

构建MicroRNA-29a和microRNA-29c腺病毒并探讨其对膀胱癌细胞增殖能力的影响

范砚茹 杜红飞 宋学东 罗春丽*

(重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

摘要 构建miRNA-29a/c的重组腺病毒并观察其对膀胱癌T24细胞增殖能力的调控。以人全基因组DNA为模板, PCR扩增miR-29a、miR-29c, 克隆至腺病毒穿梭载体pAdtrace-TO4-CMV。重组穿梭载体经*pme* I线性化后与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1共转化感受态大肠杆菌BJ5183, 通过同源重组获得重组腺病毒质粒pAdEasy-1-miR-29a、pAdEasy-1-miR-29c, *pac* I线性化后转染HEK-293细胞, 进行包装和扩增。实时荧光定量PCR检测感染腺病毒的膀胱癌T24细胞中miR-29a、miR-29c的表达水平, 并利用CCK-8实验检测细胞增殖能力。经DNA测序和限制性内切酶分析显示, 重组腺病毒质粒pAdEasy-1-miR-29a、pAdEasy-1-miR-29c构建成功; 感染腺病毒Ad-miR-29a和Ad-miR-29c后, 经实时荧光定量PCR检测, 膀胱癌细胞中miR-29a、miR-29c表达显著增高($P<0.01$); 过表达miR-29a/c后的CCK-8实验显示, 细胞增殖能力明显低于对照组($P<0.05$)。以上说明已成功构建miR-29a、miR-29c腺病毒, 过表达miR-29a/c可抑制膀胱癌细胞的增殖。

关键词 microRNA-29a; microRNA-29c; 腺病毒; 膀胱癌; 细胞增殖

MiR-29a and miR-29c Recombinant Adenovirus Vector Regulate Proliferation of Human Bladder Cancer Cells

Fan Yanru, Du Hongfei, Song Xuedong, Luo Chunli*

(College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To construct recombinant adenovirus vector containing human miR-29a and miR-29c and to determine its effect on the proliferation in human bladder cancer T24 cells, the PCR product containing miR-29a/c was amplified from human genomic DNA and inserted into the adenoviral shuttle vector pAdTrace-TO4-CMV. Then, the recombinant shuttle plasmid linearized by *pme* I was co-transformed into competent *E. coli*. BJ5183 with the adenoviral backbone plasmid pAdEasy-1. Then, the recombinant adenoviral DNA was transfected into HEK293 cells, packed and amplified miR-29a and miR-29c adenoviruses. T24 cells were infected by Ad-miR-29a and Ad-miR-29c. The expression of mature miR-29a/c was detected by Real-time PCR. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay before and after infected miR-29a/c. Real-time PCR showed that miR-29a and miR-29c significantly up-regulated in T24 cells infected with Ad-miR-29a and Ad-miR-29c ($P<0.01$). CCK-8 assay showed that cell proliferation was significantly depressed after infection ($P<0.05$). The adenovirus vector Ad-miR-29a and Ad-miR-29c were constructed successfully and the over-expression of miR-29c inhibited the proliferation of T24 cells.

Key words miR-29a/c; adenovirus; bladder cancer; cell proliferation

收稿日期: 2013-09-26 接受日期: 2013-11-19

*通讯作者。Tel: 023-68584890, E-mail: luochunli79@126.com

Received: September 26, 2013 Accepted: November 19, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-23-68584890, E-mail: luochunli79@126.com

网络出版时间: 2014-01-20 16:13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0313.html>

miRNA是一类长度约为21个碱基的非编码小分子RNA。成熟的miRNA是由60~80个碱基的发夹状双链RNA经RNase III Dicer剪切而来^[1]。据报道,至少30%的人类基因受到miRNA的调控^[2]。研究证实, miRNA通过与mRNA 3'非翻译区(3'UTR)的不完全互补,影响mRNA的稳定性或抑制mRNA的翻译,从而抑制基因表达。相反,也有部分miRNA与mRNA的5'端作用,上调相应基因的表达^[3-5]。

miR-29家族包括miR-29a/b/c, miR-29a和miR-29c分别位于第7和第1号染色体。MiR-29a/c为其家族主要成员, Dyrskjot等^[6]发现其在膀胱癌组织、细胞中表达降低。但是, miR-29a/c在膀胱癌中的具体生物学功能及作用机制尚无相关报道。

