

以 Has-miR-100-3p 抑制剂慢病毒表达 载体建立稳定感染 A549 细胞株

陈志军 徐 陌 姜 玉 任海风 赵荣荣 杨 帆 汪思应

摘要 目的 用 Has-miR-100-3p 抑制剂的慢病毒来建立稳定感染人非小细胞肺癌(NSCLC) A549 细胞株,为进一步研究 miR-100 在 NSCLC 细胞中的机制奠定基础。方法 用 has-miR-100-3p 抑制剂的重组慢病毒液,以其最适浓度感染 A549 细胞,获得稳定感染慢病毒的 A549 细胞株。荧光显微镜观察细胞感染效率,实时定量聚合酶链锁反应(qRT-PCR)和流式细胞术(FCM)分别检测稳定感染慢病毒的 A549 细胞株中 miR-100 的表达量和细胞株中绿色荧光蛋白(GFP)表达情况。结果 荧光显微镜下可见绿色荧光在细胞中表达。qRT-PCR 检测结果显示,感染抑制剂的 A549 细胞中 miR-100 的表达量显著减少;流式细胞术检测感染组细胞中均有 GFP 的表达。结论 获得了 has-miR-100-3p 抑制剂的慢病毒稳定感染的 A549 细胞株,该细胞株中内源性 miR-100 的表达下调。

关键词 慢病毒;非小细胞肺癌;微小 RNA;has-miR-100-3p
中图分类号 R 363.16; R 363.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0018-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.004

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是其常见类型,约占肺癌的 80%~85%,主要包括肺腺癌、鳞癌、大细胞癌 3 种组织学类型^[1-2]。现有的研究^[1]表明,导致肺癌发生的原因众多,在遗传因素中,某个或多个基因的改变均可导致肺癌的发生。因此,要全面地了解肺癌发生、发展的相关机制,需要去寻找更多的分子标志物。在这些分子生物标记中,microRNA 的现世引起了广泛关注,其作用机制是通过表观遗传学方式来调控基因的表达。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码的单链小分子 RNA,长度为 18~23 个核苷酸,广泛存在于真核生物中^[3]。miRNA 通过与靶基因的 mRNA

(mRNA) 3' UTR 区不完全性地互补配对识别,从而抑制靶 mRNA 的翻译或者促使其降解,即在转录后水平与翻译水平调节靶蛋白的表达^[4]。现有的研究^[5]证实 miRNA 在肺癌的发生、发展中起着重要作用。实验室前期的研究表明,miRNA-100 在 SHP-2 激活突变的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)细胞的恶性转化过程中发挥作用^[6]。miRNA-100 是 miRNA-99 家族中的一员,众多的研究证实其在多种恶性肿瘤的发生、发展过程发挥重要的调控作用^[7-12],而 miRNA-100 与肺癌的相关性还未见深入报道。为了深入了解 miRNA-100 对 NSCLC 细胞恶性生物学行为的影响,拟采用 has-miR-100-3p 抑制剂的慢病毒构建稳定感染 A549 细胞株,为进一步探讨 miR-100 在肺癌中的调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、has-miR-100-3p 抑制剂重组慢病毒载体与质粒 人 NSCLC 细胞: A549、Anip973、L18 细胞株,人胚肾上皮细胞 293 (human embryo kidney epithelial cell, HEK-293) T 细胞由美国合作实验室引进; has-miR-100-3p 抑制剂重组慢病毒载体与质粒由本实验室构建合成^[13]。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM basic (1×) 培养基(美国 Gibco 公司);进口胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、Penicilin-Streptomycin solution (双抗)(美国 Hyclone 公司); Lipofectamine 3000、OPTI-MEM 培养基(美国 Invitrogen 公司);嘌呤霉素(美国 Sigma 公司);凝胶成像分析仪(北京汇佳科技有限公司);细胞孵育箱(美国 Thermo 公司);PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司);倒置荧光显微镜 TMT2-21(日本 OLYMPUS 公司);琼脂糖电泳仪 DYCP31-CN(北京六一公司)。

