

• 生物技术与方法 •

猪 miR-331-3p 过表达载体的构建及其对细胞增殖的影响

陈涛^{1,2}, 马立霞^{1,2}, 崔景香^{1,3}, 耿进红^{1,2}, 曾勇庆^{1,2}, 陈伟^{1,2}

1 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018

2 山东农业大学 山东省动物生物工程与疾病防治重点实验室, 山东 泰安 271018

3 潍坊科技学院, 山东 潍坊 262700

陈涛, 马立霞, 崔景香, 等. 猪 miR-331-3p 过表达载体的构建及其对细胞增殖的影响. 生物工程学报, 2019, 35(5): 892-900.

Chen T, Ma LX, Cui JX, et al. Construction of miR-331-3p overexpression vector and its effect on cell proliferation. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 982-900.

摘要: 本研究旨在阐明猪 miR-331-3p 对细胞增殖的影响, 探讨其对细胞增殖的作用机制首先构建了 miR-331-3p 的过表达载体 pcDNA 3.1 (+)-miR-331-3p, 并将 PK15 细胞分为 4 组, 分别为实验组、实验组对照组、抑制剂组和抑制剂对照组。实验组和对照组分别转染 pcDNA 3.1(+)-miR-331-3p 和 pcDNA 3.1(+). 抑制剂组和抑制剂对照组分别转染 miR-331-3p Inhibitor 和 miR-331-3p 阴性对照(miR-331-3p NC)。通过在各组添加 CCK-8 试剂绘制细胞增殖曲线, 并使用 PI 染色检测细胞所处周期比例。同时, 利用实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 检测生长抑制蛋白家族成员 5 (Inhibitor of growth family member 5, *ING5*)、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (Cyclin dependent kinase 2, *CDK2*)、细胞周期蛋白依赖性激酶 3 (Cyclin dependent kinase 3, *CDK3*)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (Cyclin dependent kinase 4, *CDK4*)、细胞周期蛋白 B (*Cyclin B*) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (Cyclin dependent kinase inhibitor 1A, *CDKN1A*) 的表达变化。结果表明, 实验组 miR-331-3p 表达量显著升高, 细胞增殖曲线表明 48 h 和 72 h 时细胞数目均呈现出实验组>实验对照组和抑制剂对照组>抑制剂组的趋势 ($P<0.05$)。与实验对照组相比, 实验组处于 G0/G1 期的细胞比例下调, S 期和 G2/M 细胞的比例上调, 抑制剂对照组趋势与之相反; 同时, 实验组中与促进增殖的基因 *CDK2*、*CDK3*、*CDK4* 和 *Cyclin B* 的 mRNA 表达水平均显著升高, 而抑制增殖的基因 *ING5* 和 *CDKN1A* 均表现出显著下降的趋势。本研究成功构建了 miR-331-3p 过表达载体, 且发现 miR-331-3p 具有促进猪肾上皮细胞增殖的能力, 研究结果为深入研究 miR-331-3p 在猪生长发育中的作用机制奠定了基础。

关键词: miR-331-3p, 细胞增殖, 过表达载体, PK15, 猪

Received: October 24, 2018; **Accepted:** February 20, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31401055), Shandong Provincial Natural Science Foundation (No. ZR2018BC046), Shandong "Double Tops" Program (No. SYL2017YSTD12), Shandong Provincial Modern Pig Technology and Industry System Project (No. SDAIT-08-02).

Corresponding authors: Yongqing Zeng. Tel: +86-538-8249222-8311; E-mail: yqzeng@sdau.edu.cn
Wei Chen. Tel: +86-538-8242478; E-mail: wchen@sdau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31401055), 山东省自然科学基金项目 (No. ZR2018BC046), 山东省“双一流”奖补资金项目 (No. SYL2017YSTD12), 山东省现代农业产业技术体系生猪创新团队建设专项 (No. SDAIT-08-02) 资助。

网络出版时间: 2019-02-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190225.1030.001.html>

Construction of miR-331-3p overexpression vector and its effect on cell proliferation

Tao Chen^{1,2}, Lixia Ma^{1,2}, Jingxiang Cui^{1,3}, Jinhong Geng^{1,2}, Yongqing Zeng^{1,2}, and Wei Chen^{1,2}

