

lncRNA H19通过调控miR-146a抑制 HBV复制的分子机制

曾蓉¹ 张自力¹ 刘佳敏¹ 余玲¹ 叶青² 潘万龙^{1*}

(¹川北医学院基础医学与法医学院, 南充 637000; ²川北医学院附属医院, 南充 637000)

摘要 该文旨在探讨lncRNA H19通过miR-146a调控乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)复制的分子机制, 为阐明HBV复制的分子机制奠定基础。实时荧光定量PCR(real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测在HepG2及HBV稳定复制细胞系HepG2.2.15中H19的相对表达水平, 荧光原位杂交检测HBV(-)与HBV(+)患者肝组织中H19的表达量; 分别过表达或敲低HepG2.2.15细胞中的H19、miR-146a、结构特异性flap核酸内切酶1(flavonoid endonuclease 1, *FEN1*)基因, RT-qPCR分别检测H19、miR-146a及其下游靶基因白介素1受体相关激酶1抗体(interleukin-1 receptor-associated kinase 1, *IRAK1*)/肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNF receptor associated factor 6, *TRAF6*)、*FEN1*的表达水平, 定量PCR(quantitative polymerase chain reaction, q-PCR)检测HBV DNA拷贝数, 蛋白免疫印记法(Western blot, WB)检测FEN1蛋白表达水平, 同时, 收集10例临床HBV(+)肝组织, 5例HBV(-)肝组织检测上述指标, 采用WB、免疫组化分别检测两组标本中FEN1蛋白的表达水平。在HepG2.2.15细胞中的H19水平较对照组降低99%, 荧光原位杂交结果显示HBV(+)肝组织中H19水平较HBV(-)肝组织降低($P < 0.01$)。在HepG2.2.15细胞中过表达H19后, HBV DNA拷贝数较对照组降低 $(1.13 \pm 0.05) \times 10^5$, miR-146a、*FEN1*表达量分别降低63%、62%; 过表达miR-146a、*FEN1*后, HBV DNA拷贝数分别较对照组升高 $(1.45 \pm 0.05) \times 10^5$ 、 $(0.90 \pm 0.13) \times 10^5$, H19表达量分别降低51%、54%($P < 0.05$)。临床标本实验结果显示, 与HBV(-)肝组织相比, RT-qPCR发现HBV(+)肝组织中H19表达量降低81%, miR-146a、*FEN1*表达量分别升高21.92、5.14倍, 同时WB、免疫组化均显示FEN1蛋白水平升高($P < 0.05$)。lncRNA H19通过下调miR-146a的表达, 作用于下游靶基因*IRAK1/TRAF6*, 进而降低*FEN1*的表达量抑制HBV DNA的复制, 为阐明HBV复制的分子机制奠定了基础。

关键词 长链非编码RNA H19; 微小RNA-146a; 乙型肝炎病毒复制; 结构特异性flap核酸内切酶1

The Molecular Mechanism of lncRNA H19 Regulating miR-146a to Inhibit HBV Replication

ZENG Rong¹, ZHANG Zili¹, LIU Jiamin¹, YU Ling¹, YE Qing², PAN Wanlong^{1*}

(¹School of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China;

²Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract This study aims to investigate the molecular mechanism of lncRNA H19 regulating HBV (hepatitis B virus) replication through miR-146a, and lay the foundation for exploring the molecular mechanisms of HBV replication. The relative expression levels of H19 in HepG2 and HBV stable replicating cell line HepG2.2.15 were

收稿日期: 2023-05-18

接受日期: 2023-10-19

川北医学院国家自然科学基金预研项目(批准号: 7500820086)和南充市市校科技战略合作专项资金项目(批准号: 22SXQT0318)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13198198108, E-mail: panwl@aliyun.com

Received: May 18, 2023

Accepted: October 19, 2023

This work was supported by the Sichuan North Medical College National Natural Science Foundation Pre-Liminary Research Project (Grant No.7500820086) and the Nanchong City School Science and Technology Strategic Cooperation Special Funds Project (Grant No.22SXQT0318)

*Corresponding author. Tel: +86-13198198108, E-mail: panwl@aliyun.com

detected by RT-qPCR (real time quantitative polymerase chain reaction), and the expression levels of H19 in liver tissues of HBV (–) and HBV (+) patients were detected by fluorescence *in situ* hybridization. After overexpression or knockdown of H19, miR-146a and *FEN1* (flap endonuclease 1) in HepG2.2.15 cells, the expression levels of H19, miR-146a and its downstream target genes *IRAK1* (interleukin-1 receptor-associated kinase 1)/*TRAF6* (TNF receptor associated factor 6) and *FEN1* were detected by RT-qPCR, the copy number of HBV DNA was detected by q-PCR (quantitative polymerase chain reaction), and the expression level of FEN1 protein was detected by WB (Western blot). At the same time, 10 cases of clinical HBV (+) liver tissues and five cases of HBV (–) liver tissues were collected to test the above indexes, and WB and immunohistochemistry were used to test the protein expression level of FEN1 in the two groups of specimens, respectively. In HepG2.2.15 cells, H19 decreased by 99% compared to the control group. Fluorescence *in situ* hybridization demonstrated that the expression of H19 in HBV (+) liver tissue was lower than that in HBV (–) liver tissue ($P < 0.01$). After overexpressing of H19 in HepG2.2.15 cells, HBV DNA copies decreased by $(1.13 \pm 0.05) \times 10^5$ compared with the control group, and miR-146a and *FEN1* decreased by 63% and 62%, respectively; after overexpression of miR-146a and FEN1 in HepG2.2.15 cells, HBV DNA copies increased by $(1.45 \pm 0.05) \times 10^5$ and $(0.90 \pm 0.13) \times 10^5$, respectively, and H19 decreased by 51% and 54% compared with the control group ($P < 0.05$). The results of clinical specimens showed that compared with HBV (–) liver tissues, RT-qPCR revealed that H19 decreased by 81% in HBV (+) liver tissue, miR-146a, *FEN1* increased 21.92 and 5.14 times, respectively. Meanwhile, both WB and immunohistochemistry showed upregulated FEN1 protein ($P < 0.05$). lncRNA H19 acts on the downstream target gene *IRAK1/TRAF6* by down-regulating the expression of miR-146a, thereby reducing the expression of *FEN1* and inhibiting the replication of HBV DNA, laying the foundation for exploring the molecular mechanisms of HBV replication.