1.2 方法

1.2.1 has-miR-100-3p 抑制剂重组慢病毒的包装与浓缩 将实验室前期已构建好的 has-miR-100-3p

2016-11-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81572749)

作者单位:安徽医科大学基础医学院,合肥 230001

作者简介:陈志军 男 硕士研究生;

汪思应 男 教授,博士生导师,责任作者,E-mail: sywang@ahmu.edu.cn

抑制剂重组慢病毒载体与质粒用 Lipofectamine 3000 试剂共转染 HEK-293T 细胞,以便获取 has-miR-100-3p 抑制剂的病毒液。293T 细胞的传代培养:弃去 293T 细胞培养瓶中的培养基,在培养瓶中加入 1 ml 的 0.25% 胰酶消化 1 min 后,再向细胞培养瓶中加入 2 ml 含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基,用移液枪将细胞悬液加入离心管中,混匀后取 20 μ l 进行细胞计数,将离心管于离心机中 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;再加入 1 ml 培养基进行重悬细胞,将 293T 细胞按 5×10^5 细胞/ml 接种至培养瓶中,置于含 5% CO₂ 的细胞培养箱中。24 h 后观察细胞的融合度是否达到 80%。

重组慢病毒载体与质粒的共转染:转染前将 OPTI-MEM 培养基置于 37 $^{\circ}$ C 预热,将 293T 细胞中的培养基更换成无血清的 DMEM 培养基,再置于细胞培养箱中孵育 30 min;将 OPTI-MEM 培养基、16 μ g 的辅助质粒、25 μ g 的慢病毒载体质粒于 EP 管中混匀(标记为 A),同时用 OPTI-MEM 培养基稀释 Lipofectamine 3000 试剂(标记为 B),静置 5 min 后,将 A 管中液体加入 B 管中混匀,室温孵育 20 min;最后将 B 管中的混合液加入 293T 细胞,细胞培养箱中孵育 6 h 后更换为正常培养基。在共转染 48 h 后,用 15 ml 离心管收集上清液,4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 30 min,收集上清液并用 0.22 μ m 滤器过滤,所得液体即为慢病毒液,并将其分装冻存于液氮罐中。

用荧光法测定 has-miR-100-3p 抑制剂慢病毒的滴度:将 293T 细胞按 2×10^3 细胞/孔接种至 96 孔板中,用无血清的 DMEM 培养基按 10 倍的梯度稀释待测病毒液,再将其分别加入 96 孔板中,置于细胞培养箱中孵育;96 h 后,荧光倒置显微镜下观察 96 孔板中细胞的荧光表达强度,同时统计带有荧光的细胞个数。病毒滴度 = 带荧光的细胞数/病毒液量。

1.2.2 has-miR-100-3p 抑制剂重组慢病毒感染 A549 细胞 A549 细胞感染预实验:将 A549 细胞按 1×10^3 细胞/孔接种至 96 孔板中。24 h 后观察细胞的融合度,选取细胞融合度在 30% 的孔做慢病毒感染实验,将其按不同的感染条件分为 4 组,每组又设有不同的慢病毒梯度,第 1 组:DMEM 完全培养基 + 慢病毒组;第 2 组:DMEM 完全培养基 + 5 μ g/ml Polybrene + 慢病毒组;第 3 组:ENi.S + 慢病毒;第 4 组:ENi.S + 5 μ g/ml Polybrene + 慢病毒。然后将上述液体加入不同的孔中,感染 8 h 后换液。3~4 d

