

miR-199a 对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响及机制

程顺舟¹, 陈欣², 王平², 王吉荣^{1*}

(¹南京医科大学附属江宁医院普通外科, 江苏 南京 211100; ²南京医科大学第一附属医院肝移植中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 miR-199a 对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响及机制。方法:使用 DNA 重组技术,将含有 miR-199a 的基因片段克隆入带有 EGFP 的慢病毒载体 pLV-GFP-puro, DNA 测序鉴定阳性克隆,并用脂质体介导法将慢病毒包装系统和带 miR-199a 的质粒共转染 293T 细胞包装病毒,纯化后感染肝癌 HepG2 细胞。用荧光显微镜观察感染效率;MTT 法检测细胞增殖活性;Western blot 检测 HepG2 细胞 IκBα、p-NF-κBp65 表达;并采用 qRT-PCR 分析感染 HepG2 细胞 miR-199a 和 NF-κB 相关抗凋亡基因(TRAF2、cIAP2、Bfl-1 和 cFLIP)的表达情况。结果:成功构建了 miR-199a 重组慢病毒载体,并对其包装、纯化及浓缩后测定病毒滴度为 1.08×10⁸ TU/mL;感染后 HepG2 细胞高表达 miR-199a,抑制 HepG2 细胞增殖,并证实过表达 miR-199a 有效稳定 IκBα 表达,抑制 NF-κB 活性,进一步抑制 NF-κB 相关抗凋亡基因 TRAF2、cIAP2、Bfl-1 和 cFLIP 表达。结论:miR-199a 重组慢病毒过表达载体有效感染 HepG2 细胞,并抑制 HepG2 细胞增殖,其机制可能与 miR-199a 抑制 NF-κB 活性及其相关抗凋亡基因表达有关。

[关键词] miR-199a;慢病毒载体;HepG2 细胞;NF-κB;增殖

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-961-05

doi:10.7655/NYDXBNS20170808

Effects and mechanisms of miR-199a on proliferation of HepG2 cells

Cheng Shunzhou¹, Chen Xin², Wang Ping², Wang Jirong^{1*}

(¹Department of General Surgery, Jiangning Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 211100; ²Department of Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects and underlying mechanisms of miR-199a on proliferation of HepG2. **Methods:** The miR-199a gene was cloned to lentiviral expression vector pLV-GFP-puro with EGFP by recombining DNA technology, and positive clones were identified by DNA sequencing. The 293T cells were cotransfected with lentiviral packaged systems and miR-199a gene plasmid by lipofectin reagent to package the lentiviral particles. The HepG2 cells were infected with purified recombinant lentivirus. The transfection efficiency was assessed under fluorescent microscope; MTT assay was used to detect cell proliferation; Western Blot was used to analyze expressions of IκBα and p-NF-κBp65; In addition, qRT-PCR was performed to detect expressions of miR-199a and NF-κB related anti-apoptotic genes (TRAF2, cIAP2, Bfl-1 and cFLIP) in transfected HepG2 cells. **Results:** The recombinant lentiviral vectors of miR-199a gene were successfully constructed. The virus reached a titer of 1.08×10⁸ TU/mL after being packaging, purification and concentration. Interestingly, the transfected cells held high expression of miR-199a, which inhibited the proliferation of HepG2 cells. In addition, the transfected HepG2 cells stably expressed IκBα, effectively inhibited NF-κB activity, and further suppressed expressions of NF-κB related anti-apoptotic genes (TRAF2, cIAP2, Bfl-1 and cFLIP). **Conclusion:** The miR-199a recombinant lentiviral vector had been successfully constructed and effectively transfected HepG2 cells, which inhibited the proliferation of HepG2 cells. The underlying mechanisms may be inhibit NF-κB activity, and further inhibit expressions of NF-κB related anti-apoptotic genes by miR-199a.

