

其他肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001682

MiR-20b 直接靶向 3'-UTR 调控 HIF-1 α 表达王贺龙¹, 罗玉岚¹, 陶象男², 汪忆梦¹, 何晶¹, 郭术俊¹, 宋传旺¹

(1. 蚌埠医学院免疫学教研室、安徽省感染与免疫重点实验室, 蚌埠 233030;

2. 蚌埠医学院第二附属医院检验科, 蚌埠 233030)

【摘要】目的:探讨微小 RNA-20b (microRNA-20b/miR-20b) 是否直接靶向低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 信使 RNA 的 3'-非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 调控其基因表达。**方法:**采用 TargetScan 和 miRanda 算法预测 HIF-1 α 3'-UTR 区是否存在 miR-20b 的配对序列; 构建并鉴定表达 HIF-1 α 3'-UTR 的双荧光素酶基因报告系统 (pmiR-RB-Report™-HIF-1 α 3'-UTR), 将重组质粒 (recombinant plasmid, RP) 与 mimics-miR-20b (M) 或 NC-miR-20b (N) 共转染 HeLa 细胞, 本研究共分为 RP、RP+M、RP+N、P、P+M 和 P+N 六组, 24 h 后检测各组双荧光素酶活性的比值。**结果:**HIF-1 α 3'-UTR 区存在 miR-20b 配对区域; 成功构建了含 HIF-1 α 3'-UTR 序列的双荧光素酶基因报告载体; 重组质粒与 mimics-miR-20b 共转染的 HeLa 细胞荧光素酶活性明显低于其他对照组 ($P=0.022$)。**结论:**miR-20b 可以直接靶向结合 HIF-1 α 3'-UTR 区负向调控其表达。

【关键词】低氧诱导因子; 3'-非编码区; miR-20b; 双荧光素酶基因报告系统**【中图分类号】**R392**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-03-24MiR-20b directly targets 3'-UTR to regulate the expression of HIF-1 α Wang Helong¹, Luo Yulan¹, Tao Xiangnan², Wang Yimeng¹, He Jing¹, Guo Shujun¹, Song Chuanwang¹

(1. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Anhui Provincial Key Laboratory of Infection and Immunity; 2. Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate whether miRNA-20b (miRNA-20b/miR-20b) may bind to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) mRNA to regulate the expression of HIF-1 α . **Methods:** Targetscan and miRanda softwares were used to predict the presence or absence of miR-20b binding site in the HIF-1 α 3'-UTR region. The dual luciferase gene reporter assay system (pmiR-RB-Report™-HIF-1 α) was constructed and identified. The ratios of dual luciferase activity were detected in HeLa cells 24 hours after mimics-miR-20b (M) or NC-miR-20b (N) and recombinant plasmid (RP) co-transfection. This study was divided into six groups: RP, RP+M, RP+N, P, P+M and P+N groups. **Results:** There was a miR-20b binding site in the 3'-UTR of HIF-1 α mRNA. The double luciferase gene reporter vector containing HIF-1 α 3'-UTR was successfully constructed. The dual luciferase activity was significantly lower in recombinant plasmid and mimics-miR-20b co-transfection group than in empty group ($P=0.022$). **Conclusion:** miR-20b can directly bind to HIF-1 α 3'-UTR region to regulate the expression of HIF-1 α .

【Key words】hypoxia inducible factor; 3'-untranslated region; miR-20b; dual luciferase gene reporting system

低氧环境是组织供氧量低于需氧量, 常被作为肿瘤生长、血管生成和炎症反应的促成因素^[1], 其分

作者介绍: 王贺龙, Email: gxingzhe116@hotmail.com,

研究方向: 肿瘤免疫与抗感染免疫。

通信作者: 宋传旺, Email: chuanwangsong@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81273273); 安徽省自然科学基金资助项目 (编号: 1708085MH218); 安徽省高等学校自然科学研究资助项目 (编号: KJ2015B028by); 蚌埠医学院 2016 年度研究生科研创新计划资助项目 (编号: Byycx1602)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180504.1103.002.html> (2018-05-04)

子生物学调控机制涉及氧感受器和酶促反应的两个主要转录因子: 核因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 和低氧诱导因子 (hypoxia inducible factors, HIFs)^[2]。HIF α 有 HIF-1 α 、HIF-2 α 和 HIF-3 α 3 种亚型, 其表达模式不同, 分别调控着不同的靶基因^[3-4], 并且调控血管生成过程中多种细胞因子的产生, 如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、间质细胞因子-1 (stromal cell-derived factor, SDF-1) 和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等^[5-7]。