后,倒置荧光显微镜下观察 A549 细胞的荧光表达情况,确定 A549 细胞的感染条件。用预实验得到的感染条件正式感染 A549 细胞。将 A549 细胞按 1×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中,细胞培养箱中孵育过夜后,观察细胞的融合度是否达到 30%。感染前,弃掉 24 孔板中的培养基,提前于 EP 管中混匀以下液体:350 μ l DMEM 完全培养基 + 100 μ l hsa-miR-100-inhibition/NC + 50 μ l Polybrene,再将其加入相应的孔中,24 孔板于细胞培养箱中孵育。A549 细胞在感染 72 h 后,于显微镜下观察其荧光表达情况。

嘌呤霉素最小致死量的确定:将 A549 细胞接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后,加入嘌呤霉素,设置不同的浓度梯度(0.5、0.25、0.1 μ g/ml)进行筛选,导致 A549 细胞全部死亡的嘌呤霉素浓度是 0.25 μ g/ml,即为嘌呤霉素最小致死量。在已感染慢病毒的 A549 细胞中加入 0.25 μ g/ml 的嘌呤霉素进行筛选,并及时观察细胞的荧光表达情况。将筛选后的细胞按 10 细胞/孔接种至 6 cm 细胞培养皿中培养,每隔 3 d 换液,待细胞长至肉眼可见的细胞克隆时,挑选单个细胞克隆至 24 孔板中进行扩大培养(一般挑选多个克隆),再逐级放大,直至获得稳定的 A549 细胞株。

1.2.3 检测重组慢病毒感染 A549 细胞后 miR-100 的表达情况 按照康威世纪公司的 TRIzol Reagent 试剂说明书提取 A549 细胞的总 RNA,进行 qRT-PCR 反应。RT 反应条件:25 $^{\circ}$ C 30 min,42 $^{\circ}$ C 30 min,85 $^{\circ}$ C 5 min;ABI 7500 荧光定量 PCR 仪中,95 $^{\circ}$ C 3 min 预变性后按以下程序进行 40 个循环定量 PCR 反应(95 $^{\circ}$ C 12 s,62 $^{\circ}$ C 40 s)。检测染料选择荧光基团 SYBR,检测温度设置在 62 $^{\circ}$ C。以 U6 snRNA 为内参进行相对定量分析,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的 miRNA 的相对表达量(具体方法参照吉玛说明书)。

1.2.4 检测重组慢病毒感染 A549 细胞后荧光强度峰图的变化情况 嘌呤霉素筛选出的细胞经扩大培养后,接种至 6 孔板中,待细胞融合度达到 85% 左右时,用 0.25% 胰酶消化,收集细胞悬液至离心管中,离心,弃上清液,用预冷的 PBS 液洗涤细胞 2 次,最后收集未感染和已稳定感染慢病毒的 A549 细胞用流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学处理 实验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 miR-100 在 NSCLC 细胞株中的表达情况

课题组前期通过 RT-PCR 检测 miR-100 在 NSCLC 细胞株中的表达水平。琼脂糖凝胶电泳结果显示, A549 细胞相较于其他 NSCLC 细胞株 (Anip973、L18) ,miR-100 的表达水平较高, 差异有统计学意义 ($F = 113.6, P = 0.0015$) ,见图 1 ,确定其作为后续实验的细胞株。