Keywords lncRNA H19; miR-146a; HBV replication; *FEN1*

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是严重肝脏疾病发生的危险因素之一^[1]。在HBV感染过程中, 肝脏微环境及其调节因素对HBV的复制和增殖起着关键作用。其中, 长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 作为正常肝脏发育的重要调节因子, 在肝脏中表现出时空和组织特异性, 高度程序化地调节发育和发病过程^[2]。lncRNA是一种长度超过200个核苷酸的非编码RNA, 以往被视为“转录噪音”, 近年来发现其可在转录及转录后水平调控基因表达^[3-4], 且与肿瘤、免疫及炎症 (特别是病毒感染) 等重大疾病的发生发展关系密切^[5]。已有研究表明, PCNAP1、HULC等lncRNA可以影响HBV复制^[6-7]。此外, lncRNA根据其亚细胞定位不同而执行不同的调节功能。在细胞核内, lncRNA主要参与染色质调控、转录调控和可变剪接调控。在细胞质内, lncRNA可通过竞争性内源RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 的作用方式吸附miRNA, 从而调节mRNA的稳定性^[8-9]。

H19作为最早被鉴定和表征的lncRNA之一, 除了调控肝细胞的正常发育之外, 还在多种肝脏疾病

(比如肝细胞癌、非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎和胆汁淤积性肝纤维化) 中表达异常^[10]。H19可作为基因表达的多任务调节器影响肝脏细胞^[11-12]。研究表明, H19调节细胞的机制包括: 表观遗传调节, 产生miR-675发挥作用, 与特定的miRNA的碱基配对和整合而作为竞争性内源RNA发挥作用, 以及通过结合RNA结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 来调节mRNA的稳定性^[13]。因此, H19可以作为基因调控因子影响miRNA的活性及其各自靶mRNA的水平, 如H19通过竞争性结合miR-29b-3p, 消除miR-29b-3p对靶mRNA的抑制作用^[14]。

此外, miRNA在HBV复制中的作用逐渐被证实, 其作为宿主病毒相互作用的关键调节因子, 参与HBV感染、HBV复制和HBV相关疾病的调节。研究发现, miR-146a的表达与HBV复制水平呈正相关^[15-17]。miRNA是一类重要的转录后调控因子, 在转录后水平上可以与靶基因的3'-非翻译区相结合, 从而在转录后水平下调靶基因的表达^[18-19]。然而, H19是否可以通过调控miRNA进而调节HBV复制还有待深入研究。

我们的前期研究表明, miR-146a可以通过促进

HBV DNA复制关键酶结构特异性flap核酸内切酶1(flap endonuclease 1, *FEN1*)的表达, 进而增强HBV DNA复制^[20-21]。基于此, 我们提出研究假设: H19通过调控miR-146a, 进而下调HBV复制关键酶FEN1并抑制HBV复制。为验证该假设, 我们拟从细胞水平及人体组织标本水平加以研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂

HBV(-/+)患者手术切除标本均来自川北医学院附属医院[对本研究所取得的标本通过患者前期进行的血液乙肝检查进行分类; 所有患者均签署了知情同意书; 各项研究程序均符合伦理学规定, 并通过了川北医学院伦理委员会批准(批准号: 2023001)]。人肝癌细胞株HepG2、HBV稳定复制肝癌细胞HepG2.2.15购自赛佰康生物技术有限公司; 高糖DMEM培养基购自美国Gibco公司; 胎牛血清、胰酶购自以色列BI公司; Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司; 细胞冻存液购自苏州新赛美生物科技有限公司; RNA逆转录试剂盒、microRNA逆转录试剂盒购自美国ThermoFisher Scientific公司; miRNeasy Mini试剂盒购自德国QIAGEN公司; 荧光定量PCR检测试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司; miRNA探针PCR试剂盒购自成都格知生物技术有限公司; 细胞裂解液RIPA、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE快速凝胶配制试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 鼠抗人FEN1多克隆抗体、兔抗人GAPDH单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠IgG均购自成都正能生物技术有限公司; HRP标记的山羊抗兔IgG购自爱博泰克生物科技有限公司; RNA FISH试剂盒购自苏州吉玛基因股份有限公司; 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; H19、*FEN1*、*IRAK1*、*TRAF6*和*GAPDH*引物由北京擎科生物科技有限公司合成; H19、*FEN1*质粒由实验室前期构建保存; H19 siRNA(Ribo smart silencer)、miR-146a模拟物和抑制剂均由广州锐博生物科技有限公司合成; *FEN1* siRNA由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 在37 °C、5% CO₂细胞培养箱中, 用含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的高糖DMEM培养HepG2细胞及HepG2.2.15细胞, 在

HepG2.2.15细胞培养基中加入G418, 以保持HBV稳定复制。待其贴壁生长, 当细胞融合度达到80%~90%时, 常规换液、传代, 分别铺于细胞培养板中。

1.2.2 细胞转染 胰酶消化培养的HepG2.2.15细胞, 将其以每孔 5×10^5 个的细胞密度铺于6孔板内, 12~16 h后饥饿培养30 min, 按照Lipofectamine 2000说明书步骤分别对H19、miR-146a、*FEN1*基因进行过表达或敲低干预, 转染4~6 h后使用无抗生素完全培养基换液, 48 h收取细胞。前期通过RT-qPCR筛选H19、*FEN1* siRNA序列以用于后续实验。H19、*FEN1* siRNA、miR-146a模拟剂和miR-146a抑制剂的序列见表1。

1.2.3 苯酚-氯仿法提取HBV DNA 收取细胞、组织, 加入HBV核心颗粒提取试剂, 37 °C孵育15 min, 离心($15\,000 \times g$ 、6 min)取上清, 加入MgCl₂、DNase I、RNase后于37 °C孵育4 h, 加入PEG8000冰上孵育1 h, 然后加入消化液和蛋白酶K, 45 °C孵育过夜; 次日, 加入苯酚-氯仿-异戊醇混合物离心($14\,000 \times g$ 、3 min)取上清, 加入异丙醇沉淀DNA, 乙醇清洗DNA, 最后加入无酶水溶解DNA。

1.2.4 总RNA提取、逆转录及染料法实时荧光定量PCR 收取细胞、组织, 用Trizol法提取细胞总RNA, 采用两步法将其反转录成cDNA链。步骤1: 1 μg反应RNA, 1 μL随机引物, 补足无酶水至12 μL, 65 °C孵育5 min; 步骤2: 4 μL 5× 缓冲液, 2 μL dNTP混合物; 1 μL RNA抑制酶和逆转录酶, 25 °C孵育5 min, 42 °C孵育60 min, 70 °C孵育5 min。以逆转cDNA或酚氯仿法提取的HBV DNA为模板, 加5 μL 2× Ultra SYBR混合物、0.4 μL正向/反向引物(10 μmol/L)、0.8 μL cDNA, 补足无酶水至10 μL。检测基因表达: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火/延伸1 min, 39个循环。按照标准曲线计算HBV DNA绝对表达量, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因相对表达量。引物序列见表2。

1.2.5 miRNA提取、逆转录及TaqMan探针实时荧光定量PCR 收取细胞、组织, 使用Trizol裂解细胞后加入氯仿抽提, 使用miNeasy Mini试剂盒分离总RNA, 使用miR-146a及U6特异性引物分别逆转miR-146a及U6。反应体系: 0.15 μL dNTP, 1 μL逆转录酶, 1.5 μL缓冲液, 0.19 μL核酸酶抑制剂, 1.5 μL miR-146a/U6引物, 9.16 μL反应RNA, ddH₂O补足至15 μL; 16 °C孵育30 min, 42 °C孵育30 min, 85 °C孵育5 min。以逆转cDNA为模板, 加入5 μL荧光探针混合液, 0.72 μL 16× 引物探针混合液, 2 μL cDNA,

