

# 人肝脏特异性 miR-122 表达载体的构建及鉴定

黄增红<sup>1</sup>, 刘长梅<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 中国农业大学生物学院, 北京 100193

<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所分子病毒室, 北京 100101

**摘要:** 人肝脏特异性 miRNA-122 是肝脏中表达丰度最高的 miRNA。为研究该 miR-122 的生物学功能, 从 HepG2 细胞基因组中用 PCR 的方法扩增了 miR-122 的前体, 构建了 miR-122 的表达载体 pLMP-miR-122。pLMP-miR-122 质粒转染人正常肝细胞系 L-O2 和肝癌细胞系 HepG2 后, 细胞内成熟 miRNA-122 的表达量显著增加。该质粒与 HBV1.3 共转染 HepG2 细胞 72 h 后, HBV 的 HBs 和 HBe 蛋白水平的表达量均下降, 说明 miRNA-122 参与了 HBV 基因的复制和表达的调控, 为进一步研究 miRNA-122 的功能和其他一些肝病如 HCC 的调控机制打下基础。

**关键词:** miRNA, miR-122, pLMP 质粒, HBV

## Construction and identification of the human liver-specific miR-122 expression vector

Zenghong Huang<sup>1</sup>, and Changmei Liu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Virus, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** miR-122 is the most abundant miRNA in adult human liver. To study the functions of miR-122 in liver disease, we amplified the precursor of human miR-122 gene by polymerase chain reaction (PCR) from the HepG2 genomic DNA, and then constructed miR-122 expression vector pLMP-miR-122. pLMP-miR-122 could overexpress mature miR-122 when human normal liver cells L-O2 and the hepatoma cells HepG2 were transfected with it. When HepG2 cells were co-transfected with HBV1.3 and pLMP-miR-122, we found that miR-122 could down-regulate the expression of HBs and HBe antigen. These results showed that the human liver specific miR-122 expression vector was constructed successfully, and it could regulate the replication and the expression of HBV genes. The plasmid pLMP-miR-122 will facilitate further studies of the functions of miR-122 in the development of liver virus infection diseases and HCC.

**Keywords:** miRNA, miR-122, pLMP vector, HBV

miRNA (microRNA) 是一类广泛存在于真核生物长度为 21~25nt 的非蛋白质编码小 RNA。它们能以序列特异性方式调节基因表达, 在发育、凋亡、代谢方面都起着不容忽视的作用, 从而受到广泛关注<sup>[1]</sup>, 并且与肿瘤等多种疾病的发生、发展密切相

关<sup>[2,3]</sup>。成熟 miRNA 与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 结合以抑制其翻译或降解其 mRNA, 实现基因表达的转录后调控。miRNA 与靶位点近乎完全配对时会以 RISC (RNA-induced silencing complex, RNA 诱导的沉默复合体) 的方式降解靶基因, 不完全配对时将抑

Received: November 27, 2008; Accepted: January 9, 2009

Corresponding author: Changmei Liu. Tel: +86-10-64807517; E-mail: liuchm@im.ac.cn

制靶基因的翻译<sup>[4]</sup>。

miR-122 是肝脏特异性的,它在肝脏中的表达丰度很高,占肝脏总 miRNA 的 70%以上,其位于 18 号染色体上,定位于 18q21.31.<sup>[5]</sup>。目前发现很多 miRNA 对病毒自身的蛋白合成、释放及机体对病毒的免疫应答有调节作用<sup>[6]</sup>。有研究表明 miR-122 的表达与肝炎病毒复制及肝癌形成存在相关性<sup>[7]</sup>。本研究成功构建了 miR-122 的表达载体,为进一步研究 miR-122 参与的一些基因调控以及肝相关疾病的机理提供了一个很好的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株和细胞

质粒载体 pLMP 由美国 Howard Hughes 医学研究所 Ross A Dickins 惠赠; JM109 细菌菌株、L-O2 细胞和 HepG2 细胞由本实验室保存。

### 1.2 试剂

限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*R I, Solution I 连接酶, ExTaq 酶购自大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒, 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; DMEM 培养基, 胎牛血清购自 Gbico 公司; Trizol 和脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 购自 Invitrogen 公司; ABI TaqMan<sup>®</sup> microRNA assays 购自 ABI 公司; ELISA 试剂盒购自上海科华生物科技有限公司。

