



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.12.009
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4131.shtml

· 基础研究 ·

靶向 hTERT 人工 miRNA 表达框架的构建及其对 HepG2 细胞端粒酶活性的抑制作用

徐慧, 龚霞, 赵丹丹, 范张玲, 彭剑雄

(中南大学湘雅医学院 医学检验系, 湖南 长沙 410013)

摘要

目的: 构建针对 hTERT 基因的人工 miRNA 表达框架, 并验证其对 HepG2 细胞端粒酶活性的抑制作用。
方法: 应用融合 PCR 技术针对不同位点设计并构建 3 个靶向 hTERT 的人工 miRNA 表达框架, 对各表达框架鉴定后, 将其单独或两种共转染 HepG2 细胞, 采用 TRAP-银染法和 TRAP-二聚体蝎形探针荧光定量 PCR 法检测细胞端粒酶活性。

结果: 3 个针对 hTERT 基因的人工 miRNA 表达框架均成功构建, 单独或共转染 HepG2 细胞后, HepG2 细胞的端粒酶活性均被不同程度的抑制, 且两种表达框架共转染的抑制作用明显大于单独转染, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: 靶向 hTERT 基因的人工 miRNA 表达框架能有效而特异抑制 HepG2 细胞端粒酶活性, 多位点联合抑制是一种有效的实验方案。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(12):1647-1651]

关键词

端粒, 末端转移酶; RNA 干扰; 细胞系, 肿瘤

中图分类号: R730.5

Construction of artificial miRNA expression cassettes targeting hTERT and their inhibitory effects on telomerase activity in HepG2 cells

XU Hui, GONG Xia, ZHAO Dandan, FAN Zhangling, PENG Jianxiong

(Department of Laboratory Medicine, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Corresponding author: PENG Jianxiong, Email: jxpeng@csu.edu.cn

ABSTRACT

Objective: To construct the artificial miRNA expression cassettes targeting hTERT gene and validate their inhibitory effect on telomerase activity in HepG2 cells.

Methods: Three artificial miRNA expression cassettes targeting different sites of hTERT gene were designed and constructed by overlap extension PCR method. After identification, the cassettes were transfected alone or co-transfected into HepG2 cells, and then the telomerase activities in HepG2 cells were detected by TRAP-silver staining and TRAP-duplex scorpion probe fluorescence quantitative PCR.

Results: The three artificial miRNA expression cassettes targeting hTERT gene were all successfully constructed, and after they were transfected alone or co-transfected into the HepG2 cells, the telomerase activities in HepG2 cells were inhibited to different degrees, and the inhibitory effect of co-transfection with two miRNA expression

基金项目: 中南大学本科生自由探索计划项目资助 (2282014bks193)。

收稿日期: 2014-10-30; 修订日期: 2014-11-25。

作者简介: 徐慧, 中南大学湘雅医学院硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学诊断方面的研究。

通信作者: 彭剑雄, Email: jxpeng@csu.edu.cn

cassettes was significantly stronger than those of any lone transfection. All the differences reached statistical significance (all $P < 0.05$).

Conclusion: The artificial miRNA expression cassettes targeting hTERT gene can effectively inhibit telomerase activity in HepG2 cells, and combined inhibition is an effective experimental program.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(12):1647-1651]

KEYWORDS Telomerase; RNA Interference; Cell Line, Tumor

CLC number: R730.5

端粒酶与恶性肿瘤的发生、发展关系密切,通过端粒酶途径,端粒 DNA 能得以保持,使细胞永生^[1]。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是催化这一反应的限速酶,抑制 hTERT 基因的表达可以降低端粒酶活性,从而抑制肿瘤细胞的分裂和增殖,已成为肿瘤基因治疗的理想靶点^[2-3]。针对 hTERT 基因,本实验室首先利用体外合成的方法制备 shRNA^[4],接着利用融合 PCR 技术构建了以双 H1 启动子和 U6/H1 双启动子驱动的 siRNA 表达框架^[5-6],结果均显示端粒酶活性明显降低。

人工 miRNA 表达框架是一种由 PCR 得到的 miRNA 表达模版,该模板以内源 miRNA 前体作为骨干,将 pre-miRNA 置换为设计好的序列,利用 miRNA 的内源性作用机制来抑制特定的靶基因^[7]。本实验应用构建靶向 hTERT 基因的人工 miRNA 表达框架转染 HepG2 细胞,研究其对端粒酶活性的抑制作用,为肿瘤抑制探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料