为进一步阐释miR-29a、miR-29c在膀胱癌中的生物学功能及其作用机制,本研究利用AdEasy系统构建了miR-29a、miR-29c腺病毒表达载体。通过实时荧光定量PCR(Real-time PCR)对Ad-miR-29a、Ad-miR-29c在体外表达进行了验证,利用CCK-8实验检测miR-29c可抑制膀胱癌细胞的增殖能力,为进一步研究miR-29a/c对膀胱癌细胞的增殖、凋亡及迁移等提供了良好的研究工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞 腺病毒穿梭质粒pAdtrace-TO4, 腺病毒骨架质粒pAdEasy-1, 大肠杆菌DH5 α 、BJ5183、HEK-293细胞及膀胱癌细胞T24均由重庆医科大学临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶*pme* I和*pac* I购自Fermentas公司; 限制性内切酶*Hind* III、*Bam*H I、T4 DNA连接酶、DNA聚合酶、DNA marker、实时荧光定量PCR和逆转录试剂盒、PCR纯化试剂盒等均购自TaKaRa公司(日本); 质粒提取试剂盒购自OMEGA公司; DNA提取试剂盒购于TIANGENE公司; 脂质体LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司(美国); DMEM培养基购自Hyclone公司(美国); PCR引物及测序由上海英潍捷基(Invitrogen)贸易有限公司完成, CCK-8购于Beyotime生物有限公司(中国)。

1.1.3 引物设计 MiR-29a、miR-29c前体检测引物序列如下: 上游引物MiR-29a: 5'-CCT AGC ACC ATC TGA AAT CG-3', miR-29c: 5'-GCC TAG CAC

CAT TTG AAA TCG-3'; 通用下游引物序列: 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3', miRNA逆转录引物: 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT AAC CG-3'。据GenBank中编码人MiR-29a、miR-29c的基因组DNA序列, 运用primer 5.0设计合成MiR-29a、miR-29c的引物, 上游引物序列: 5'-CGC GGA TCC ATG GTT AAA GAG CCC AAT GTA TGC TG-3', 5'-CGC GGA TCC ATG CGG CGT TGA TTG CGG GGC A-3'; 下游引物序列: 5'-CCC AAG CTT TCAG TAT AAC CAT TCA TGA TAT GCT AA-3'及5'-CCC AAG CTT TC A CAG CAA AAT GCA ACT AGA GAA CAT C-3'; 划线处为酶切位点*Bam*H I和*Hind* III; U6上游引物: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', U6下游引物: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

1.2 方法

1.2.1 miR-29a、miR-29c基因扩增 提取人体膀胱癌旁组织基因组DNA, PCR扩增miR-29a、miR-29c。扩增片段大小分别为360 bp、390 bp, 将PCR产物进行纯化。PCR反应条件: 预变性94 °C 1 min; 变性94 °C 30 s, 退火56.4 °C/63.9 °C 30 s, 延伸72 °C 1 min, 扩增35个循环; 再延伸72 °C 5 min。之后进行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 试剂盒纯化PCR产物。

1.2.2 重组穿梭质粒pAdTrace-TO4-CMV-miR-29a/c的构建 用*Bam*H I和*Hind* III双酶切miR-29a/c-PCR和pAdTrace-TO4质粒, 纯化酶切后产物, 经T4连接酶于16 °C水浴反应16 h。连接产物转化感受态大肠杆菌DH5 α , 用含50 mg/L硫酸卡那霉素的LB平板进行筛选。挑选部分克隆菌落, 提取质粒。经*Bam*H I和*Hind* III双酶切及PCR鉴定, 并送Invitrogen公司测序。鉴定正确的重组腺病毒穿梭质粒命名为pAdTrace-TO4-CMV-miR-29a/c。