### 1.3 miRNA 表达载体的构建

#### 1.3.1 目的片段的扩增

依据 Sanger miRBase 数据库收录的 miRNA 数据, 找到 hsa-miR-122 的成熟序列, 其前体序列 pre-hsa-miR-122, 通过人类基因组 BLAST 数据库找到 pre-hsa-miR-122 的定位, 并且向其两端侧翼序列延伸得到一段序列。根据 pre-miR-122 序列设计引物, 扩增产物的总长度约为 130 bp。上游引物 5'-CCGCTCGAGTTCGTGGCTACAGAGTTT-3', 下游引物 5'-CCGGAATTCTTTATCGAGGGAAGGATT-3', 下划线为酶切位点, 上游引物的酶切位点为 *Xho* I, 下游为 *Eco*R I, 引物由北京奥科生物技术公司合成。用 PCR 的方法从 HepG2 细胞基因组上扩增含有 miR-122 基因的目的片段。PCR 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 59°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳, 按琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书回收目的片段。

#### 1.3.2 表达载体的连接、测序及序列分析

将回收 hsa-miRNA-122 基因的 PCR 产物和载体 pLMP 分别用 *Xho* I 和 *Eco*R I 限制性核酸内切酶进行双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收酶切后的目的片段和载体大片段。于 16°C 连接目的片段和载体, 转化 JM109 感受态细胞, 用菌落 PCR 方法鉴定, 阳性克隆提取质粒酶切鉴定并测序。测序的结果和 miRNA 的前体序列用 Vector NTI 软件及 Align 程序进行序列比对分析。构建成功的质粒载体命名为 pLMP-miR-122。

### 1.4 细胞培养及转染

#### 1.4.1 细胞培养和转染

HepG2 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, L-O2 细胞用 10%胎牛血清的 1640 培养基, 并含有 100  $\mu$ g/mL 链霉素, 100  $\mu$ g/mL 青霉素的双抗, 培养条件为 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培养。转染前 1 天将细胞接入培养板, 24 h 内待细胞生长密度达到 60%~80% 左右即可转染, 参照脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 说明书转染 miRNA 表达载体。

#### 1.4.2 RT-PCR 检测成熟的 hsa-miR-122 的表达量

转染前 1 天, 将 L-O2 细胞和 HepG2 细胞以  $0.7 \times 10^5$  接入 12 孔板, 24 h 内向细胞共转染 LMP 空载体和 pLMP-miR-122 载体, 转染 24 h 后收集细胞, 提取细胞总 RNA, 提取用 Trizol, 操作参考说明书。RNA 的反转录及 Real time PCR 操作按照说明书进行。

#### 1.4.3 ELISA 检测 HBs 和 HBe 抗原的表达量

转染前 1 天, 将 HepG2 细胞以  $0.7 \times 10^5$  接入 12 孔板, 24 h 内向细胞共转染 HBV1.3 和 pLMP-miR-122 载体, 转染 72 h 后收集细胞上清, ELISA 检测 HBs 和 HBe 抗原的表达量, 检测方法参照说明书。

## 2 结果

### 2.1 miR-122 表达载体的酶切鉴定及测序

根据前述方法扩增 miR-122 前体, 图 1 为表达载体构建示意图, 扩增产物与 pLMP 连接后, 阳性克隆用 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切会得到一条大小 100 bp 左右的目的片段, 而空载体酶切只有 1 条带(图 2)。测序结果表明 miR-122 前体正确克隆到 pLMP 中(图 3), 可用于下一步实验。

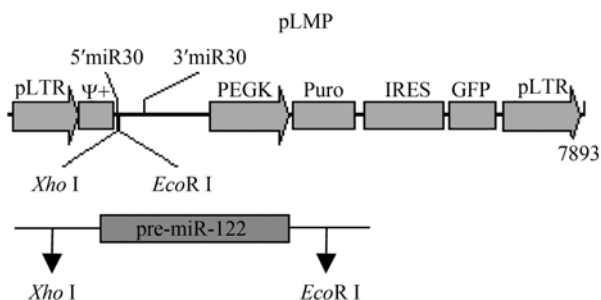


图 1 pLMP-miR-122 的表达载体的构建示意图

Fig. 1 Schematic map of pLMP-miR-122 vector construction.

