

技术前沿

DOI: 10.11699/cyxb20131204

pri-mir-302/367 重组慢病毒载体的构建 及其下游调节基因的鉴定

张耀林¹, 马海滨², 陈冬梅², 范恒², 李玉奎²

(1. 宁夏医科大学检验学院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院宁夏人类干细胞研究所, 银川 750004)

【摘要】目的:构建可诱导表达 pri-mir-302/367 的慢病毒载体,并研究 miR-302/367 家族基因 miR-302a/b/c/d 和 miR-367 及其下游调节基因 OCT4, SOX2 和 NANOG 在 HeLa 细胞中的诱导性表达。**方法:**以正常人基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 pri-mir-302/367 基因。经双酶切后连接入 pLV-TRE 质粒,构建 pLV-TRE-302 慢病毒重组体,酶切及测序予以鉴定。将重组质粒和辅助质粒共同转染 293 FT 细胞,并测定病毒滴度。用病毒转染 HeLa 细胞,强力霉素(doxycycline, DOX)诱导后,通过 real-time PCR 测定 miR-302/367 家族基因及其下游调节基因的表达。实验分为诱导组(DOX+)、非诱导组(DOX-)和空白组(blank)。**结果:**酶切及测序证实重组慢病毒载体 pri-mir-302/367 构建成功,病毒滴度为 5×10^6 TU/ml;DOX 诱导 72 h 后,real-time PCR 结果显示诱导组高于非诱导组和空白组($P < 0.05$,其中 miR-302a: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.032$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.048$; miR-302b: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.001$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; miR-302c: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$; miR-302d: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.002$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.047$; miR-367: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.001$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; OCT4: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; SOX2: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$; NANOG: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$),而非诱导组与空白组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,其中 miR-302a: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.057$; miR-302b: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.832$; miR-302c: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.445$; miR-302d: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.979$; miR-367: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.161$; OCT4: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.051$; SOX2: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.060$; NANOG: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.078$)。**结论:**成功构建了携带人 miR-302/367 可控性慢病毒载体,为后续的重编程研究奠定了实验基础。

【关键词】pri-mir-302/367; Tet-on 系统; 可诱导性慢病毒载体; HeLa 细胞

【中国图书分类法分类号】R34

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-14

作者介绍:张耀林, Email: yaolinzhang@163.com,

研究方向:干细胞生物学。

通信作者:李玉奎, Email: yukuili@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81160098)。

expression dynamics[J]. Immunol Rev, 2012, 247(1): 120-132.

[6] Morita R, Schmitt N, Bentebibel S E, et al. Human blood CXCR5+ CD4+T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion[J]. Immunity, 2011, 34(1): 108-121.

[7] Kassiotis G, O'Garra A. Establishing the follicular helper identity[J]. Immunity, 2009, 31(3): 450-452.

[8] Patakas A, Platt A M, Butcher J P, et al. Putative existence of reciprocal dialogue between Tfh and B cells and its impact on infectious and autoimmune disease[J]. Immunol Lett, 2011, 138(1): 38-46.

[9] Simpson N, Gatenby P A, Wilson A, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular Helper T cell is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(1): 234-244.

[10] Ogehang A, McGuire H M, Yu D, et al. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells[J]. Immunity, 2008, 29(1): 127-137.

[11] Korthauer U, Graf D, Mages H W, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM

[J]. Nature, 1993, 361(6412): 539-541.

[12] Ma C S, Hare N J, Nichols K E, et al. Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+T cells[J]. J Clin Invest, 2005, 115(4): 1049-1059.

[13] de Leval L, Rickman D S, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells[J]. Blood, 2007, 109(11): 4952-4963.

[14] Oestreich K J, Mohn S E, Weinmann A S, et al. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile[J]. Nat Immunol, 2012, 13(4): 405-411.

[15] Pipkin M E, Sacks J A, Cruz-Guilloty F, et al. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells[J]. Immunity, 2010, 32(1): 79-90.

