

# miR-29b 对肝癌细胞中甲基化转移酶表达的调控作用

吕赛群<sup>1</sup>, 金华君<sup>2</sup>, 钱其军<sup>1,2</sup>

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

**摘 要:** DNA 甲基化异常在肿瘤发生中起着极为重要的作用,而基因组 DNA 的甲基化主要通过 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)来完成。microRNA 和甲基化转移酶的表达具有一定的联系。构建携带有 miR-29b 的腺病毒载体并包装病毒,鉴定正确后,将病毒感染肝癌细胞 PLC,用 qRT-PCR 的方法检测 miR-29b 在 PLC 细胞中对甲基化转移酶表达的调控作用。结果表明,成功构建携带有 miR-29b 的腺病毒,qRT-PCR 方法检测表明 miR-29b 能有效地调控甲基化转移酶的表达。

**关键词:** miR-29b; 甲基化转移酶; DNMT3A; DNMT3B

**中图分类号:** Q789      **文献标识码:** A

## 0 引 言

研究认为 DNA 甲基化与肿瘤密切相关。DNA 甲基化可通过影响癌基因的表达以及基因组的稳定性而参与肿瘤形成。肿瘤的 DNA 甲基化改变表现为总体的甲基化水平降低与启动子区 CpG 岛的甲基化水平升高<sup>[1]</sup>。而基因组 DNA 的甲基化主要通过 DNA 甲基化转移酶 DNMTs 来完成<sup>[2]</sup>。肿瘤细胞中 DNA 甲基化状态的改变不仅仅涉及了 DNMTs 在细胞内的催化作用,同时 DNMTs 本身作为一种作用因子和其他活性蛋白的相互作用同样对肿瘤细胞的 DNA 甲基化状态产生影响,研究显示在很多肿瘤细胞中 DNMTs 异常高表达<sup>[3]</sup>,所以,关于 DNMTs 在肿瘤细胞中的表达水平以及它和其他蛋白协同作用的研究同样受到重视。DNMT3A、DNMT3B 为从头甲基转移酶,它们可甲基化 CpG,使其半甲基化,继而全甲基化。从头甲基转移酶可能参与细胞生长分化调控,在肿瘤基因甲基化中起重要作用。

microRNA 是生物体内源,长度约为 19~25 个核苷酸的非编码小 RNA,它通过与靶基因 mRNA 上的靶序列互补配对结合,在转录后水平上对基因的表达进行负调控,导致 mRNA 的降解或翻译抑制<sup>[4]</sup>。miRNA 在多种癌组织中表达异常下调,其异常下调与肿瘤发生发展过程关系密切。据文献报道,miR-29b 在肺癌细胞中表达下调,并能与 DNMT3A、DNMT3B 基因 mRNA 的 3'UTR 结合,对这两个基因的表达起调控作用<sup>[5]</sup>。

本研究构建了携带 miR-29b 的腺病毒载体,并在 293 细胞中与 Ad5/11 嵌合型腺病毒骨架质粒 pPE3-F11B-RC(+)进行重组得到腺病毒 Ad5/11-miR-29b,研究该腺病毒在肝癌细胞 PLC 中对 DNMT3A 和 DNMT3B 基因的调控作用。qRT-PCR 检测结果发现,感染了腺病毒 Ad5/11-miR-29b 后,miR-29b 的表达明显增高,且相对于对照而言, DNMT3A 和 DNMT3B 基因的表达则相对下降,表明 miR-29b 在肝癌细胞中对于 DNMT3A 和 DNMT3B 基因的表达能起到负调控作用,从而为进一步的研究肿瘤的发生发展打下了基础。

收稿日期: 2010-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(30730104)