[Key words] miR-199a; lentiviral vector; HepG2; NF-κB; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):961-965]

[基金项目] 江苏省六大人才高峰(2014-YY-008)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 756208141@qq.com

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种消化系统常见的恶性肿瘤, 全世界发病率较高, 我国是全球 HCC 发病率最高的国家, 约有 55% 病例发生在我国, 而且发病率逐年上升^[1]。乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是 HCC 发生的一个重要因素, 但其发病机制仍然不清楚, 一直是研究的热点^[2-4]。微 RNA 或小分子 RNA (micro RNA, miRNA) 是近年来在真核生物体内发现的一类长度约 22 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA, 主要通过靶向结合, 发挥降解靶 mRNA 或抑制 mRNA 翻译的作用。它参与多种生物学过程包括炎症反应、细胞的分化及癌变等过程^[5], 可能与肝癌的发生、发展密切相关。HBV 激活经典 NF- κ B 通路的过程是肝炎向肝癌转化研究中的一个热点^[6], I κ B α 是 NF- κ B 活化的关键性抑制性分子^[7], 在卵巢癌中已经证实 microRNA-199a (miR-199a) 可稳定 I κ B α 的表达, 抑制 NF- κ B 活性^[8], 但在肝癌研究中尚未有报道。本研究拟构建 miR-199a 慢病毒表达载体, 并包装成重组病毒感染人肝癌 HepG2 细胞, 探讨 miR-199a 对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HepG2 细胞和 293T 细胞 (中科院上海细胞库), 慢病毒表达质粒 pLV-GFP-puro 及 2 种辅助包装原载体质粒 psPAX2、pMD2.G (南京医科大学第一附属医院肝脏外科实验室保存)。SYBR real-time PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Bam*H I、*Mlu* I、DNA 聚合酶、RNAiso Plus、T4 DNA 连接酶和反转录酶等试剂 (大连 TaKaRa 公司), 感受态细胞 DH5 α (上海北诺生物科技有限公司), DNA oligo 由南京金斯瑞公司合成, Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司, 美国), DMEM、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), 慢病毒浓缩及纯化试剂盒 (Cell Biolabs 公司, 美国), I κ B- α 、p-NF- κ Bp65、 β -actin 一抗、兔源性二抗 (Cell Signaling Technology 公司, 美国)。DNA 测序由南京金斯瑞公司完成, ABI7500 real-time PCR 仪 (ABI 公司, 美国), 水浴箱 (PolyScience 公司, 美国), 细胞培养箱 (三洋公司, 日本), PCR 仪 (Eppendorf 公司, 德国), 荧光显微镜 (奥林巴斯公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及重组慢病毒的包装、生产及浓缩

HepG2 细胞和 293T 细胞在含有 10% 胎牛血清

的 DMEM (高糖) 中培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。按照 miR-199a 基因序列 (GenBank NR_029586.1), 由南京金斯瑞公司进行设计及合成 miR-199a, 并在目的基因序列的两端分别添加限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Mlu* I 酶切位点, 克隆至慢病毒表达载体 pLV-GFP-puro, 命名为 pLV-GFP-puro-miR-199a, 并用限制性内切酶酶切后进行琼脂糖凝胶电泳及测序, 以验证重组克隆中插入片段的序列信息。用 Lipofectamine™ 2000 将测序正确的重组慢病毒表达载体与包装载体 psPAX2 和 pMD2.G 共同转染 293T 细胞, 包装 miR-199a 慢病毒颗粒, 使用无双抗培养基培养, 感染 8 h 后换完全培养基。48 h 后收集病毒上清液, 纯化测滴度后于 -80 °C 冰箱冻存备用。

