

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 03. 029

# 高表达 miR-122 腺病毒载体构建与功能检测

郝军莉, 张金华, 吴祥云, 何茂兰, 王丹

(成都医学院生物医学系, 成都 610083)

**摘要:** 利用改造后的腺病毒表达载体 pDC312-cmv, 构建含有 8 个 miR-122 表达框的重组腺病毒载体 p-8miR-122, 通过 RT-PCR、ELISA、Southern blot 验证重组载体高表达 miR-122 水平及抗乙肝病毒活性的能力。结果表明: 重组腺病毒载体 p-8miR-122 构建成功且可高表达 miR-122。并且, 为鉴定重组腺病毒高表达 miR-122 水平及抗乙肝病毒活性的能力, 本文还分别对空载体 pDC312-cmv 和重组腺病毒载体 p-8miR-122 进行腺病毒包装、扩增、纯化和 TCID50 滴度检测, 其结果表明: 纯化后的对照腺病毒和重组腺病毒滴度分别高达  $3 \times 10^{10}$  IU/mL 和  $1 \times 10^{11}$  IU/mL, 重组腺病毒与对照病毒相比具有 miR-122 高表达和抗乙肝病毒活性的能力。

**关键词:** miR-122; 腺病毒; 高表达; 高纯度; 抗乙肝病毒活性

**中图分类号:** Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)02-0424-06

## Construction and identification of miR-122 expressing recombinant adenovirus

HAO Jun-Li, ZHANG Jin-Hua, WU Xiang-Yun, HE Mao-Lan, WANG Dan

(School of Biomedical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

**Abstract:** To construct miR-122 overexpression adenovirus vector, gene including eight miR-122 precursor fragments was inserted into recombinant construct pDC312-cmv. Abilities of miR-122 overexpression and anti-HBV activities by the recombinant vector p-8miR-122 were analyzed by RT-PCR, ELISA and Southern blot. Through adenovirus packaging, amplification, purification and TCID50 titer detection, the titers of pDC312-cmv and p-8miR-122 adenovirus were  $3 \times 10^{10}$  IU/mL and  $1 \times 10^{11}$  IU/mL. Adenovirus p-8miR-122 had the abilities of miR-122 overexpression and anti-HBV activities.

**Key words:** miR-122; adenovirus; overexpression; high purity; anti-HBV

## 1 引言

MicroRNA (miRNA) 是一类长度约为 22 bp 的非编码小 RNA, 通过碱基互补配对常与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' untranslated regions, 3' UTR) 结合, 诱导 mRNA 的翻译抑制、脱腺苷化和降解, 调控靶基因的表达<sup>[1]</sup>。miR-122 在肝细胞中特异性高表达, 占肝细胞中总 mi-

croRNA 含量的 70%, 在肝脏发育<sup>[2]</sup>、分化、脂代谢<sup>[3]</sup>, 病毒感染以及肝癌发生中发挥极其重要的调控作用<sup>[4, 5]</sup>。Lanford 等科学家发现 miR-122 可以作为靶点治疗丙肝病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) 感染, 说明 miR-122 可作为治疗 HCV 的一个潜在靶点<sup>[6]</sup>。

前期研究结果表明, miR-122 通过抑制靶基因细胞周期蛋白 G1 (cyclinG1) 的表达, 促进

收稿日期: 2015-03-01

基金项目: 四川省卫生计生科研项目(13Z068)

作者简介: 郝军莉(1985-), 女, 河南开封人, 讲师, 博士, 研究方向为乙肝病毒治疗和肝癌发生机制。E-mail: haojunli00@163.com

通讯作者: 王丹。E-mail: wangdan@cmc.edu.cn

cyclinG1 相互作用蛋白 p53 的表达和活性, 从而抑制乙肝病毒 (Hepatitis B Virus, HBV) 的转录和复制<sup>[7]</sup>, 同时, miR-122 可以直接靶向 HBV mRNA, 调控 HBV 转录后水平<sup>[8]</sup>. 在临床肝癌样本中, 肝癌组织中 miR-122 的表达量较对照组癌旁组织显著下调<sup>[9]</sup>, 同时 miR-122 的下调引发肝癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC) 也得到其它研究的证实, miR-122 基因敲除鼠自发形成肝纤维化和肝癌, 在肝脏中重新表达 miR-122 可以显著降低肿瘤的发生率<sup>[10, 11]</sup>.