HepG2 细胞由本实验室保存; pSUPER.retro.neo+GFP (美国 Oligoengine 公司); Taq Master Mix、Taq DNA 聚合酶、dNTP、MgCl₂、质粒小提试剂盒(北京天根生化科技有限公司); ExTaq DNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司); DMEM 细胞培养液(美国 HyClone 公司); 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); DNA 产物纯化试剂盒、阳离子聚合物转染试剂(美国 Thermo 公司)。

1.2 人工 miRNA 表达框架的构建与鉴定

用 Life Technologies 公司 miRNA 在线设计软件设计 3 条 miRNA 干扰序列(针对 hTERT 基

因 2647-2667、3579-3590、3877-3897) 和 1 条阴性对照序列,经 BLAST 排除非特异同源序列: GAA ATC ATC CAC CAA ACG CAG GGT TTT GGC CAC TGA CTG ACC CTG CGT TGT GGA TGA TTT (2647-2667); GAA CAC TCA CTC AGG CCT CAG AGT TTT GGC CAC TGA CTG ACT CTG AGG CGA GTG AGT GTT (3579-3590); GTT TGG TCA CTC CAA ATT CCC AGT TTT GGC CAC TGA CTG ACT GGG AAT TGA GTG ACC AAA (3877-3897); GGA ATA CCG ACA TAC ATC ACA CGT TTT GGC CAC TGA CTG ACG TGT GAT GTG TCG GTA TTC (阴性对照)。参考小鼠 BIC 非编码 mRNA 序列(miR-155)中 5' miR 侧翼序列(134~160 核苷酸)和 3' miR 侧翼序列(221~265 核苷酸),设计两端带 miRNA 侧翼的特异 miRNA 干扰序列(图 1)。将此干扰序列反义链 3' 端添加 19 个碱基,该碱基与 H1 启动子 3' 端形成反向互补区域。添加碱基后的片段称为片段 B,由上海生物工程有限公司合成。用 Primer 5.0 软件设计引物 P1、P2 和 P3,利用融合 PCR 构建人工 miRNA 表达框架(图 2)。引物 P1、P2 和 P3 的序列分别为: 5'-GAG ATC TGT GGT CTC ATA C-3'; 5'-GAA TTC GAA CGC TGA CGT C-3'; 5'-GCA AAA AGG CCA TTT GTT CC-3'。PCR1 反应体系为: 2 × Taq Master Mix 25 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1.5 μL, 模板 50 ng, ddH₂O 补足至 50 μL。循环参数: 94 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 32 个循环; 72 °C 5 min。PCR2 反应体系为: 10 × Ex Taq buffer 3.2 μL, dNTP Mix 2.6 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, PCR1 纯化产物和片段 B 各 50 ng, Ex Taq 酶 0.16 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。循环参数: 94 °C 3 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 5 个循环(不加 PCR1 纯化产物、片段 B 和 Ex Taq 酶)。95 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 28 个循环; 72 °C

5 min(加入 PCR1 纯化产物、片段 B 和 Ex Taq 酶)。上述产物均经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 纯化回收后由上海生物工程有限公司进行 DNA 测序。同时用

RNA fold Web Server 预测特异性 miRNA 干扰序列的 RNA 二级结构。



图 1 两端带侧翼的特异性 miRNA 干扰序列示意图 5' 端侧翼: 小鼠 BIC 非编码 mRNA 基因序列 134-160; 3' 端侧翼: 小鼠 BIC 非编码 mRNA 基因序列 221-265; pre-miRNA: 特异性 miRNA 干扰序列; TTTTT: H1 启动子的终止信号

Figure 1 Schematic of the specific miRNA interference sequence with two flanking strands 5' flanking strand: Sequence 134-160 of the mouse BIC non-coding mRNA; 3' flanking strand: Sequence 221-265 of the mouse BIC non-coding mRNA; pre-miRNA: Specific miRNA interference sequence; TTTTT: Termination signal of the H1 promoter

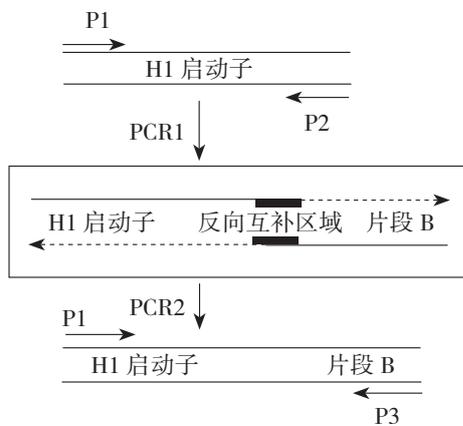


图 2 融合 PCR 构建人工 miRNA 表达框架示意图 P1、P2、P3: PCR 引物

Figure 2 Schematic drawing of construction of the artificial miRNA expression cassettes by overlap extension PCR P1, P2 and P3: PCR primers