表1 小干扰RNA序列、miRNA模拟剂和miRNA抑制剂序列

Table 1 Sequences for siRNA and miRNA mimic/inhibitor

小干扰RNA和miRNA siRNA and miRNA	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
H19 siRNA	siRNA1 Forward: CCA ACA TCA AAG ACA CCA T Reverse: ATG GTG TCT TTG ATG TTG G siRNA2 Forward: CCC GTC CCT TCT GAA TTT A Reverse: TAA ATT CAG AAG GGA CGG G siRNA3 Forward: CGT GAC AAG CAG GAC ATG A Reverse: TCA TGT CCT GCT TGT CAC G ASO CCA CGG AGT CGG CAC ACT AT CTC CAT CTT CAT GGC CAC CC CAC CTT GGC AAG TGC CTG TG
FEN1 siRNA	Forward: GCC CGU GUA UGU CUU UGA UTT Reverse: AUC AAA GAC AUA CAC GGG CTT
miR-146a mimic	Forward: UGA GAA CUG AAU UCC AUG GGU U Reverse: AAC CCA UGG AAU UCA GUU CUC A
miR-146a inhibitor	AAC CCA UGG AAU UCA GUU CUC A

补足无酶水至10 μ L。检测基因表达: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 95 $^{\circ}$ C变性10 s, 56 $^{\circ}$ C退火30 s, 60 $^{\circ}$ C延伸30 s, 45个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因相对表达量。引物序列见表2。

1.2.6 Western blot 取干预后细胞或收集临床肝脏组织, 用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液冰上裂解30 min后, 4 $^{\circ}$ C离心30 min, 收取上清, 使用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。等质量上样, 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 并将电泳凝胶转移到PVDF膜, 10%的脱脂奶粉室温封闭1 h, 加入FEN1一抗(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗脱3次(10 min/次)后, 用HRP标记羊抗鼠IgG二抗(1:5 000)于室温孵育1 h。以GAPDH为内参蛋白, 显影, 计算蛋白相对表达量。

1.2.7 荧光原位杂交 对HBV(-/+)患者肝组织进行石蜡切片后, 进行环保透明剂, 100%、90%、80%、70%乙醇高浓度至低浓度脱蜡, PBS洗脱后, 滴加蛋白酶工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min后滴加 $2\times$ SSC漂洗。再行70%、80%、90%、100%乙醇低浓度至高浓度脱水, 自然干燥后, 滴加变性液, 78 $^{\circ}$ C孵育8 min, 再次行低浓度到高浓度乙醇脱水, 滴加预制变性探针, 封片, 置于37 $^{\circ}$ C原位杂交仪中孵育12~16 h。次日, 滴加洗涤液洗片15 min, $2\times$ SSC、PBS洗脱。最后, 用DAPI染核后滴加抗荧光淬灭剂封片。

1.2.8 免疫组化 石蜡切片行环保透明剂、100%、90%、80%、70%乙醇高浓度至低浓度脱蜡, PBS洗脱, 使用枸橼酸钠缓冲液(pH=6.0)进行微波炉抗原修复。待其自然冷却至室温后, PBS洗脱, 3% H_2O_2 室温孵育10 min, PBS洗脱后, 5% BSA室温封闭30 min, 加入FEN1一抗(1:100), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗脱, HRP标记羊抗鼠IgG二抗(1:100)室温孵育1 h, PBS洗脱。室温下, DAB(1:20)显色2 min, 流水清洗30 s, 苏木素染核5 min, 流水清洗1 min后进行低浓度到高浓度乙醇脱水透明, 中性树胶封片。

1.3 统计学处理

采用SPSS 23.0统计软件进行数据处理, 用Graph-Pad Prism 8.0进行作图。两两比较采用独立样本t检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

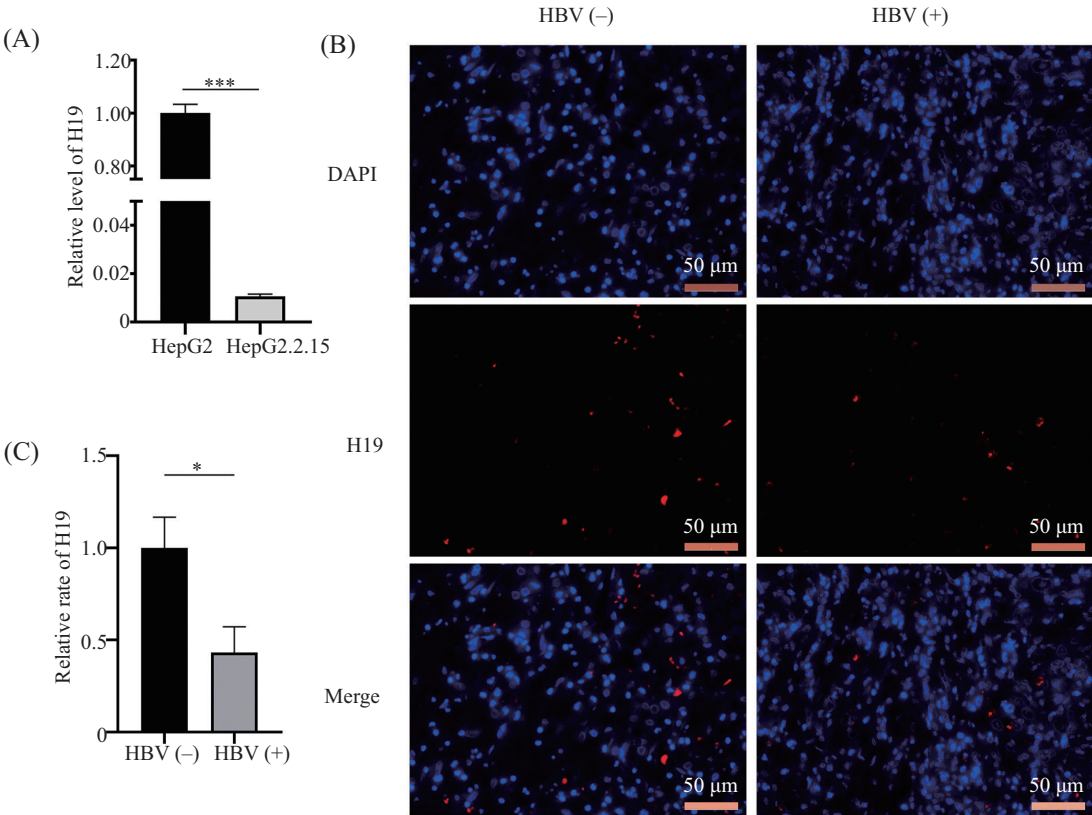
2.1 H19在HBV稳定复制细胞系 HepG2.2.15及HBV(+)组织中的表达量显著降低

用RT-qPCR检测H19在HepG2、HepG2.2.15细胞中的相对表达量。结果显示, HepG2.2.15细胞中H19表达水平较HepG2细胞降低99%(图1A, $P<0.001$)。