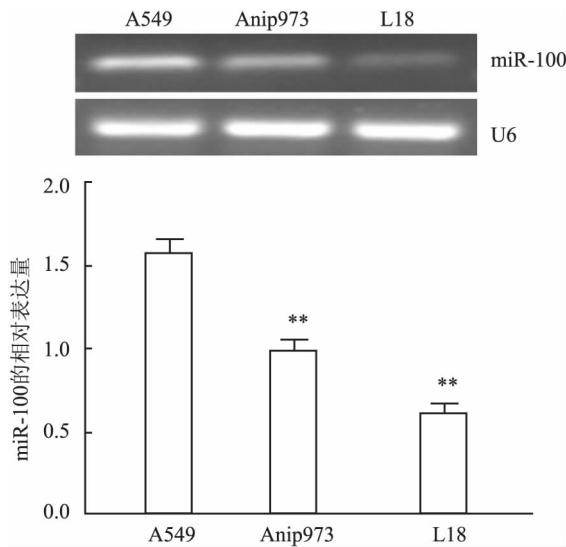


图 1 RT-PCR 检测 miR-100 在 NSCLC 细胞株中的表达水平及其统计学分析与 A549 细胞比较: ** $P < 0.01$

2.2 A549 细胞感染重组慢病毒的实验条件的确定

将包装好的重组慢病毒按不同的感染条件分为 4 组, 每组又设有不同的慢病毒浓度梯度。感染预实验确定重组慢病毒感染 A549 细胞的条件为第 2 组: MOI 为 1×10^7 (即 MOI = 10) ,见图 2。

2.3 慢病毒感染 A549 细胞 采用预实验结果确定的慢病毒感染条件感染 A549 细胞, 从而获得稳定表达 miR-100-3p 抑制剂的 A549 细胞株。将 miR-100-3p 抑制剂 (LV-miR-100-3p-Inh) 及其阴性对照 (LV-Inh-NC) 按预实验确定的感染条件感染 A549 细胞, 感染 3 d 后, 观察 A549 细胞中绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达情况。显微镜下可见感染的 A549 细胞中 85% 以上有 GFP 的表达, 且细胞的生长状态良好, 这表明 has-miR-100-3p 抑制剂重组慢病毒在 A549 细胞中的感染效率符合实验要求。见图 3。

2.4 稳定感染慢病毒的 A549 细胞中 miR-100-3p

的表达水平 将已经建立的稳定感染慢病毒 has-miR-100-3p 抑制剂组及其对照组 has-miR-100-3p 阴性对照组的 A549 细胞传代培养后, 收集细胞提取总 RNA, 然后通过 ABI 7300 进行 qRT-PCR 反应。

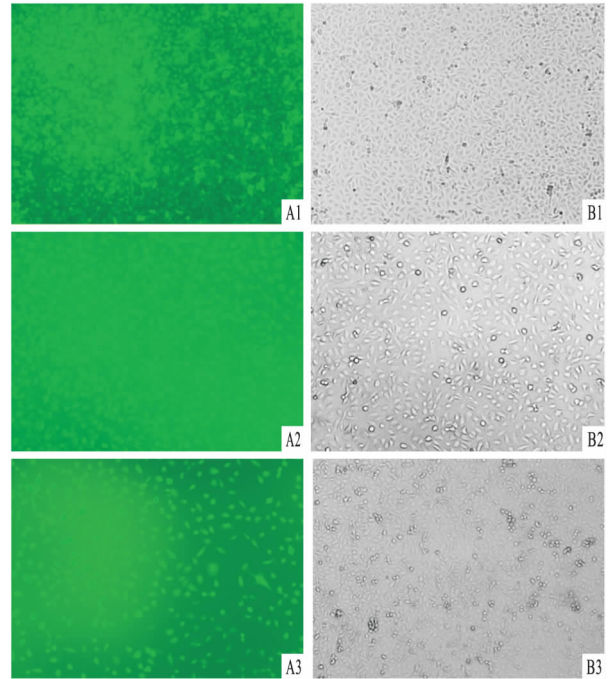


图 2 重组慢病毒在不同感染条件下感染 A549 细胞株 $\times 200$
A: 荧光显微镜图; B: 相差显微镜图; 1: MOI 为 1×10^8 ,MOI = 100; 2: MOI 为 1×10^7 ,MOI = 10; 3: MOI 为 1×10^6 ,MOI = 1