(责任编辑:冉明会)

Construction of pri-mir-302/367 lentiviral vector and verification of its downstream regulatory genes

ZHANG Yaolin¹, MA Haibin², CHEN Dongmei², FAN Heng², LI Yukui²

(1. Institute of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University; 2. Ningxia Human Stem Cell Institute, General Hospital, Ningxia Medical University)

[Abstract] **Objective:** To construct inducible lentiviral vector containing human miR-302/367 and study its gene expression of miR-302a/b/c/d and miR-367 and downstream gene expression of OCT4, SOX2 and NANOG in HeLa cells. **Methods:** pri-mir-302/367 gene was amplified by PCR from human genomic DNA and was cloned into pLVX-TRE vector to construct the recombinant lentiviral vector. The ligation was analyzed by digestion and confirmed by sequencing. Then the recombinant vectors were transfected into 293FT cells and the lentiviral viruses were harvested from 293FT cells. After determining the titer, viruses were used to infect HeLa cells. RNA was extracted for real-time PCR to detect the expressions of miR-302/367 and its downstream genes and the expression were devict-ed into DOX+ group, DOX- group and blank group. **Results:** Digestion and sequencing demonstrated successful construction of recombinant inducible lentiviral vector miR-302/367. The virus titers were 5×10^6 TU/ml. After 72 h introduction with DOX, the results of real-time PCR shown that miR-302/367 and pluripotent related genes (OCT4, SOX2 and NANOG) were significantly upregulated in DOX+ group compared with those in blank group and DOX- group ($P < 0.05$, miR-302a: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.032$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.048$; miR-302b: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.001$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; miR-302c: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$; miR-302d: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.002$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.047$; miR-367: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.001$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; OCT4: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; SOX2: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$; NANOG: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$), while there was no significant difference between DOX+ group and blank group ($P > 0.05$, miR-302a: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.057$; miR-302b: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.832$; miR-302c: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.445$; miR-302d: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.979$; miR-367: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.161$; OCT4: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.051$; SOX2: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.060$; NANOG: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.078$). **Conclusions:** The recombinant inducible lentiviral vector containing pri-mir-302/367 can be successfully constructed, which lay a solid foundation for further study the reprogramming of miR-302/367 in the following experiments.

[Key words] pri-mir-302/367; Tet-on system; inducible lentiviral vector; HeLa cells

microRNA 是一种 21~25 nt 的内源性非编码的单链小分子 RNA, 广泛存在于真核生物中。在哺乳动物体内, 经加工成熟 microRNA 主要通过靶基因 3' 非编码区特异性的碱基配对形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 而发挥转录后调节作用。现已发现其广泛参与细胞的增生、分化、凋亡等生物学过程^[1]。miR-302/367 是一类高度保守的胚胎干细胞特异性的 microRNA 分子, 编码于人的 4 号染色体上, 其前体结构 pri-mir-302/367 经加工最终产生 5 个不同的 microRNA 分子, 即 miR-302a/b/c/d 和 miR-367。2004 年 Suh 等^[2]首次报道了 miR-302/367 表达于小鼠及人的胚胎干细胞中。近年来, 有学者发现其在维持胚胎干细胞的多能性方面发挥着重要的作用^[3]。随着诱导多能性干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 技术的发展, Lin 等^[4]研究小组发现 miR-302/367 与体细胞重编程有密切的关系。最近有学者^[5]通过抑制 miR-302 和 miR-372 的靶基因提高了小鼠胚胎成纤维细胞重编程的效率; 同时 Anokye-Danso 等^[6]用 miR-302/367 将成纤维细胞诱导成 iPSCs, 诱导效率较 Yamanaka 的四因子提高了近一百倍且诱导

时间明显缩短, 这为体细胞重编程提供了新的思路。

本实验旨在构建携带 pri-mir-302/367 的 Tet-on 慢病毒载体, 并用包装好的病毒感染 HeLa 细胞, 经强力霉素 (doxycycline, DOX) 诱导之后检测 miR-302/367 家族基因及其下游调节基因 OCT4、SOX2 和 NANOG 的表达情况, 为后续利用携带 pri-mir-302/367 的慢病毒载体介导重编程的相关研究奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验所需 Tet-on 慢病毒系统和 Xfect™ 转染试剂购自 Clontech 公司; PCR 酶、限制性内切酶购自 Takara 公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 引物由上海生工合成; 质粒提取试剂盒 (包括质粒小提和去内毒素质粒大提试剂盒) 和 DNA 凝胶试剂盒购自 Omega 公司; RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司; cDNA 合成试剂盒和 real-time PCR 试剂购自 Fermentas 公司; 293FT 细胞株和 HeLa 细胞株购自美国 ATCC 细胞中心; 培养细胞所需的 DMEM 培养基、胎牛血清等购自 GIBCO 公司; DH5α 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增 通过 miRBase 数据库获得 pri-

mir-302/367 序列,以人基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 pri-mir-302/367 基因。上游引物:5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAT-ACCATTAAAGAGTGCTATCA-3' (含 *Not* I 酶切位点),下游引物:5'-CGACGCGTCTTGTAAATGATTCTCTGAGAT-3' (含 *Mlu* I 酶切位点)。反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后回收并纯化 PCR 产物。