1.2.3 重组腺病毒质粒的构建 *Pme* I酶切重组穿梭质粒pAdTrace-TO4-CMV-miR-29a/c。将线性化的重组穿梭质粒与腺病毒骨架质粒(pAdEasy-1)共转染大肠杆菌BJ5183感受态细菌。用含有50 mg/L硫酸卡那霉素的LB平板筛选阳性克隆。挑选出数个阳性克隆, 经扩增培养后, 提取质粒并进行*Pac* I酶切鉴定。鉴定正确的重组腺病毒质粒命名为pAdEasy-1-miR-29a/c, 保存菌株和病毒质粒。

1.2.4 HEK293细胞包装、扩增重组腺病毒 重组腺病毒质粒pAdEasy-1-miR-29a/c经*Pac* I酶切线性

化,乙醇沉淀后,产物按照Lipofectamine™ 2000使用说明,对融合度达50%的HEK293细胞进行转染,置于37 °C、5% CO₂环境培养48 h后,观察细胞病变和荧光情况。细胞生长至90%以上且发生细胞病变效应时,收集细胞,反复冻融3次,涡旋离心后,4 °C、12 000 r/min离心15 min,收集细胞裂解上清液即第一代重组腺病毒,扩大培养HEK293细胞,利用病毒反复感染细胞以提高病毒滴度。

1.2.5 重组腺病毒的鉴定 将Ad-miR-29a/c腺病毒、Ad-pAdTrace-TO4空载腺病毒分别感染T24细胞,48 h后利用TRIzol提取细胞总RNA,逆转录为cDNA后,采用实时荧光定量PCR检测miR-29a、miR-29c表达变化。MiRNA逆转录引物: 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT AAC CG-3'。按照TaKaRa公司逆转录试剂盒说明进行。实时定量PCR条件: 预变性95 °C 30 s; 变性95 °C 10 s, 退火53 °C 20 s, 延伸72 °C 30 s, 重复40个循环; 溶解曲线: 65 °C~95 °C, 每5 s增加0.5 °C。以U6为内参,用2^{-ΔΔCt}值计算目的基因的相对表达量。

1.3 CCK-8实验

将生长良好的T24细胞接种于96孔板(1 000/孔),培养12 h后感染miR-29c腺病毒,分别在1, 2, 3, 4 d时加入CCK-8试剂,继续培养4 h后在酶标仪上检测各组D值。分别设置未感染及感染空载体的T24为对照,并设置试剂对照组,每组设5个复孔。

1.4 统计学处理

各项数据使用SPSS 17.0软件分析,以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用配对t检验,组间比较用One-way ANOVA分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

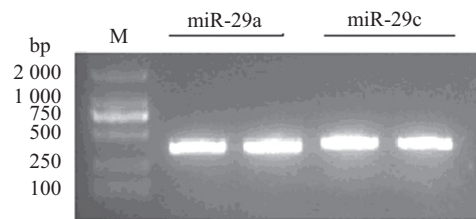
2 结果

2.1 miR-29a、miR-29c基因扩增鉴定

PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析可见,在360 bp及390 bp的miR-29a、miR-29cDNA片段,大小与理论值相符(图1)。

2.2 重组穿梭质粒pAdTrace-TO4-cMV-miR-29a/c的鉴定

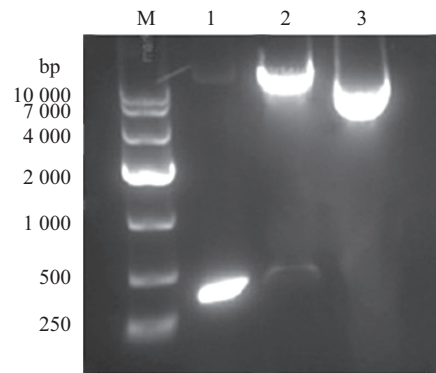
克隆的miR-29a和miR-29c的前体序列在人基因组中的长度分别约为360 bp、390 bp。对筛选出的阳性克隆用miR-29a和miR-29c检测引物经PCR检测以及BamH I和Hind III双酶切检测,均检测出大小相同的片段(图2和图3)。对重组质粒进行测序,结果



M: DNA marker DL2000; miR-29a: 360 bp; miR-29c: 390 bp.