取HBV(-/+)肝组织石蜡切片后进行RNA荧光原位杂交, 结果显示, 在HBV(+)组织中的H19阳性率

表2 荧光定量PCR引物序列
Table 2 Primer sequences for RT-qPCR/q-PCR

基因 Genes	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
H19	Forward: TCA AGC CTG GGC CTT TGA AT Reverse: CCT TCC AGA GCC GAT TCC TG
miR-146a	Forward: GAG AAC TGA ATT CCA TGG GT Reverse: GGC AGT GAT GTT GCG GT
<i>FEN1</i>	Forward: CAA AGG CCA GTC ATC CCT CCT Reverse: GCG AAC AGC AAT CAG GAA CTG
HBV DNA	Forward: ACC GAC CTT GAG GCA TAC TT Reverse: GCC TAC AGC CTC CTA GTA CA
<i>IRAK1</i>	Forward: TGC AGA TCT ACA AGA AGC ACC T Reverse: CCT CTC GTA CAC CTG GGT CAT AG
<i>TRAF6</i>	Forward: GGC CCA GGC TGT TCA TAG TT Reverse: CAG CTC CCG GAT TTG ATG GT
<i>GAPDH</i>	Forward: CGC TCT CTG CTC CTC CTG TTC Reverse: ATC CGT TGA CTC CGA CCT TCA C
<i>U6</i>	Forward: GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT Reverse: AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT

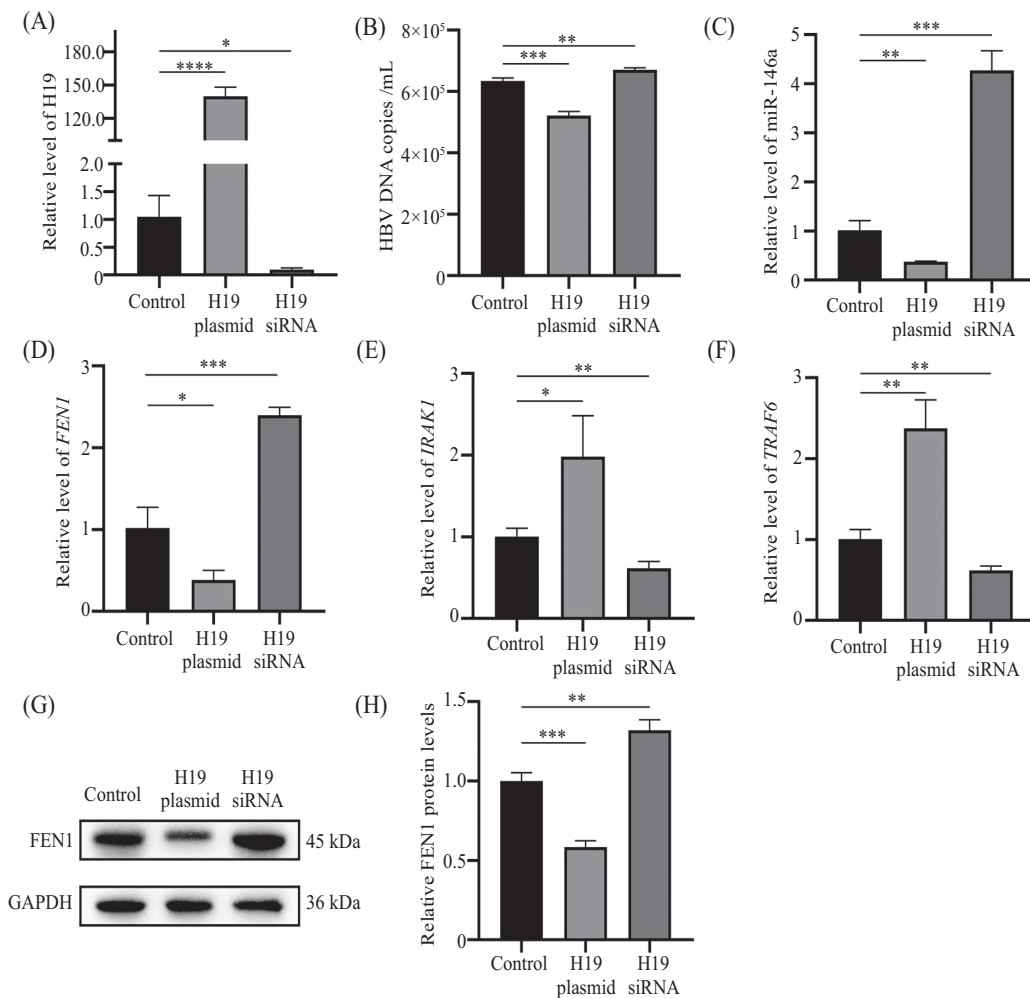


A: H19在HepG2和HepG2.2.15细胞中的差异表达。B: RNA FISH检测H19在HBV(-)和HBV(+)肝组织中的表达。C: 测定H19在HBV(-)和HBV(+)肝组织中的阳性率。* $P<0.05$; *** $P<0.001$ 。

A: differential expression of H19 in HepG2 and HepG2.2.15 cells. B: RNA FISH detects the exprssion of H19 in HBV (-) and HBV (+) liver tissue. C: the positive rates of H19 in HBV (-) and HBV (+) liver tissues are determined. * $P<0.05$; *** $P<0.001$.

图1 H19在HepG2和HepG2.2.15中的相对表达量及H19 RNA荧光原位杂交

Fig.1 Relative expression of H19 in HepG2 and HepG2.2.15 and H19 RNA fluorescence *in situ* hybridization



转染H19质粒和H19 siRNA后检测每个基因的相对表达量。A: H19 mRNA的表达水平。B: HBV DNA拷贝数。C~F: miR-146a、*FEN1*、*IRAK1*和*TRAF6*的表达水平。G、H: *FEN1*的蛋白表达水平。* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ 。

After transfection of H19 plasmid and H19 siRNA, the relative expression of each gene is detected. A: the mRNA levels of H19. B: number of HBV DNA copies. C-F: the mRNA levels of miR-146a, *FEN1*, *IRAK1* and *TRAF6*. G,H: the protein levels of *FEN1*. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$.

图2 H19通过下调 miR-146a抑制 HBV复制

Fig.2 H19 down-regulates miR-146a to inhibit HBV replication

较HBV(-)组织降低57%(图1B和图1C, $P<0.05$)。同时,观察到H19与探针结合部位主要位于细胞质中。

2.2 H19通过下调 miR-146a抑制 HBV复制

在HepG2.2.15细胞中过表达或敲低H19,结果显示干预H19成功(图2A, $P<0.05$)。与对照组相比,过表达H19后HBV DNA拷贝数降低 $(1.13 \pm 0.05) \times 10^5$ (图2B, $P<0.001$), miR-146a、*FEN1* mRNA水平分别降低63%、62%(图2C和图2D, $P<0.05$), *IRAK1* mRNA、*TRAF6* mRNA水平分别升高1.98、2.36倍(图2E和图2F, $P<0.05$), *FEN1*蛋白表达水平降低42%(图2G和图2H, $P<0.001$); 敲低H19后, HBV DNA拷贝数升高 $(0.36 \pm 0.03) \times 10^5$ (图2B, $P<0.01$), miR-146a、*FEN1*

mRNA水平分别升高4.21、2.35倍(图2C和图2D, $P<0.001$), *IRAK1* mRNA、*TRAF6* mRNA水平分别降低39%、39%(图2E和图2F, $P<0.01$), *FEN1*蛋白表达水平升高1.32倍(图2G和图2H, $P<0.01$)。