1.2.2 重组质粒的构建及鉴定 PCR 产物和 pLV-TRE3G 空质粒经 *Mlu* I 和 *Not* I 双酶切后,纯化产物用 T4 DNA 连接酶进行连接并转化 DH5 α 。菌液 PCR 初步鉴定阳性菌落,酶切鉴定后送上海生工测序。

1.2.3 重组慢病毒包装和滴度测定 本实验所用的慢病毒系统本身没有携带绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP),为了检测转染效率,作者引入 pMX-GFP 质粒。按照 Xfect™ 转染试剂说明,用 pLV-TRE-302 质粒、pLV-Tet 质粒、pMX-GFP 质粒和 Xfect Reaction Buffer 制备成转染复合物转染 293FT 细胞。转染 72 h 后于荧光显微镜下观测转染效率,并分别于 48 h 及 96 h 收集病毒上清,500 $\times$ g 离心 10 min 去除细胞碎片后分装,4 °C 保存备用。向 HeLa 细胞(5×10^3 个/孔,96 孔板)中分别加入不同稀释梯度的病毒稀释液及终浓度为 8 μ g/ml 聚凝胺,终体积为 1 ml。24 h 后换液并加入 0.25 μ g/ml 嘌呤霉素和 600 μ g/ml G418 进行细胞筛选(病毒体系带有嘌呤霉素和新霉素标签)。10 d 后用 1% 的结晶紫染色并计数克隆数目,以最高稀释度对应克隆的数目计算病毒滴度。

1.2.4 重组慢病毒感染 HeLa 细胞及 DOX 诱导 用制备好的病毒上清感染 HeLa 细胞。感染前,按 2.0×10^5 个/孔将 HeLa 细胞接种于 6 孔板上,37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度培养箱培养,待细胞达 70%~80% 融合时即可用于感染。感染前 24 h 将细胞更换成无血清培养液,次日转染 24 h 后加入新鲜的完全培养液,于 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度培养箱培养,共感染 2 次。感染后 48 h 加入 DOX (200 ng/ml) 进行诱导。

1.2.5 Real-time PCR 检测诱导后 miR-302a/b/c/d、miR-367 及下游调节基因 OCT4、SOX2 和 NANOG 的表达 DOX 诱导 72 h 后提取 HeLa 细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA,用 real-time PCR 检测 miR-302a/b/c/d 和 miR-367 及下游调节基因 OCT4、SOX2 和 NANOG 的表达情况。其中,miR-302a/b/c/d 和 miR-367 以 U6 为内参;OCT4、SOX2 和 NANOG 以 GAPDH 为内参,每组重复 3 次。使用 Bio-rad iQ™5 Optional System Software 分析实验数据,以校正后的 Ct 值($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为检验统计量。公式为: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参})_{处理组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参})_{对照组}$ 。实验所用到的相关引物如表 1。

1.2.6 统计学方法 应用 SPSS 18.0 统计学软件,数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组慢病毒载体的构建

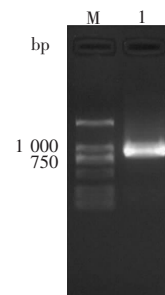
对 pri-mir-302/367 的 PCR 扩增产物进行 1.0% 的琼脂糖电泳,在 750~1 000 bp 之间出现 1 条特异性条带,与理论值 979 bp 大小基本一致(图 1)。然后对 pLV-TRE-302 重组质

粒分别行 *Mlu* I 和 *Not* I 双酶切及 *Mlu* I 单酶切,产物进行 1.0% 的琼脂糖电泳鉴定。双酶切可见 1 条介于 10 000 bp 于 7 500 bp 之间的条带(pLV-TRE 空质粒大小为 7 819 bp)及 1 条约为 1 000 bp 的条带;单酶切仅见 1 条介于 10 000 bp 与 7 500 bp 之间的特异条带(图 2)。pLV-TRE-302 重组质粒经测序鉴定结果与设计序列完全相符。