图1 miR-29a、miR-29c基因PCR扩增产物

Fig.1 PCR products of miR-29a and miR-29c genes

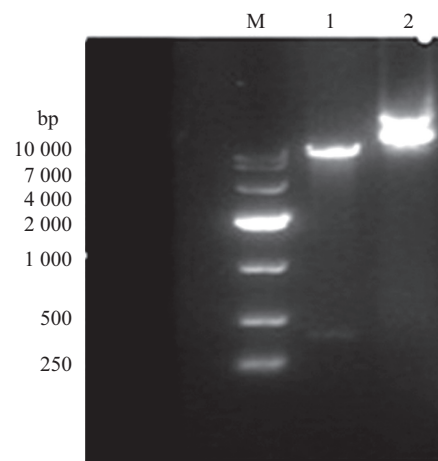


M: DNA marker DL10000; 1: miR-29a PCR产物; 2: 质粒pAdTrace-TO4-miR-29a酶切产物; 3: pAdTrace-TO4。

M: DNA marker DL10000; 1: PCR production of miR-29a; 2: restrictive enzyme digestion production of pAdTrace-TO4-miR-29a; 3: pAdTrace-TO4.

图2 PCR及BamH I和Hind III双酶切鉴定pAdTrace-TO4-CMV-miR-29a

Fig.2 Identification of recombinant shuttle plasmid with restrictive enzyme digestion and PCR



M: DNA marker DL10000; 1: 质粒pAdTrace-TO4-miR-29c酶切产物; 2: pAdTrace-TO4。

M: DNA marker DL10000; 1: restrictive enzyme digestion production of pAdTrace-TO4-miR-29c; 2: pAdTrace-TO4.

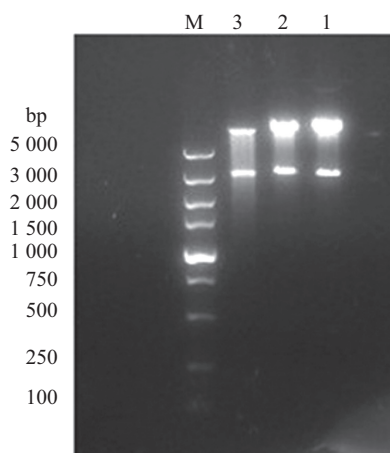
图3 BamH I和Hind III双酶切检测pAdTrace-TO4-cMV-miR-29c

Fig.3 Identification of recombinant shuttle plasmid with restrictive enzyme digestion