作者简介: 吕赛群(1985-),女,浙江嵊州人,硕士研究生,从事肿瘤干细胞以及靶向基因一病毒治疗研究。

通讯作者: 钱其军,电子邮箱: qianqj@sino-gene.com

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料及试剂

Ad5/11 嵌合型腺病毒骨架质粒 pPE3-F11B-RC(+)由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室构建。pDC311-SiRNA 质粒购自 Macromix 公司。实验室用限制性内切酶与连接酶均购自 NEB 公司。胶回收试剂盒购自 MN 公司。Lipofectamine2000 试剂盒和 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒均购自 Qiagen 公司。人肝癌细胞株 PLC 均由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室保存。细胞用培养基均购自 Gibco 公司。RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒及 qRT-PCR 试剂盒均购自 Qiagen 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 质粒 pDC311-miR-29b 的构建及鉴定

据引物设计原则,采用 Oligo6.0 软件设计一对引物,并在上、下游引物中分别引入 *Xho* I 和 *Spe* I 酶切位点,引物序列如下:

引物 1:5'-CCGCTCGAGGAACCTTTGTCTGGGCAACTT-3';

引物 2:5'-GACTAGTCCACATGCAATTCAGGTCAGT-3';

以人基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增 pre-miR-29b 片段,扩增产物经 *Xho* I 和 *Spe* I 酶切,DNA 回收试剂盒回收后,将回收产物与经相同酶切回收的 pDC311-SiRNA 载体片段 16℃过夜连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株,挑取阳性克隆扩增后提取质粒,通过酶切鉴定重组质粒。鉴定正确的 pDC311-miR-29b 由上海英骏公司测序,确定目的片段序列及读码框的正确性。

#### 1.2.2 重组腺病毒的包装及鉴定

利用 Lipofectamine2000 试剂盒,将质粒 pDC311-miR-29b 和 Ad5/11 嵌合型腺病毒骨架质粒 pPE3-F11B-RC(+)共转染至 293 细胞包装非增殖型病毒 Ad5/11-miR-29b。共转染后 9~14d 出现病毒空斑,经 3 次病毒空斑纯化,得到非增殖型病毒 Ad5/11-miR-29b。参考 Qiagen 公司操作说明,应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取腺病毒 DNA。应用引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增,扩增产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳分析。将重组腺病毒在 293 细胞中反复打量扩增,通过氯化铯密度梯度离心法进行纯化,并用 TCID<sub>50</sub> 法测得重组腺病毒 Ad5/11-miR-29b 的滴度。

#### 1.2.3 细胞中 miR-29b 表达量分析

分别取以下对数生长期细胞:L02、A549、H460、H1299、HepG2、Hep3B、PLC、7721、7404。消化、重悬、稀释;细胞计数,铺 6 孔板,1×10<sup>6</sup>/孔,5% CO<sub>2</sub>,37℃孵育。等细胞长至对数期,每孔分别用 700  $\mu$ L Trizol 裂解液裂解细胞,应用 Qiagen 公司 RNA 抽提试剂盒抽提细胞总 RNA,并进行逆转录,以 L02 为对照细胞,U6 为内参,qRT-PCR 检测细胞中 miR-29b 的表达量。

U6 引物序列如下:

引物 3:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';

引物 4:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';

#### 1.2.4 miR-29b 对 DNMT3A 和 DNMT3B 基因的调控作用分析

取对数生长期细胞,消化、重悬、稀释;细胞计数,铺 6 孔板,5×10<sup>5</sup>/孔,每孔用 2 mL 培养液重悬,5% CO<sub>2</sub>,37℃孵育 24 h;换无血清培养液,按 MOI=5 加入 Ad5/11-miR-29b,十字法摇匀;轻摇,2 h 后换含 5%血清培养液;48 h 后弃上清,每孔分别用 700  $\mu$ L Trizol 裂解液裂解细胞,应用 Qiagen 公司 RNA 抽提试剂盒抽提细胞总 RNA,并进行逆转录,以 GAPDH 为内参,没有感染病毒的细胞作为对照,qRT-PCR 检测细胞中 DNMT3A 和 DNMT3B 基因的表达量变化。

