

# 人 microRNA - 339 慢病毒载体的构建及其对结肠癌细胞 SW620 迁移的影响

周 畅<sup>1,2</sup>, 陈 芳<sup>2</sup>, 陆艳霞<sup>2</sup>, 袁 理<sup>2</sup>, 李学农<sup>2</sup>

**摘要** 目的 构建人 microRNA-339 (has-miR-339) 慢病毒载体,并探讨 miR-339-5p/3p 对结肠癌细胞 SW620 迁移能力的影响。方法 由 miRBase 及 NCBI 数据库查找获得 miR-339 前体序列 (pre-miR-339) 及其侧翼序列,将 pre-miR-339 和 PLVTHM 载体经双酶切后连接,产生 PLVTHM-pre-miR-339 慢病毒载体,并经测序鉴定;以 PLVTHM-pre-miR-339、psPAX2 和 pMD2. G 三质粒包装系统共同转染 293FT 细胞,包装产生慢病毒。流式细胞仪筛选建立稳定过表达 pre-miR-339 的 SW620 细胞株,实时荧光定量 RT-PCR 检测 miR-339-5p 及 miR-339-3p 表达。利用细胞划痕实验进行细胞迁移能力检测。结果 成功构建 PLVTHM-pre-miR-339 慢病毒载体,测序证实所插入基因序列完全正确。倒置荧光显微镜下观察可见转染后的 293FT 细胞及 SW620 细胞均表达绿色荧光。在过表达 pre-miR-339 的 SW620 亚细胞系中,miR-339-5p 及 miR-339-3p 表达水平显著高于空载对照组。划痕实验结果显示:与 SW620/PLVTHM-NC 组相比,SW620/PLVTHM-pre-miR-339 组细胞迁移减缓,划痕较宽。结论 成功构建了 PLVTHM-pre-miR-339 慢病毒载体和稳定过表达 miR-339-5p 及 miR-339-3p 的 SW620 亚细胞系,并证实 miR-339-5p/3p 可抑制结肠癌细胞 SW620 的迁移能力。

**关键词** miR-339;结肠癌;慢病毒载体;细胞迁移

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1574-05

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类具有转录后水平基因表达调控作用的非编码小分子 RNA,给结肠癌的研究带来了重大启示<sup>[1-2]</sup>。miRNA 可在结肠癌发生、发展过程中充当癌基因或抑癌基因的作用<sup>[3]</sup>。miR-21 可以通过转录后调节肿瘤抑制因子 Pcd4,促进结直肠癌的侵袭和转移<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5]</sup>报道 miR-34a 通过抑制 Rb/E2F 信号通路,发挥抑癌基因的作用。人 microRNA-339 前体序列

(has-pre-microRNA-339, pre-miR-339) 在 Dicer 酶剪切后可产生两种不同序列的成熟剪接体:miR-339-5p 和 miR-339-3p,两者在结直肠癌中的作用尚未见报道。而增强两者在结直肠癌细胞中的稳定表达是进行功能研究的前提。因此构建 pre-miR-339 慢病毒载体成为理想的选择。为此,该研究将重组载体 pre-miR-339 慢病毒载体转入结肠癌细胞 SW620,流式分选出稳定表达 pre-miR-339 的细胞,并初步探讨其成熟剪接体 miR-339-5p/3p 对结肠癌细胞 SW620 迁移能力的影响;为后续进一步完成 miR-339-5p 和 miR-339-3p 影响结直肠癌细胞增殖及转移的功能实验作准备。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株与质粒载体** 人结肠癌 SW620 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;293FT 人胚肾细胞购自美国 Invitrogen 公司;慢病毒包装系统 (PLVTHM、psPAX2、pMD2. G) 由本实验室保存。