也证明插入的片段是miR-29a和miR-29c前体序列。

2.3 重组腺病毒质粒载体的鉴定

重组腺病毒质粒经*Pac* I酶切鉴定,可切出3.0 Kb或4.5 Kb大小的片段(图4)。说明重组腺病毒Ad-miR-

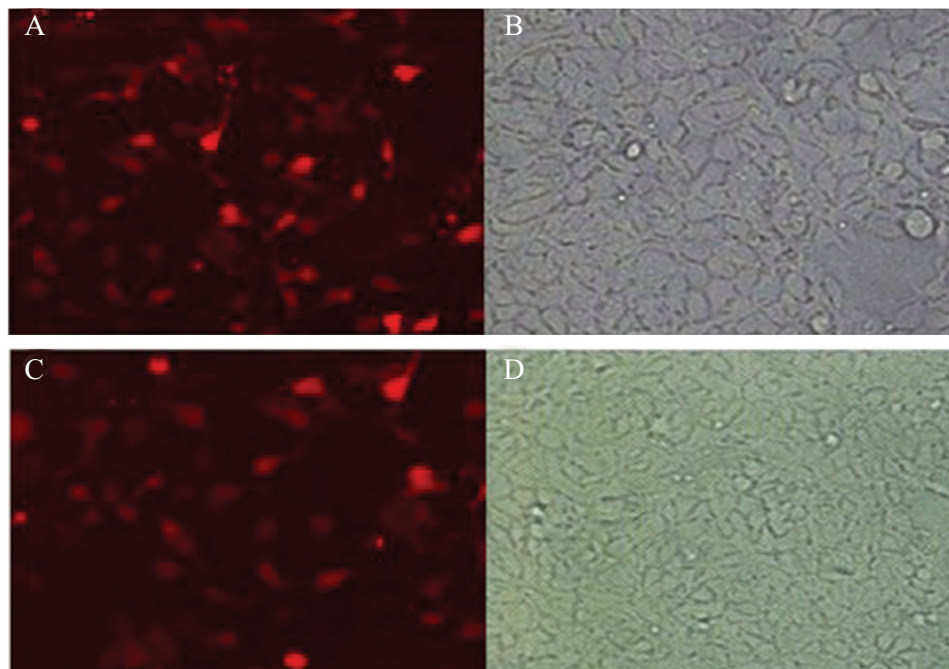


M: DNA marker 5000; 1, 2: pAdEasy-1-miR-29a *Pac* I酶切产物; 3: pAdEasy-1-miR-29c *Pac* I酶切产物。

M: DNA marker 5000; 1: *Pac* I enzyme digestion production of pAdEasy-1-miR-29a; 2: *Pac* I enzyme digestion production of pAdEasy-1-miR-29c.

图4 重组腺病毒质粒酶切鉴定

Fig.4 Identification of recombinant plasmid with plasmid with restrictive enzyme digestion



A: miR-29a红色荧光; B: miR-29a白光; C: miR-29c红色荧光; D: miR-29c白光。

A: red fluorescence of miR-29a; B: the white light of miR-29a; C: red fluorescence of miR-29c; D: the white light of miR-29c.

图5 重组腺病毒质粒转染HEK-293细胞9天后荧光显微镜观察(100×)

Fig.5 Inverted microscope of HEK-293 cells 9 days after being transfected with recombinant adenovirus plasmid (100×)

29a和Ad-miR-29c质粒构建成功。

2.4 重组腺病毒的包装和扩增

重组腺病毒质粒转染HEK-293细胞48 h后,可观察到红色荧光,12 d后收集病毒(图5),经4轮扩增可得到滴度为 1.6×10^{12} 的病毒液。

2.5 Real-time PCR检测miR-29a、miR-29c表达

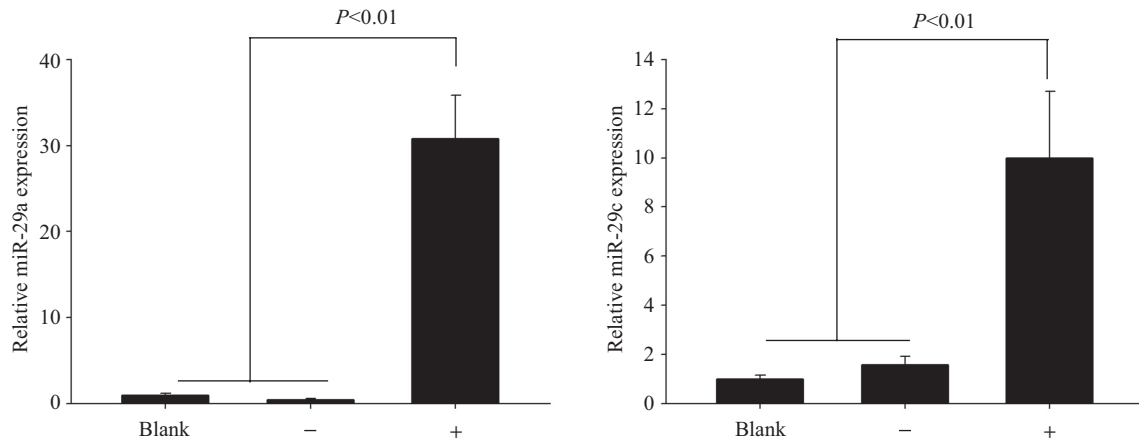
Ad-miR-29a、Ad-miR-29c感染T24细胞48 h后,miR-29a、miR-29c的表达水平较阴性对照病毒Ad-pAdTrace-TO4以及未感染病毒的细胞显著升高(图6)。