1 College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

2 Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

3 Weifang University of Science and Technology, Weifang 262700, Shandong, China

Abstract: To investigate the effect of miR-331-3p on the proliferation of porcine renal epithelial cells (PK15) and its mechanism, the pcDNA 3.1(+) overexpression vector of miRNA-331-3p (pcDNA 3.1(+)-miR-331-3p) was constructed. PK15 cells were divided into four groups, including experimental group, experimental control group, inhibitor group and inhibitor control group. Experimental group and experimental control group were transfected with pcDNA 3.1(+)-miR-331-3p and pcDNA 3.1(+), respectively. Inhibitor group and inhibitor control group were transfected with miR-331-3p inhibitor and miR-331-3p negative control (miR-331-3p NC), respectively. Above all, CCK-8 reagent was used to plot the cell proliferation curve and Propidium (PI) staining was used to detect the proportion of cell stages. Secondly, its expression change were detected by quantitative real-time PCR that included the growth inhibitory protein family member 5 (*ING5*), cyclin-dependent kinase 2 (*CDK2*), cyclin-dependent kinase 3 (*CDK3*), cyclin-dependent kinase 4 (*CDK4*), *Cyclin B* and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*). The results showed that the expression of miRNA-331-3p was significantly increased in the experimental group. The cell proliferation curve showed that the number of cells in experimental group was significantly higher than that in experimental control group or inhibitor control group at 48 h and 72 h ($P < 0.05$). Simultaneously, Inhibitor group was significantly lower than experimental control group or inhibitor control group in the number of cells at 48 h and 72 h ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the experimental group and the control group. Compared with the experimental control group, the proportion of cells of experimental group in G0/G1 phase decreased, the proportion of S phase and G2/M phase increased, and the inhibitor control group showed the opposite trend. Simultaneously, the expression levels of *CDK2*, *CDK3*, *CDK4* and *Cyclin B* genes in the experimental group were significantly increased, while *ING5* and *CDKN1A* genes inhibiting proliferation showed a significant downward trend. These results demonstrate that the miR-331-3p overexpression vector was successfully constructed, and miR-331-3p has the ability to promote the proliferation of PK15 cells. The study lays a solid foundation for further research for its role in pig growth and development.

Keywords: miR-331-3p, cell proliferation, overexpression vector, PK15, pig

miRNA 是长度为 18–24 nt 的短序列的单链非编码 RNA, 在进化上具有高度的保守性, 主要通过调控基因表达的水平起作用。许多研究已表明, miRNA 主要通过与其靶基因的 3' UTR 互补配对, 引起靶基因 mRNA 的降解或者抑制其翻译^[1], 实现对基因表达水平的调控, 从而参与细胞的增殖、分化、凋亡和代谢等许多生物学过程^[2–3]。

miR-331-3p 是一种在各种物种中高度保守的 miRNA, 目前研究发现 miR-331-3p 在癌细胞的增殖分化以及癌症的发生、发展中发挥着重要

作用^[4], 在功能上具有多种作用。miR-331-3p 可以靶向作用于细胞周期相关基因 *E2F1* (*E2F* transcription factor 1), 具有抑制胃癌细胞生长和克隆的形成的能力^[5]。研究发现, miR-331-3p 的受体 lncRNA-HOTAIR 参与调节人表皮生长因子受体 2 (Glutamyl-tRNA (Gln) amidotransferase subunit *HER2*, *HER2*) 的去阻遏, 并强化额外水平的转录后调控可降低 *HER2* 蛋白的表达, 进而降低胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[6]。*ING5* 是一个肿瘤抑制基因, 抑制细胞生长并且诱导细胞凋亡。

miR-331-3p 能够通过抑制 *ING5* 表达促进肝癌 (HCC) 细胞的增殖^[7]。综上所述, miR-331-3p 一直被认为是一种肿瘤相关因子, 本身的作用也具有多样性, 但这些研究都仅限于人类的癌症细胞中, miR-331-3p 对于其他物种或细胞的作用研究很少。

猪是人类重要的肉食来源, 其自身生长受多种因素的影响。miRNA 作为目前较热门的研究领域, 已经有很多研究表明 miRNA 在猪生长发育过程中发挥着重要的作用, 例如 miR-1、miR-133 和 miR-206 都是肌肉特异性的 miRNA, 在肌肉形成过程中起着关键作用^[8], 但是 miR-331-3p 在猪细胞增殖方面的研究鲜有报道。猪肾上皮细胞系即 PK15 细胞, 是一种常见的细胞系, 对于猪圆环病毒 (PCV)、猪细小病毒 (PPV) 和猪瘟病毒 (CSFV) 等多种病毒比较敏感, 现已广泛应用于猪瘟病毒、猪伪狂犬病病毒和猪细小病毒等的分离、体外培养以及相关疫苗的生产中, 具有非常重要的作用^[9]。因此, 本研究选取 PK15 细胞作为研究对象, 通过研究 miR-331-3p 对 PK15 细胞增殖的影响, 为进一步探讨 miR-331-3p 在猪生长发育中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