2.3 miR-146a通过下调H19促进HBV复制

在HepG2.2.15细胞中过表达或敲低 miR-146a,结果显示干预 miR-146a成功(图3A, $P<0.01$)。与对照组相比,过表达 miR-146a后HBV DNA拷贝数升高 $(1.45 \pm 0.05) \times 10^5$ (图3B, $P<0.0001$), H19水平降低51%(图3C, $P<0.01$), *FEN1* mRNA水平升高2.64倍(图3D, $P<0.001$), *IRAK1* mRNA、*TRAF6* mRNA水平分别降低89%、50%(图3E和图3F, $P<0.001$), *FEN1*蛋白表达水平

升高1.88倍(图3G和图3H, $P<0.0001$); 敲低miR-146a后, HBV DNA拷贝数降低 $(1.16\pm 0.13)\times 10^5$ (图3B, $P<0.01$), H19水平升高3.05倍(图3C, $P<0.01$), *FEN1* mRNA水平降低82%(图3D, $P<0.01$), *IRAK1* mRNA、*TRAF6* mRNA水平升高2.47、1.29倍(图3E和图3F, $P<0.05$), FEN1蛋白表达水平降低53%(图3G和图3H, $P<0.0001$)。

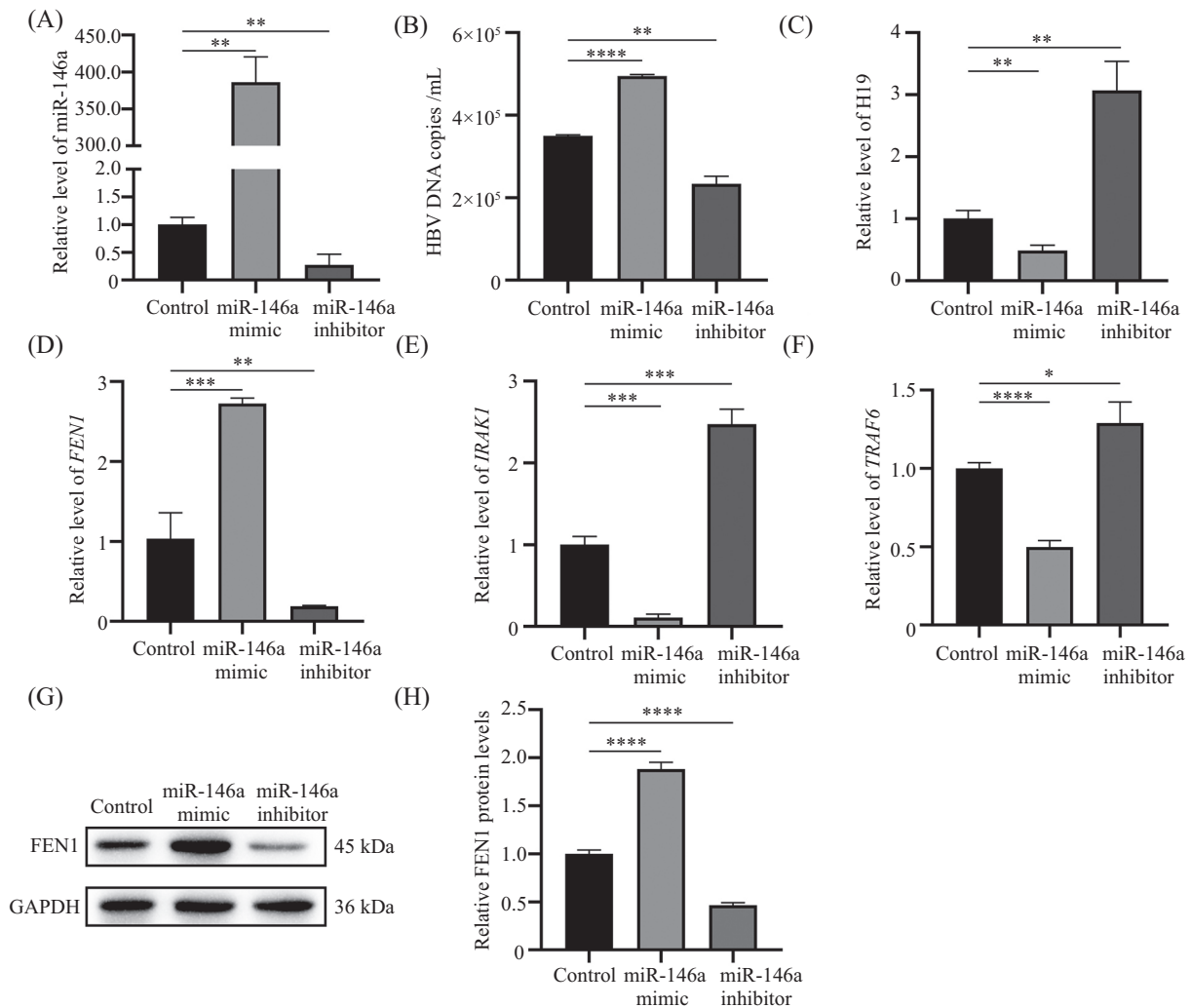
2.4 FEN1通过下调H19、上调miR-146a促进HBV复制

在HepG2.15细胞中过表达或敲低*FEN1*, 结果显示干预*FEN1*成功(图4A, $P<0.01$)。与对照组相比, 过表达*FEN1*后HBV DNA拷贝数升高 $(0.90\pm 0.13)\times 10^5$ (图4B, $P<0.001$), H19水平降低54%(图4C, $P<0.001$), miR-

146a水平升高3.09倍(图4D, $P<0.01$), *IRAK1* mRNA、*TRAF6* mRNA水平分别降低67%、62%(图4E和图4F, $P<0.01$), FEN1蛋白表达水平升高1.83倍(图4G和图4H, $P<0.001$); 敲低*FEN1*后, HBV DNA拷贝数降低 $(0.40\pm 0.08)\times 10^5$ (图4B, $P<0.05$), H19水平升高2.85倍(图4C, $P<0.01$), miR-146a水平降低43%(图4D, $P<0.01$), *IRAK1* mRNA、*TRAF6* mRNA水平分别升高2.87、3.92倍(图4E和图4F, $P<0.01$), FEN1蛋白表达水平降低65%(图4G和图4H, $P<0.0001$)。