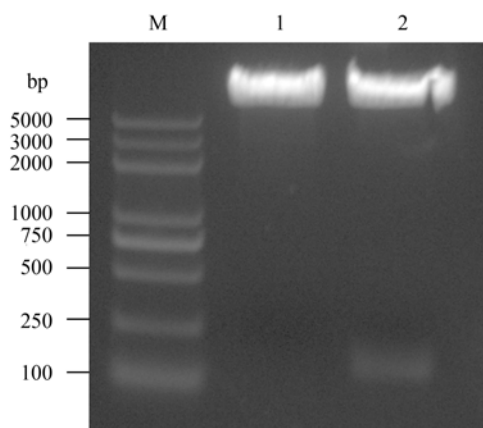


图 2 pLMP-miR-122 的 Xho I 和 EcoR I 的双酶切鉴定

Fig. 2 Map of pLMP-miR-122 digested with *EcoR* I and *Xho* I. M: BM5000; 1: pLMP; 2: pLMP-miR-122.

```

GGGATTACTTCTTCAGGTAAACCAACAGAAG
GCTCGAGTTCGTGGCTACAGAGTTTCCTTAGC
AGAGCTGTGGAGTGTGACAATGGTGTGTTGTGT
CTAAACTATCAAACGCCATTATCACACTAAAT
AGCTACTGCTAGGC AATCCTTCCCTCGATAAA
GAATTCAAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATC
TTGTTTAC

```

图 3 pLMP-miR-122 的部分测序序列

Fig. 3 Partial sequence of pLMP-miR-122.

## 2.2 LMP-miR-122 转染细胞后 miR-122 的表达检测

为了检测 miR-122 在正常肝细胞系和肝癌细胞系中的表达情况, 将 pLMP-miR-122 和 pLMP 空载体分别转染 L-O2 和 HepG2 细胞, 24 h 后收集细胞提取 RNA 做 RT-PCR 检测, 结果显示, 转染 pLMP-miR-122 后, Hep2 细胞中成熟 miR-122 的表达量上升了将近 20 倍, 而在正常肝细胞系 L-O2 中的表达上升了 60 多倍(图 4), 说明构建的载体在正常肝细胞系和肝癌细胞系中均能成功表达成熟的 miR-122。

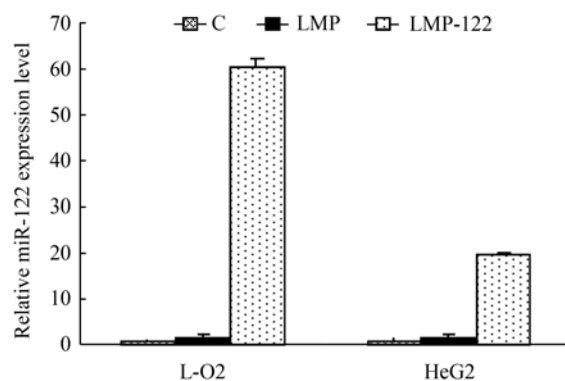


图 4 转染 pLMP-miR-122 后细胞中 miR-122 的表达量

Fig. 4 miR-122 level in cells after transfected with pLMP-miR-122. C: no transfection; LMP: transfection of LMP plasmids; LMP-122: transfection of LMP-miR-122.

## 2.3 ELISA 检测 HBs 和 HBe 抗原的表达水平

为了检测 miR-122 对 HBV 基因表达的影响, 用 pLMP-miR-122 与 HBV1.3 共转染 HepG2 细胞, 对照为空质粒 pLMP, 72 h 后取细胞上清检测 HBs 抗原和 HBe 抗原的表达量。由图 5 可知, 与单独转染 HBV1.3 和空载体 LMP 相比, 转染 LMP-miR-122 组的 HBs 抗原和 HBe 抗原的表达量均下降, 说明 miR-122 参与了 HBV 基因表达的调控。

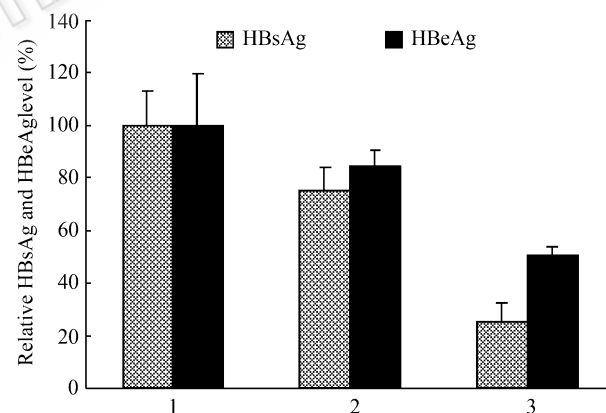


图 5 ELISA 检测 s 抗原和 e 抗原的表达

Fig. 5 ELISA measurements of HBsAg and HBeAg. 1: transfection of HBV1.3 plasmid; 2: co-transfection of HBV1.3 and pLMP plasmids; 3: co-transfection of HBV1.3 and pLMP-miR-122 plasmids.