猪肾上皮细胞 (PK15)、pcDNA 3.1(+) 哺乳动物表达载体均由实验室保存。莱芜猪耳组织采于莱芜猪原种场; DMEM 培养基、Opti-MEM 无血清培养基、PBS、0.25%胰酶、胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 均购于 Gibco 公司 (美国); 青链霉素混合液购于北京索莱宝科技有限公司 (中国北京); 反转录和荧光定量试剂购于 TaKaRa (中国大连)。CCK-8 试剂盒购于碧云天生物技术有限公司 (中国上海); 微量 RNA 提取试剂盒购于 Omega Bio-Tek (美国); 细胞周期与凋亡检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司 (中国上海);

miR-331-3p inhibitor 和 miR-331-3p NC 购于上海吉玛制药技术有限公司 (中国上海); T4 DNA 连接酶、*Kpn* I 内切酶和 *Xba* I 内切酶均购于 Thermo Scientific (美国); DNA 提取试剂盒、质粒大提试剂盒和普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于天根生化科技有限公司 (中国北京); 转染试剂 Lipofectamine[®] 3000 购于 Invitrogen (美国); 实验所用引物合成以及测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。实验地点为山东农业大学动物育种学研究室。

1.2 培养基的配制

10%完全培养基: 10%胎牛血清+100 IU/mL 青链霉素+DMEM。5%完全培养基: 5%胎牛血清+100 IU/mL 青链霉素+DMEM。无双抗培养基: 10%胎牛血清+DMEM。

1.3 方法

1.3.1 miR-331-3p 过表达载体的构建

首先利用 Primer 5.0 设计包含 miR-331-3p 前体序列的上下游引物, 分别在其 5'端添加 *Kpn* I 内切酶和 *Xba* I 内切酶的酶切位点以及 2 bp 的保护碱基 AA (表 1)^[10]。然后提取莱芜猪耳组织的基因组, 以 DNA 为模板通过普通 PCR 扩增的方式获得目的片段, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 经纯化回收。最后将目的片段和载体同时酶切、琼脂糖凝胶电泳分离、纯化回收、T4 DNA 酶连接构建到 pcDNA 3.1(+) 载体上。

1.3.2 细胞培养

PK15 细胞培养使用完全培养基, 培养在 CO₂ 培养箱中, 培养条件为 5% CO₂、37 °C。当细胞密度大于 80%, 换用无双抗培养基进行实验。该实验所用的所有细胞均处于对数生长期, 细胞活性大于 95%。

1.3.3 细胞转染

将细胞接种到培养板上, 生长到一定密度时, 换用无双抗培养基继续培养。将实验分为 4 组:

1) 实验组: 转染 pcDNA3.1(+)-miR-331-3p 载体;
2) 实验对照组: 转染 pcDNA3.1(+)载体; 3) 抑制剂组: 转染 miR-331-3p inhibitor; 4) 抑制剂对照组: 转染 miR-331-3p NC。转染步骤按照 Lipofectamine[®] 3000 说明书操作, 转染 4 h 更换新的无双抗的培养基, 24 h 后更换完全培养基继续培养, 48 h 后收集细胞。

1.3.4 绘制细胞生长曲线

将生长良好的 PK15 细胞 1×10^4 /mL 的密度接种到 96 孔板, 每孔加入 100 μ L 5% 完全培养基。分别在第 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h, 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h, 然后用酶标仪 (Promega, 美国) 检测细胞在 450 nm 下的 OD 值, 计算平均值, 并绘制实验组、实验对照组、抑制剂组和抑制剂对照组的生长曲线。

1.3.5 细胞 RNA 提取及荧光定量 PCR

将 PK15 细胞接种到 6 孔板, 待细胞汇合度达到 80% 时转染细胞, 48 h 后提取细胞总 RNA,

然后反转录为 cDNA。利用 Premier 5.0 设计 *CDK2*、*CDK3*、*CDK4*、*Cyclin B*、*ING5*、*CDKN1A* 和 *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 基因的荧光定量引物 (表 1), 其中 *GAPDH* 持家基因作为内参^[11]。利用 LightCycler[®] 96 实时荧光定量 PCR 系统, 检测过表达 miR-331-3p 后细胞周期相关基因的表达情况, 其定量结果通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算。反应体系 (20 μ L) 为: $2 \times$ TB Green Premix Ex Taq 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。

同样, 设计 miR-331-3p 的上游引物 (表 1), 下游引物使用试剂盒内的通用下游引物, 以 U6 作为内参基因^[12], 引物使用 miRNA 反转录试剂盒内的 U6 上下游引物。同样使用 LightCycler[®] 96 实时荧光定量 PCR 系统, 检测 miR-331-3p 的表达变化。反应体系 (20 μ L) 为: $2 \times$ TB Green Premix Ex Taq 10 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 6.4 μ L。

表 1 实验中用到的基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of genes used in this experiment

