

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.014.html>

过表达和抑制 miR-133a 对 JEG-3 中 HLA-G 表达的影响

陈蕊¹, 井航², 李雷³, 杨洋¹, 延佳佳¹

摘要 目的 研究微小 miR-133a 在人绒毛癌细胞株 (JEG-3) 中对人类白细胞抗原 G (HLA-G) 的表达调控作用。方法 用脂质体包裹化学合成的 miR-133a 前体分子并转染 JEG-3, 从而过表达及抑制 miR-133a, 逆转录-聚合酶链反应技术 (RT-PCR) 检测转染后 miR-133a 及 HLA-G 在 mRNA 水平的表达情况。Western blot 法检测转染 miR-133a 后细胞中 HLA-G 蛋白水平的表达。结果 JEG-3 细胞中抑制 miR-133a 后 HLA-G 在 mRNA 及蛋白水平均表达增加; 在 JEG-3 细胞中过表达 miR-133a 后 HLA-G 在 mRNA 及蛋白水平均表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 在 JEG-3 细胞中 miR-133a 能够负性调控 HLA-G 的表达, 进一步验证了 miR-133a 与自然流产、子痫前期等疾病的相关性, 并为进一步探索相关疾病机制及临床诊治提供了一定的实验基础。

关键词 微小 RNA; JEG-3; HLA-G

中图分类号 R 730.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)12-1810-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.014

mRNA 是一种非编码单链 RNA, 由 18~25 个核苷酸组成, 在生理过程中, 其主要发挥降解靶基因, 抑制蛋白合成, 并在转录以及翻译水平调控目的基因表达等相关作用^[1-2], 从而参与各项生理功能。人类白细胞抗原 G (human leukocyte antigen-G, HLA-G) 作为非经典的 I 类人类白细胞抗原分子, 能够在绒毛外滋养细胞中选择性高表达, 其表达失衡与多种妊娠并发症相关^[3-4]。研究^[5]显示 miR-133a 在肿瘤抑制中发挥重要作用, 近年来研究^[6-7]显示 miR-133a 与妊娠并发症具有相关性。人类绒毛外滋养细胞与绒毛膜癌细胞具有相似的调控机制及生物学特性, 该研究选择人绒毛膜癌细胞 (human chorionic cancer cells JEG-3, JEG-3) 作为研究模型, 并通过在该细胞系中过表达及抑制 miR-133a 后检测

HLA-G 在不同水平的表达研究, 探究 miR-133a 与 HLA-G 之间的相关性及可能的调控关系, 为进一步探究滋养细胞相关病理妊娠的病因及治疗提供相关的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 JEG-3 购自 ATCC 中国细胞库; DMEM-F12 培养液、胎牛血清、细胞转染相关试剂 Opti-MEM 培养液购自美国 Gibco 公司; miR-133a 前体分子、miR-133a 抑制剂及羧基荧光素荧光素酶标记的 pre-miRNA 阴性对照均由上海吉玛生物公司合成; 脂质体 2000 购自美国 Invitrogen 公司; Matrigel 胶购自美国 BD Bioscience 公司; RNAiso 及 Prime-ScriptTM RT reagent Kit 反转录试剂购自日本 TaKaRa 公司; PCR 实验中使用引物序列由北京奥科公司合成; 细胞裂解液、蛋白定量试剂盒均购自中国科昊生物技术公司; Western blot 配胶试剂盒购自北京众美生物技术公司; Anti-HLA G antibody MEM-G/1 鼠抗人单克隆抗体、一抗购自英国 Abcam 公司; 二抗购自北京康为世纪科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 解冻复苏 JEG-3 细胞, 并接种培养于细胞孵箱中 (培养条件 37℃、5% CO₂、95% 湿度), 6 h 后第一次换液, 随后每 24 h 换液一次; 当细胞铺满细胞培养皿 (瓶) 平底约 80% 后进行传代, 传代比例约为 1:3, 8 h 后第一次换液, 随后每 24 h 换液一次。