**1.2 试剂** DMEM 及 RPMI-1640 细胞培养基均购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Opti-MEM 培养基、Lipofectamine™ 2000 转染试剂及质粒中量抽提试剂盒均自美国 Invitrogen 公司;KOD-Plus 高保真酶购自日本 TOYOBO 公司;限制性核酸内切酶 Mlu I、Cla I 及 T4 DNA 连接酶均购自加拿大 Fermentas 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,质粒小量抽提试剂盒均自美国 Biomiga 公司;实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒购自美国 GeneCopoeia 公司;TRIzol 试剂购自大连宝生物工程有限公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 引物设计** 依据 miRBase 数据库提供的 has-miR-339 前体序列 (MI0000815),结合 NCBI 数据库查询其基因组 (NC\_000007.13) 序列,获得其侧翼序列,设计插入片段全长共 253 bp。通过 Premier 5.0 软件设计引物序列,上游引物:5'-TGCGACGCGTTCTCCTTACCATCCCTGA-3',下游引物:5'-CCATCGATCTGGAAGTAACCCAAGCC-3'。

**1.3.2 慢病毒载体构建和鉴定** 以正常结直肠黏

2014-04-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272758)

作者单位:<sup>1</sup> 广东药学院人体解剖学教研室,广州 510006

<sup>2</sup> 南方医科大学病理学系,广东省分子肿瘤病理学重点实验室,广州 510515

作者简介:周 畅,女,博士,讲师;

李学农,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:

leexue0@126.com

膜组织基因组 DNA 为模板,扩增目的片段。PCR 反应条件为:预变性 94 °C 2 min,变性 98 °C 10 s,退火 57 °C 30 s,延伸 68 °C 30 s,历经 40 个循环。得到的扩增产物经纯化后连接慢病毒载体 PLVTHM,之后通过菌液 PCR 鉴定、双酶切鉴定、测序鉴定,成功得到 PLVTHM-pre-miR339 慢病毒载体。

**1.3.3 建立稳定过表达 pre-miR-339 的 SW620 细胞株** 取对数生长期的 293FT 细胞,按照每个 10 cm 的培养皿  $2.5 \times 10^6$  个细胞数接种于细胞培养皿中,培养 24 h 后,细胞融合度为 80% ~ 90% 时,按照 Lipofectamine™ 2000 转染说明书制备 DNA-Lipofectamine 2000 复合物并进行病毒包装。质粒转染分为两组:PLVTHM-NC 质粒组和 PLVTHM-pre-miR-339 质粒组。转染 48 ~ 72 h 后收集病毒上清液 4 °C、3 000 r/min 离心 5 min 后,用直径为 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤分装,用于细胞感染。将病毒上清液感染 SW620 细胞,次日更换培养基,感染后 72 h,在倒置荧光显微镜下观察 GFP 的发光情况。利用流式细胞仪分选 GFP + 细胞为目的细胞 (SW620/PLVTHM-NC、SW620/PLVTHM-pre-miR339)。

**1.3.4 实时荧光定量 RT-PCR 检测 miR-339-5p/3p 的表达** 分别提取 SW620/PLVTHM-NC 组、SW620/PLVTHM-pre-miR339 组细胞总 RNA,根据 GeneCopoeia 公司实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作,检测不同细胞株中 miR-339-5p/3p 的表达,并以 U6 做内参照。

**1.3.5 细胞划痕实验** 取对数生长期各组细胞,以  $1 \times 10^5$  个/每孔接种于 24 孔板,待细胞融合达 95% 以上时,用无菌 10  $\mu\text{l}$  枪头在 24 孔板上划痕。每隔 12 h 观察细胞生长迁移情况,共观察 72 h,并拍照留存。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件分析实验数据。实时荧光定量 RT-PCR 结果比较,方差齐性时采用两独立样本 *t* 检验,方差不齐时采用近

似 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒载体 PLVTHM/pre-miR-339 的构建

**2.1.1 miR-339 前体及其侧翼序列的 PCR 扩增** 以正常结直肠黏膜组织基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应扩增 pre-miR-339,产物约为 253 bp,2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物大小,与预计产物大小一致,见图 1。