## 3 讨论

随着分子生物学技术及生物信息学手段的不断发展, 目前, 在人类细胞中已经发现了数百种 miRNA 基因, 但其功能研究还处于起始阶段, 其中只有少数 miRNA 的功能得到了研究, 而绝大部分的

功能尚有待揭示<sup>[8]</sup>。

miR-122 是肝脏特异高表达的 miRNA, 在胎肝中表达量很低, 但在成人的肝细胞中每个细胞表达量达 50 000 拷贝以上<sup>[9]</sup>。研究表明, miR-122 在调控 HCV 病毒复制的过程中起重要作用, 与其他的 miRNA 下调基因的表达相反, miR-122 上调 HCV 的表达, 具体的调控机制目前仍不清楚<sup>[10]</sup>。最新的研究发现, 在 HCV 基因组中找到了 miR-122 的靶序列<sup>[11]</sup>, 这为研究者在 HBV 的研究中提供了一个很好的典范, 但是 miR-122 是如何调控 HBV 基因的复制及表达的, 目前还不清楚。

最近有研究者发现 miR-122 的新靶点: Bcl-w, 一个抗凋亡 Bcl-2 家族的成员, 作用位点位于 Bcl-2 的 3' UTR, 升高 miR-122 能明显抑制 Bcl-w 蛋白的表达, 进而降低细胞活力<sup>[12]</sup>。还发现具有抑制细胞生长活性的 cyclin G1 也是 miR-122 的靶蛋白, 这对于 miRNA 调节细胞周期研究提供了基础<sup>[13]</sup>。miR-122 在肝癌组织中表达下调, 同时在肝癌来源的细胞株中也低表达, 如 HepG2 和 Hep3B 等<sup>[14]</sup>。这些研究结果提示, miR-122 表达下调是在肝癌发生过程中伴随发生的事件, 也可能是肝癌的一个潜在的生物标志<sup>[14]</sup>。但是, miR-122 是在肝癌发生过程中具有直接的作用或只是在肝癌中受到了异常的调节, 还有待深入的研究。慢性乙肝能转为肝硬化, 并进一步转为肝癌, 在这个过程中, 是否有 miRNA 参与基因的调控以及何种 miRNA 的调控起主导作用, 目前还没有报道, 所以寻找 miRNA 靶基因并研究其调控功能, 是目前研究 miRNA 的一个热点, 这也为疾病的分子治疗提供了一个平台。

目前研究 miRNA 的功能一般是通过抑制或过表达这两种手段来进行。而实现 miRNA 在细胞内的表达有 2 种方法: 一是直接向细胞内转染合成 miRNA 分子; 二是通过表达载体在细胞内表达 miRNA。本研究采取的是从基因组中 PCR 扩增 pre-miRNA 片段, 将其构建到表达载体从而表达出 miRNA。这种方法所表达的 miRNA 更接近细胞内源的 miRNA, 为今后研究 miRNA 的功能提供了新的思路。

本研究成功构建了 miR-122 的表达载体, 使用该载体过量表达 miR-122 的研究结果表明, miR-122 能显著降低 HBs 和 HBe 抗原的表达。因此 miR-122

对 HBV 的表达具有调节作用, 其可能是通过调节某个或某些基因来间接调节 HBV 的复制和表达, 为此, 本实验室将进一步对其进行研究。

## REFERENCES

- [1] Bartel DP. microRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116** (2): 281–297.
- [2] Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, *et al.* Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 2005, **434**: 338–345.
- [3] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, **120**: 15–20.
- [4] Yi R, Qin Y, Macara IG, *et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 2003, **17**(24): 3011–3016.
- [5] Jopling CL, Norman KL, Sarnow P. Positive and negativemodulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, **71**: 369–376.
- [6] Christopher S, Sullivan, Don Ganem. MicroRNA and viral infection. *Mol Cell*, 2005, **20**(1): 3–7.
- [7] Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, *et al.* Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, **7**: 1009–1019.
- [8] Marsden PA. RNA interference as potential therapy-not so fast. *N Engl J Med*, 2006, **355**(9): 953–954.
- [9] Chang J, Nicolas E, Marks D, *et al.* Mir-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may down regulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biology*, 2004, **1**(2): 106–113.
- [10] Chang J, Guo JT, Jiang D, *et al.* Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol*, 2008, **82**(23): 8215–8223.
- [11] Jopling CL, Schutz S, Sarnow P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe*, 2008, **4**(1): 77–85.
- [12] Lin CL, Gong HY, Tseng HC, *et al.* miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **375**(3): 315–320.
- [13] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, *et al.* Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2007, **67**(13): 6092–6099.
- [14] Kutay H, Bai S, Datta J, *et al.* Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 2006, **99**(3): 671–678.