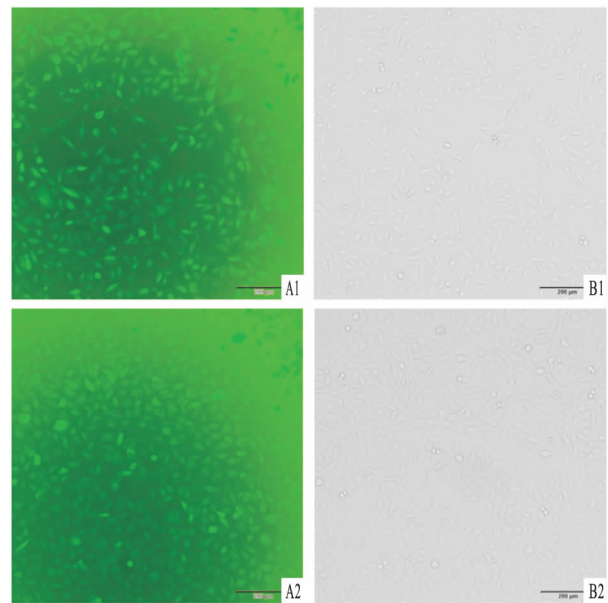


图 3 建立稳定表达 has-miR-100-3p 抑制剂和阴性对照的 A549 细胞株 $\times 200$
A: 荧光显微镜图; B: 相差显微镜图; 1: miR-100-3p 抑制剂组; 2: 阴性对照组

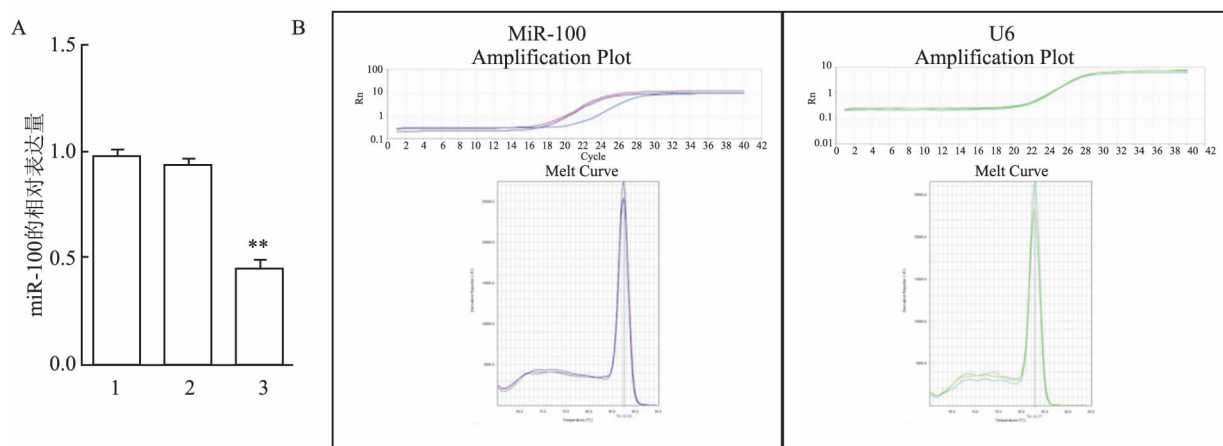


图4 qRT-PCR检测慢病毒稳定感染A549细胞后miR-100的相对表达量

A: qRT-PCR检测miR-100的相对表达量; B: PCR扩增曲线与溶解曲线; 1: 未转染组; 2: 阴性对照组; 3: miR-100抑制剂组; 与未转染组以及阴性对照组比较: ** $P < 0.01$

结果显示: 稳定转染了 has-miR-100-3p 抑制剂的 A549 细胞较阴性对照组 miR-100-3p 的表达水平降低了 57.6%, 差异有统计学意义 ($F = 105.8$, $P = 0.0094$)。见图 4。

2.5 稳定感染慢病毒的 A549 细胞中 GFP 的表达水平 将已经建立的稳定感染慢病毒 has-miR-100-3p 抑制剂组及其对照组 has-miR-100-3p 阴性对照组的 A549 细胞传代培养后, 收集细胞沉淀, 通过流式细胞仪检测其 GFP 的表达情况。结果显示: 稳定感染了 miR-100-3p 抑制剂及其阴性对照组均可见 GFP 的荧光峰图增强, 见图 5。