1.3 细胞培养和转染

HepG2 细胞用 DMEM 培养, 对数生长期的细胞用胰酶消化, 以 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板温育 24 h, 细胞融合度达 70%~90% 时, 用阳离子聚合物转染试剂转染。实验为 6 组: (1) 2647-2667 组; (2) 3579-3590 组; (3) 3877-3897 组; (4) 3579-3590 和 3877-3897 共转染组; (5) 阴性对照序列组; (6) 只有转染试剂的空白对照组, 每组做 3 个重复。

1.4 TRAP- 银染法定性检测端粒酶活性

转染 48 h 后, 按 Kim 法^[8]对 HepG2 细胞进行裂解。端粒酶特异性引物 TS: 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3'; ACX: 5'-GCG CGG[CTT ACC]3CTA ACC-3'。30 μ L 反应体系为: 10 \times TRAP buffer 3 μ L, dNTPs (0.5 mmol/L) 3 μ L, MgCl₂ (15 mmol/L) 3 μ L, TS (10 μ mol/L) 1.5 μ L, 细

胞裂解液 4 μ L, ddH₂O 13.6 μ L, 25 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 3 min; Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L, ACX (10 μ mol/L) 1.5 μ L, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色。

1.5 TRAP- 二聚体蝎形探针荧光定量 PCR 法检测端粒酶活性^[9-10]

二聚体蝎形探针由探针引物 (PP): FAM-5'-[CCC TAA]3- 阻断剂 -AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3' (阻断剂为 3 个碳原子的碳链, 带下划线的为探针序列) 与猝灭探针 (QP): 5'-[TTA GGG]3-3'-DABCYL 组成。该反应的下游引物为 ACX。以人工合成的寡核苷酸端粒酶延伸产物 TSR 作为标准品建立标准曲线, TSR 序列为: 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT AG[GGT TAG] 7-3'。20 μ L 反应体系为: 10 \times TRAP buffer 2 μ L, dNTPs (0.5 mmol/L) 2 μ L, MgCl₂ (15 mmol/L) 2 μ L, PP (10 μ mol/L) 1 μ L, QP (10 μ mol/L) 4 μ L, ACX (10 μ mol/L) 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.4 μ L, 细胞裂解液 2 μ L, ddH₂O 5.6 μ L, 25 $^{\circ}$ C 30 min; 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 90 s, 45 $^{\circ}$ C 90 s (采集荧光) 40 个循环。按上述荧光定量 PCR 的条件, 将 TSR 进行 10 倍量的连续稀释, 取 5 个浓度, 分别为 (copies/ μ L): 6.02×10^7 、 6.02×10^6 、 6.02×10^5 、 6.02×10^4 、 6.02×10^3 , 建立标准曲线。标准品和实验组均各做 3 个重复。

1.6 统计学处理

用 SPSS 18.0 进行统计学分析。计量资料数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验 (方差齐) 或 Dunnett 检验 (方差不齐)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人工 miRNA 表达框架的构建与鉴定

琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物为 365 bp 的目的片段, 与预期结果一致 (图 3); 测序结果经 NCBI BLAST 比对后, 与预期序列一致; RNA fold Web Server 预测特异性 miRNA 干扰序列的 RNA 二级结构, 茎环结构与小鼠 miRNA-155 (134~265 核苷酸) 有高度的相似性, 符合预期结果。

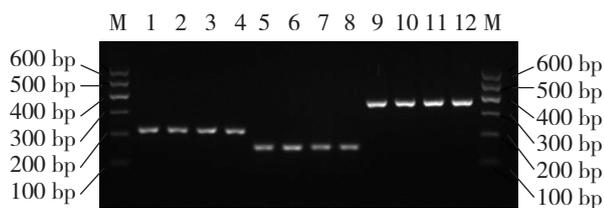


图 3 PCR 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分析结果
M: DNA Marker I; 1-4: H1 启动子 (221 bp); 5-8: 分别针对 2647-2667、3579-3590、3877-3897 位点和阴性对照的片段 B (156 bp); 9-12: 分别针对 2647-2667、3579-3590、3877-3897 位点和阴性对照的人工 miRNA 表达框架 (365 bp)

Figure 3 Analysis of the PCR products by 2.5% agarose gel electrophoresis M: DNA Marker I; 1-4: H1 promoters (221 bp); 5-8: B fragments specific to the target sites 2647-2667, 3579-3590, 3877-3897, negative control sequence, respectively (156 bp); 9-12: Artificial miRNA expression cassettes specific to the target sites 2647-2667, 3579-3590, 3877-3897, negative control sequence, respectively (365bp)