目前 miR-122 的表达载体表达量有限且没有合适的运输工具, 化学合成胆固醇修饰的 miR-122 agomir 造价高, 在动物实验中应用局限, 慢病毒载体可以将携带的目的基因整合到宿主的基因组中, 可能造成基因组的表达异常. 鉴于腺病毒具有宿主范围广、高滴度、可以感染处于增殖和非增殖期的细胞等优点, 故本研究设计含有 8 个 miR-122 表达框的腺病毒载体, 并体外包装、纯化和滴度检测, 以获得高纯度的 miR-122 高表达腺病毒载体, 为临床上乙肝和肝癌等治疗药物的开发提供理论基础及实验依据.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

腺病毒载体 pDC312、辅助质粒 PBH $\Delta$ E1, E3、腺病毒感染性滴度 (TCID<sub>50</sub>) 检测试剂盒购自本元正阳基因技术有限公司; pcDNA3.1、pHBV1.3, 包含 1.3 个 HBV D 型基因组拷贝<sup>[12]</sup>为本实验室保存. 质粒小提试剂盒、质粒胶回收试剂盒购自北京博迈德基因技术有限公司; 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; DMEM 培养基购于 GIBCO 公司; Opti-MEM、转染试剂 Lipofectamine 2000 (lipo2000)、Trizol 购于 invitrogen 公司; miR-122、U6 定量 PCR 探针、microRNA 反转录试剂盒购自 invitrogen 公司 (美国); Southern blot 检测试剂盒购自 GE 公司.

### 2.2 方法

2.2.1 细胞转染 将生长状态良好的肝癌细胞系 HepG2 消化铺入 6 孔板中, 12~18 h 细胞汇合度达到 80%~90%, 利用 lipo2000 转染, 6 h 后每孔用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 换成含有

10% 小牛血清的 DMEM 完全培养基 2 mL, 将培养板放入含 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的细胞培养箱中培养.

2.2.2 RNA 提取 6 孔板中每孔加入 1 mL Trizol 裂解 5 min, 按照 Total RNA Extraction Kits 说明书提取 RNA, 用 DEPC 水溶解沉淀后, 核酸分析仪中检测 RNA 浓度和纯度<sup>[12]</sup>.

2.2.3 cDNA 和 microRNA 反转录 mRNA 反转录参照 Takara 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明书<sup>[13]</sup>; microRNA 反转录参照 invitrogen 公司的 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit. 反转录产物于 -20 °C 短暂保存或直接用于 RT-PCR 检测.

2.2.4 RT-PCR 检测 mRNA 定量 PCR 采用 SYBR Green 检测, miR-122 定量 PCR 采用 Taqman 2 $\times$ universal PCR Master 检测, 每次试验均重复 3 次.

2.2.5 Southern blot 检测 利用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 按照 GE 公司 Southern blot 检测说明书步骤操作, 洗膜并曝光显影.

2.2.6 引物设计 引物均合成于上海英骏生物技术有限公司, 序列如表 1 所示.

2.2.7 腺病毒包装和鉴定 将 pDC312-cmv 或 p-8miR-122 和框架载体 PBH $\Delta$ E1, E3 共转染与 HEK293 细胞中, 待转染组细胞 80% 变圆后收集细胞, 非转染组细胞生长正常, 利用 3 次反复冻融的方法将含有腺病毒的细胞裂解, 离心后收集含有腺病毒的上清液, 将对照病毒和腺病毒加入 HepG2 细胞中, 72 h RT-PCR 检测 miR-122 表达量.

2.2.8 腺病毒的大量扩增 将原代腺病毒感染生长状态良好的 HEK293, 待细胞 80% 变圆后, 收集细胞, 加入少量 DMEM 完全培养基悬浮细胞, -80 °C 保存.

2.2.9 腺病毒纯化 利用 CsCl 不连续密度梯度纯化腺病毒, 将纯化的病毒液在分子筛为 25000 道尔顿的纤维素酯膜中进行 4 °C 透析, 3 次重复后分装于 -80 °C 长期保存.