表 1 Real-time PCR 引物
Tab.1 Primers of real-time PCR

名称	序列(5'-3')
扩增引物	
miR-302a	TAAGTGCTTCCATGTTTTGGTGA
miR-302b	TAAGTGCTTCCATGTTTTACTAG
miR-302c	TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG
miR-302d	TAAGTGCTTCCATGTTTGAGTGT
miR-367	AATTGCACCTTTAGCAATGGTGA
miR-302/367 ^a	GCAGGGTCCGAGGTATTC
U6	F-CTCGCTTCGGCAGCACA R-AACGCTTCACGAATTTGCGT
OCT4	F-CTTGCTGCAGAAAGTGGGTGGAGGAA R-CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA
SOX2	F-AGCTACAGCATGATGCAGGA R-GGTCATGGAGTTGTACTGCA
NANOG	F-AGTCCCAAAGGCCAAACAACCCACTTC R-TGCTGGAGGCTGAGGTATTTCTGTCTC
GAPDH	F-ACGGATTTGGTCTTATTTGGG R-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT
反转录引物	
miR-302a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGACTCACC
miR-302b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGACCTACTAA
miR-302c	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGACCCACTG
miR-302d	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGACACACTC
miR-367	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGACTCACC

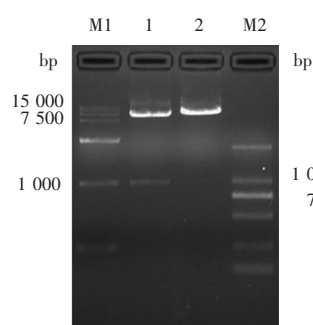
注:F,上游引物;R,下游引物;a,通用引物



M. DNA marker(DL2000); 1. pri-mir-302/367 PCR 扩增产物(979 bp)

图 1 pri-mir-302/367 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Analysis of pri-mir-302/367 PCR product by agarose gel electrophoresis



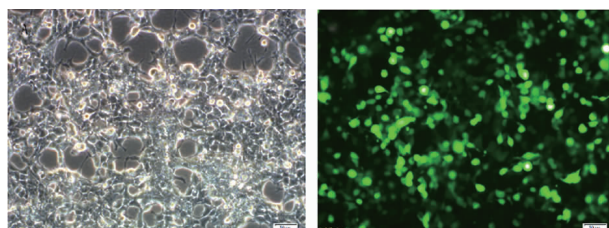
M1. DNA marker (DL15000); 1. pLV-TRE-302 重组质粒双酶切;
2. pLV-TRE-302 重组质粒单酶切; M2. DNA marker (DL2000)

图 2 pLV-TRE-302 重组质粒酶切琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Analysis of restriction enzyme digestion of recombinant vector pLV-TRE-302 by agarose gel electrophoresis

2.2 转染效率的检测及慢病毒滴度测定

转染后 72 h, 利用荧光显微镜对转染效率进行了初步鉴定。如图 3 所示, 可以看到较为明显的绿色荧光。然后加入嘌呤霉素和 G418 对感染后的 HeLa 细胞进行了筛选(图 4)。根据预设浓度梯度, 经计算后本实验测得慢病毒滴度为 5×10^6 TU/ml。

