液检测蛋白浓度(BCA 蛋白浓度检测试剂盒,碧云天),取蛋白样品加入 5 × 蛋白上样缓冲液置于沸水中 5 ~ 10 min 使蛋白变性。用 10% SDS-PAGE 蛋白电泳分离蛋白,湿转法转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 ~ 2 h,孵育一抗 CFLAR(1∶500 稀释;Proteintech)、β-actin(1∶5 000 稀释;Bioworld),4 ℃过夜。1 × TBST 洗膜 5 ~ 10 min × 3 次,加入二抗:羊抗兔(1∶5 000;Bioworld),室温孵育 1.5 h,1 × TBST 洗膜 5 min × 3 次。使用 ECL™ 化学发光检测系统 (Pierce, USA)进行检测。

1.2.6 双荧光素酶检测 将 SMMC-7721 细胞接种于 24 孔板,分别共转染 (1)TK(50 ng) + pTARGET(500 ng) + pGL3-control (300 ng);(2) TK(50 ng) + pTARGET-miR-499a(500 ng) + pGL3-control(300 ng);(3) TK(50 ng) + pTARGET(500 ng) + pGL3-control-wt CFLAR(300 ng);(4)TK(50 ng) + pTARGET-miR-499a(500 ng) + pGL3-control-mut CFLAR(300 ng);(5) TK(50 ng) + pTARGET-miR-499a(500 ng) + pGL3-control-wt CFLAR(300 ng)转染 48 h 后,PBS 清洗细胞 3 次,每孔中加入 100 μL 1 × passive lysis buffer (PLB),常温下摇床裂解 20 min,根据说明书使用 Luciferase Assay Reagent Ⅱ and Stop& Glo

Reagent 试剂检测荧光素酶活性。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

数据均来自 3 次独立的重复实验,数据表示为平均值 ± 标准偏差(SD)。通过使用 *t* 检验进行统计分析。

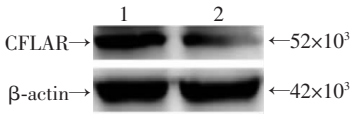
2 结果

2.1 HBV 上调 miR-499a 的表达

我们之前的芯片研究结果显示,在 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中 miR-499a 的表达差异。为了确认该结果,我们用 qRT-PCR 检测了 miR-499a 的表达。结果显示,miR-499a 在 HepG2.2.15细胞(322 ± 93.37)中较 HepG2 细胞(1.001 4 ± 0.06)表达显著升高($P<0.01$),为了进一步验证 HBV 上调 miR-499a 的表达,我们用表达 HBV 的腺病毒感染 HepG2,结果显示,miR-499a 表达在 HBV 感染组 Ad-HBV-HepG2 细胞中(9.34 ± 0.26)较对照组 Ad-GFP-HepG2 细胞中(1.000 5 ± 0.04)表达量显著上调($P<0.01$)。

2.2 miR-499a 的靶基因

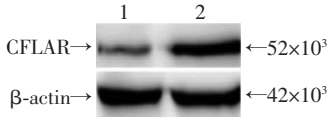
为了进一步探讨 miR-499a 的生物学功能,我们用靶基因预测软件 TargetScan 及 miRand 预测 miR-499a 的靶基因,通过转染 miR-499a 过表达质粒至 SMMC-7721 细胞后对靶基因进行筛选。首先对 miR-499a 过表达效果进行了确认,结果显示 miR-499a 在转染过表达质粒 pTARGET-miR-499a 的细胞中(40.44 ± 4.01)明显高于对照组(1.004 ± 0.11)($P<0.01$),然后通过 Real-time PCR 与 Western blot 对所筛选的靶基因 CFLAR 进行验证,结果显示 CFLAR 在 mRNA 水平(0.18 ± 0.07)和蛋白水平(图 1)较对照组(1.001 ± 0.05)表达明显下降($P<0.01$),表明在肝癌细胞中高表达的 miR-499a 抑制基因 CFLAR 基因的表达。



1:pTARGET;2: pTARGET-miR-499a

图 1 Western blot 检测转染 pTARGET-miR-499a 后 CFLAR 的表达

为了进一步确认 CFLAR 是 miR-499a 的靶基因,我们转染 miR-499a 抑制剂和对照 NC 至 SMMC-7721 细胞中,qRT-PCR 结果显示,miR-499a 抑制剂能显著降低 miR-499a 表达水平(0.25 ± 0.04),对照组(1.004 ± 0.11)($P<0.01$),而靶基因 CFLAR 在 miR-499a 被抑制之后,在 mRNA 水平(2.54 ± 0.17)($P<0.01$)和蛋白水平(图 2)较对照组(1.000 4 ± 0.03)表达明显上升($P<0.01$)。以上结果证明 CFLAR 是 miR-499a 的靶基因。