Gene	GenBank accession number	Primer sequence (5'-3')	Fragment size (bp)
miR-331-3p		F: GGTATGGGCTATCCTAGAA	
Pre-miR-331-3p	100498734	F: <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> R: <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u>	558
<i>CDK2</i>	100154715	F: AAGATGGACGGAGCTTGTTATCGC R: CTGGCTTGGTCACATCCTGGAAG	108
<i>CDK3</i>	100523273	F: TCATCCACCGAGACCTGAAGCC R: AGACATCCACAGCCGTCGAGTAG	192
<i>CDK4</i>	100144492	F: TGAGATGGAGGAGTCTGGAGCAC R: CTCGGAAGGCAGAGATTCGCTTG	80
<i>Cyclin B</i>	397662	F: GACTGGCTAGTGCAGGTTTCAGATG R: ATGGCAGTGACACCAACCAGTTG	137
<i>ING5</i>	110256977	F: TGGAGCACTACCTGGACAGTATCG R: GGTCTTCACCGTGGCAATGTACTC	146
<i>CDKN1A</i>	100152215	F: CGAGAGCGATGGAACCTCGACTTC R: TCCACATGGTCCTCCTGAGACG	200
<i>GAPDH</i>	396823	F: AGGTCGGAGTGAACGGATTTG R: ACCATGTAGTGGAGGTCAATGAAG	118

Note: denotes the protective bases; ____ denotes the restriction site.

1.3.6 细胞周期检测

将细胞接种到 6 孔板, 待细胞汇合度达到 30% 左右时分别转染实验组、实验对照组、抑制剂组和抑制剂对照组, 当细胞密度达到 80%–90% 时, 小心收集细胞培养液到 1.5 mL 离心管内备用。用胰酶消化细胞, 至细胞可以被轻轻用移液管或枪头吹打下来时, 加入前面收集的细胞培养液, 终止胰酶消化过程, 吹打下所有的贴壁细胞, 并轻轻吹散细胞。再次收集到离心管内。300×g 离心 3 min 去除培养基, 再用 1 mL 预冷 PBS 洗 1 遍。然后进行细胞固定, 加入 1 mL 冰浴预冷的 70% 乙醇中, 4 °C 固定 12 h, 300×g 离心去除 70% 乙醇, 使用 PBS 再洗 1 遍。最后加入碘化丙啶染色液 (PI), 37 °C 避光水浴 30 min, 结束后锡箔纸包裹离心管放到冰盒上, 经 0.75 μm 滤膜过滤后使用 BD FACSCalibur 流式细胞仪上机检测细胞所处周期的比例^[13]。

1.3.7 实验设计与数据处理

所有实验均设置不少于 3 次重复, 所有数据均以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 20 统计分析软件中的 One-way ANOVA 进行方差分析, 通过 Duncan 氏方法进行多重比较, 显著性水平定为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 miR-331-3p 过表达载体的构建

实验所克隆的 miR-331-3p 前体大小为 558 bp, 并且以其为模板进行菌液 PCR 后经琼脂糖凝胶电泳检测, 发现扩增的目的片段与预期大小一致, 且条带单一、无杂带 (图 1A)。提取质粒经测序比对, 结果与预期相符, 无杂峰干扰 (图 1B), 所提取的质粒经核酸蛋白浓度测定仪检测质粒浓度高、质量好, 可用于细胞转染实验。

2.2 miR-331-3p 对细胞生长曲线的影响

经检测发现, 4 组细胞的生长曲线均呈 S 型 (图 2), 符合体外细胞培养的生长特点。在转染 24 h 后, 实验组细胞数显著高于实验对照组、抑制剂组和抑制剂对照组 ($P < 0.05$); 但是实验对照组、抑制剂组与抑制剂对照组之间差异均不显著 ($P > 0.05$), 可能是由于 miR-331-3p 抑制剂在 24 h 时作用效果不显著, 导致此时 miR-331-3p 的表达下调不显著。在 48 h 和 72 h 时均呈现出实验组 > 实验对照组和抑制剂对照组 > 抑制剂组的趋势 ($P < 0.05$), 在 96 h 时实验组、实验对照组、抑制剂组和抑制剂对照组差异已不显著。

