

miR-19b 对 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响

曹 静,贾振亚,范文洁,徐 玥,范璐璐,孙国平

摘要 目的 研究 miR-19b 对 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响。方法 根据前期 miRNA 芯片结果提示丹皮酚处理后人肝癌 HepG2 细胞的 miR-19b 表达增加,采用 qRT-PCR 验证丹皮酚处理 HepG2 细胞的 miR-19b 表达改变;将 hsa-miR-19b mimics 瞬时转染 HepG2 细胞,采用 qRT-PCR 验证转染效率,MTT 比色法检测转染后细胞体外增殖抑制率,TUNEL 染色和流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 qRT-PCR 验证 62.5 mg/L 丹皮酚处理人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后 miR-19b 差异表达明显。过表达 miR-19b 可以抑制 HepG2 细胞增殖和促进其凋亡。结论 丹皮酚作用可以引起肝癌细胞 miR-19b 表达出现差异性表现。过表达 miR-19b 可能是丹皮酚抑制 HepG2 细胞增殖和促进凋亡作用的部分机制。

关键词 肝癌;HepG2;丹皮酚;miR-19b;细胞凋亡

中图分类号 R 282.71;R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1222-05

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是真核生物中广泛存在的一类约含有 22 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA,功能是在转录后水平调控基因的表达。异常表达的 miRNAs 与肿瘤的增殖、分化、凋亡和转移有着密切的联系。近年研究^[1]提示 miRNAs 广泛参与到中药抗肿瘤的作用过程中,从 miRNAs 水平探讨中药的抗癌机制为肿瘤临床治疗提供了新的依据和研究思路。丹皮酚是药理活性广泛、高效、低毒的中药,已被证实对肝癌、肺癌等多种肿瘤细胞株有增殖抑制作用,其抗肿瘤机制也成为研究热点^[2-3]。目前丹皮酚的作用机制与 miRNAs 的关系尚未见报道。该课题组前期芯片结果提示丹皮酚作用人肝癌 HepG2 细胞后 miR-19b 表达上调,为此,该研究通过验证 miR-19b 的表达差异并探讨其对肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响,以进一步探讨丹皮酚的抗肿瘤机制,为肝癌的临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2014-02-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272739、81071986)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤科,合肥 230022

作者简介:曹 静,女,硕士研究生;

孙国平,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:sunguoping@ahmu.edu.cn

1.1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞库,本课题组冻存。

1.1.2 药品及试剂 丹皮酚注射液购自上海第一制药厂(规格 10 mg/2 ml,批号 990402);四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;胰蛋白酶购自江苏碧云天生物技术研究;PI 试剂盒购自美国 BD 公司;TUNEL 染色试剂盒购自德国 Roche 公司;LipofectamineTM 2000、TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;hsa-miR-19b mimics (5'-UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA-3')、阴性对照 (5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3')、Hairpin-itTM miRNAs RT-PCR Quantitation Kit 及 U6 snRNA Real-time RT-PCR Normalization Kit 均购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 Nacpo-6100 CO₂ 培养箱(美国杜邦公司产品);YJ-4450 型医学净化工作台(苏州净化设备公司);IX-70 荧光倒置式显微镜(日本 Olympus 光学工业株式会社产品);EL301 Strip reader 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);EPICS XL-MLC 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);GL-20A 全自动高速冷冻离心机(湖南仪器仪表厂离心机厂);荧光定量 PCR 仪(Thermo PIKOREAL 96)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞 HepG2 培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养,常规消化、传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 药物处理及总 RNA 提取 取对数生长期 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,实验组加入 62.5 mg/L 丹皮酚,同时设置空白对照组。24 h 后收集细胞,经冰 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 1 ml TRIzol 试剂吹打混匀,静置 5 min 后转移至经 DEPC 水处理的无 RNA 酶 EP 管中,收集总 RNA,具体步骤按照说明书操作。所得总 RNA 用紫外分光光度仪测纯度及浓度,取 A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.8 ~ 2.0 总 RNA,分装于 -80℃ 冰箱保存。