## 2 实验结果

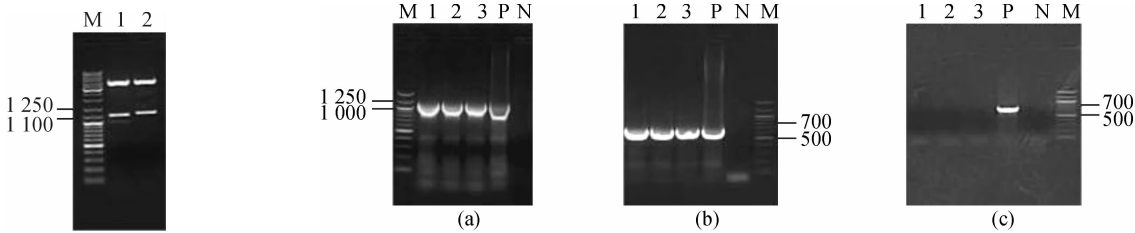
### 2.1 载体 pDC311-miR-29b 的酶切鉴定

载体 pDC311-miR-29b 构建好后,酶切进行鉴定,用 *Xho* I 和 *Spe* I 酶切得到 1 188 bp 和 3 918 bp 2 条带,用 *Xba* I 酶切得到 1 236 bp 和 3 870 bp 2 条带,切出的条带大小与理论值相符(图 1)。同时测序结果表

明目的片段序列正确,无移码突变。表明重组质粒 pDC311-miR-29b 构建成功,可用于下一步病毒包装。

2.2 重组腺病毒鉴定

应用特异性引物分别 PCR 扩增鉴定重组腺病毒基因、11 型 fiber 及野毒,扩增出的条带与理论相符(图 2),说明腺病毒包装成功。



M: DNA Mix Marker, 1. pDC311-miR-29b with *Xho* I & *Spe* I, 2. pDC311-miR-29b with *Xba* I M. 均为 DNA Mix Marker, 1~3. 均为病毒克隆, N 均为 Negative, a 图中 P 为 pDC311-miR-29b, b 图中 P 为 pPE3-F11B, c 图中 P 为 pXC1

图 1 重组载体 pDC311-miR-29b 的酶切鉴定

图 2 重组腺病毒鉴定

图 2(a)所示,重组腺病毒均能扩增出 1 188 bp 的目的条带,与阳性对照一致,说明重组腺病毒均含有 miR-29b 基因。

图 2(b)所示,重组腺病毒均能扩增出 731 bp 的目的条带,与阳性对照一致,说明重组腺病毒均含有 11 型 fiber。

图 2(c)所示,重组腺病毒均不能扩增出与阳性对照一致的 748 bp 的目的条带,说明重组腺病毒均未含有野毒。

挑取鉴定正确的克隆进行病毒大量扩增,并经氯化铯梯度离心方法纯化病毒,TCID<sub>50</sub> 法测得病毒滴度为  $1.78 \times 10^{10}$  pfu/mL。

2.3 细胞中 miR-29b 表达量分析

qRT-PCR 方法分析各细胞株中 miR-29b 的表达量,结果见图 3。

如图 3 所示,同对照细胞 L02 相比,大部分肿瘤细胞 miR-29b 的表达量降低,这同文献中报道的相似,肿瘤细胞中 microRNA 异常表达,可能和肿瘤的发生发展有关。