1.2.2 包装病毒感染 HepG2 细胞及筛选稳定株

将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板, 每孔细胞数约为 5×10^4 个, 单细胞生长至 60%~70% 汇合时, 用含有 miR-199a 重组慢病毒颗粒及含有对照空载体 pLV-GFP-puro 的重组慢病毒颗粒感染 HepG2 细胞, 每孔加入 10 μ L 病毒原液 (滴度为 1×10^8 TU/mL), 同时加入 Polybrene 至 8 μ g/mL 以提高感染效率。感染后第 2 天 (约 24 h), 吸去培养液, 换上新鲜的完全培养液, 继续 37 °C 培养。感染后 48、72 h, 通过荧光显微镜观察, 加入终浓度为 2 μ g/mL 的 Puromycin。每隔 2~3 d 更换 1 次终浓度为 2 μ g/mL 的 Puromycin 完全培养基, 药物筛选 2 周后, 荧光显微镜观察。

1.2.3 MTT 实验分析细胞增殖活性

实验共设为过表达组 (pLV-GFP-puro-miR-199a, OE 组)、阴性对照组 (negative control, NC 组) 和正常组 (normal, N 组)。将细胞制作为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液, 96 孔细胞培养皿中每孔加入 100 μ L 细胞悬液; 分别在 24、48、72 h 加入 20 μ L MTT 溶液, 每组设置 6 个复孔; 孵育箱培养 4 h 后, 小心吸去培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO; 酶标仪检测 590 nm 处吸光度值。

1.2.4 qRT-PCR 实验

提取各组细胞的 RNA 逆转录成 cDNA, 以 GAPDH 为内参对照分析 miR-199a、TRAF2、cIAP2、Bfl-1 和 cFLIP 表达。各引物序列如下: miR-199a: 上游 5'-CAAAGAGTCAGACATTCCTCCT-3', 下游 5'-TCTGAGCAGCCAAGGAAACCA-3'; TRAF2: 上游 5'-AAGTCCCCTTAACCTGTGACG-3', 下游 5'-CAAGTCTTGACGTGGTCCTG-3'; cIAP2: 上游 5'-AGGGCAGATGGTCTGTGA-3', 下游 5'-TGTCAGCTGTGAC-

CCTTATGA -3'; Bfl-1 引物序列:上游 5'-TCATATTT-TGTTGCGGAGTTCA-3',下游 5'-GGTGTGTGATTG-TGCCATTT-3'; cFLIP:上游 5'-TCCTGAACAGTAC-TATTTTCGT GTGA-3',下游 5'-AGCATGAGATATAA-AATGAAAAGAAGG-3'; GAPDH:上游 5'-CATCTTC-TTTTTCGTCGCCA-3',下游 5'-TAAAAGCAGCCCT-GGTGACC-3'。引物购自南京金斯瑞公司,按照 95 °C, 30 s;95 °C,5 s;60 °C,30 s,40 个循环;95 °C,15 s; 60 °C,30 s;95 °C,15 s 的反应参数进行反应。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

1.2.5 Western blot

用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白,BCA 测蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液 100 °C 水浴煮沸 5 min。SDS-PAGE 进行电泳分离后,采用湿转法转 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜后加入二抗孵育 1 h,TBST 洗涤后,加入发光液,凝胶电泳成像系统进行分析,实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

各组定量数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graphpad5.0 统计软件对数据进行分析。满足正态分布以及方差齐性检验的两组间差异的比

较,采用两组独立样本的 t 检验;细胞不同时间点增殖分析采用重复测量方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pLV-GFP-puro-miR-199a 载体构建及病毒滴度测定

重组慢病毒质粒 pLV-GFP-puro-miR-199a 经 *Bam*H I 和 *Mlu* I 双酶切,电泳结果约 100 bp,鉴定结果与预期一致,测序结果表明,合成的 pLV-GFP-puro-miR-199a 的核苷酸插入正确,没有碱基缺失或替换,病毒滴度 1×10^8 TU/mL。

2.2 miR-199a 慢病毒感染 HepG2 细胞效率及表达

HepG2 细胞与慢病毒感染液共培养,经药物筛选 2 周后,在荧光显微镜下观察各组细胞,可见 OE 组和 NC 组约 95% HepG2 细胞成功表达绿色荧光蛋白(图 1A),说明慢病毒感染细胞比例达到实验预期要求。进一步分析 miR-199a 在各组的表达水平,图 1B 显示 OE 组表达水平较 N 组和 NC 组明显升高,差异有统计学意义。