1.2.3 qRT-PCR 检测 miR-19b 表达量 按照上海吉玛公司的试剂盒说明书合成第一链 cDNA。将 1

$\mu\text{mol/L}$ MiR-RT primers 和 $1 \mu\text{mol/L}$ U6 RT primers 各 $1.2 \mu\text{l}$ 、 $2 \mu\text{l}$ 总 RNA、 $4 \mu\text{l}$ $5 \times \text{MMLV RT Buffer}$ 、 $0.75 \mu\text{l}$ dNTP、 $0.2 \mu\text{l}$ MMLV RT、补 DEPC 水配成 $20 \mu\text{l}$ 反应体系,反应条件: 25°C 30 min 、 42°C 30 min 、 85°C 5 min 、 4°C 保存。以 cDNA 为模板,利用 miR-19b 特异性引物和染料分子 SYBRGreenI 进行 PCR 扩增,每个反应孔设 3 个复孔。序列均有上海吉玛公司合成,PCR 反应条件为: 95°C 预变性 3 min ; 95°C 12 s 、 62°C 40 s ,共 40 个循环。检测设在 62°C 此步。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miR-19b}} - \text{Ct}_{\text{U6}}$;比较 miR-19b 在丹皮酚作用前后的表达差异时,按 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{miR-19b丹皮酚组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{miR-19b空白对照组}}$ 计算。

1.2.4 细胞转染 依据 Lipofectamine™ 2000 使用指南进行,取对数生长期的 HepG2 细胞以 2×10^5 个/孔密度铺于 6 孔板内,培养至细胞达 30% ~ 50% 融合度时进行细胞转染。转染分组为:空白对照组、转染 miR-19b mimics 组、阴性转染组。按推荐浓度将 100 pmol FAM 标记的 hsa-miR-19b mimics 或其对应的阴性对照分别加入 $250 \mu\text{l}$ Opti-MEM 轻轻混合。Lipofectamine 2000 $5 \mu\text{l}$ 与 $250 \mu\text{l}$ Opti-MEM 混合并在室温下孵育 5 min 。将上述稀释液均匀混合,在室温下孵育 20 min ,以形成转染复合物。向每个实验组孔内加入转染复合物并补齐无血清 DMEM 至终体积为 2 ml ,同时空白对照组内加入无血清 DMEM 2 ml 。转染后 $6 \sim 8 \text{ h}$ 更换含 10% 胎牛血清的完全培养基 2 ml ,置 37°C 常规培养待检测。

1.2.5 转染效率检测 按上述步骤,完成 miR-19b mimics 组及阴性转染组转染并换液后,于 Olympus 倒置显微镜下观察荧光,定性观察转染效率。细胞继续培养至转染后 48 h ,用 TRIzol 提取总 RNA,方法同 1.2.3,用 qRT-PCR 定量检测转染后细胞中 miR-19b 量的表达变化;数据同样采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析,按 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{miR-19b mimics组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{阴性转染组}}$ 计算。

1.2.6 MTT 法检测细胞体外增殖抑制实验 取对数生长期的 HepG2 细胞,以 5.0×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中,培养 24 h 待细胞贴壁后,按上述实验分组进行转染,每组设置 5 个复孔。分别于转染后 24 、 48 、 72 h 行 MTT 检测。实验终止前 4 h 加入 MTT 溶液 $10 \mu\text{l}$ /孔,继续培养 4 h 后,弃去培养液,加入 DMSO $150 \mu\text{l}$ /孔,在酶标仪波长 490 nm 处检测各孔的吸光度值 (absorbance, A)。实验重复 3 次,并根据 A 值计算细胞体外增殖抑制率。增殖抑制率 (%) = $1 - (\text{转染组平均 A 值} / \text{空白组平均 A$