2.4 miR-29b 对 DNMT3A 和 DNMT3B 基因的调控作用分析

qRT-PCR 方法检测过量表达 miR-29b 的肿瘤细胞 PLC 中 DNMT3A 和 DNMT3B 基因的表达量变化,结果见图 4 和图 5。

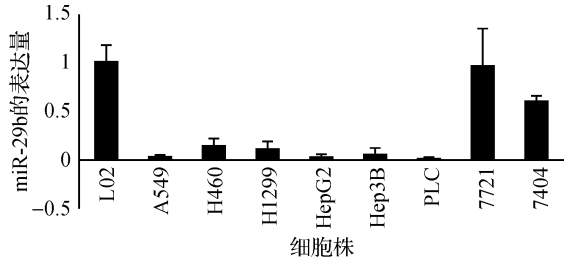


图 3 各个细胞中 miR-29b 表达量分析

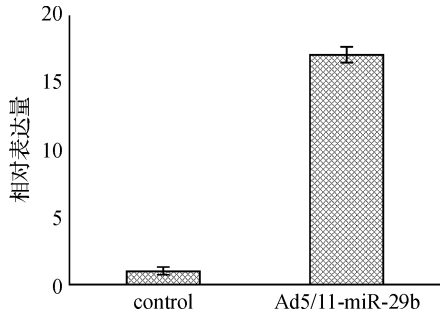


图 4 PLC 细胞中感染过 Ad5/11-miR-29b 后 miR-29b 表达量分析

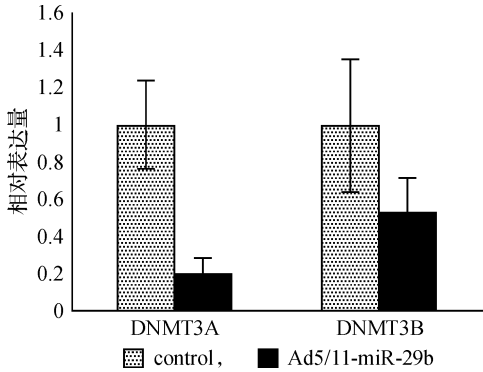


图 5 PLC 细胞中感染过 Ad5/11-miR-29b 后 DNMT3A 和 DNMT3B 表达量分析

图 4 所示,感染了重组腺病毒 Ad5/11-miR-29b 后,PLC 细胞中 miR-29b 的表达量增高了 17.036 倍,说明细胞中感染 Ad5/11-miR-29b 后达到了恢复提高 miR-29b 表达的效果。

图5所示,感染了重组腺病毒 Ad5/11-miR-29b 后,PLC 细胞中 DNMT3A 和 DNMT3B 的表达量均有明显下降,说明 miR-29b 在肝癌细胞中对 DNMT3A 和 DNMT3B 的表达起负调控的作用。

### 3 讨论

现代肿瘤理论认为,甲基化修饰是继基因结构变异即突变和缺失之后的第3种抑癌基因失活机制,其中一种可能的因素是 DNMTs 高表达和 DNMTs 复合体调控障碍<sup>[6-7]</sup>。大多数肿瘤细胞的 DNMTs 水平表达明显高于正常细胞,并与抑癌基因启动子高甲基化状态相关<sup>[8]</sup>。与基因突变引起的癌变不同,由于高度甲基化而导致的抑癌基因转录失活并不改变基因本身的序列,因此从理论上说,恢复基因的正常甲基化状态可以重新激活基因的功能,研究者通过转入反义的 DNMTs 片段来诱导肿瘤细胞凋亡,发现 DNMTs 反义基因有可能通过减低 DNMTs 活性使被高甲基化的调亡基因恢复活性<sup>[9]</sup>。其中 DNMT 抑制剂类物就是一类通过抑制 DNMTs 的活性、逆转基因的异常甲基化状态,从而达到抗癌效果的药物。这类抑制剂包括反义 RNA、小分子干涉 RNA(siRNA)以及化学抑制剂<sup>[10]</sup>。近年来研究十分热门的 microRNA 也被发现与 DNA 高度甲基化有密切的关系。研究者发现一些 microRNA 能与 DNMTs 基因 mRNA 的 3'UTR 结合,提示这些 microRNA 与 DNMTs 基因的表达存在联系,而这些 microRNA 往往在肿瘤细胞中异常低表达。