1.2.2 细胞转染 按实验所需培养足量的 JEG-3 细胞, 待细胞培养至平台期后, 消化并接种细胞于 6 孔板中。待细胞生长密度 $\geq 70\%$ 时进行下一步转染。分为: miR-133a 抑制组、空白对照、阴性对照组、miR-133a 过表达组。转染试剂按照 Lipofectamine 2000 说明书比例配制, 将配置好的转染液依次加入到相应分组细胞中, 阴性对照加入等量的 Opti-MEM, 将细胞放入细胞培养箱内, 标记 FAM 荧光素酶 6 h 后第一次换液, 加入含胎牛血清的完全培养液并在荧光显微镜下观察、记录转染效果。

1.2.3 RT-PCR 法检测 各组 JEG-3 细胞中 miR-

2017-07-20 接收

基金项目: 陕西省教育厅科研计划项目 (编号: 12JK0767)

作者单位: ¹ 西安医学院第一附属医院妇科, 西安 710077

² 西安交通大学医学部法学院, 西安 710061

³ 中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京协和医院妇产科, 北京 100730

作者简介: 陈蕊, 女, 硕士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: miss-ruichen@sina.com

133a 及 HLA-G mRNA 的表达 转染后 48 h 行细胞 RNA 提取,具体操作步骤严格按照 TRIzol 试剂说明书进行,随后应用紫外分光光度法检测 RNA 浓度。甲醛变性凝胶电泳确认质量合格。

按照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒说明书进行反转录 cDNA 合成,因 miRNA 分子量小且其扩增产物较小,因此在 RT 过程中加入反转录引物以保证反应特异性,各基因的引物序列见表 1。

miR-133a PCR 反应体系:取 1 μ l 反转录产物为模板,miRNA 通用 Forwards 引物和特异 Reverse 引物各 1 μ l,与 2 $\times$ Tap Plus PCR Master -MIX 混合,PCR 仪进行 PCR 扩增,以 U6 为内参,反应体系 25 μ l,PCR 反应体系及循环数:94 $^{\circ}$ C、3 min;94 $^{\circ}$ C、30 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、5 min,共计 32 个循环数。

HLA-G PCR 反应体系:取 1 μ l 反转录产物为模板,HLA-G 的 Forwards 引物和 Reverse 引物各 1 μ l,与 2 $\times$ Tap Plus PCR Master -MIX 混合,PCR 仪进行 PCR 扩增,以 β -actin 为内参,反应体系 25 μ l,PCR 反应参数:94 $^{\circ}$ C、3 min,94 $^{\circ}$ C、30 s,58 $^{\circ}$ C、40 s,72 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、5 min;35 个循环。

表 1 各基因的引物序列

基因	引物序列(5'-3')
miR-133a	F:GCCAAGCTGGTAAATGGAA R:TATGCTTTTGACGACTGTGTGAT
U6P	F:CTCGCTTCGGCAGCACA R:AACGCTTCACGAATTTGCG
HLA-G	F:AACEETCTTCCTGCTCT R:CTCCTTTTCAATCTGAGCTCTTCT
β -actin	F:GAGAGGGAAATCGTCCGTGAC R:CATCTGCTGGAAGGTGGACA

使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离扩增的 PCR 产物,在 Alphamager 凝胶图象成像系统中扫描成像,并记录各特异性 DNA 扩增带。目的基因/内参 β -actin 的灰度值比值为样本 mRNA 相对表达量,随后进行统计学分析。

1.2.4 Western blot 法检测转染 miR-133a 后细胞中 HLA-G 蛋白水平的表达 应用全细胞裂解液和 PMSF 混合液提取细胞蛋白,1:100 配比,静置 20 min。整个过程在冰上进行。细胞匀浆置于 EP 管中,离心后将上清液提取并标记后 -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,绘制标准曲线,并计算蛋白浓度。