值) $\times 100\%$ 。

1.2.7 末端双脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口标记技术 (TUNEL) 检测细胞凋亡 将细胞接种于 6 孔板中(含多聚赖氨酸处理过的盖玻片),待细胞贴壁后,分为空白对照组和转染 miR-19b mimics 组,转染 48 h 后取出细胞爬片。 4% 多聚甲醛固定 25 min 后,按 TUNEL 染色说明书操作,DAB 显色,对比染色,脱水透明后封片观察。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的 HepG2 细胞,以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板内,隔日待细胞贴壁后,按上述操作过程及分组进行细胞转染。分别于转染后 24 h 和 48 h ,收集空白对照组、转染 miR-19b mimics 及阴性转染组的肝癌细胞到试管中, 2000 r/min 离心 10 min ,弃上清液,用 PBS 漂洗 2 遍,按 BD 公司 PI 染料说明书操作,细胞收集于 $70\% \sim 80\%$ 冰乙醇内, -20°C 冰箱固定 2 h 以上,收集细胞 2000 r/min 离心 10 min ,PBS 漂洗后加入 PI 染料 $150 \mu\text{l}$ /孔,室温避光孵育 30 min ,过 400 目网筛后上机检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,上述实验均重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。图表在 GraphPad Prism 5.0 中生成。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测丹皮酚作用后 miR-19b 表达量变化 经 62.5 mg/L 丹皮酚作用 24 h 组中 miR-19b 的相对表达量是未处理的人肝癌 HepG2 细胞空白对照组的 (2.086 ± 0.108) 倍,显著高于空白对照组细胞中的表达量 ($P < 0.05$),见图 1A。

2.2 瞬时转染效率观察

2.2.1 荧光显微镜观察转染效率 按推荐浓度向 6 孔板内转染 FAM 标记的 100 pmol hsa-miRNA19b mimics,转染后 6 h 换含血清的正常培养基,于 Olympus 荧光倒置显微镜下放大 200 倍观察转染效率:明场下观察到明显的 FAM 绿色荧光,对比细胞场和荧光场观察转染效率达 90% 以上,见图 2。

2.2.2 转染后 miR-19b 表达量变化 阴性转染组与 miR-19b mimics 组相比,人肝癌 HepG2 细胞转染 miR-19b mimics 作用 48 h 后 qRT-PCR 结果提示:转染 miR-19b mimics 组细胞内 miR-19b 的表达量提高了 (137.239 ± 16.923) 倍,显著高于转染阴性对照片段组 ($P < 0.01$),见图 1B,表明瞬时转染人工合成的 miR-19b mimics 成功构建了过表达 miR-19b 的