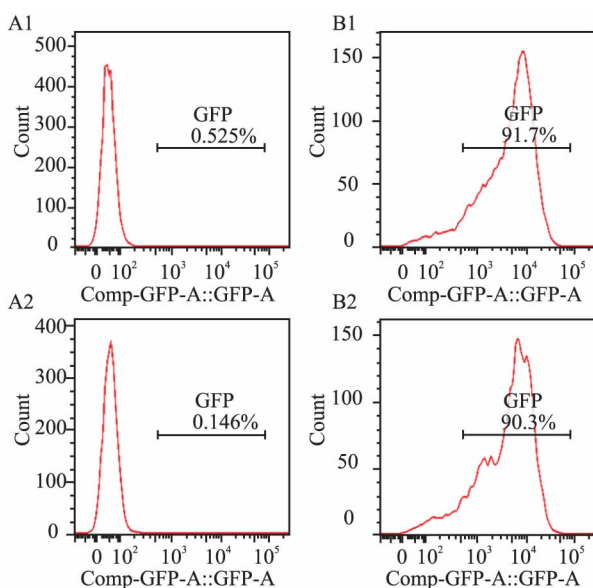


图5 流式细胞仪检测慢病毒稳定感染A549细胞前后荧光强度峰图的变化

A: 感染前; B: 感染后; 1: 阴性对照组; 2: miR-100抑制剂组

3 讨论

miRNAs 作为一类小分子非编码 RNA, 其不仅参与动植物的发育及生理过程, 且其异常表达还会导致多种疾病和肿瘤的发生^[3-4]。miRNA-100 是 miR-99 家族中的一员, 自 2002 年被发现至今, 已有众多关于其在肿瘤发生、发展过程中发挥调控作用的研究^[7]。付海龙等^[8]研究发现, 人类 miRNA-100 位于染色体 11q24.1, 且 has-miR-100 中“13-AAC-CCGUAGAUCGAAACUUGUG-34”序列在鼠、果蝇等上百余种物种中高度保守, 这提示 miRNA-100 可能在各物种的生长发育过程中均发挥着强大的生物学功能。

实验室前期的研究^[7]表明, 用小剂量的 As_2O_3 长期诱导 SHP-2^{D61G/+} MEF 细胞后, miRNA-100 的表达降低, 且细胞的生物学行为也随之进一步恶化, 这提示 miRNA-100 可能参与了 SHP-2 激活突变的 MEF 细胞的恶性化过程。同时已有大量文献^[9-12]报道, miRNA-100 参与了包括淋巴瘤、膀胱癌、子宫内膜癌、宫颈癌、乳腺癌在内的多种肿瘤的发生、发展, 且其与肿瘤的侵袭及转移高度相关。在本研究中, 通过 RT-PCR 检测了 miRNA-100 在 NSCLC 细胞中的表达情况, 显示与其它 NSCLC 细胞株相比, A549 细胞株中 miRNA-100 的表达水平明显降低。为了进一步研究 miRNA-100 在非小细胞肺癌进展中的作用机制, 本研究采用慢病毒表达载体构建稳定感染 A549 细胞株。由于慢病毒具有以下特点: 能在细胞中稳定表达外源基因, 对感染细胞的毒性

小,感染范围广(能够感染多种难转染的细胞系)且感染效率高^[14]。因此,选用慢病毒感染 A549 细胞株,建立稳定细胞系,以达到敲低其内源性 miRNA-100 表达的目的,为后续的实验研究奠定基础。