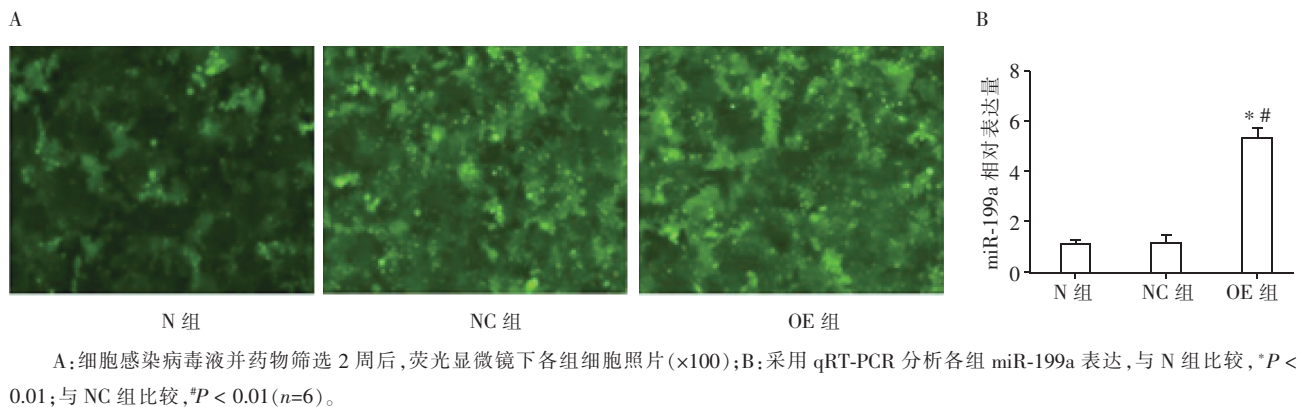


图 1 miR-199a 慢病毒感染 HepG2 细胞效率及表达

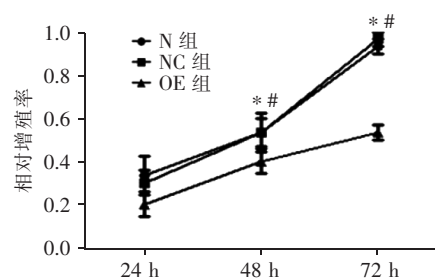
Figure 1 Infected efficiency of lentivirus vector carrying miR-199a in HepG2 cells

2.3 MTT 染色法分析 miR-199a 对 HepG2 细胞增殖的影响

各组细胞分别于培养 24、48 和 72 h 后进行 MTT 染色,分析相对增殖率(图 2)。24 h 内 3 组结果没有明显差异,48、72 h OE 组则明显抑制 HepG2 细胞增殖,差异有统计学意义。

2.4 miR-199a 对 HepG2 细胞 NF- κ B 活性的影响

NF- κ B 在细胞增殖及凋亡中起关键性作用,分析 NF- κ B 的相关活性蛋白 I κ B α 和 p-NF- κ Bp65 的表达情况。结果显示,I κ B α 表达在 OE 组较 N 组及



与 N 组比较,* $P < 0.05$,与 NC 组比较,* $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 2 miR-199a 重组慢病毒对 HepG2 细胞增殖的影响
Figure 2 Effects of lentivirus vector carrying miR-199a on the proliferation of HepG2 cells

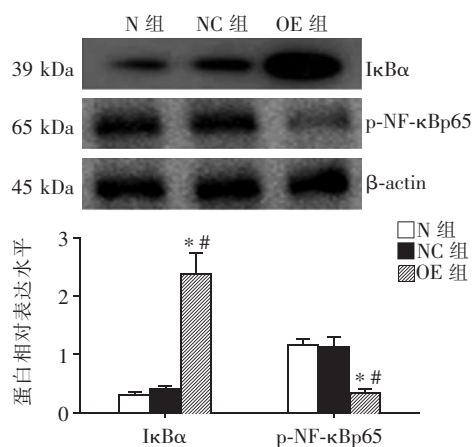
NC 组明显升高;而 p-NF-κBp65 则相反,在 OE 组明显低表达,差异有统计学意义(图 3)。