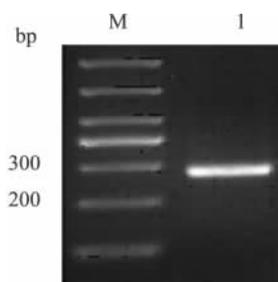


图 1 PCR 扩增 pre-miR-339 及其侧翼序列  
M:DNA Marker;1:PCR 产物

**2.1.2 慢病毒载体 PLVTHM/pre-miR-339 的构建及鉴定** PCR 产物和 PLVTHM 载体经双酶切、纯化、连接转化后挑取 6 个单克隆菌落培养过夜,菌液 PCR 鉴定(图 2A)。菌液 PCR 阳性单克隆,小量提取质粒后经双酶切鉴定,结果显示与预计大小相符(图 2B)。克隆送测序鉴定,Blast 比对后与 GenBank 公布序列一致(图 2C)。由此,成功构建了 PLVTHM/pre-miR-339 载体。

**2.2 慢病毒的包装** 将包装产生的两种慢病毒颗粒 (PLVTHM-NC 质粒组和 PLVTHM-pre-miR-339 质粒) 分别感染 293FT 细胞,72 h 后倒置荧光显微镜下可见两组 293FT 细胞均有绿色荧光表达,见图 3。

**2.3 稳定过表达 pre-miR-339 的 SW620 细胞株的建立** 离心收集转染后的 293FT 细胞病毒上清液,感染 SW620 细胞,72 h 后倒置荧光显微镜下可观察

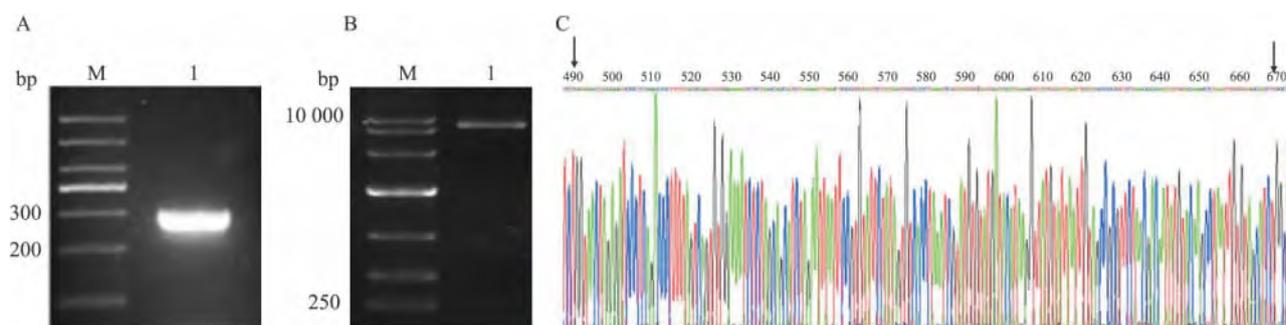


图 2 重组质粒 PLVTHM/pre-miR-339 鉴定图

A:菌液 PCR 鉴定电泳图; B:重组质粒 PLVTHM/pre-miR-339 双酶切鉴定电泳图; C:重组质粒部分测序结果; M:DNA Marker; 1:1 号克隆