2.6 CCK-8实验

CCK-8实验检测细胞增殖,培养第2 d实验组细胞与其他两组相比细胞增殖速度明显减慢,细胞增殖抑制率约为未转染组2倍左右($P < 0.05$)。未感染组细胞及感染空载腺病毒细胞组间无明显差异,说明miR-29a/c显著抑制T24细胞的增殖(图7)。

3 讨论

MiR-29家族由miR-29a/29b/29c组成,miR-29a及miR-29c分别位于染色体7q32及1q32^[7]。近来,多项研究证实miR-29s在急性髓细胞白血病、套细胞淋巴瘤、鼻咽癌、胆管上皮细胞癌、肝细胞癌等多种肿瘤中表达异常,对肿瘤的发育、分化、增殖

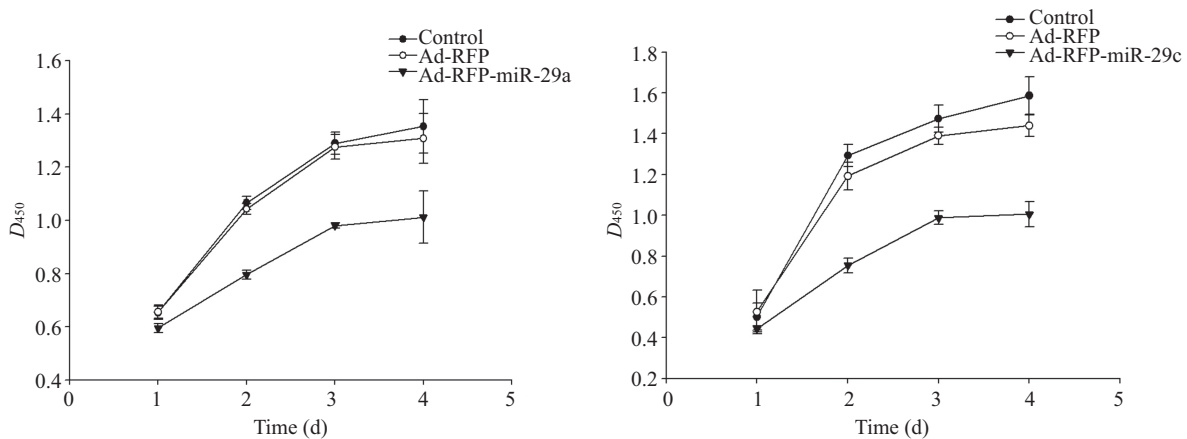


Blank: 正常T24细胞; -: 感染Ad-pAd-Trance-TO4腺病毒的T24细胞; +: 感染Ad-miR-29a或Ad-miR-29c腺病毒的T24细胞。

Blank: T24 cells; -: T24 cells infected by Ad-pAd-Trance-TO4; +: T24 cells infected by Ad-miR-29a/c.

图6 Ad-miR-29a/c腺病毒感染T24细胞后miR-29a、miR-29c表达

Fig.6 Identify expressions of miR-29a and miR-29c of T24 cells infected by Ad-miR-29a/c



A: miR-29a抑制T24细胞生长; B: miR-29c抑制T24细胞生长。

A: inhibiting effects of miR-29a on T24 cell growth; B: inhibiting effects of miR-29c on T24 cell growth.