2.5 HBV(-)肝组织与HBV(+)肝组织中HBV复制相关基因表达量

收集10例临床HBV(+)肝组织和5例HBV(-)肝

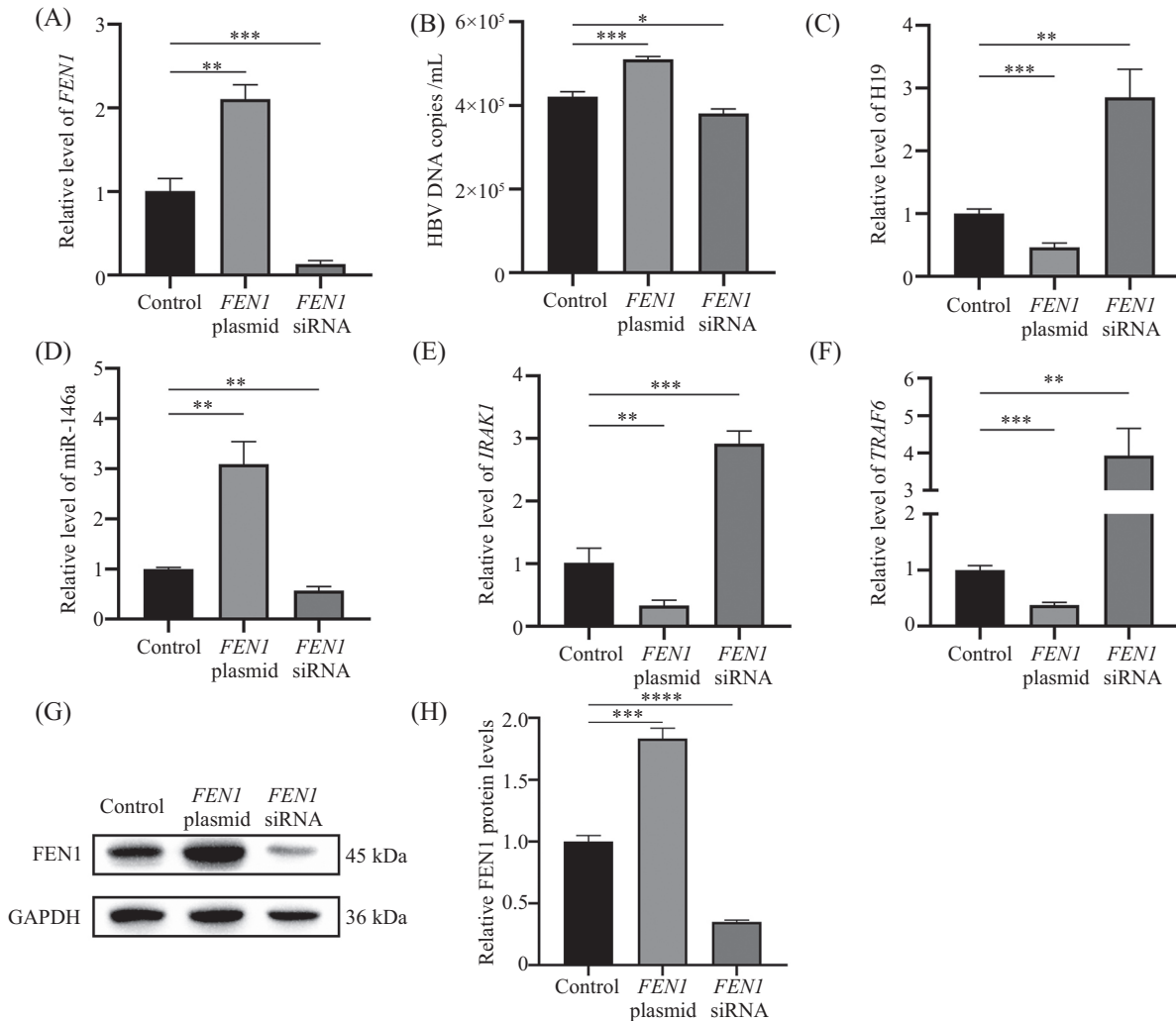


转染miR-146a mimic和miR-146a inhibitor后检测每个基因的相对表达量。A: miR-146a的表达水平。B: HBV DNA拷贝数。C~F: H19、*FEN1*、*IRAK1*和*TRAF6*的表达水平。G、H: *FEN1*的蛋白表达水平。* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ 。

After transfection of miR-146a mimic and miR-146a inhibitor, the relative expression of each gene is detected. A: the levels of miR-146a. B: number of HBV DNA copies. C-F: the levels of H19, *FEN1*, *IRAK1* and *TRAF6*. G-H: the protein levels of *FEN1*. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$.

图3 miR-146a通过下调H19促进HBV复制

Fig.3 miR-146a down-regulates H19 to promote HBV replication



转染*FEN1*质粒和*FEN1* siRNA后检测每个基因的相对表达量。A: *FEN1* mRNA的表达水平。B: HBV DNA拷贝数。C~F: H19、miR-146a、*IRAK1*和*TRAF6*的表达水平。G、H: *FEN1*的蛋白表达水平。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

After transfection of *FEN1* plasmid and *FEN1* siRNA, the relative expression of each gene is detected. A: the mRNA levels of *FEN1*. B: number of HBV DNA copies. C-F: the levels of H19, miR-146a, *IRAK1* and *TRAF6*. G, H: the protein levels of *FEN1*. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

图4 *FEN1*通过下调H19、上调miR-146a促进HBV复制

Fig.4 *FEN1* down-regulates H19 and up-regulates miR-146a to promote HBV replication

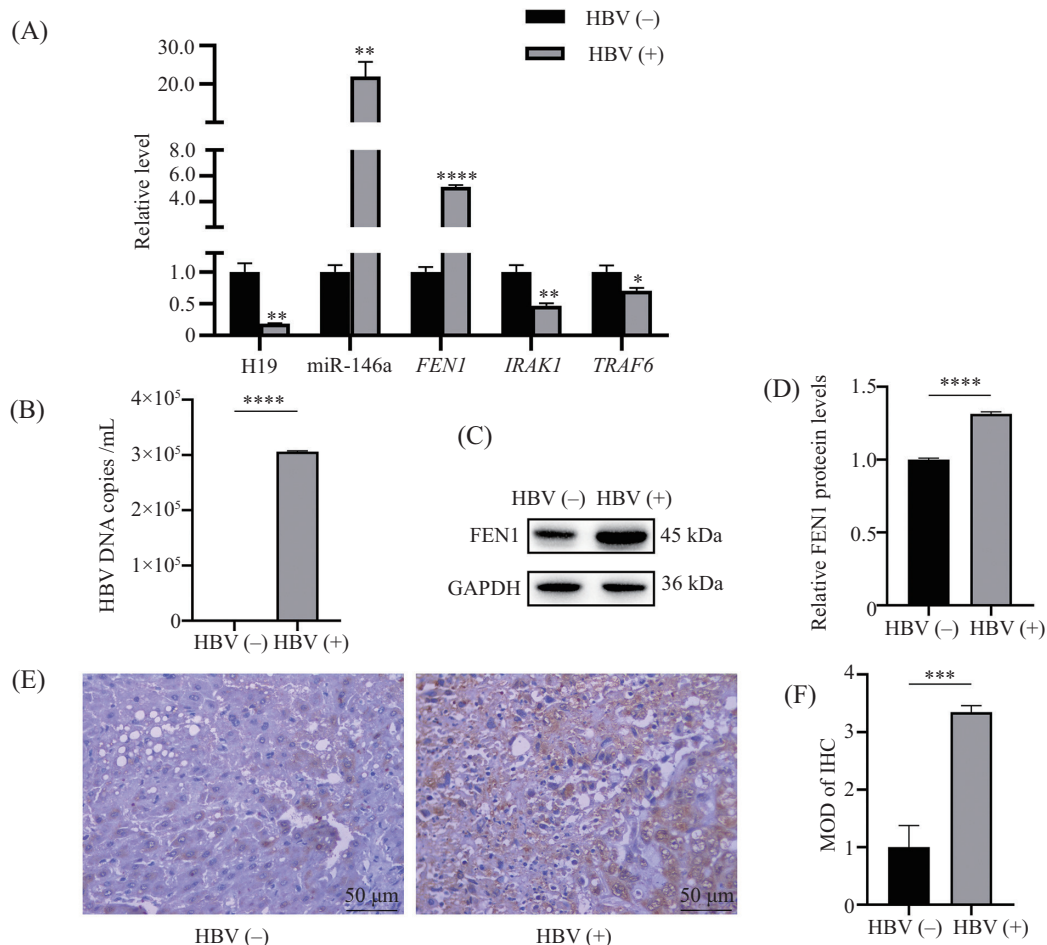
组织以检测HBV复制相关基因表达量。与HBV(-)肝组织相比, HBV(+)肝组织的H19、*IRAK1* mRNA、*TRAF6* mRNA水平分别降低81%、53%、29%, miR-146a、*FEN1* mRNA水平分别升高21.92、5.14倍(图5A, $P < 0.05$)。WB、免疫组化检测FEN1蛋白在两组中的表达情况, 与HBV(-)肝组织相比, HBV(+)肝组织中FEN1蛋白表达水平分别升高1.31、3.35倍(图5C和图5F, $P < 0.001$)。