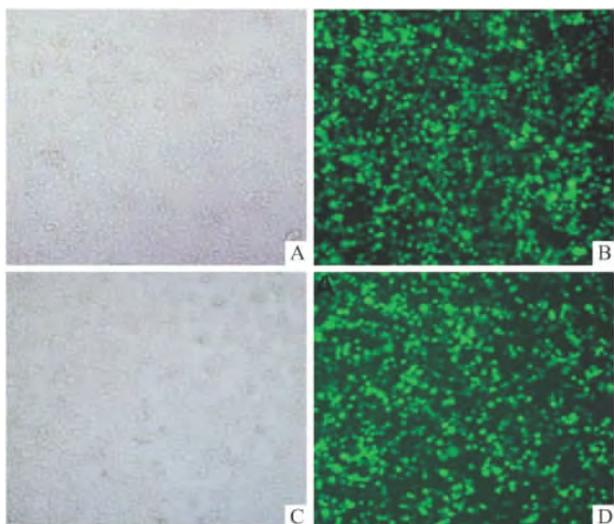


图3 慢病毒感染后的293FT细胞 ×100

A:感染 PLVTHM/NC 质粒后普光图; B: 感染 PLVTHM/NC 质粒后荧光图; C:感染 PLVTHM/pre-miR-339 质粒后普光图; D: 感染 PLVTHM/pre-miR-339 质粒后荧光图

到转染 SW620 细胞中 PLVTHM-NC 质粒组和 PLVTHM/pre-miR-339 质粒组均有绿色荧光表达, 稳定细胞株分别命名为 SW620/PLVTHM-NC 及 SW620/PLVTHM-pre-miR-339。根据 GFP 标记, 经过流式细胞仪分选获得 GFP+ 细胞, 分选后表达绿色荧光的细胞纯度达 95% 以上, 见图 4。

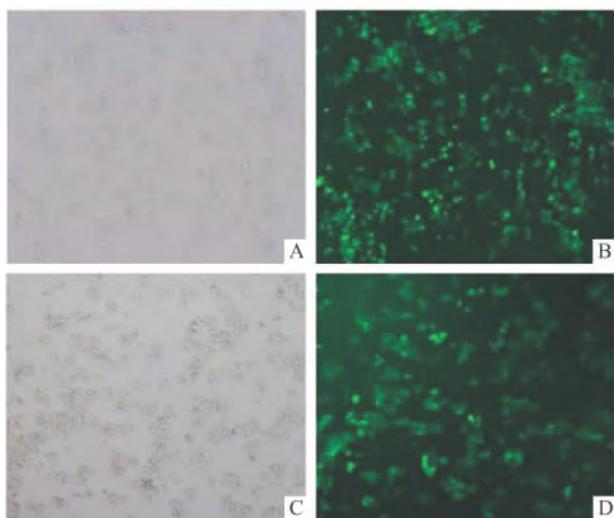


图4 流式分选后慢病毒感染的SW620细胞 ×100

A:感染 PLVTHM/NC 质粒后普光图; B:感染 PLVTHM/NC 质粒后荧光图; C:感染 PLVTHM/pre-miR-339 质粒后普光图; D: 感染 PLVTHM/pre-miR-339 质粒后荧光图

**2.4 荧光定量 RT-PCR 检测 pLVTHM-pre-miR-339 转染后 SW620 细胞中 miR-339-5p、miR-339-3p 的表达** miR-339-5p 在不同细胞组中的相对表达量

分别为: SW620/PLVTHM-NC 组 ( $1.31 \pm 0.4$ ), SW620/PLVTHM-pre-miR-339 组 ( $45.11 \pm 10.30$ )。经两独立样本 *t* 检验, 结果显示: miR-339-5p 在 SW620/PLVTHM-pre-miR-339 组中的表达水平高于 SW620/PLVTHM-NC 组 ( $t = -7.621, P = 0.02$ )。miR-339-3p 在不同细胞组中的相对表达量分别为: SW620/PLVTHM-NC 组 ( $1.15 \pm 0.18$ ), SW620/pLVTHM-pre-miR-339 组 ( $3.07 \pm 0.64$ )。miR-339-3p 在 SW620/pLVTHM-pre-miR-339 组中的表达水平高于 SW620/PLVTHM-NC 组 ( $t = -5.638, P = 0.03$ )。表明 pre-miR-339 转染成功。