2.5 miR-199a 对 NF-κB 相关抗凋亡基因的影响

为进一步研究 miR-199a 对 HepG2 细胞凋亡的影响,分析 NF-κB 相关凋亡基因 TRAF2、cIAP2、Bfl-1 和 cFLIP 的表达情况。结果显示,OE 组 NF-κB 相关抗凋亡基因表达均明显抑制,与 NF-κB 活性具有一致性,差异有统计学意义(图 4)。

3 讨论

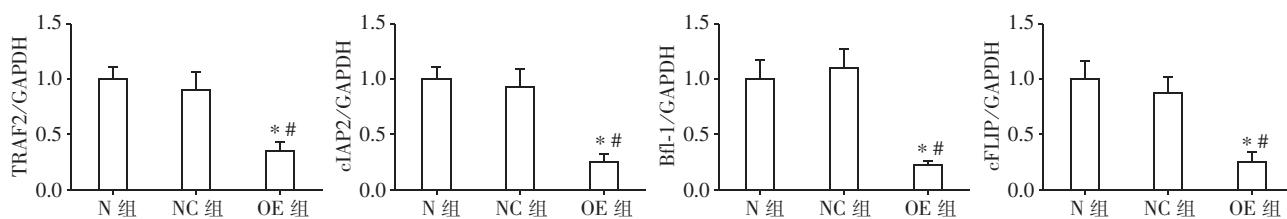
慢性 HBV 感染与肝癌发病相关,慢性病毒性肝炎和肝硬化被认为是肝癌的癌前病变,但目前为止,乙型肝炎导致肝癌发生的确切机制尚不明确^[3]。NF-κB 是一个高度保守的转录因子蛋白家族,在未被激活的细胞,大多数 NF-κB 二聚体是通过结合 IκB 蛋



与 N 组比较, * $P < 0.05$; 与 NC 组比较, # $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 3 Western blot 检测 miR-199a 对 HepG2 细胞 NF-κB 活性的影响

Figure 3 Effects of miR-199a on activities of NF-κB in HepG2 cells by Western blot



与 N 组比较, * $P < 0.05$; 与 NC 组比较, # $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 4 qRT-PCR 检测 miR-199a 对 NF-κB 相关抗凋亡基因的影响

Figure 4 Effects of miR-199a on NF-κB related anti-apoptosis genes in HepG2 cells by qRT-PCR

白存在于细胞质中,稳定 NF-κB 的表达及活化。IκBα 是一种主要的 IκB 蛋白,当 IκBα 降解,可使 IκBα 与 NF-κB 解离,从而激活经典的 NF-κB 活化途径^[9]。NF-κB 的活化,一方面作用于病毒基因促进病毒复制,另一方面作用于原癌基因的 NF-κB 位点,使原癌基因过表达,多因素综合作用,致使肝细胞转化和 HCC 的发生^[10]。在肝癌细胞中 miR-199a 可负性调节细胞的增殖功能^[11]及侵袭功能^[12]。近期研究表明,在卵巢癌细胞中 miR-199a 正向调节 IκBα 表达,进而抑制 NF-κB 活化^[8]。

NF-κB 信号通路在肿瘤发生发展过程中具有重要作用,特别是它可以调控一些细胞凋亡相关基因表达如 TRAF 家族、IAPs 家族、Bcl-2 家族及 FLIP 基因、p53 基因、COX-2 基因的转录表达,从而大大提高肿瘤细胞的抗凋亡能力,直接影响恶性肿瘤的发生和发展过程^[13-16]。本研究结果证实 miR-199a 能有效地抑制 NF-κB 信号通路活化,抑制肝癌细胞的增殖。因而,miR-199a 可能通过抑制 NF-κB 信号相关