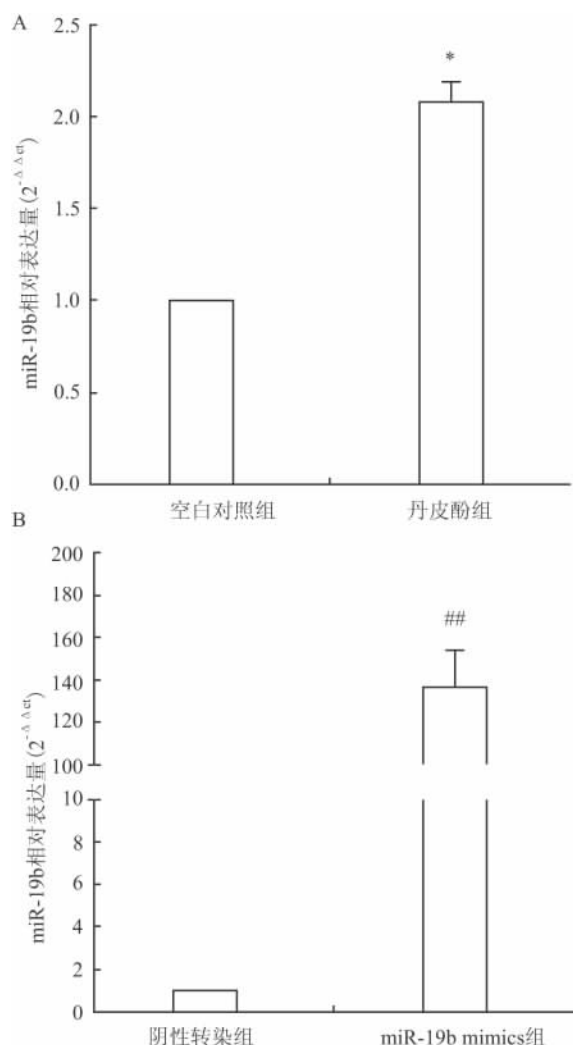


图1 qRT-PCR 检测 miR-19b 相对表达量差异 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析)

A: 丹皮酚作用前后 miR-19b 表达; B: 转染 miR-19b mimics 前后 miR-19b 表达; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性转染组比较: ## $P < 0.01$

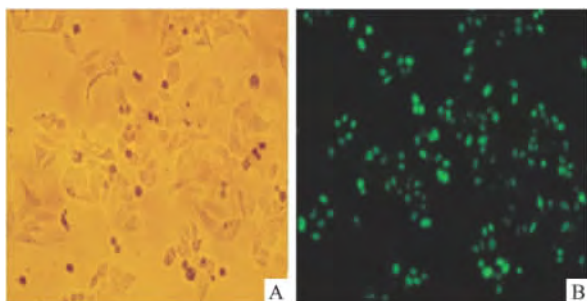


图2 荧光显微镜下观察转染 FAM 标记的 miR-19b mimics 的 HepG2 细胞 ×200

A: 普通光源; B: 荧光场

HepG2 细胞。

2.3 过表达 miR-19b 对 HepG2 细胞体外增殖影响 采用 MTT 法对空白对照组、转染 miR-19b mim-

ics 组和阴性转染组 HepG2 细胞分别于 24、48、72 h 测定 A 值, 见表 1。以 y 代表细胞抑制率, x 为检测时间, 绘制细胞抑制率图。转染 miR-19b mimics 组, 24 h 细胞增殖即表现出明显抑制, 随作用时间增加, 细胞增殖抑制作用更加明显。转染后 24、48、72 h 各组细胞 A 值差异均有统计学意义。(24 h $F = 7.161$ 、48 h $F = 8.709$ 和 72 h $F = 31.752$, $P < 0.05$)。其中空白对照组与阴性转染组 A 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 miR-19b mimics 组与空白对照组、miR-19b mimics 组与阴性转染组的 A 值比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

表1 转染 miR-19b mimics 对 HepG2 细胞株的增殖抑制作用 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

转染分组 (5 pmol/孔)	各时间点 A 值		
	24 h	48 h	72 h
空白对照	0.67 ± 0.02	1.12 ± 0.10	1.37 ± 0.02
miR-19b mimics	0.59 ± 0.02 **	0.94 ± 0.06 *	1.11 ± 0.02 **
阴性转染	0.66 ± 0.05	1.10 ± 0.05	1.36 ± 0.10