**2.5 miR-339-5p/3p 抑制结直肠癌细胞的迁移能力** 对细胞培养环境造成机械力损伤后连续观察 72 h, 结果显示: 与 SW620/pLVTHM-NC 细胞组相比, SW620/pLVTHM-pre-miR-339 细胞组的细胞迁移减缓, 划痕较宽, 见图 5。

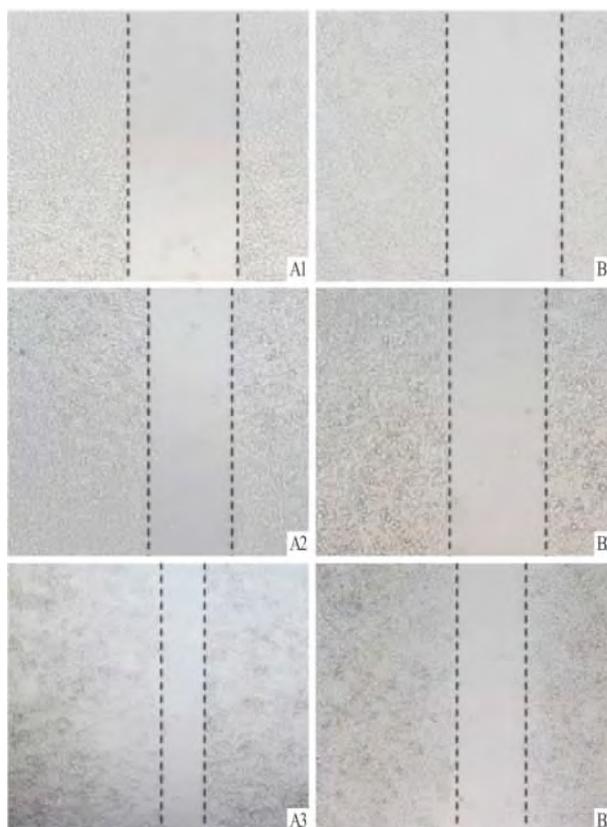


图5 miR-339-5p/3p 对 SW620 细胞划痕后迁移能力的影响 ×100  
A: SW620/pLVTHM-NC 组; B: SW620/pLVTHM-pre-miR-339 组; 1:0 h; 2:24 h; 3:72 h

### 3 讨论

近期一项对比早期结直肠癌患者组织与晚期复发患者组织的 microRNA 芯片研究<sup>[6]</sup>显示: II 期结

直肠癌患者组织的 miR-339-5p 表达量相对于 I 期结肠直肠癌患者组织呈现下降趋势。has-miR-339 前体为 pre-miR-339, 全长 94 个核苷酸, 定位于人类 7 号染色体上, 最早见于红细胞发育的研究报道<sup>[7]</sup>。miR-339-5p/3p 是 pre-miR-339 在 Dicer 酶切后形成的两条互补的 miRNA。之前 Wu et al<sup>[8]</sup> 通过 miRNA 芯片筛选出在乳腺癌中具有抑癌作用的 miR-339-5p, 可靶向调控 BCL-6, 显著抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭。此外, 有研究<sup>[9]</sup> 报道, Dicer 控制下的 miR-222 和 miR-339 通过下调 ICAM-1 促进癌细胞增强抵御抗细胞毒性 T 淋巴细胞攻击的能力。而 miR-339-3p 在肿瘤中的作用研究未查到相关文献, 只是在国内的研究论文中有所记载。迄今为止, 结肠直肠癌中有关 miR-339-5p 及 miR-339-3p 功能的相关研究仍未有报道。因此 miR-339-5p 及 miR-339-3p 在结肠直肠癌发生发展中的作用及其分子机制值得我们深入探讨。