微小 RNA(microRNA/miR)是一类约 22 碱基大小的高度保守非编码单链 RNA,可以通过结合到靶基因 mRNA 的 3'-UTRs(3'-untranslated regions,3'-UTRs)在转录后水平调控基因的表达^[8],导致 mRNA 的降解或抑制翻译的进行。MiR-20b 是 miR-17 家族的成员之一,既往研究表明 miR-20b 可以负向调控 HIF-1 α 的表达,抑制肿瘤细胞的侵袭和增殖等^[9-11],但具体的作用机制不清。因此,明确 miR-20b 对 HIF-1 α 的具体调控机制将会对探索新的肿瘤治疗途径具有重要的意义。本研究主要探讨 miR-20b 是否可以靶向结合 HIF-1 α mRNA 3'-UTR 区,达到对 HIF-1 α 表达的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

PmiR-RB-Report™ 质粒(6720bp)购自广州锐博公司,DH5 α 大肠杆菌购自碧云天公司,Dual-Luciferase 基因报告系统购于 Promega 公司,Lipofectamine™ 2000、Trizol 试剂由 Invitrogen 公司提供,AxyPre DNA 凝胶回收试剂盒、AxyPro 质粒抽提试剂盒购于康宁公司,DNA 连接酶、*Xho*I、*Not*I 内切酶由 Takara 公司提供。PCR 合成试剂盒、SYBR Green 荧光定量试剂盒均由北京全式金公司提供。Mimics-miR-20b、NC-miR-20b 及 HIF-1 α 引物序列由上海生工公司合成,HIF-1 α PCR 引物由 DNAMAN 设计,产物大小为 430 bp(表 1)。*Xho*I 酶切位点序列为 CTCGAG,*Not*I 酶切位点为 GCGGCCGC。

表 1 实验所用到的模拟物和引物序列

Tab.1 Sequence of mimics and primers in the study

类别		碱基序列(5'-3')
Mimics-miR-20b	上游	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG
	下游	ACCUGCACUAUGAGCCACUUUGUU
NC-miR-20b	上游	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	下游	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
HIF-1 α PCR 引物序列	上游	ATGCTTATATCTGGAAGGTATGTGG
	下游	AAAGAGCAAGGGAACGAAAA
酶切位点及保护碱基序列	上游	ATAAGAATGCGCCGCTAACTAT
	下游	CCGCTCGAGCGG

1.2 方法

1.2.1 小鼠 HIF-1 α 基因 3'-UTR 区序列扩增 根据 Trizol 试剂说明书提取小鼠 RAW264.7 细胞总 RNA,然后根据试剂盒要求操作,利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增 HIF-1 α 基因的 3'-UTR 序列,扩增长度 430 bp。PCR 反应条件:95℃预变性 1 min,95℃变性 30 s,57℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环。

1.2.2 pmiR-RB-Report™-HIF-1 α 3'-UTR 双荧光素酶重组质粒构建 将 HIF1 α 基因的 PCR 产物与质粒进行分别进

行 *Xho*I、*Not*I 双酶切,酶切产物进行琼脂糖凝胶分离后并胶回收纯化得到含有黏性末端的线性 DNA 双链。按照 Takara DNA Ligation Kit Ver.2.0 说明书进行连接反应,然后将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α 进行扩增培养,浓集菌液后抽提重组质粒。最后将重组质粒进行 *Xho*I、*Not*I 双酶切鉴定,并将菌液送上海生工公司测序鉴定。

1.2.3 细胞转染 转染前 24 h 将 HeLa 细胞接种于 24 孔板,根据实验设计方案分为 RP、RP+M、RP+N、P、P+M 和 P+N 6 组,每个实验组包括 3 个孔,共 18 个孔。使第 2 天转染时细胞融合达到 70%~90%,按照 Lipo-2000 说明配制转染复合物,使 mimics-miR-20b 或 NC-miR-20b 最终浓度为 60 μ mol/L,质粒为 1 μ g/L,Lipo-2000 3 μ L/L,转染复合物混匀后在培养箱孵育 30 min。然后将转染复合物加入 HeLa 细胞在培养箱中培养 4~6 h 后更换含 10%胎牛血清的细胞培养液,继续培养 24 h 后用酶标仪测定荧光素酶活性。以上实验分别重复 2 次。