采用蛋白提取试剂盒提取蛋白,加入 5 $\times$ Loading buffer 上样缓冲液,沸水中煮 15 min 使其变性。采用制胶试剂盒配制 10% 分离胶,5% 浓缩胶。依照步骤灌胶,加样(每孔加样约 15 μ l,约含总蛋白 50 μ g),电泳(时间 80 V、30 min 后 120 V、60 min)。转膜完成后,将膜转移至封闭液中(5% 脱脂牛奶)封闭 2 h,加稀释至适当浓度的一抗孵育于膜上(Anti-HLA-G antibody [MEM-G/1]:1:1 000, β -actin:1:2 000),置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。次日 TBS 洗膜,孵二抗(二抗浓度 1:4 000),室温孵育 2 h,TBS 洗膜。化学发光后显影定影。采用软件 Image J 进行灰度分析,标本中相应目的蛋白的表达量以目的蛋白/内参 β -actin 的灰度值比值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间比较采用 ANOVA 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率 以标记 FAM 荧光素酶的阴性对照组观察转染效率,转染成功后,可观测到细胞核内的绿色荧光,并依此计算细胞的转染效率,可达 70% 以上。见图 1。

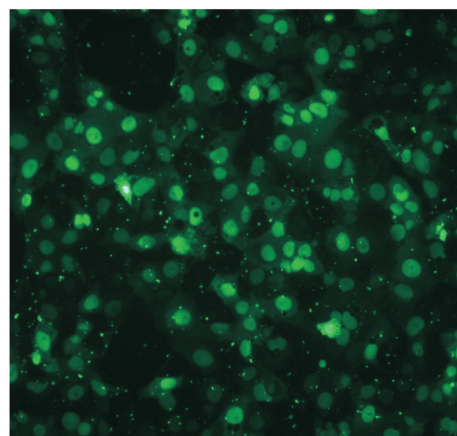


图 1 JEG-3 细胞转染效率 $\times 200$

2.2 RT-PCR 法检测各组 JEG-3 细胞中 miR-133a 及 HLA-G mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示,miR-133a 抑制组细胞中转染 miR-133a inhibitor 后 miR-133a 表达下降,miR-133a 过表达组细胞中转染 miR-133a mimics 后 miR-133a 表达上升,两者与阴性对照组相比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示转染效果较好。进一步研究中提示 miR-133a 抑制组细胞中转染 miR-133a inhibitor 后

表2 各组 JEG-3 细胞中 miR-133a 及 HLA-G 在 mRNA 及蛋白水平的表达 ($\bar{x} \pm s$)

项目	miR-133a 抑制组	空白对照组	阴性对照组	miR-133a 过表达组	F 值
miR-133a/U6 (mRNA)	59.45 $\pm$ 0.96*	102.48 $\pm$ 0.72	102.18 $\pm$ 1.82	161.39 $\pm$ 1.6*	6317.733
HLA-G/ β -actin (mRNA)	102.92 $\pm$ 2.5*	76.72 $\pm$ 0.56	75.61 $\pm$ 0.95	62.71 $\pm$ 1.33*	578.873
HLA-G/ β -actin (蛋白)	142.82 $\pm$ 2.5*	127.06 $\pm$ 0.52	123.43 $\pm$ 1.68	108.73 $\pm$ 1.2*	321.249

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

HLA-G mRNA 的表达增高;miR-133a 过表达组细胞中转染 miR-133a mimics 后 HLA-G mRNA 的表达下降,与阴性对照组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