与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

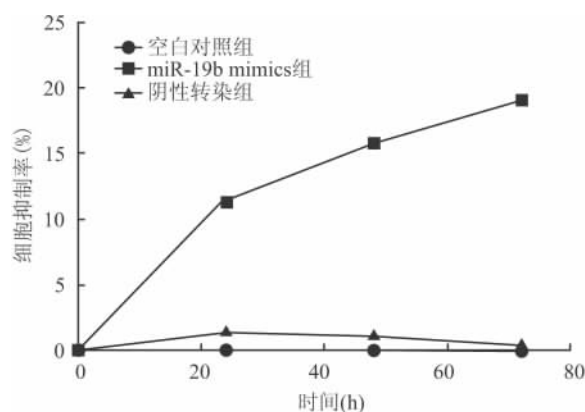


图3 转染 miR-19b mimics 对 HepG2 细胞株的增殖抑制作用

2.4 TUNEL 染色检测转染 miR-19b mimics 组人肝癌 HepG2 细胞的凋亡 TUNEL 染色可以标记含有断裂 DNA 的凋亡细胞, TUNEL 染色阳性的凋亡细胞内出现不同程度的棕褐色颗粒或斑片。TUNEL 染色结果显示: 空白对照组细胞见少许凋亡细胞; 过表达 miR-19b 组出现典型的凋亡细胞, 表现为染色质凝集、边集化, 呈新月形聚集于核膜下, 见图 4。

2.5 过表达 miR-19b 对 HepG2 细胞的凋亡诱导作用 在 DNA 图谱 G0/G1 期前出现的亚 G1 峰代表着凋亡细胞。流式细胞术分析表明转染 miR-19b mimics 组与空白对照组及阴性转染组相比, 在

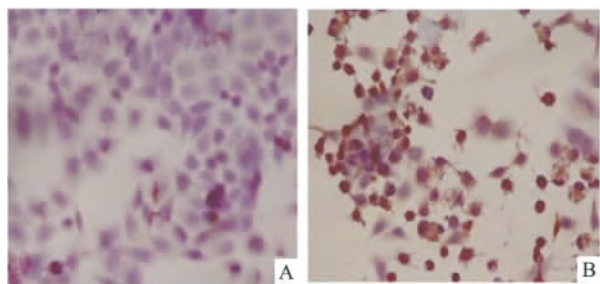


图4 HepG2 细胞的凋亡形态学变化 DAB ×400
A: 空白对照组; B: miR-19b mimics 组

作用 24 h 和 48 h 后均可见明显的亚 G1 峰, 即凋亡峰, 且随着转染时间的延长, 其凋亡率有所升高。转染 miR-19b mimics 组细胞处于亚 G1 期的比例在 24 h 和 48 h 分别为 $(10.18 \pm 0.34)\%$ 和 $(16.11 \pm 1.01)\%$, 而空白对照组为 $(2.03 \pm 0.14)\%$ 和 $(3.33 \pm 0.38)\%$, 阴性转染组为 $(2.57 \pm 0.49)\%$ 和 $(3.73 \pm 0.59)\%$, 3 组差异有统计学意义 (24 h $F = 488.33$, 48 h $F = 315.18$, $P < 0.01$)。与空白对照组和阴性转染组比较, miR-19b mimics 组处于亚 G1 期即凋亡期的细胞比例相对较高 (24 h 与 48 h $P < 0.01$), 而空白对照组和阴性转染组的差异无统计学意义, 见图 5。

3 讨论

本课题组利用 62.5 mg/L 丹皮酚处理肝癌

HepG2 细胞 24 h, 采用 miRNAs 微阵列芯片杂交检测分析显示, 与空白对照组比较, 丹皮酚组 miRNAs 表达谱的差异, 以上调或者下调 2 倍作为筛选标准, 发现其中 miR-19b 差异表达明显。qRT-PCR 检测显示 miR-19b 的表达量在丹皮酚作用后明显增高。由此推测, miR-19b 在人肝癌 HepG2 细胞经丹皮酚处理后的表达上调可能对肝癌增殖是一种负调控因子。

为探究 miR-19b 在人肝癌 HepG2 细胞的增殖和凋亡中的具体作用, 将人工合成的 hsa-miR-19b mimics 瞬时转入 HepG2 细胞中, 荧光显微镜观察及 qRT-PCR 检测均提示成功构建过表达 miR-19b 的 HepG2 细胞模型。用 MTT 比色法显示过表达 miR-19b 的 HepG 细胞在转染后 24、48、72 h 体外增殖均表现出被抑制的效应, 且随着作用时间延长抑制作用更明显。TUNEL 染色显示过表达 miR-19b 组出现典型的凋亡细胞形态。流式细胞术 PI 单染法结果显示, 转染 miR-19b mimics 组表现出明显的代表凋亡的亚 G1 峰, 与阴性转染组和空白对照组比较, 差异有统计学意义。以上结果均提示 miR-19b 在人肝癌体外细胞水平实验中可能行使着抑癌作用。