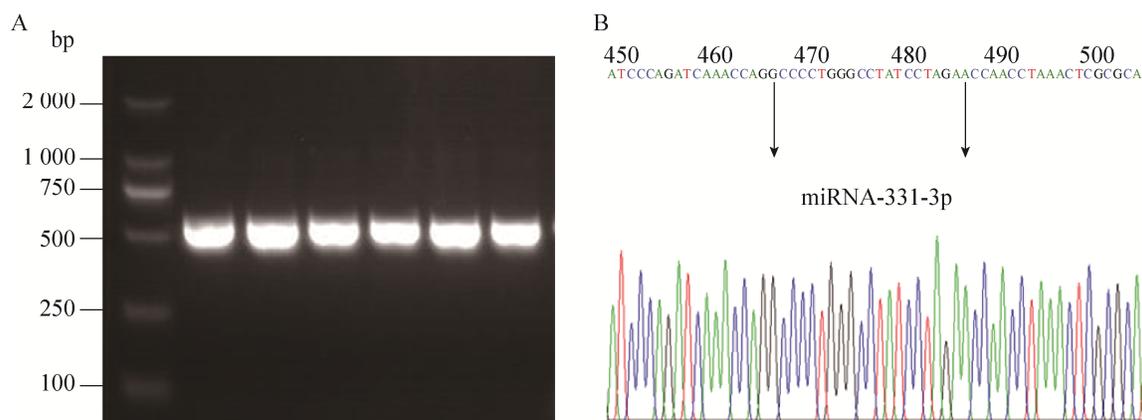


图 1 菌液 PCR 扩增结果和 pre-miR-331-3p 测序分析

Fig. 1 Bacterial liquid PCR and pcDNA 3.1(+)-miR-331-3p sequencing map. (A) Agarose gel electrophoresis of bacterial PCR. (B) Sequencing map of pcDNA 3.1(+)-miR-331-3p.

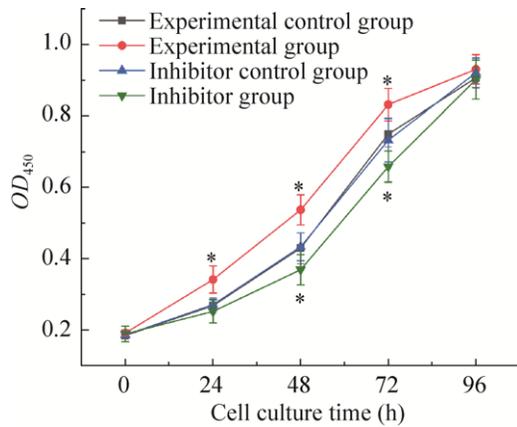


图 2 miR-331-3p 对细胞生长曲线的影响

Fig. 2 Effect of miRNA-331-3p on cell growth curve. * $P < 0.05$.

2.3 miR-331-3p 的表达差异分析

利用 qPCR 方法分别检测实验组、实验对照组、抑制剂组和抑制剂对照组细胞在转染 48 h 后 miR-331-3p 的表达差异。实验组 miR-331-3p 的表达量显著高于实验对照组 ($P < 0.05$), 这表明所构建的 pcDNA3.1(+)-miR-331-3p 载体在 PK15 细胞中能够发挥作用, 提高了细胞自身 miR-331-3p 的表达水平, 效果良好。相反, 抑制剂组 miR-331-3p 的表达水平相对于抑制剂对照组显著下降 ($P < 0.05$), 这表明 miR-331-3p inhibitor 确实可以达到抑制细胞本身的 miR-331-3p 表达的水平, 符合实验要求 (图 3)。

2.4 过表达 miR-331-3p 对细胞增殖相关基因的影响

为了探讨 miR-331-3p 对细胞增殖的影响, 利用 RT-qPCR 法检测了 miR-331-3p 的靶基因 *ING5*, 以及周期相关基因 *CDK2*、*CDK3*、*CDK4*、*Cyclin B* 和 *CDKN1A* 的表达变化。结果表明, 促进细胞增殖的 *CDK2*、*CDK3*、*CDK4* 和 *Cyclin B* 基因的 mRNA 表达趋势均为实验组 > 实验对照组和抑制剂对照组 > 抑制剂组 ($P < 0.05$) (图 4); 而具有抑制细胞增殖作用的 *CDKN1A* 和 *ING5* 基因的 mRNA 表达量具有相反的变化趋势, 即实验组 < 实验对照组和抑制剂对照组 < 抑制剂组 ($P < 0.05$) (图 4)。

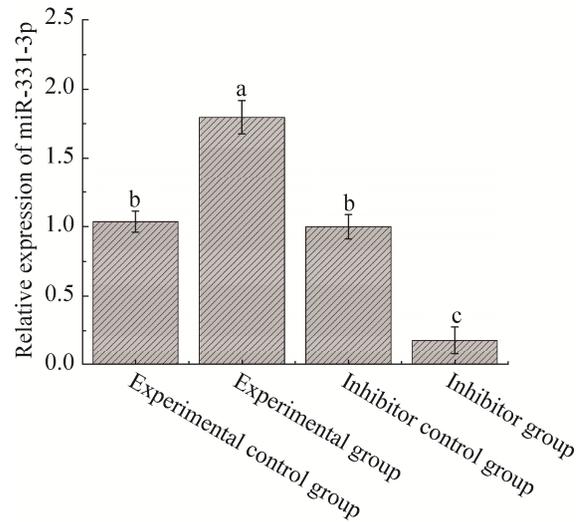


图 3 miR-331-3p 表达变化分析

Fig. 3 Analysis of expression changes of miR-331-3p. Different lower-case letters denoted significant difference ($P < 0.05$).