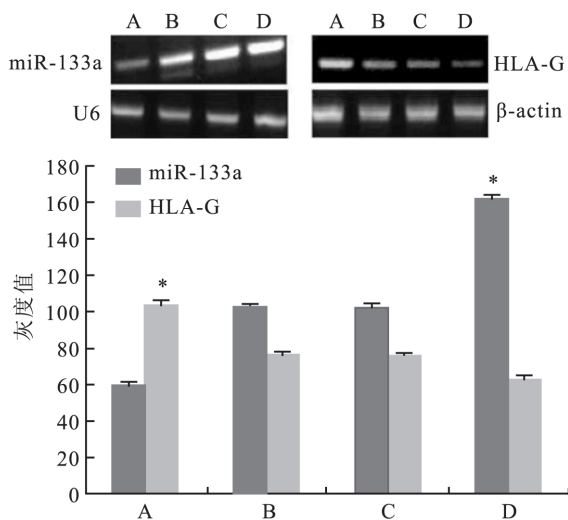


图2 RT-PCR 检测结果统计学分析图

A: miR-133a 抑制组; B: 空白对照组; C: 阴性对照组; D: miR-133a 过表达组; 与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 Western blot 法检测转染 miR-133a 后细胞中 HLA-G 蛋白水平的表达 Western blot 结果显示: miR-133a 抑制组细胞中转染 miR-133a inhibitor 后 HLA-G 蛋白的表达增高;miR-133a 过表达组细胞中转染 miR-133a mimics 后 HLA-G 蛋白的表达下降,与阴性对照组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 3。

3 讨论

在胚胎植入前,HLA-G 起重要调控作用,并通过其调控免疫分子作用^[8],调整母胎免疫微环境,对滋养细胞增殖、浸润及子宫内膜血管重塑等过程均有影响作用^[9]。孕期母胎界面的滋养细胞具有肿瘤的浸润特性,其通过浸润子宫螺旋动脉从而使动脉管腔增加,进而减少血管阻力,增加血流量,从而有利于母胎间的营养物质交换。此过程发生异常往往会导致临床多种妊娠相关疾病^[9],如自然流

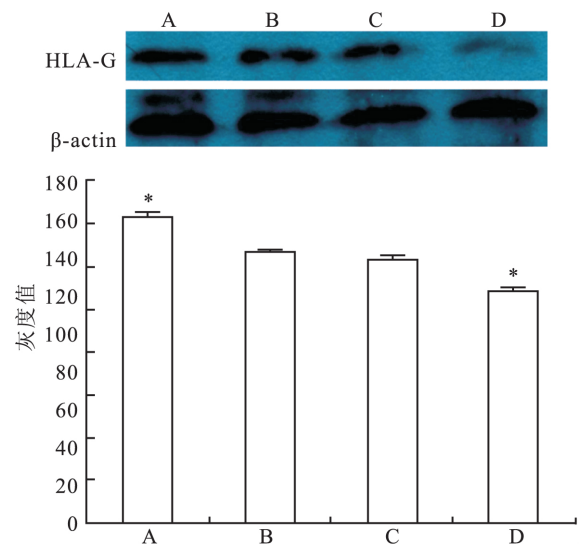


图3 JEG-3 细胞中 HLA-G 蛋白水平的表达

A: miR-133a 抑制组; B: 空白对照组; C: 阴性对照组; D: miR-133a 过表达组; 与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

产、胎儿生长受限、子痫前期等。JEG-3 细胞系为人绒毛癌细胞株,具有正常滋养细胞特点及可以特异性表达 HLA-G,作为研究^[10]滋养细胞的体外模型具有良好的特异性和稳定性。

miRNA 在转录后基因的表达调控过程中起到一定作用^[11-12],既往研究^[7]显示 miR-133a 参与多种病理妊娠疾病过程,本研究结果显示,在 JEG-3 细胞中特异性抑制 miR-133a 表达后,HLA-G 从 mRNA 到蛋白水平均表达增加;而过表达 miR-133a 后,HLA-G 从 mRNA 到蛋白水平均表达下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 miR-133a 能够在转录及翻译水平抑制 HLA-G 的表达,故而可以推测 miR-133a 如表达异常,可引起滋养细胞中 HLA-G 在不同水平的表达变化,从而可能引发母胎间免疫耐受异常及螺旋动脉侵入程度的改变,故而参与自然流产、孕中晚期胎儿生长受限、子痫前期等发病过程。

既往有研究^[13]显示 miR-133a 可调节 HLA-G 的表达,但仅对过表达 miR-133a 后的相关调控作用进行了分析,并未能反向验证该实验结果。而本研