2.3.10 腺病毒滴度检测 按照腺病毒感染性滴度 (TCID<sub>50</sub>) 检测试剂盒说明书检测已纯化的腺病毒滴度.

表 1 用于 FCR、RT-PCR、Southern blot 扩增的寡核苷酸序列

Tab. 1 Sequence of oligonucleotide primers used for PCR、RT-PCR、Southern blot amplification

引物名称	引物序列(5'→3')	酶切位点
PCR 引物		
cmv-F	GCGTCGACTGTACGGGCAGATATACGCGTT	Sal I
cmv-R	GAAGATCTCGTGGGGATACCCCTAGAGC	Bgl II
pre-miR-122-F	CGGGATCCTTTCTCTGCTTAGGTCACAATATGT	BamH I
pre-miR-122-R	CCGCTCGAGAGATCTATCAGATGAACCTTCTTGCTCAA	Xho I ; Bgl II
RT-PCR 引物		
pgRNA-F	TCTTGCCTTACTTTTGGGAAG	
pgRNA-R	AGTTCTTCTTCTAGGGGACC	
total mRNA-F	ACGTTCCCTTTGTTACGTCCCGT	
total mRNA-R	CCCAACTCCTCCCAGTCCTTAA	
GAPDH-F	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	
GAPDH-R	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG	
Southern blot 探针		
HBX-F	ACGTCCTTTGTTTACGTCCCGT	
HBX-R	CCCAACTCCTCCCAGTCCTTAA	

注:下划线部分表示酶切位点

### 3 结果

#### 3.1 腺病毒载体 pDC312-cmv 的构建及鉴定

以 pCDNA3.1 载体为模板,PCR 扩增包含 cmv 启动子和多克隆位点的目的片段,琼脂糖凝胶电泳上出现了一条约 1 kb 的 DNA 条带,同预期结果相符(图 1A),以 *Sal* I 和 *Bgl* II 酶切 PCR 片段,*Sal* I 和 *Bam*H I 酶切 pDC312 空载体,1% 琼脂糖凝胶电泳(图 1B),回收并连接,载体鉴定后测序正确。

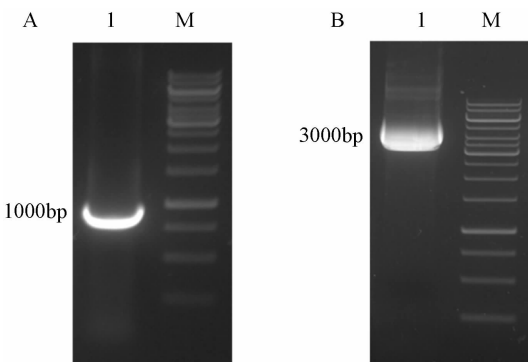


图 1 pDC312-cmv 重组载体的构建和鉴定

(A)1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物;1:PCR 产物,M: marker(1 kb);(B)1% 琼脂糖凝胶电泳分析双酶切产物;1:双酶切产物,M:marker(1 kb);

Fig. 1 Construction and identification of pDC312-cmv recombinant construct

#### 3.2 重组载体 p-miR-122 和 p-8miR-122 的构建及鉴定

根据 Primer Premier 软件设计 pre-miR-122 引物,按照示意图构建含有多个 miR-122 前体的片段(图 2A). 以人 cDNA 为模板,PCR 扩增包含 miR-122 前体的目的片段,在琼脂糖凝胶中出现一条约 250 bp 的条带(图 2B),和预期相符,将扩增产物和 pDC312-cmv 质粒分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切、回收和连接,获得 pDC312-cmv-miR-122(p-miR-122)重组表达载体,酶切和测序鉴定正确<sup>[14,15,16]</sup>. 将测序正确的 p-miR-122 分为两份,分别进行 *Bam*H I、*Xho* I 和 *Bgl* II、*Xho* I 双酶切,回收连接获的 p-2miR-122 重组表达载体,酶切和测序鉴定. 按照这种方法,以此构建出 p-4miR-122、p-8miR-122 的重组载体(图 2C),测序鉴定序列正确。