近年来, 实现生物体内源性 miRNAs 过表达主要有两种方法, 分别为: 化学合成 miRNA 片段的转染和 miRNA 过表达载体的转染。相对于前者而言, 构建载体可实现 miRNA 在培养细胞或者动物体内的稳定过表达, 并且费用更低廉, 其中慢病毒载体为理想选择之一。慢病毒载体是以慢病毒基因组为基础, 去除部分基因片段并代之以所需的外源性基因和标志物构建而成, 可稳定、高效整合入宿主细胞基因组, 从而高水平的表达效应分子<sup>[10-11]</sup>。

miR-339-5p/3p 在培养细胞或者动物体内的稳定过表达, 即从人类基因组 DNA 中用 PCR 法扩增出 pre-miR-339 及侧翼序列, 酶切后定向插入慢病毒表达载体, 感染目的细胞整合至靶细胞基因组后可长期表达 pre-miR-339, 可模拟 miRNA 生理状态下形成的自然过程, 最终产生成熟产物: miR-339-5p 与 miR-339-3p。在建立的稳转 pre-miR-339 的 SW620 细胞中, miR-339-5p 及 miR-339-3p 表达水平均得以显著提高。且 miR-339-5p 增高的倍数明显高于 miR-339-3p。

此外, miR-339-5p/3p 对结肠癌细胞迁移能力的影响进行了初步验证。在体外细胞划痕致伤愈合实验中发现: 与 SW620/PLVTHM-NC 组相比, SW620/pLVTHM-pre-miR-339 组的细胞迁移运动愈合能力减弱。表明 SW620/PLVTHM-pre-miR-339 组中的剪切成熟产物 miR-339-5p/3p 可抑制结肠癌细胞 SW620 的迁移运动能力。

### 参考文献

- [1] Pizzini S, Bisognin A, Mandruzzato S et al. Impact of microRNAs on networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development of metastasis [J]. *BMC Genomics* 2013, 14:589.
- [2] Lages E, Ipas H, Guttin A, et al. MicroRNAs: molecular features and role in cancer [J]. *Front Biosci*, 2012, 17 (6):2508-40.
- [3] Farazi T A, Spitzer J I, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer [J]. *J Pathol* 2011, 223(2):102-15.
- [4] Chang K H, Miller N, Kheirleisid E A, et al. MicroRNA-21 and PDCD4 expression in colorectal cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2011, 37(7):597-603.
- [5] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(39):15472-7.
- [6] Yang L, Belaguli N, Berger D H. MicroRNA and colorectal cancer [J]. *World J Surg* 2009, 33(4):638-46.
- [7] Bruchova H, Yoon D, Agarwal A M, et al. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis [J]. *Exp Hematol* 2007, 35(11):1657-67.
- [8] Wu Z S, Wu Q, Wang C Q, et al. MiR-339-5p inhibits breast cancer cell migration and invasion *in vitro* and may be a potential biomarker for breast cancer prognosis [J]. *BMC Cancer* 2010, 10:542.
- [9] Ueda R, Kohanbash G, Sasaki K, et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(26):10746-51.
- [10] Cockrell A S, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36(3):184-204.
- [11] 王彦梅, 何家才, 邹多宏, 等. 突变型 HIF-1 $\alpha$  慢病毒载体的构建及其在常氧条件下的抗降解作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(10):1147-51.

## Construction of human microRNA-339 lentivirus vector and its effect on migration of SW620 colon cancer cells

Zhou Chang<sup>1,2</sup>, Chen Fang<sup>2</sup>, Lu Yanxia<sup>2</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Anatomy and Histology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006;

<sup>2</sup>Dept of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University;

Key Laboratory of Molecule Tumor Pathology in Guangdong Province, Guangzhou 510515)