miR-19b 是 miRNA-17-92 家族中的重要成员, 该家族包括 6 种成熟的 miRNA, 包括 miR-17、miR-20a、miR-18a、miR-19a、miR-19b-1 和 miR-92-1, 根据种子序列的不同, 可再分为 miR-17 家族、miR-18 家

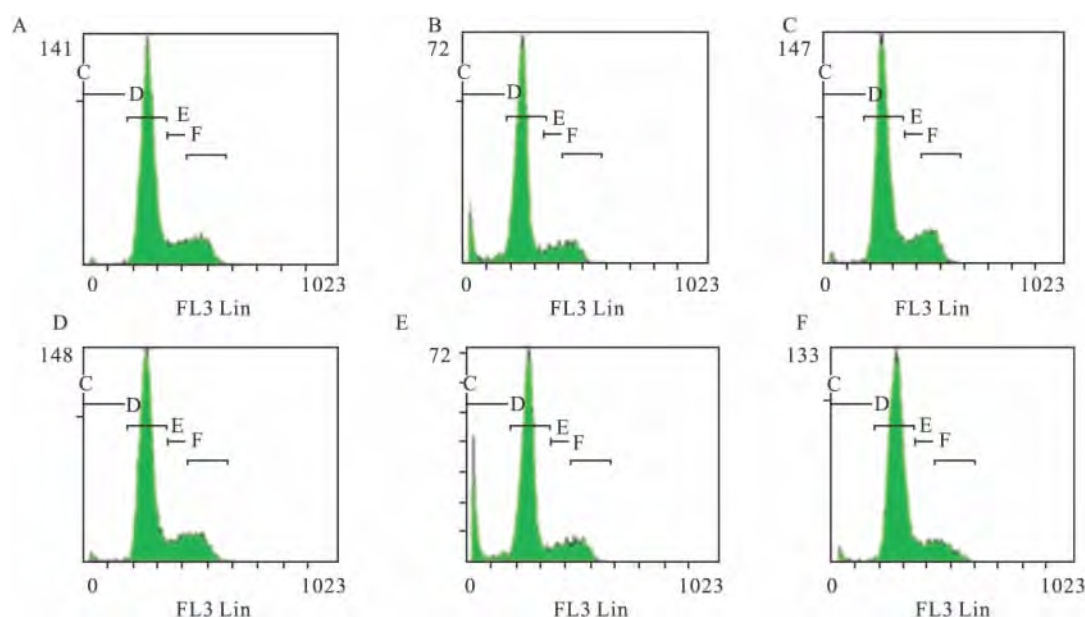


图5 流式细胞仪分析 HepG2 细胞凋亡

A: 24 h 空白对照组; B: 24 h miR-19b mimics 组; C: 24 h 阴性转染组; D: 48 h 空白对照组; E: 48 h miR-19b mimics 组; F: 48 h 阴性转染组

族、miR-19 家族及 miR-92 家族,在肿瘤细胞中发挥着复杂的调控作用^[4]。现有研究^[5-6]报道 miR-19b 在前列腺癌、宫颈癌等多种肿瘤中表现出促癌的作用。与之相反,肝癌细胞的研究^[7]显示,miR-19 可能部分通过调节 CREB3L4、PDE4A、JAM2、RUNX2 等的表达来抑制肝癌细胞的增殖和侵袭转移;在人成淋巴细胞 TK6 经放射治疗前后对比 miRNAs 表达谱显示经照射治疗后细胞 miR-19b 表达量较照射旁细胞明显上调^[8]。因此,miR-19b 的作用在不同肿瘤株中存在争议,发生这种矛盾的原因可能与 miRNA 靶向调控 mRNA 机制的复杂性相关。一条 miRNA 可能调控至少 200 条 mRNA 的表达,同时一个 mRNA 也包含着不止一个 miRNA 的调控结合位点;且在不同的肿瘤细胞株中其调控作用亦不尽相同。