#### 3.3 miR-122 表达载体抗乙肝病毒活性验证

将 pDC312-cmv、p-miR-122、p-8miR-122 分别和 pHBV1.3 共转染于 HepG2 细胞中,48 h 检测成熟 miR-122 水平(如图 3A),说明 p-miR-122、p-8miR-122 与空载体相比,显著提高细胞中成熟的 miR-122 水平,并且 p-8miR-122 产生的成熟 miR-122 水平接近于 p-miR-122 的 8 倍. 24 h、48 h、72 h 利用 ELISA 检测细胞上清中 HBV S、E 抗原水

平(如图 3B),利用 RT-PCR 检测 48 h 上清中的 HBV DNA 拷贝数和细胞中 pgRNA、total RNA 水平(如图 3C、3D),利用 Southern blot 检测细胞

内 HBV 拷贝数(E),说明了 miR-122 的高表达可以显著抑制 HBV S、E 抗原的分泌、HBV 拷贝数及 HBV mRNA 水平.

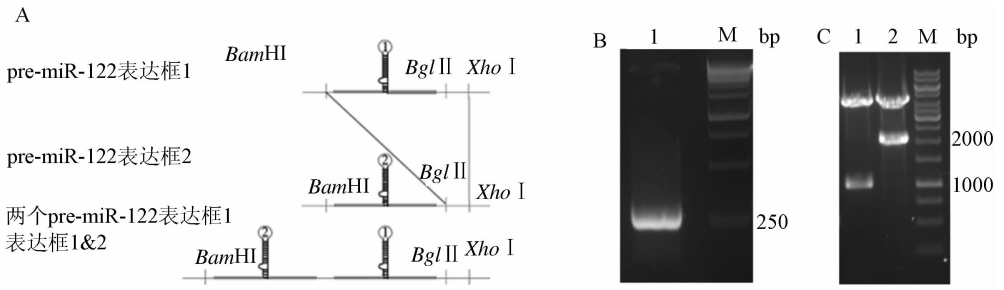


图 2 p-miR-122 和 p-8miR-122 重组载体的构建和鉴定

(A)多个 miR-122 载体的构建示意图;(B)1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物;1:PCR 产物,M:marker(1 kb);(C)1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物;1-2:酶切产物,M:marker(1 kb);

Fig. 2 Construction and identification of p-miR-122, p-8miR-122 recombinant plasmids