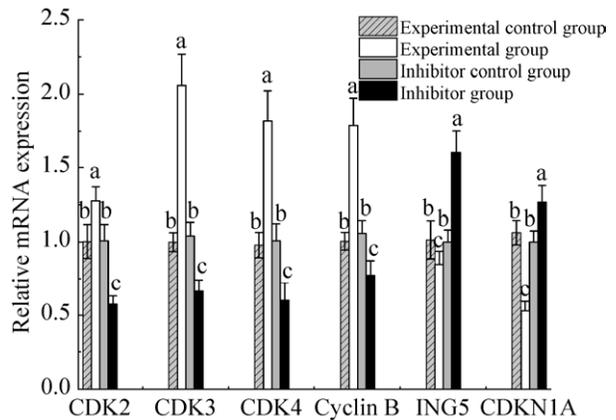


图 4 细胞增殖相关基因的表达变化分析

Fig. 4 Analysis of expression changes of cell proliferation related genes. Different lower-case letters of the same group denoted significant difference ($P < 0.05$).

2.5 miR-331-3p 对细胞周期的影响

PI 染色后利用流式细胞仪检测各组 PK15 细胞的周期分布, 得到的实验数据经 ModFit 软件分析后得到流式细胞图 (图 5)。由图可知各组中 DNA 合成前期 (G0/G1 期) 的细胞所占比例, 实验组 < 实验对照组和抑制剂对照组 < 抑制剂组 ($P < 0.05$)。各组中处于 DNA 合成期 (S 期) 的细胞