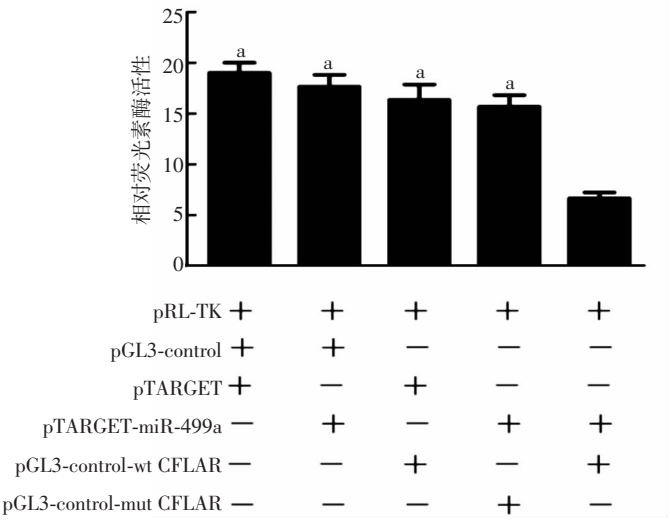


1: NC;2: miR-499a 抑制剂

图 2 Western blot 检测转染 miR-499a 抑制剂后 CFLAR 的表达

2.3 miR-499a 与靶基因 CFLAR 的作用机制

为了进一步探明 miR-499a 作用于靶基因 CFLAR 的机制,我们构建了 CFLAR 的 3'UTR 野生型与突变型质粒,与 miR-499a 过表达质粒 pTARGET-miR-499a 进行共转染至 SMMC-7721 细胞,用双荧光素酶报告系统检测,结果显示,CFLAR 野生型 3'UTR 荧光素酶活性(6.65 ± 0.76)相比于对照组(16.33 ± 1.527)低($P<0.01$),但 CFLAR 突变型 3'UTR 荧光素酶活性(15.43 ± 1.85)与对照组相比较,未见明显降低(图 3),表明 miR-499a 可以通过与 CFLAR 的 3'UTR 作用抑制其表达。



a: $P<0.05$, 与野生型比较

图 3 双荧光素酶报告系统检测 miR-499a 对 CFLAR 的影响

2.4 HBV 与 CFLAR 的关系

HBV 是否通过调节 miR-499a 来影响 CFLAR 的表达? 我们用 Real-time PCR 检测了 HepG2.2.15 和 HepG2 细胞、Ad-HBV-HepG2 和 Ad-GFP-HepG2 细胞中 CFLAR 的表达,发现 CFLAR 在 HepG2.2.15 细胞中(0.34 ± 0.02)比对照组 HepG2 细胞(1.001 ± 0.03)中表达低($P<0.01$),CFLAR 在 Ad-HBV-HepG2 细胞中(0.57 ± 0.05)比对照组 Ad-GFP-HepG2 细胞中(1.009 ± 0.16)中表达低($P<0.05$)。表明 HBV 可以通过上调 miR-499a 来降低其靶基因 CFLAR 的表达。

3 讨论

miRNA 通过调控相关基因的表达广泛参与机体生长、发育等生物学过程。miRNA 和人类疾病之间有密切联系,越来越多的研究表明,miRNA 是肿瘤发生的重要因素之一,有研究表明一些 miRNA 如 miR-145,miR-143 在直肠癌中表达下降[16],而另外一些 miRNA 如 miR-17,miR-18 在肺癌中表达升高[17],并且研究发现很多抑癌基因与促癌基因在 miRNA 表达异常的组织中同样有异常的表达[18-19]。由此可见研究 miRNA 与恶性肿瘤发生、发展的分子生物学与遗传学机制有重要的意义。由于 HBV 可以导致肝癌的发生,

HBV 又可以影响 miRNA 的表达[12],说明 HBV 可能通过调控 miRNA 来影响肝癌发生和发展过程。我们发现 HBV 可以上调 miR-499a 的表达,但 HBV 是否通过 miR-499a 途径导致肝癌的发生需要进一步探究。