图7 miR-29a/c对T24细胞的生长抑制作用

Fig.7 Inhibiting effects of miR-29a/c on T24 cell growth

及凋亡都有着重要的作用。如miR-29a/29b/29c在急性髓细胞白血病中表达下调,并且通过与CDK6的3'UTR区域靶向性结合,使其表达降低,抑制CDK6与CyclinD1结合,从而抑制肿瘤增殖,促进凋亡;研究者发现,在胆管癌和肝癌中MiR-29直接靶向抗凋亡蛋白MCL1及BCL-2,促进肝癌细胞凋亡^[8-14]。近来, Dyrskjot等^[6]利用健康人体及膀胱癌患者组织标本进行芯片检测,发现miR-29a/c在膀胱癌中表达显著下调,并且对不同阶段的癌组织进行检测,发现miR-29a/c表达与膀胱癌的进展及预后等有关。但是,关于miR-29a/c在膀胱癌中的具体作用机制及相应基因调控机制尚不清楚,因此,为了更进一步研究miR-29a、miR-29c在膀胱癌细胞中的生物学功能,本课题充分利用腺病毒具有感染效率高、宿主广泛、载体

容量大、不整合进宿主染色体、容易制备等优点^[15],成功构建了表达Ad-miR-29a、Ad-miR-29c的腺病毒载体,并对miR-29c对膀胱癌细胞增殖能力的影响做了初步探讨,这为进一步深入研究其生物学功能及其具体分子机制提供了有效的理论依据及分子工具。

本课题组将从循环血液入手,检测正常人及癌症病人血清中miR-29a/c的表达,为膀胱癌的快速诊断提供实验依据;本实验已初步验证miR-29a/c抑制膀胱癌细胞的增殖,根据<http://www.microrna.org/microrna>及<http://www.targetscan.org>数据库预测miR-29a/c的靶基因,本课题组将进一步验证miR-29a/c与AKT的靶位关系,是否通过抑制PI3K/AKT信号通路从而抑制膀胱癌细胞的增殖,探索以miR-29a/c为靶点诊断和治疗膀胱癌的可能性。

参考文献 (References)

- 1 Kosik KS. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(12): 911-20.
- 2 Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455(7209): 58-63.
- 3 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9(2): 102-14.
- 4 Bartel DP. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- 5 Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjot L, Ramanathan R, Hansen TB, *et al.* Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *Int J Cancer* 2011; 128(6): 1327-34.
- 6 Dyrskjot L, Ostenfeld MS, Bramsen JB, Silahatoglu AN, Lamy P, Ramanathan R, *et al.* Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death *in vitro*. *Cancer Res* 2009; 69(11): 4851-60.
- 7 Schneider B, Nagel S, Kaufmann M, Winkelmann S, Bode J, Drexler HG, *et al.* T(3;7)(q27;q32) fuses BCL6 to a non-coding region at FRA7H near miR-29. *Leukemia* 2008; 22(6): 1262-6.
- 8 Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, Fabbri M, Volinia S, Tsao T, *et al.* MicroRNA-29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114(26): 5331-41.
- 9 Garzon R, Liu S, Fabbri M, Fabbri M, Volinia S, Tsao T, *et al.* MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene re-expression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 2009; 113(25): 6411-8.
- 10 Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. MiR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: Regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem* 2009; 108(1): 216-24.
- 11 Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, *et al.* MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(15): 5874-8.
- 12 Zhao JJ, Lin J, Lwin T, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, *et al.* MicroRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* 2010; 115(13): 2630-9.
- 13 Xiong Y, Fang JH, Yun JP, Yang J, Zhang Y, Jia WH, *et al.* Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 51(3): 836-45.
- 14 Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007; 26(42): 6133-40.
- 15 He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(5): 2509-14.