近年来,随着对 microRNA 与肺癌等多种肿瘤关系的深入探究,这些成果极大地完善和丰富了癌症发生、发展过程中的分子生物学与遗传学机制^[10-11]。而关于 miRNA-100 在肺癌的发生、发展中的作用和机制,目前国内外相关研究还比较少。所以通过慢病毒敲低 A549 细胞内源性 miRNA-100 的表达,从而构建稳定感染 miR-100-3p 抑制剂的 A549 细胞株,这为进一步探讨 miRNA-100 在肺癌进展中的作用机制,以及寻找 miRNA-100 的表达调控方式等奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Stewart B W, Wild C P. World Cancer Report 2014 [R]. ISBN (Epub)978-92-832-0432-9
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin* 2016, 66(2):115-32
- [3] Bui T V, Mendell J T. Myc: Maestro of microRNAs [J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(6):568-75.
- [4] Agarwal S, Hanna J, Sherman M E, et al. Quantitative assessment of miR34a as an independent prognostic marker in breast cancer [J]. *Br J Cancer* 2015, 112(1):61-8.
- [5] Feng B, Wang R, Chen L B. MiR-100 resensitizes docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells (SPC-A1) to docetaxel by targeting plk1 [J]. *Cancer Lett* 2012, 317(2):184-91.
- [6] 崔花芹,汪心怡,陈吉,等. 环境污染物 As 及 SHP2D61G/+ 激活对小鼠成纤维母细胞 miRNA 表达谱的影响 [J]. *中国比较医学杂志* 2013, 7(23):1-6.
- [7] Qin C, Huang R Y, Wang Z X. Potential role of miR-100 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy [J]. *Tumor Biol* 2015, 36(3):1403-9.
- [8] 付海龙,徐广峰,史春梅,等. has-miR-100 的生物信息学分析 [J]. *国际检验医学* 2012, 33(18):2177-80.
- [9] Xu C, Zeng Q, Xu W, et al. MiRNA-100 inhibits human bladder urothelial carcinogenesis by directly targeting mTOR [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(2):207-19.
- [10] Li B H, Zhou J S, Ye F, et al. Reduced miR-100 expression in cervical cancer and precursors and its carcinogenic effect through targeting PLK1 protein [J]. *Eur J Cancer* 2011, 47(14):2166-74.
- [11] Gebeshuber C A, Martinez J. Mir-100 suppresses IGF2 and inhibits breast tumorigenesis by interfering with proliferation and survival signaling [J]. *Oncogene* 2013, 32(27):3306-10.
- [12] Li X J, Luo X Q, Han B W, et al. MicroRNA-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways [J]. *Br J Cancer* 2013, 109(8):2189-98.
- [13] 董伟,刘媛媛,陈志军,等. hsa-miR-100-3p 抑制剂慢病毒表达载体稳定感染 BEAS-2B 细胞株的建立 [J]. *中华疾病控制杂志* 2016, 20(2):188-92.
- [14] Jiang W, Hua R, Wei M, et al. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(2):13875.

Establishment of A549 stable cell lines with lentivirus-based has-miR-100-3p inhibitor

Chen Zhijun, Xu Mo, Jiang Yu, et al

(School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To establish a stable infection of human non-small cell lung cancer (A549) cell lines with has-miR-100-3p inhibitors lentiviral, provide material for further study of miR-100 in NSCLC cell mechanism.

Methods We obtain a stable infected A549 cell lines by infecting A549 cells with optimal concentration of has-miR-100-3p inhibitor recombinant lentivirus. The high cell infection efficiency was observed by fluorescence microscopy. The expression of miR-100 in A549 cells with or without infecting lentivirus was used to detect by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the green fluorescent protein (GFP) expression was used to detect by flow cytometry. **Results** We observed fluorescence expression in all A549 cells by fluorescence microscope. The expression of miR-100 in A549 cells after infecting with has-miR-100-3p inhibitors lentiviral was reduced significantly, measured by qRT-PCR. And the GFP expression was observed in all infected cell lines by flow cytometry. **Conclusion** The A549 stable cell lines with lentivirus-based has-miR-100-3p inhibitor is established in which the expression of miR-100 is knockdowned.

Key words lentivirus; non-small cell lung cancer; microRNA; has-miR-100-3p