本实验提出了 CFLAR 是一个 miR-499a 的靶基因,miR-499a 作用于 CFLAR 的 3'UTR 抑制 CFLAR 的表达。HBV 可以上调 miR-499a 的表达,miR-499a 又可以降低靶基 CFLAR 的表达,那么 HBV 能否能通过上调 miR-499a 降低 CFLAR 的表达呢? 我们通过 qRT-PCR 证实了 HBV 可以通过上调 miR-499a 降低 CFLAR 的表达。

miR-499a 在肿瘤疾病的发展中的作用越来越重要,有研究表明 miR-499 在口腔鳞状细胞癌组织中表达下降,扮演着肿瘤抑制因子的角色[20],但我们的实验却发现 HBV 可以上调 miR-499a 的表达,说明 miR-499a 在肝癌中可能是一个促进肿瘤发生的因子。有研究表明 miR-499a 可能导致肝癌患者有一个不良的预后[21],CFLAR 又可以引起乳腺癌细胞功能的改变[10],说明 HBV 可能通过 miR-499a 途径调控 CFLAR 的表达而引起肝癌细胞功能发生改变进一步导致肝癌的发生。这些结果为进一步探索肝癌发病机制提供了新的思路。

本实验提出了 HBV 可以上调 miR-499a 的表达,但是 HBV 具体是通过什么途径上调 miR-499a 还需进一步研究。

参考文献:

[1] Mansueto G, Forzati F, Ferraro A, *et al*. Identification of a new pathway for tumor progression: microRNA-181b up-regulation and CBX7 down-regulation by HMGA1 protein[J]. Genes Cancer, 2010, 1(3): 210-224.

[2] Deng M, Tang H, Zhou Y, *et al*. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 17): 2997-3005.

[3] Feng R, Chen X, Yu Y, *et al*. miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2010, 298(1): 50-63.

[4] Ding L, Xu Y, Zhang W, *et al*. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2[J]. Cell Res, 2010, 20(7): 784-793.

[5] Yan L X, Huang X F, Shao Q, *et al*. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis[J]. RNA, 2008, 14(11): 2348-2360.

[6] Connolly E, Melegari M, Landgraf P, *et al*. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype[J]. Am J Pathol, 2008, 173(3): 856-864.

[7] Tsai W C, Hsu S D, Hsu C S, *et al*. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis[J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2884-2897.

[8] Sheng Y, Ding S, Chen K, *et al*. Functional analysis of miR-101-3p and Rap1b involved in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma pathogenesis[J]. Biochem Cell Biol, 2014, 92(2): 152-162.

[9] Inohara N, Koseki T, Hu Y, *et al*. CLARP, a death effecter domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(20): 10717-10722.

[10] Day T W, Huang S, Safa A R. c-FLIP knockdown induces ligand-independent DR5-, FADD-, caspase-8-, and caspase-9-dependent apoptosis in breast cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(12): 1694-1704.

[11] Li Z, Zhang J, Chen D, *et al*. Casper/c-FLIP is physically and functionally associated with NF-kappaB1 p105[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(4): 980-985.

[12] Lin Z, Flemington E K. miRNAs in the pathogenesis of oncogenic human viruses[J]. Cancer Lett, 2011, 305(2): 186-199.

[13] Xu X, Fan Z, Kang L, *et al*. Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(2): 630-645.

[14] Wang C M, Wang Y, Fan C G, *et al*. miR-29c targets TNFAIP3, inhibits cells proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(3): 586-592.

[15] Zhang Z Z, Liu X, Wang D Q, *et al*. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma at the mRNA level[J]. Word J Gastroenterol, 2011, 17(28): 3353-3358.

[16] Michael M Z, O'Connor S M, van-Holst-Pellekaan N G, *et al*. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia[J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(12): 882-891.

[17] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, *et al*. A polycistronic MicroRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation[J]. Cancer Res, 2005, 65(21): 9628-9632.

[18] Harfe B D. MicroRNAs in vertebrate development[J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(4): 410-415.

[19] Tong A W, Nemunaitis J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2008, 15(6): 341-355.

[20] Hou Y Y, Lee J H, Chen H C, *et al*. The association between miR-499a polymorphism and oral squamous cell carcinoma progression[J]. Oral Dis, 2014, [Epub ahead of print].

[21] Ma Y, Wang R, Zhang J, *et al*. Identification of miR-423 and miR-499 polymorphisms on affecting the risk of hepatocellular carcinoma in a large-scale population[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2014, 18(7): 516-524.

(收稿:2014-07-08;修回:2014-10-15)

(编辑 邓强庭)