2.2 TRAP- 银染法定性检测端粒酶活性

结果显示, 与空白对照组比较, 各实验组 HepG2 细胞端粒酶活性均受到不同程度的抑制, 尤以 3579-3590 组, 3877-3897 组, 3579-3590 和 3877-3897 共转染组 3 组细胞端粒酶活性抑制明显; 阴性对照组未见明显抑制 (图 4)。

2.3 TRAP- 荧光定量 PCR 法检测端粒酶活性

单因素方差分析显示, 组间差异有统计学意义 ($F=1\ 708.6$, $P<0.05$)。两两比较采用 Dunnett 检验, 阴性对照组和空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 各实验组与空白对照组比较, 端粒酶活性均受到不同程度的抑制, 且差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); 共转染组与 3579-3590 组或 3877-3897 组比较, 端粒酶活性进一步降低 ($P<0.05$) (表 1)。

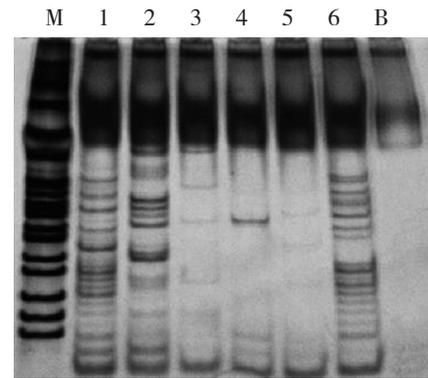


图 4 靶向 hTERT 基因的人工 miRNA 表达框架转染 HepG2 细胞对端粒酶活性的影响 M: pBR322 DNA/MspI Marker; 1: 阴性对照组; 2-5: 分别针对 2647-2667、3579-3590、3877-3897、3579-3590、3877-3897 共转染组; 6: 空白对照组; B: 双蒸水代替细胞裂解液

Figure 4 Effect of transfection of the artificial miRNA expression cassettes targeted hTERT gene on telomerase activity in HepG2 cells M: pBR322 DNA/MspI Marker; 1: negative control group; 2-5: 2647-2667, 3579-3590, 3877-3897, and co-transfected 3579-3590 with 3877-3897, respectively; 6: Blank control group; B: Double distilled water instead of cell lysates

表 1 TRAP- 二聚体蝎形探针荧光定量 PCR 法检测端粒酶活性

组别	平均数 (拷贝/μL)	标准差
空白对照组	34 686 169.86	4 050 913.01
阴性对照组	29 476 123.26	1 086 725.93
2647-2667 组	8 722 083.44	483 671.16
3579-3590 组	248 445.73	42 338.15
3877-3897 组	211 593.90	20 113.65
3579-3590+3877-3897 共转染组	294 20.82	305 1.21

3 讨论

新近研究显示, siRNA 与内源 miRNA 的过分竞争而扰乱 miRNA 的表达, 甚至使转基因动物呈现高致死性^[11-12]。与 siRNA 相比, 人工 miRNA 采用内源性 miRNA 的生成途径, 具较高的生物安全性和较低的毒副作用^[13-14], 已广泛应用于功能基因组学、抗病毒、抗肿瘤等方面的研究^[15-17]。目前应用较广的人工 miRNA 表达载体主要基于鼠源 miR-30 和 miR-155 结构; 此外, Hu 等^[18]通过比较 RNAPol II 启动子 CMV 和 RNAPol III 启动子 H1, 发现 H1 启动子有更强的转录和干扰效率。基

于上述原因,本研究参考小鼠 miR-155 的侧翼序列,构建针对 hTERT 基因的人工 miRNA 表达框架。与质粒或病毒载体等繁琐复杂的构建方法比,此新型人工 miRNA 表达框架构建采用重叠延伸 PCR 技术,仅需 1 d 时间,操作简便,成本低,尤其无病毒源性序列具生物安全性。

在 TRAP 法中,由于 PCR 反应的下游引物是端粒重复序列的互补序列,可结合在端粒重复序列的任意部位。若以此重复序列为靶设计探针,则释放的荧光信号与端粒酶延伸产物之间不能呈现正比关系,因此无法进行定量检测^[19]。本研究采用 TRAP-二聚体蝎形探针荧光定量 PCR 法,利用分子内杂交使荧光信号与 PCR 产物形成一对一的关系,提高了检测结果的准确性。研究结果表明,相比 2647-2667 组,3579-3590 和 3877-3897 组对端粒酶活性的抑制作用更加明显,说明 miRNA 主要作用于 3'UTR。共转染组与干扰单一靶点相比,端粒酶活性有显著降低,这与其他研究者得出的共转染可以提高干扰效率的实验结果一致^[20]。以上结果提示进行多位点联合抑制是可以选择的一种有效方案,为肿瘤的抑制提供新的思路。