抗凋亡基因表达,进而促进肝癌细胞凋亡,最终表现为抑制肝癌细胞的增殖。本研究分析 NF-κB 信号相关抗凋亡基因 TRAF2、cIAP2、Bfl-1 和 cFLIP 表达,证实 miR-199a 能明显抑制这些抗凋亡基因表达。因而 miR-199a 对于肿瘤细胞增殖及凋亡具有重要调控作用,可能通过调控 NF-κB 信号通路及其下游相关保护性基因表达实现。

非病毒载体系统的细胞转染主要方式是质粒载体介导方式,普遍存在转染效率低、持续时间短、目的基因表达弱等问题。而以病毒为载体的细胞感染方式,因为具有感染效率高、目的基因表达强、持续时间长的优点而受到关注。在本研究中,本组以病毒为载体的细胞感染方式,用慢病毒表达载体使 HepG2 中 miR-199a 表达增高,并用细胞分子生物学方法分析 miR-199a 对 HepG2 细胞增殖、NF-κB 活性以及 NF-κB 相关抗凋亡基因表达,得出了 miR-199a 对 HepG2 生物学活性影响的结论,为进一步研究 miR-199a 基因对肝细胞性肝癌的细胞生物学行

为、探讨其作用机制、寻找肝癌防治新途径奠定了一定基础。

[参考文献]

- [1] 张洪新. 肝细胞肝癌微创综合治疗的现状与展望[J]. 中华肝脏外科手术学电子杂志,2013,2(3):6-8
- [2] Shlomai A,de Jong YP,Rice CM. Virus associated malignancies;the role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Cancer Biol*,2014,26(1):78-88
- [3] McMahon BJ. Chronic hepatitis B virus infection[J]. *Med Clin North Am*,2014,98(1):39-54
- [4] Xu C,Zhou W,Wang Y,et al. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*,2014,345(2):216-222
- [5] Tili E,Michaille JJ,Croce CM. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer[J]. *Immunol Rev*,2013,253(1):167-184
- [6] Kao JH,Chen PJ,Chen DS. Recent advances in the research of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma:epidemiologic and molecular biological aspects [J]. *Adv Cancer Res*,2010,108(1):21-72
- [7] Hoesel B,Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer[J]. *Mol Cancer*,2013,12:86
- [8] Chen R,Alvero AB,Silasi DA,et al. Regulation of IKK β by miR-199a affects NF- κ B activity in ovarian cancer cells[J]. *Oncogene*,2008,27(34):4712-4723
- [9] Gerondakis S,Fulford TS,Messina NL,et al. NF- κ B control of T cell development [J]. *Nat Immunol*,2014,15(1):15-25
- [10] Han YF,Zhao J,Ma LY,et al. Factors predicting occurrence and prognosis of hepatitis-B-virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*,2011,17(38):4258-4270
- [11] Jia XQ,Cheng HQ,Qian X,et al. Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-199a inhibits cell proliferation of human hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Biochem Biophys*,2012,62(1):237-244
- [12] Shen Q,Cicinnati VR,Zhang X,et al. Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion [J]. *Mol Cancer*,2010,9:227
- [13] Oberoi-Khanuja TK,Murali A,Rajalingam K. IAPs on the move:role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration[J]. *Cell Death Dis*,2013,4(9):e784
- [14] Chapard C,Hohl D,Huber M. The role of the TRAF-interacting protein in proliferation and differentiation [J]. *Exp Dermatol*,2012,21(5):321-326
- [15] Fulda S. Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells[J]. *Cancer Lett*,2013,338(1):168-173
- [16] Oztürk S,Schleich K,Lavrik IN. Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs):fine-tuners of life and death decisions[J]. *Exp Cell Res*,2012,318(11):1324-1331

[收稿日期] 2016-05-29