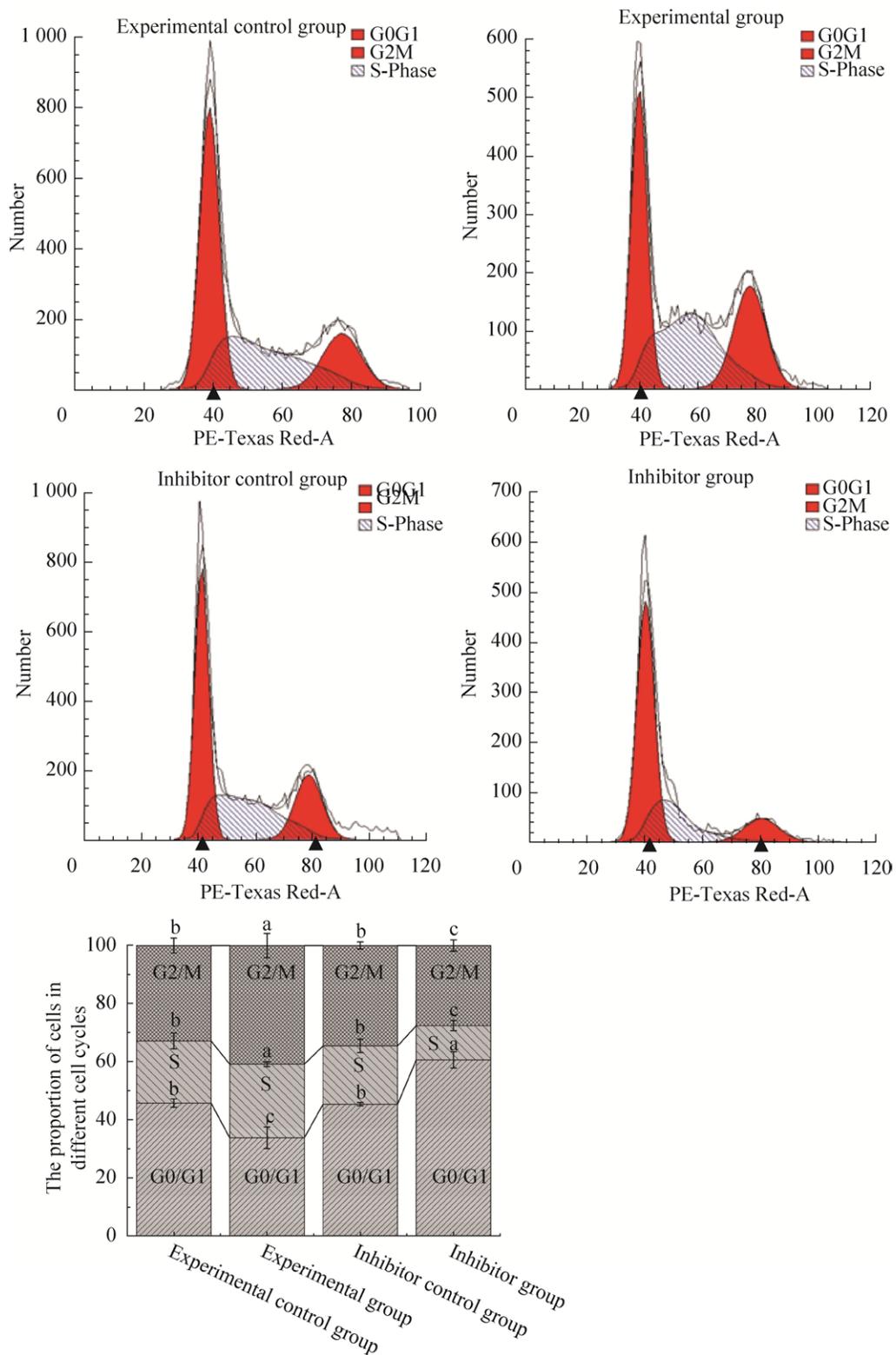


图5 流式细胞术分析细胞所处周期

Fig. 5 Flow cytometric analysis of the indicated cells. Different lower-case letters of the same group denoted significant difference ($P < 0.05$).

所占比例, 实验组>实验对照组和抑制剂对照组>抑制剂组 ($P<0.05$)。并且各组中处于 DNA 合成后期和分裂期 (G2/M 期) 的细胞所占的比例也是实验组>实验对照组和抑制剂对照组>抑制剂组 ($P<0.05$), 与细胞处于 S 期的比例具有相同趋势。

3 讨论

miRNA 作为内源非编码短链 RNA, 在细胞增殖、凋亡、分化等细胞过程中发挥着重要的作用。不同的 miRNA 可能发挥着相同或相反的作用, 甚至同种 miRNA 在不同的细胞中也具有不同的作用。研究表明 miR-331-3p 作用机制复杂, 在不同的癌细胞中可能发挥着完全相反的作用机制^[14-16]。

过表达 miR-331-3p 后相对于实验对照组和抑制剂对照组, 流式细胞术结果表明 G0/G1 期细胞比例显著降低, 抑制剂组显著升高, G0/G1 期细胞所占比例降低说明细胞增殖速度加快, 反之增殖速度减慢^[17]。同时 DNA 合成期 (S 期), 处于 S 期的细胞所占比例也显著性升高, 表明过表达 miR-331-3p 后促使大量细胞由 G1 期过渡到 S 期, S 期细胞所占比例升高, DNA、组蛋白合成速度加快, 组装成染色体使细胞内染色体数目加倍为进入细胞分裂期做准备, 抑制剂组结果相反。过表达 miR-331-3p 后在 G0/G1 期细胞所占比例降低 S 期细胞所占比例升高的基础上, DNA 合成后期 (G2 期) 和细胞分裂期 (M 期) 细胞所占比例也显著地高于实验对照组、抑制剂组和抑制剂对照组。其中 G2 期是 DNA 复制结束与开始有丝分裂之间的间隙, 在这期间细胞合成某些蛋白质和 RNA 分子, 做好细胞进入 M 期的物质准备。M 期为细胞分裂期, M 期细胞所占比例升高直接说明了分裂期细胞增多, 表明细胞生长分裂加速。所以处于 G2/M 期的细胞所占比例显著升高 ($P<0.05$), 表明了细胞此时增殖能力较强能够快速

大量分裂, 使细胞数目增加。与其相反的是抑制剂组相对于其他分组均表现出细胞 G2/M 期所占比例下降, 也从反面证明了这一点。因此流式细胞分析的结果表明 miR-331-3p 具有促进细胞增殖的效果, 这与细胞增殖曲线实验组增殖速度加快, 抑制剂组增殖速度减慢相符合。

细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDKs), 如 *CDK2*、*CDK3* 和 *CDK4* 已被公认为真核生物细胞生长和增殖的关键调控因子, 这是哺乳动物细胞 G1-S 相变所必需的^[18-19]。*Cyclin B* 是细胞进入和退出细胞周期 M 期所必需的^[20]。相反地, 细胞 *CDKN1A* 的过度表达可能通过诱导细胞抑制细胞增殖周期阻滞, 它是 CDKs 的抑制剂^[21]。荧光定量表明实验组随着 miR-331-3p 表达升高显著上调 *CDK2*、*CDK3* 和 *CDK4* 促进细胞周期由 G1 期到 S 期的转变, 促使处于 S 期的细胞所占比例显著上调 ($P<0.05$), 同时上调 *Cyclin B* 基因的表达促进细胞周期由 G2 期进入 M 期, 使实验组处于 G2/M 期细胞的比例上调。随着 miR-331-3p 的高表达, 细胞内的 *CDKN1A* 基因表达下调, *CDKN1A* 具有阻滞细胞增殖的作用。其表达下调从另一个方面表明, miR-331-3p 具有促进细胞增殖的作用。综合各个周期相关基因的荧光定量的表达结果说明, miR-331-3p 具有促进细胞增殖的功能。有研究表明 *ING5* 为 miR-331-3p 的靶基因^[7], miR-331-3p 的过表达和抑制表达导致 *ING5* 基因发生相应的下调和上调也证明了这一观点, 因此在猪肾上皮细胞中 miR-331-3p 有可能是通过作用于 *ING5* 基因达到促使细胞增殖的效果。