参考文献

- [1] Xu L, Li S, Stohr BA. The role of telomere biology in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*. 2013, 8(2):49-78. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164030.
- [2] Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics[J]. *Nat Rev Cancer*. 2008, 8(3):167-179.
- [3] Park YJ, Kim EK, Moon S, et al. Human telomerase reverse transcriptase is a promising target for cancer inhibition in squamous cell carcinomas[J]. *Anticancer Res*. 2014, 34(11):6389-6395.
- [4] 张琴,巢时斌,付文金,等.体外构建的小片段发夹 RNA 对肿瘤细胞端粒酶基因表达的干扰[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(2):148-152.
- [5] 张慧慧,陈明,罗建新,等.体外构建双 H1 启动子 SECs 及其对 HepG2 细胞端粒酶活性的干扰作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18(1):53-57.
- [6] 龚霞,张慧慧,彭剑雄,等. U6/H1 双启动子 siRNA 表达框架构建及其对肿瘤细胞端粒酶活性的干扰作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(6):769-774.
- [7] Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells[J]. *Mol Cell*. 2002, 9(6):1327-1333.
- [8] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*. 1994, 266(5193):2011-2015.
- [9] Uehara H. Real-time detection and quantification of telomerase activity utilizing energy transfer primers[J]. *Methods Mol Biol*. 2006, 335:157-169.
- [10] Huang Y, Kong D, Yang Y, et al. Real-time quantitative assay of telomerase activity using the duplex scorpion primer[J]. *Biotechnol Lett*. 2004, 26(11):891-895.
- [11] Saliew-wondim D, Hölker M, Rings F, et al. Depletion of BIRC6 leads to retarded bovine early embryonic development and blastocyst formation in vitro[J]. *Reprod Fertil Dev*. 2010, 22(3):564-579.
- [12] Grimm D, Wang L, Lee JS, et al. Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver[J]. *J Clin Invest*. 2010, 120(9):3106-3119.
- [13] Boudreau RL, Martins I, Davidson BL. Artificial microRNAs as siRNA shuttles: improved safety as compared to shRNAs in vitro and in vivo[J]. *Mol Ther*. 2009, 17(1):169-175.
- [14] Liu XY, Tang QS, Chen HC, et al. Lentiviral miR30-based RNA interference against heparanase suppresses melanoma metastasis with lower liver and lung toxicity [J]. *Int J Biol Sci*. 2013, 9(6):564-577.
- [15] Patel AK, Shah RK, Parikh IK, et al. Goat activin receptor type IIB knockdown by artificial microRNAs in vitro[J]. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014, 174(1):424-436.
- [16] Liu X, Fang H, Chen H, et al. An artificial miRNA against HPSE suppresses melanoma invasion properties, correlating with a down-regulation of chemokines and MAPK phosphorylation[J]. *PLoS One*. 2012, 7(6):e38659. doi: 10.1371/journal.pone.0038659.
- [17] Chi Y, Wang X, Yang Y, et al. Survivin-targeting Artificial MicroRNAs Mediated by Adenovirus Suppress Tumor Activity in Cancer Cells and Xenograft Models[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014, 3:e208. doi: 10.1038/mtna.2014.59.
- [18] Hu T, Chen P, Fu Q, et al. Comparative studies of various artificial microRNA expression vectors for RNAi in mammalian cells[J]. *Mol Biotechnol*. 2010, 46(1):34-40.
- [19] Skvortsov DA, Zvereva ME, Shpanchenko OV, et al. Assays for detection of telomerase activity[J]. *Acta Naturae*. 2011, 3(1):48-68.
- [20] Xu W, Chang H, Qin CK, et al. Impact of Co-transfection with Livin and survivin shRNA expression vectors on biological behavior of HepG2 cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013, 14(9):5467-5472.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 徐慧,龚霞,赵丹丹,等.靶向hTERT人工miRNA表达框架的构建及其对HepG2细胞端粒酶活性的抑制作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(12):1647-1651. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.12.009

Cite this article as: XU H, GONG X, ZHAO DD, et al. Construction of artificial miRNA expression cassettes targeting hTERT and their inhibitory effects on telomerase activity in HepG2 cells[J]. *Chin J Gen Surg*. 2014, 23(12):1647-1651. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.12.009