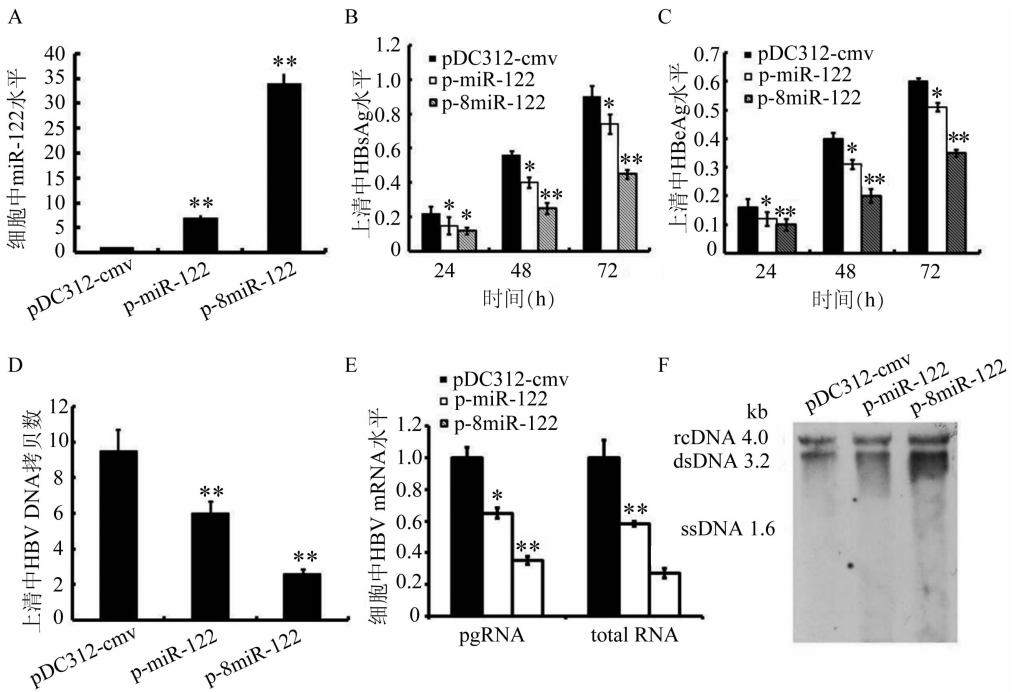


图 3 p-miR-122、p-8miR-122 表达载体抗病毒活性检测

(A)48 h 定量 PCR 检测 miR-122 水平;(B-C)24、48、72 h ELISA 检测上清中 HBV HBsAg 和 HBeAg 水平;(D)48 h RT-PCR 检测上清中 HBV DNA 拷贝数;(E)48 h RT-PCR 检测细胞中 HBV mRNA 水平;(F)48 h 通过 Southern blot 检测细胞中 HBV DNA 拷贝数. \* 表示处理间有显著性区别( $P < 0.05$ ), \*\* 表示处理间有极显著性区别( $P < 0.01$ )

Fig. 3 Detection of the anti-HBV activities of p-miR-122 and p-8miR-122 constructs

### 3.4 腺病毒功能验证

3.4.1 p-8miR-122 腺病毒表达 miR-122 水平检测 按照待感染细胞数和腺病毒滴度 1 : 1、1 : 10、1 : 100 比例加入 p-8miR-122 腺病毒或对照病毒于 HepG2 细胞中,48 h 检测细胞中 miR-122 水平(如图 4A),说明含有 8 个 miR-122 表达

基因的腺病毒可以显著提高成熟的 miR-122 水平,其中待感染细胞数和腺病毒滴度 1 : 100 时,细胞中成熟的 miR-122 水平最高.

3.4.2 高表达 miR-122 腺病毒抗乙肝病毒活性检测 将 pHBV1.3 质粒转染 HepG2 细胞中,按照待感染细胞数和腺病毒滴度 1 : 100 加入 p-

8miR-122 腺病毒或对照病毒,48 h 后 ELISA 检测血清中 HBV S、E 抗原,RT-PCR 检测上清中 HBV DNA 拷贝数和细胞中 HBV mRNA 水平