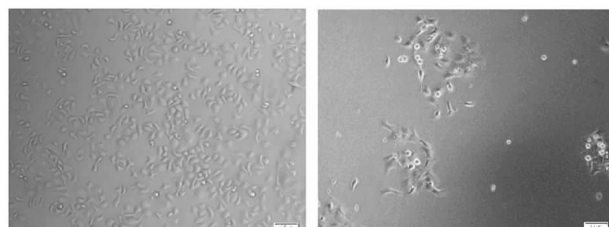


A. 普通显微镜

B. 荧光显微镜

图 3 在 293FT 细胞检测重组慢病毒

Fig.3 Detection of lentivirus in 293FT cells



A. 筛选前

B. 筛选后

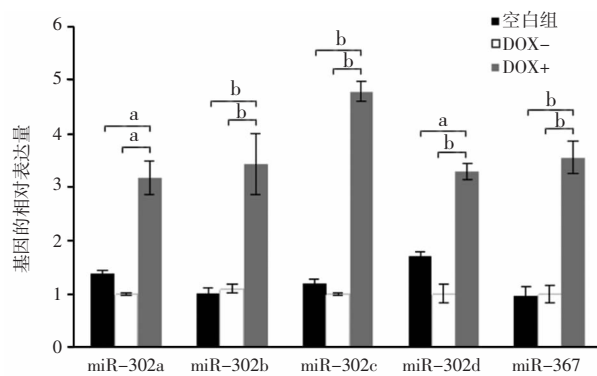
图 4 嘌呤霉素和 G418 筛选 HeLa 细胞

Fig.4 Selection of HeLa cells by puromycin and G418

2.3 Real-time PCR 检测 miR-302/367 家族基因在 HeLa 细胞中的表达

DOX 诱导后, real-time PCR 检测 HeLa 细胞中 miR-302/367 家族基因的表达情况。结果显示, 诱导组基因表达均高于非诱导组及空白组 ($P < 0.05$, 其中 miR-302a: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.032$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.048$; miR-302b: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.001$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; miR-302c: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$; miR-302d:

$P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.002$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.047$; miR-367: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.001$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$), 其中以 miR-302b、miR-302c 和 miR-367 最为明显, $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} < 0.01$; 而非诱导组和空白组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 其中 miR-302a: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.057$; miR-302b: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.832$; miR-302c: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.445$; miR-302d: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.979$; miR-367: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.161$) (图 5)。



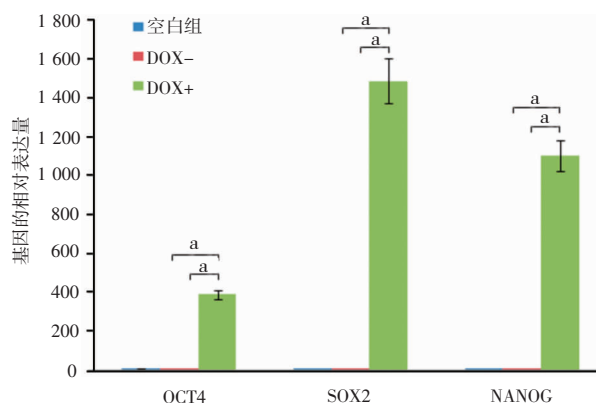
DOX+: 诱导组; DOX-: 非诱导组; a, $P < 0.05$, b, $P < 0.01$

图 5 Real-time PCR 检测 miR-302/367 家族基因表达

Fig.5 Detection of miR-302/367 family gene expression by real-time PCR

2.4 检测受 miR-302/367 调节的下游基因

Real-time PCR 结果显示, 经 DOX 诱导后, HeLa 细胞中受 miR-302/367 调节的下游多能性诱导因子 OCT4、SOX2 和 NANOG 均得到明显上调, 即诱导组高于非诱导组和空白组 ($P < 0.01$, OCT4: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.001$; SOX2: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$; NANOG: $P_{\text{DOX+ vs. DOX-}} = 0.000$, $P_{\text{DOX+ vs. blank}} = 0.000$)。非诱导组和空白组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, OCT4: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.051$; SOX2: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.060$; NANOG: $P_{\text{blank vs. DOX-}} = 0.078$) (图 6)。



DOX+: 诱导组; DOX-: 非诱导组; a, $P < 0.01$

图 6 Real-time PCR 检测 miR-302/367 下游调节基因的表达情况

Fig.6 Detection of miR-302/367 downstream regulatory gene expression by real-time PCR

3 讨论

诱导多能性干细胞因能避免伦理学争议和免疫排斥而有望成为药物筛选和疾病治疗等新的种子细胞。然而,诱导效率低下和致瘤性成为其走向临床应用的主要障碍。2011 年 Lin 等^[7]研究小组利用 miR-302/367 代替多能性诱导因子将人和小鼠的体细胞重编程为 iPSCs。研究表明,miR-302/367 介导的体细胞重编程较 Yamanaka 的四因子重编程具有明显的优势^[7]:①诱导时间短(1~2 周 vs. 2~3 周)。miR-302/367 直接靶向沉默表观基因,使基因组去甲基化介导重编程;Yamanaka 四因子则间接通过 miR-302/367 诱导体细胞重编程。②诱导过程简单且诱导效率高(>10% vs. <1%)。miR-302/367 介导的体细胞重编程只涉及 1 个 microRNA 分子,Yamanaka 的四因子却需要 4 个不同的转录因子。③安全性高。miR-302/367 可通过抑制 CDK2 和 CDK4/6 来抑制肿瘤的发生^[8],而四因子中 c-Myc 和 Klf4 属于原癌基因,本身具有潜在的致癌性。尽管 miR-302/367 能介导体细胞重编程的发生,但其是否具备重编程诸如血细胞等终末分化细胞的能力还有待进一步的研究。