**Abstract Objective** To provide an effective tool for miR-339-5p/3p effect on migration of SW620 colon cancer,

# N-乙酰半胱氨酸对吸烟导致小鼠肺气肿及 IL-12 水平的影响

胡代菊 郭欣 梅晓冬

**摘要** 目的 观察 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对烟草烟雾暴露导致的小鼠肺气肿及白介素-12(IL-12)水平的影响。方法 健康雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,按随机数字表法分为正常对照组、烟雾暴露组和 NAC 组。烟雾暴露组和 NAC 组小鼠给予香烟烟雾吸入共 20 周。NAC 组小鼠在烟雾暴露 16 周时,予以加用 NAC 腹腔内注射给药 4 周后处死小鼠,留取肺组织、血液和肺泡灌液(BALF)。使用 HE 染色法观察小鼠肺组织病理形态改变,计算单位面积内的平均肺泡内衬间隔以及肺泡数;使用酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠 BALF 和血清中 IL-12 的浓度水平。结果 与正常对照组相比,烟雾暴露组小鼠肺组织内炎症细胞浸润及肺气肿样变化明显,肺泡内衬间隔增加,肺泡数减少。同时,血清及 BALF 内 IL-12 水平较正常对照组明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );NAC 组小鼠肺组织病理变化与烟雾暴露组相比明显减轻,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );血清和 BALF 内 IL-12

水平较烟雾暴露组显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 NAC 能明显抑制烟雾暴露导致的肺气肿,降低炎症因子 IL-12 水平,提示 NAC 对烟雾暴露导致的小鼠肺部炎症反应及肺气肿可能有减轻作用。

**关键词** 烟雾;肺气肿;慢性阻塞性肺病;白介素-12;N-乙酰半胱氨酸

中图分类号 R 563.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1578-04

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以不完全可逆气流受限为主要特征的慢性气道炎症性疾病。其主要病理变化为气道慢性炎症反应和肺气肿,其发生与肺组织对有害颗粒或气体的炎症反应有关<sup>[1]</sup>。各种原因导致的肺部损伤最终均与氧化应激、气道炎症反应和肺泡细胞凋亡以及免疫调节之间的相互作用密切相关<sup>[2]</sup>。吸烟是导致 COPD 发生和发展的主要因素,占 COPD 病例发病原因的 80% 左右,吸烟除导致气道慢性炎症外,其导致的氧化应激异常也是吸烟导致 COPD 的又一重要机制。该研究通过烟熏法建立肺气肿模型,模拟 COPD 慢性炎症反应及肺气肿病

2014-07-14 接收

基金项目:安徽省科技厅计划项目(编号:1308085MH115)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院呼吸内科,合肥 230001

作者简介:胡代菊,女,硕士研究生;

梅晓冬,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:hfmxd@sina.com

the microRNA-339 lentiviral expression vector (has-miR-339) was constructed. **Methods** MiR-339 precursor sequence (pre-miR-339) and flanking sequence were obtained by the miRBase database. The DNA encoding pre-miR-339 was digested with double connective enzyme and ligated to pLVTHM. The constructs were confirmed by direct DNA sequencing. Lentivirus was generated by co transfection with the above construct with packaging plasmids psPAX2 and pMD2. G into HEK293FT. A stable SW620 subline overexpressing with pre-miR-339 was selected by flow cytometry. Confirmation of stable transfection of the plasmids was obtained using the Real-time RT-PCR assay. The migration of SW620 cells was measured with scratch assay. **Results** Through double enzyme digestion and DNA sequencing, the lentiviral expression vector containing pre-miR-339 was successfully constructed. And fluorescence microscope observation showed that the 293FT packaging cells and SW620 cells expressed green fluorescence. The migration results showed that compared with the control group (SW620/PLVTHM-NC), experimental group (SW620/PLVTHM-pre-miR-339) cell migrated more slowly, scratch distance was wider. **Conclusion** The lentiviral vector containing pre-miR-339 and a stable SW620 subline with miR-339-5p and miR-339-3p overexpression are successfully constructed. And the results confirm that miR-339-5p/3p can inhibit the migration of SW620 colon cancer cells.

**Key words** miR-339; colorectal cancer; lentiviral expression vector; migration