3 讨论

HBV是一种非细胞病变的部分双链、小型嗜肝

DNA病毒, 通过逆转录复制对肝脏造成持续性损伤, 导致肝炎和肝功能障碍^[1,22]。直至今日, HBV感染非常普遍, 且现有治疗效果远不能令人满意, HBV感染仍然是一个严峻的全球公共卫生问题^[23], 因此, 迫切需要对HBV复制和发病的分子机制进行探索^[24]。现有研究表明, miRNA能够有效调控HBV复制, 体内lncRNA又可稳定和调节miRNA, 然而lncRNA是否通过调控miRNA影响HBV复制仍未完全明了。

我们的研究发现, lncRNA H19在HBV稳定复制细胞系HepG2.2.15中的表达量明显低于HepG2细胞, 荧光原位杂交及RT-qPCR显示在HBV(+)肝组织中



A: H19、miR-146a、*FEN1*、*IRAK1*和*TRAF6*在HBV(-)肝组织和HBV(+)肝组织中的相对表达量。B: HBV(-)肝组织和HBV(+)肝组织中HBV DNA拷贝数。C、D: HBV(-)肝组织和HBV(+)肝组织中FEN1的相对表达量。E: HBV(-/+)肝组织中FEN1蛋白的免疫组化实验。蓝色代表苏木精染色的细胞核。棕褐色代表FEN1抗原定位。F: 免疫组化检测FEN1抗原平均光密度(mean optical density, MOD)值。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

A: the relative expression levels of H19, miR-146a, *FEN1*, *IRAK1* and *TRAF6* in HBV (-) and HBV (+) liver tissues. B: number of HBV DNA copies in HBV (-) and HBV (+) liver tissues. C,D: the relative expression of FEN1 protein in HBV (-) and HBV (+) liver tissues. E: immunohistochemistry of FEN1 protein in HBV (-/+) liver tissue. Blue color represents hematoxylin-stained nuclei. Tan color represents FEN1 antigen localization. F: FEN1 antigen MOD (mean optical density) value detected by immunohistochemistry. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

图5 HBV(-)肝组织与HBV(+)肝组织中HBV复制相关基因的表达情况

Fig.5 Expression of HBV replication-related genes in HBV (-) and HBV (+) liver tissues

的H19水平明显低于HBV(-)肝组织(图1A~图1C, 图5A), 这提示H19与HBV感染及复制密切相关, 抑制或下调H19的表达对HBV的复制具有重要意义, 因此, 我们推测H19在HBV复制中起重要的调控作用。lncRNA如HOTAIR可调节HBV复制亦有相关报道^[25], 这进一步肯定了我们的研究假设。H19在肝功能中起着重要作用, 然而其调控HBV的相关作用却鲜有报道。我们的前期研究发现miR-146a/*FEN1*/HBV调控轴^[20], 据此我们推测miR-146a为H19可能的调控靶标, H19可以通过miR-146a影响HBV复制。

为验证H19可通过miR-146a抑制HBV复制的科

学假说, 我们首先过表达或敲低H19(图2B), 发现在过表达H19后HBV DNA表达水平降低, 在敲低H19后HBV DNA表达水平升高。这表明H19确可调控HBV DNA复制, 在HBV复制中起着关键作用。同时我们注意到, 当过表达或敲低H19后, miR-146a水平随之降低或升高(图2C), 这说明H19严格调控miR-146a的表达, 由于前期我们已证实miR-146a/*FEN1*/HBV调控轴, 因此我们有理由相信, H19通过调控miR-146a进而影响HBV复制。相应地, 为确证H19是否受miR-146a的影响, 我们过表达或敲低miR-146a, 发现HBV DNA表达水平随之升高或降低(图3B), H19表达水

平随之降低或升高(图2C),这可能是由于lncRNA与mRNA的结构具有相似性,因此,lncRNA可以竞争性结合miRNA的结合位点,进而调控miRNA下游mRNA。这说明H19可与miR-146a相互调控进而影响HBV复制。由此可见,H19在HBV复制中扮演着重要角色。

此外,过表达H19可以促进miR-146a下游靶基因*IRAK1/TRAF6*的表达,敲低H19可以抑制*IRAK1/TRAF6*的表达(图2E和图2F)。同时,过表达miR-146a可以下调*IRAK1/TRAF6*的表达,敲低miR-146a可以促进*IRAK1/TRAF6*的表达(图3E和图3F),且miR-146a负向调控*IRAK1/TRAF6*在PARK等^[26]、CHEN等^[27]、ZENG等^[28]的研究中均有报道。这表明,H19可与miR-146a相互作用,减少miRNA诱导的基因沉默,削弱或增强机体免疫应答,从而抑制HBV复制。也就是说,在HBV感染期间,H19负向调控miR-146a,解除了miR-146a对*IRAK1/TRAF6*的抑制作用,进而调控细胞核内基因转录影响HBV复制。

*FEN1*作为内源性调控因子,也是HBV复制中间体形成的关键因子^[29-30]。我们的前期研究揭示miR-146a通过*IRAK1/TRAF6*影响*FEN1*转录及翻译,HBV复制亦受到影响,但H19是否可以通过*FEN1*而使HBV复制受抑制仍需进一步探究。为此,我们过表达*FEN1*后,发现*FEN1*可以促进HBV DNA及miR-146a的表达,同时抑制H19的表达(图4B~图4D),说明*FEN1*确实是H19调控HBV复制过程中的重要影响因素。此外,*FEN1*与miR-146a可以协同促进HBV DNA的复制,*FEN1*通过促进miR-146a的表达,加强miR-146a对H19的抑制作用。与此同时,我们分别过表达或敲低H19、miR-146a,随后检测*FEN1*水平,亦发现H19可降低*FEN1*的表达量(图2D),miR-146a可促进*FEN1*的表达(图3D),这充分证明了上述调控关系,即H19调控miR-146a,促进下游靶基因*IRAK1/TRAF6*对*FEN1*的抑制作用,从而抑制HBV复制。