究中通过从过表达及抑制 miR-133a 双向两方面进行了检测分析,结果提示 miR-133a 对在 mRNA 和蛋白水平对 HLA-G 存在负向调控作用。而过往研究^[3]指出 miR-133a 仅能够在翻译水平抑制 HLA-G 蛋白的表达,则与本实验结果略有出入。因此,是否还存在其他因素及相关细胞因子的介入调控影响,还需要进一步研究。

本研究提示,miR-133a 在 JEG-3 细胞中可以负调节 HLA-G 的表达,进一步验证了 miR-133a 与自然流产、子痫前期等疾病的相关性,并为进一步探索相关疾病机制及临床诊治提供了一定的实验基础。

参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2): 215–33.
- [2] Morales-Prieto D M, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, et al. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells [J]. Placenta, 2012, 33(9): 725–34.
- [3] Nowak I, Malinowski A, Barcz E, et al. Possible role of HLA-G, LILRB1 and KIR2DL4 gene polymorphisms in spontaneous miscarriage [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2016, 64(6): 505–14.
- [4] Zhu X M, Han T, Wang X H, et al. Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytotoxicity in JEG-3 cells [J]. Am J Obstet Gynecol, 2010, 202(6): 592.e1–7.
- [5] 王玉洲, 李金媚, 杨志雄. miR-133a 与肿瘤发生发展研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(4): 313–5.
- [6] Ackerman W E, Buhimschi I A, Eidem H R, et al. Comprehensive RNA profiling of villous trophoblast and decidua basalis in pregnancies complicated by preterm birth following intra-amniotic infection [J]. Placenta, 2016, 8(44): 23–33.
- [7] Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, et al. Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood [J]. Thromb Res, 2016, 1(137): 126–40.
- [8] Morandi F, Ferretti E, Bocca P, et al. A novel mechanism of soluble HLA-G mediated immune modulation: downregulation of T cell chemokine receptor expression and impairment of chemotaxis [J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11763.
- [9] Vianna P, Mondadori A G, Bauer M E, et al. HLA-G and CD8+ regulatory T cells in the inflammatory environment of pre-eclampsia [J]. Reproduction, 2016, 152(6): 741–51.
- [10] Zhu X M, Yang Y, Han T, et al. Suppression of microRNA-18a expression inhibits invasion and promotes apoptosis of human trophoblast cells by targeting the estrogen receptor α gene [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2701–6.
- [11] Fu G, Brki J, Hayder H, et al. MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(3): 5519–44.
- [12] 陈静, 秦智慧, 何方舟. MicroRNA-155 在子痫前期发病机制中的研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(9): 14–6.
- [13] Wang X H, Li B, Wang J, et al. Evidence that miR-133a causes recurrent spontaneous abortion by reducing HLA-G expression [J]. Reprod Biomed Online, 2012, 25(4): 415–24.

Overexpression and specific inhibition of miR-133a regulate the expression of HLA-G in human choriocarcinoma JEG-3 cell lines

Chen Rui¹, Jing Hang², Li Lei³, et al

⁽¹⁾Dept of Gynaecology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077;

⁽²⁾Dept of Forensic Science, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; ⁽³⁾Dept of Obstetrics and Gynaecology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union College, Beijing 100730

Abstract Objective To investigate the regulation of HLA-G expression by miR-133a in JEG-3 cells. **Methods** The trophoblastic JEG-3 cells were transfected with pre-miR-133a or pre-miR-133a inhibitor. miR-133a mRNA, HLA-G mRNA and HLA-G protein were detected in the transfected JEG-3 cells using RT-PCR and Western blot. **Results** In cells transfected with pre-miR-133a, miR-133a significantly increased, and HLA-G mRNA and protein significantly decreased, compared with cells treated with pre-miR-133a inhibitor ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-133a down regulates HLA-G expression at the transcription level. Low expression of HLA-G is expected to decrease its immune tolerance effect. This process may be involved in development of immune mediated pathological pregnancy.

Key words microRNA; JEG-3; HLA-G