(如图 4B-D), p-8miR-122 腺病毒可以显著抑制 HBV 的复制和转录。

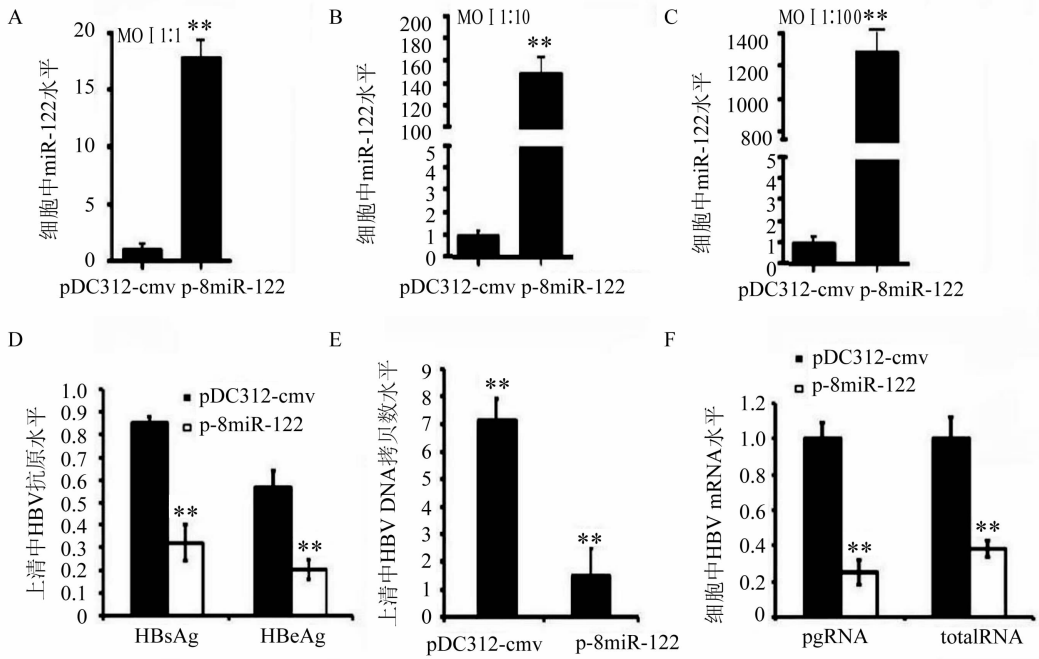


图 4 p-8miR-122 腺病毒抗乙型肝炎病毒活性检测

(A)RT-PCR 检测 HepG2 细胞中 miR-122 水平;(B)ELISA 检测血清中 HBV HBsAg 和 HBeAg 水平;(C)RT-PCR 检测血清中 HBV DNA 拷贝数;(D)RT-PCR 检测细胞中 HBV mRNA 水平。\* 表示处理间有显著性区别( $P < 0.05$ ), \*\*表示处理间有极显著性区别( $P < 0.01$ )

Fig. 4 Detection of the anti-HBV activities of p-8miR-122 Adenovirus

## 4 讨论

本研究改造了原有的腺病毒载体 pDC312,通过引入强启动子,构建了一个能高表达目的基因的载体.通过同尾酶技术构建了含有 8 个 miR-122 表达框的重组载体 p-8miR-122,并在细胞实验中验证了 p-8miR-122 高表达 miR-122 并抑制 HBV 复制和转录的功能. p-8miR-122 较仅有一个 miR-122 表达框的表达载体 p-miR-122 能显著的提高成熟的 miR-122 水平和抑制 HBV 复制和转录的能力.一般的质粒载体难以进入细胞不利于后续的动物实验.有文献报道利用慢病毒载体构建了多个 miR-122 表达框的载体,建立了稳定表达细胞系<sup>[2]</sup>,而慢病毒载体基因可整合在宿主基因组中,可能改变宿主基因功能,且慢病毒分泌在上清中,很难得到高纯度和高滴度的慢病毒.故我们利用病毒副作用小,感染能力强、操作方便的腺病毒载体,构建了含有 8 个 miR-122 前体的高表达载体.利用腺病毒包装、扩增、纯化和腺病毒的滴度检测得

到了可以高表达 miR-122 和具有抗乙型肝炎病毒活性的高纯度腺病毒,为临床上乙肝和肝癌等治疗药物的开发提供理论基础及实验依据。

### 参考文献:

- [1] Hao J, Jin W, Li X, *et al.* Inhibition of alpha interferon (IFN- $\alpha$ )-induced microRNA-122 negatively affects the anti-hepatitis B virus efficiency of IFN- $\alpha$ [J]. *J Virol*, 2013, 87(1):137.
- [2] Xu H, He J H, Xiao Z D, *et al.* Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development[J]. *Hepatology*, 2010, 52(4):1431.
- [3] Moore K J, Rayner K J, Suarez Y, *et al.* The role of microRNAs in cholesterol efflux and hepatic lipid metabolism[J]. *Annu Rev Nutr*, 2011, 31:49.
- [4] Hu J, Xu Y, Hao J, *et al.* MiR-122 in hepatic function and liver diseases[J]. *Protein Cell*, 2012, 3(5):364.
- [5] Tsai W C, Hsu S D, Hsu C S, *et al.* MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hep-

- atocarcinogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8):2884.
- [6] Lanford R E, Hildebrandt-Eriksen E S, Petri A, *et al*. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection[J]. *Science*, 2010, 327(5962):198.
- [7] Wang S, Qiu L, Yan X, *et al*. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1) - modulated P53 activity[J]. *Hepatology*, 2012, 55(3):730.
- [8] Li C, Wang Y, Wang S, *et al*. Hepatitis B virus mRNA-mediated miR-122 inhibition upregulates PTTG1-binding protein, which promotes hepatocellular carcinoma tumor growth and cell invasion[J]. *J Virol*, 2013, 87(4):2193.
- [9] Coulouarn C, Factor V M, Andersen J B, *et al*. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties[J]. *Oncogene*, 2009, 28(40):3526.
- [10] Nakao K, Miyaaki H, Ichikawa T. Antitumor function of microRNA-122 against hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(4):589.
- [11] Hsu S H, Wang B, Kota J, *et al*. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8):2871.
- [12] Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(4):1841.