进一步,我们对上述调控机制中的关键调节因子在临床组织标本中加以验证,发现相较于HBV(-)肝组织,H19在HBV(+)肝组织中低表达,这与SUNDE等^[31]用临床样本检测H19的结果相一致。同时,miR-146a、*FEN1*和HBV DNA呈现高表达,*IRAK1*、*TRAF6*呈低表达(图5)。基于体外研究,我们认为最合理的解释为H19作为miRNA的重要调控因子影响miR-146a水平,进而上调下游靶基因*IRAK1/TRAF6*的表

达,*IRAK1/TRAF6*以*FEN1* mRNA作为转录抑制靶标,最终减少HBV DNA的复制。

在本研究中,我们探明了lncRNA H19通过调控miR-146a抑制HBV复制的分子机制,为深入了解HBV复制的分子机制奠定了基础。这一分子机制仍需在活体组织及动物或人体模型中加以验证,尽管较难,却是从基础到临床诊断及治疗应用的必经之路。

参考文献 (References)

- [1] XU R R, HU P P, LI Y W, et al. Advances in HBV infection and replication systems *in vitro* [J]. *Virology*, 2021, 18(1): 105.
- [2] MORLANDO M, FATICA A. Alteration of epigenetic regulation by long noncoding RNAs in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 570.
- [3] LI L, HAN T, LIU K, et al. LncRNA H19 promotes the development of hepatitis B related hepatocellular carcinoma through regulating microRNA-22 via EMT pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2019, 23(12): 5392-401.
- [4] QUINN J J, CHANG H Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(1): 47-62.
- [5] AGLIANO F, RATHINAM V A, MEDVEDEV A E, et al. Long noncoding RNAs in host-pathogen interactions [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(6): 492-510.
- [6] FENG J, YANG G, LIU Y, et al. LncRNA PCNAP1 modulates hepatitis B virus replication and enhances tumor growth of liver cancer [J]. *Theranostics*, 2019, 9(18): 5227-45.
- [7] LIU Y, FENG J, SUN M, et al. Long non-coding RNA HULC activates HBV by modulating HBx/STAT3/miR-539/APOBEC3B signaling in HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2019, 454: 158-70.
- [8] BAI Y, LONG J, LIU Z, et al. Comprehensive analysis of a ceRNA network reveals potential prognostic cytoplasmic lncRNAs involved in HCC progression [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18837-48.
- [9] CAO Z, PAN X, YANG Y, et al. The lncLocator: a subcellular localization predictor for long non-coding RNAs based on a stacked ensemble classifier [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(13): 2185-94.
- [10] POPE C, MISHRA S, RUSSELL J, et al. Targeting H19, an imprinted long non-coding RNA, in hepatic functions and liver diseases [J]. *Diseases*, 2017, 5(1): 11.
- [11] WANG Y, HYLEMON P B, ZHOU H. Long noncoding RNA H19: a key player in liver diseases [J]. *Hepatology*, 2021, 74(3): 1652-9.
- [12] SHERMANE LIM Y W, XIANG X, GARG M, et al. The double-edged sword of H19 lncRNA: insights into cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2021, 500: 253-62.
- [13] GIOVARELLI M, BUCCI G, RAMOS A, et al. H19 long non-coding RNA controls the mRNA decay promoting function of KSRP [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(47): E5023-8.
- [14] LÜ M, ZHONG Z, HUANG M, et al. LncRNA H19 regulates

- epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA [J]. *Bba-Mol Cell Res*, 2017, 1864(10): 1887-99.
- [15] WANG Y, LI Y. miR-146 promotes HBV replication and expression by targeting ZEB2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 576-82.
- [16] LIU Y, QIN L, WANG J, et al. miR-146a maintains immune tolerance of Kupffer cells and facilitates hepatitis B virus persistence in mice [J]. *J Immunol*, 2022, 208(11): 2558-72.
- [17] FU L, FU X, MO J, et al. miR-146a-5p enhances hepatitis B virus replication through autophagy to promote aggravation of chronic hepatitis B [J]. *Iubmb Life*, 2019, 71(9): 1336-46.
- [18] WANG H H, LI X M, LI T, et al. Multiple roles of microRNA-146a in immune responses and hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5): 5033-42.
- [19] OURA K, MORISHITA A, MASAKI T. Molecular and functional roles of microRNAs in the progression of hepatocellular carcinoma: a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8362.
- [20] JI M, MEI X, JING X, et al. The cooperative complex of Argonaute-2 and microRNA-146a regulates hepatitis B virus replication through flap endonuclease 1 [J]. *Life Sci*, 2020, 257: 118089.
- [21] 潘万龙, 方岩, 许舸, 等. 结构特异性核酸酶FEN1对HBV复制的影响[J]. 第三军医大学学报(PAN W L, FANG Y, XU G, et al. Effect of structure-specific nucleic acid enzyme FEN1 on HBV replication [J]. *J Third Mil Med Univ*), 2012, 34(19): 1925-8.
- [22] LI H, YAN L, SHI Y, et al. Hepatitis B virus infection: overview [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1179: 1-16.
- [23] GE L, ZHANG X, HU S, et al. H19 suppresses the growth of hepatoblastoma cells by promoting their apoptosis via the signaling pathways of miR-675/FADD and miR-138/PTK2 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5218-31.
- [24] JIAO F, SHEN C, NING J, et al. HBV T1719G mutation reduced HBV replication through mutant Enh II and HBx protein *in vitro* [J]. *J Viral Hepatitis*, 2019, 26(6): 710-7.
- [25] REN F, REN J H, SONG C L, et al. LncRNA HOTAIR modulates hepatitis B virus transcription and replication by enhancing SP1 transcription factor [J]. *Clin Sci*, 2020, 134(22): 3007-22.
- [26] PARK H, HUANG X, LU C, et al. MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(5): 2831-41.
- [27] CHEN X, XIE M, LIU D, et al. Downregulation of microRNA-146a inhibits ovarian granulosa cell apoptosis by simultaneously targeting interleukin-1 receptor-associated kinase and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5155-62.
- [28] ZENG Z, GONG H, LI Y, et al. Upregulation of miR-146a contributes to the suppression of inflammatory responses in LPS-induced acute lung injury [J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(7): 275-82.
- [29] BALAKRISHNAN L, BAMBARA R A. Flap endonuclease 1 [J]. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82(1): 119-38.
- [30] KITAMURA K, QUE L, SHIMADU M, et al. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus [J]. *Plos Pathog*, 2018, 14(6): e1007124.
- [31] YILMAZ S S, KAYABASI C, OZMEN Y B, et al. Analysis of long non-coding RNA (lncRNA) expression in hepatitis B patients [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2018, 18(2): 150-61.