关于过表达 miR-19b 在肝癌细胞中作用的具体机制尚未见报道。查询靶基因预测软件 TargetScan Human,miR-19b 的靶基因库中 PTEN 为其调节基因之一,其在体外影响前列腺癌细胞中 PTEN 表达和调节 PI3K/Akt 信号通路已有报道^[5]。另外,在炎症反应中的研究^[9]提示 miR-19b 可能影响 NF- κ B 信号通路。这些成果为探究 miR-19b 的作用机制提供了线索。但在肝癌细胞中是否通过以上通路调节尚需要进一步通过荧光素酶报告试验及 Western blot 分别从基因和蛋白水平进行验证。丹皮酚处理后的 miR-19b 表达差异是否与丹皮酚剂量呈正相关尚有

待深入研究,并可能为丹皮酚进入肝癌的临床治疗进一步提供理论支持。

参考文献

- [1] 吴唐维,宁勇,陈卫群.微 RNA 参与中药抗肿瘤作用的研究进展[J].重庆医学,2013,42(13):1536-8.
- [2] 彭万仁,付卫争,孙国平,等.丹皮酚对人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡和 COX-2、Survivin、XIAP、c-IAP1 表达的影响[J].中国药理学通报,2010,26(6):735-9.
- [3] 雷宇,金问森,陈先平,等.丹皮酚对人肺腺癌 A549 细胞放射增敏作用机制的研究[J].中华放射医学与防护杂志,2012,32(2):166-9.
- [4] Olive V, Jiang I, He L. Mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1348-54.
- [5] Tian L, Fang Y X, Xue J L, et al. Four microRNAs promote prostate cell proliferation with regulation of PTEN and its downstream signals in vitro[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75885.
- [6] Xu X M, Wang X B, Chen M M, et al. MicroRNA-19a and -19b regulate cervical carcinoma cell proliferation and invasion by targeting CUL5[J]. Cancer Lett, 2012, 322(2):148-58.
- [7] 朱俊杰,匡玉庭. MicroRNA-19 对肝癌细胞系迁移与侵袭能力的影响[J].中国血液流变学杂志,2010,20(3):376-9.
- [8] Chaudhry M A, Omaruddin R A. Differential regulation of microRNA expression in irradiated and bystander cells[J]. Mol Biol, 2012, 46(4):634-43.
- [9] Gantier M P, Stunden H J, McCoy C E, et al. A miR-19 regulon that controls NF- κ B signaling[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(16):8048-58.

miR-19b's effect on cell proliferation and apoptosis of HepG2

Cao Jing, Jia Zhenya, Fan Wenjie et al

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate miR-19b's effects on the cell proliferation and apoptosis of HepG2 cell lines.

Methods According to our previous research results of miRNA's chip, the expression of miR-19b in human liver cancer HepG2 cells was increased after paeonol treatment. MiR-19b's expression was detected by quantitative Real-time PCR. After transient transfection of hsa-miR-19b mimics into HepG2 cells, the proliferation of HepG2 cells was evaluated using MTT and the cell apoptosis rate of each group was assayed by TUNEL and flow cytometry. **Results** The results of qRT-PCR confirmed that miR-19b's expression was up-regulated evidently after HepG2 cells were disposed with 62.5 mg/L paeonol for 24 h. Over-expression of miR-19b could inhibit the cell proliferation and promote apoptosis of HepG2 cells. **Conclusion** Paeonol can lead to changes of miR-19b's expression in liver cancer cells. Over-expression of miR-19b may partly contribute to paeonol's effect on inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis in HepG2.

Key words liver cancer; HepG2; paeonol; miR-19b; apoptosis