目前,关于 miR-302/367 介导重编程的机制^[9]主要涉及以下方面:首先,miR-302/367 沉默 MECP1/2 和 AOF1/2 的激活因子并抑制 MECP1/2 和 HDAC2,引起下游分子如 DNA 甲基转移酶 1 的下调,导致基因组整体的去甲基化和染色质 H3K4me2/3 的共价修饰,最终激活多能性诱导因子(尤其 OCT4、SOX2 和 NANOG)促使重编程发生^[4,10]。同时,被激活的多能因子如 OCT4 又可反向促进 miR-302/367 的表达,从而形成正反馈调节巩固重编程^[11]。此外,也有学者报道,miR-302/367 还可以下调 RHOC 和 TGF- β 2 的表达,促进间质细胞向上皮样转化,加快重编程的进程^[12]。

本实验通过克隆 miR-302/367 的前体结构 pri-mir-302/367,模拟正常体内 microRNA 分子的加工过程,利用 Tet-on 慢病毒系统,成功构建重组慢病毒表达载体 pLV-TRE-302。病毒感染 HeLa 细胞,经 DOX 诱导后,检测 miR-302/367 家族基因 miR-302a/b/c/d 和 miR-367 及受其调节的下游基因 OCT4、SOX2 和 NANOG 的表达情况。miR-302a/b/c/d 和 miR-367 表达证实了 miR-302/367 的前体结构 pri-mir-302/367 在 HeLa 细胞体内加工为成熟的 microRNA 分子,间接验证了重组载体的正确性;OCT4、

SOX2 和 NANOG 的上调证实了 miR-302/367 对多能性诱导因子的调节作用,提示其有介导体细胞重编程的潜力。

总之,本实验成功构建 pri-mir-302/367 重组慢病毒载体,并检测了 pri-mir-302/367 的成熟体 miR-302a/b/c/d、miR-367 和下游调节基因 OCT4、SOX2 和 NANOG 的表达情况;初步验证了 miR-302/367 对 OCT4、SOX2 和 NANOG 的调节作用,为后续 miR-302/367 可诱导性表达及相关重编程的研究奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Alvarez-Garcia I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. Development, 2005, 132(21): 4653-4662.
- [2] Suh M R, Lee Y, Kim J Y, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs[J]. Dev Biol, 2004, 270(2): 488-498.
- [3] Lipchina I, Elkabetz Y, Hafner M, et al. Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response[J]. Genes Dev, 2011, 25(20): 2173-2186.
- [4] Lin S L, Chang D C, Lin C H, et al. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(3): 1054-1065.
- [5] Subramanyam D, Lamouille S, Judson R L, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(5): 443-448.
- [6] Anokye-Danso F, Trivedi C M, Juhr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(4): 376-388.
- [7] Lin S L. Concise review: deciphering the mechanism behind induced pluripotent stem cell Generation[J]. Stem Cells, 2011, 29(11): 1645-1649.
- [8] Lin S L, Chang D C, Ying S Y, et al. MicroRNA miR-302 inhibits the tumorigenicity of human pluripotent stem cells by coordinate suppression of the CDK2 and CDK4/6 cell cycle pathways[J]. Cancer Res, 2010, 70(22): 9473-9482.
- [9] Kuo C H, Deng J H, Deng Q, et al. A novel role of miR-302/367 in reprogramming[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(1): 11-16.
- [10] Lin S L, Chang D, Chang L S, et al. MiR-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state[J]. RNA, 2008, 14(10): 2115-2124.
- [11] Rosa A, Brivanlou A H. A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation[J]. EMBO J, 2011, 30(2): 237-248.
- [12] Liao B J, Bao X C, Liu L Q, et al. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition[J]. J Biol Chem, 2011, 286(19): 17359-17364.

(责任编辑:关蕴良)