因此,本研究中通过定量分析了 miR-29b 在多个肿瘤细胞株中的表达量,结果表明 miR-29b 在肺癌细胞及肝癌细胞中表达均异常下调,与之前文献报道相似<sup>[5]</sup>。为此构建携带 miR-29b 的非增殖型腺病毒 Ad5/11-miR-29b,以恢复 miR-29b 在肝癌细胞株 PLC 的表达,并检测 miR-29b 表达量提高后,对细胞内源性 DNMT3A 和 DNMT3B 的影响。但由于 DNMT3A 和 DNMT3B 在细胞中表达量非常低,Western Blotting 未检测到这2个蛋白的表达。然而,通过 qRT-PCR 检测发现 PLC 细胞感染病毒 48 h 后,甲基化酶 DNMT3A 和 DNMT3B 表达量显著降低。可见肝癌细胞中 miR-29b 的表达量与 DNMT3A、DNMT3B 的表达量呈负相关,暗示 miR-29b 也可在转录水平负向调控 DNMT3A、DNMT3B 的表达。本研究结果表明利用 miR-29b 对 DNMT3A 和 DNMT3B 的负调控作用,阻断 DNMT3A 和 DNMT3B 对一些抑癌基因的异常甲基化,从而恢复抑癌基因在肿瘤细胞中的正常表达,并发挥治疗作用,是一种行之有效的肿瘤辅助治疗手段。

### 参考文献:

- [1] Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future[J]. *Oncogene*, 2002, 21(35): 5427-5440.
- [2] Robertson K D, Wolffe A P. DNA methylation in health and disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2000, 1(1): 11-19.
- [3] Xie S, Wang Z, Okanom, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family[J]. *Gene*, 1999, 236(1): 87-95.
- [4] Lai E C. MicroRNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation [J]. *Nat Genet*, 2002, 30(4): 363-364.
- [5] Muller Fabbri, Ramiro Garzon. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B[J]. *PNAS*, 2007, 104(5): 15805-15810.
- [6] Milutinovic S, Knox J D, Szyf M. DNA methyltransferase inhibition induces the transcription of the tumor suppressor p21 (WAF1/CIP1/sdi1)[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(9): 6353-6359.
- [7] Rhee I, Bachman K E, Park B H, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells[J]. *Nature*, 2002, 416: 552-556.
- [8] Fang J Y, Lu R, Mikovits J A, et al. Regulation of hMSH2 and hMLH1 expression in the human colon cancer cell line SW1116 by DNA methyltransferase 1[J]. *Cancer Lett*, 2006, 233(1): 124-130.
- [9] Luczak M W, Jagodzinski P P. The role of DNA methylation in cancer development[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44(1): 143-145.
- [10] Robert M F, Morin S, Beaulieu N, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells[J]. *Nature Genet*, 2003, 33(1): 61-65.

# Regulating the Expression of DNA Methyltransferase in Liver Cancer Cells by miR-29b

LÜ Sai-qun, JIN Hua-jun, QIAN Qi-jun

(1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**Abstract:** Abnormal DNA methylation plays an extremely important role in tumors. DNA methylation is completed through DNA methyltransferases (DNA methyltransferases, DNMTs). The miR-29 had a certain relationship with the expression of methylation transferase. In this study, an adenovirus vector carrying miR-29b is constructed and the virus is used to infect the liver cancer cell PLC. Then qRT-PCR is exploited to detect the relative quantity of miR-29b and methyltransferase in the infected PLC cells. The results show that the adenovirus carrying miR-29b can effectively elevate the cellular miR-29b and inhibit the expression of methyltransferases.

**Key words:** miR-29b; DNA methyltransferases; DNMT3A; DNMT3B

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 58 页)

# The Status and Conservation of She's Costume in Jingning

CHEN Jing-yu<sup>1,2</sup>

(1. School of Fashion, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;  
2. College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou 215000, China)

**Abstract:** With the research of field study of costume culture, the paper analyses the shape of traditional costume in Jingning She minority autonomous county in Zhejiang, describes the feature in dress and personal adornment. On the basis of the present situation of She's costume, this paper expounds on the main problems to She people, gives new view of solid-protection and live-inheritance.

**Key words:** She; costume culture; status; conservation

(责任编辑: 张祖尧)