4 结论

本研究成功构建了 miR-331-3p 的过表达载体, 并且发现 miR-331-3p 可以通过促进周期相关

基因 *CDK2*、*CDK3*、*CDK4*、*Cyclin B* 基因的表达，以及抑制 *ING5* 和 *CDKN1A* 的表达，从而促进猪肾上皮细胞增殖，这为深入研究 miR-331-3p 在猪生长发育中的作用机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Lund E, Güttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of MicroRNA precursors. *Science*, 2004, 303(5654): 95–98.
- [2] Zhuang M, Qiu XB, Cheng D, et al. MicroRNA-524 promotes cell proliferation by down-regulating PTEN expression in osteosarcoma. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 114.
- [3] Pogue AI, Cui JG, Li YY, et al. Micro RNA-125b (miRNA-125b) function in astrogliosis and glial cell proliferation. *Neurosci Lett*, 2015, 476(1): 18–22.
- [4] Chang RM, Yang H, Fang F, et al. MicroRNA-331-3p promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase. *Hepatology*, 2015, 60(4): 1251–1263.
- [5] Guo XB, Guo L, Ji J, et al. miR-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer. *Biochem Bioph Res Commun*, 2010, 398(1): 1–6.
- [6] Giles KM, Barker A, Zhang PM, et al. MicroRNA regulation of growth factor receptor signaling in human cancer cells//Wu W, ed. *MicroRNA and Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011.
- [7] Cao YY, Chen J, Wang D, et al. Upregulated in Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma cells, miR-331-3p promotes proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting *ING5*. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 38093–38106.
- [8] Ge YJ, Chen J. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle*, 2011, 10(3): 441–448.
- [9] Walia R, Dardari R, Chaiyakul M, et al. Porcine circovirus-2 capsid protein induces cell death in PK15 cells. *Virology*, 2014, 468–470: 126–132.
- [10] Li CH, Chen W, Hu JQ, et al. miRNA-29a targets *COL3A1* to regulate the level of type III collagen in pig. *Gene*, 2016, 592(1): 140–147.
- [11] Shi T, Yan XR, Qiao LY, et al. MiR-330-5p negatively regulates ovine preadipocyte differentiation by targeting branched-chain aminotransferase 2. *Anim Sci J*, 2018, 89(6): 858–867.
- [12] Mi L, Chen YS, Zheng XL, et al. MicroRNA-139-5p suppresses 3T3-L1 preadipocyte differentiation through notch and IRS1/PI3K/Akt insulin signaling pathways. *J Cell Biochem*, 2015, 116(7): 1195–1204.
- [13] Xu LN, Qi YL, Lv LW, et al. *In vitro* anti-proliferative effects of *Zuojinwan* on eight kinds of human cancer cell lines. *Cytotechnology*, 2014, 66(1): 37–50.
- [14] Fujii T, Shimada K, Asano A, et al. MicroRNA-331-3p suppresses cervical cancer cell proliferation and E6/E7 expression by targeting NRP2. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1351–1364.
- [15] Lai YJ, He S, Ma LM, et al. HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate PTEN expression by inhibiting miR-19 in cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem*, 2017, 432(1/2): 179–187.
- [16] Li J, Zhang YY. Research progress of miR-331-3p in malignant tumors. *Prac Oncol J*, 2018, 32(2): 125–129 (in Chinese).
李静, 张云艳. miR-331-3p 在恶性肿瘤中的研究进展. *实用肿瘤学杂志*, 2018, 32(2): 125–129.
- [17] Ye P, Ke XP, Zang XH, et al. Up-regulated MiR-27-3p promotes the G1-S phase transition by targeting inhibitor of growth family member 5 in osteosarcoma. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 219–227.
- [18] Tsai LH, Lees E, Faha B, et al. The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene*, 1993, 8(6): 1593–1602.
- [19] Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 1995, 9(10): 1149–1163.
- [20] Ito M. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol Biol*, 2000, 43(5/6): 677–690.
- [21] Zhang YY, Xu ZN. miR-93 enhances cell proliferation by directly targeting *CDKN1A* in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 1723–1727.

(本文责编 郝丽芳)