1.2.4 荧光素酶活性检测 按照 Promega 公司的双荧光素酶活性检测试剂说明进行操作,先将 HeLa 细胞用灭菌的 PBS 洗涤 2 次,加入新鲜配制的细胞裂解液,反复吹打使细胞充分裂解。然后 13 000 g 离心 1 min 取细胞上清,在避光的 96 孔板中加入待测细胞上清 20 μ L,并加入 hLuc 激活剂 LAR II 100 μ L,检测 hLuc 荧光强度,再加入猝灭剂 Stop & Glo 试剂 100 μ L,检测 hRLuc 荧光强度。最后以 hRLuc/hLuc 的比值作为质粒自我复制的相对量。

1.3 统计学分析

统计学分析使用软件 GraphPad Prism 6.0,所得数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,利用单因素方差分析比较各组实验的结果,其组间两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

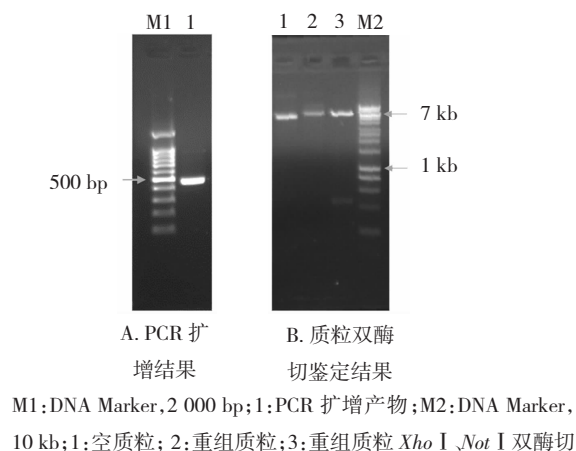
2 结果

2.1 HIF-1 α -3'-UTR 存在 miR-20b 的结合靶点

MiR-20b 的种子区域是 AAAGUGC,利用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)和 miRanda (<http://www.microran.org/microna/home.do/>)预测工具^[12],本课题组发现在 HIF-1 α 的 3'-UTR 区存在 miR-20b 种子区的互补序列 GCGAUUU,因此推测 HIF-1 α -3'-UTR 存在 miR-20b 的结合靶点。

2.2 重组质粒鉴定

2.2.1 重组质粒双酶切结果 以 RAW264.7 细胞的 RNA 为模版,应用 PCR 技术逆转录扩增 HIF-1 α 3'-UTR 区序列的 430 bp 大小,对产物进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的纯度和大小(图 1A)。将 PCR 产物连接到 pmiR-RB-Report™ 质粒 hRLuc 基因的下游,形成的环状重组质粒即是 pmiR-RB-Report-HIF-1 α -3'-UTR 双荧光素酶基因报告载体,应用 *Xho*I、*Not*I 双酶切鉴定重组质粒(图 1B),在 400~600 bp 之间可见 1 条亮带,说明 HIF-1 α 的 PCR 产物成功克隆到载体质粒上。

图 1 PCR 扩增目的基因 HIF-1 α 3' -UTR 电泳结果

及质粒双酶切鉴定结果

Fig.1 Electropherogram of target PCR amplification products of HIF-1 α 3' -UTR and identification of recombinant plasmid by dual-enzyme cut

2.2.2 测序及同源序列对比结果 为进一步验证本研究构建的重组质粒,将含有重组质粒的菌液送检测序,公司测序结果显示信号明显(图 2A),和 PCR 产物的序列吻合,在产生信号的 260 bp 处可见 miR-20b 的种子配对区,即结合靶点(图 2C)。此外,将测序结果在 PubMed 通过同源序列相似性对比发现此序列来源于小鼠的 HIF-1 α mRNA 基因,两者呈镜像对称(图 2D),这充分说明成功构建了携带 HIF-1 α 3' -UTR 区基因的重组质粒。

2.3 荧光素酶活性检测

本研究使用的基因报告检测载体是 pmiR-RB-ReproTM 质粒,结构如图 3A 所示,和其他基因报告系统不同的是: hRLuc 作为报告基因, Luc 作为内参基因, hRLuc/Luc 的比值大小作为荧光素酶的活性的强弱,各组比值结果以 3 $\times$ 3 次数据的均数和标准差表示。单因素方差分析检测结果显示重组质粒+miR-20b 共转染组的荧光素酶活性明显降低(图 3B; RP+M, $P=0.022$),见表 2。RP+M vs. RP; $P=0.005$; RP+M vs. RP+N; $P=0.004$; RP+M vs. P+N; $P=0.015$; RP+M vs. P+M; $P=0.002$; RP+M vs. P; $P=0.027$,说明 miR-20b 可以抑制 HIF-1 α 的表达。

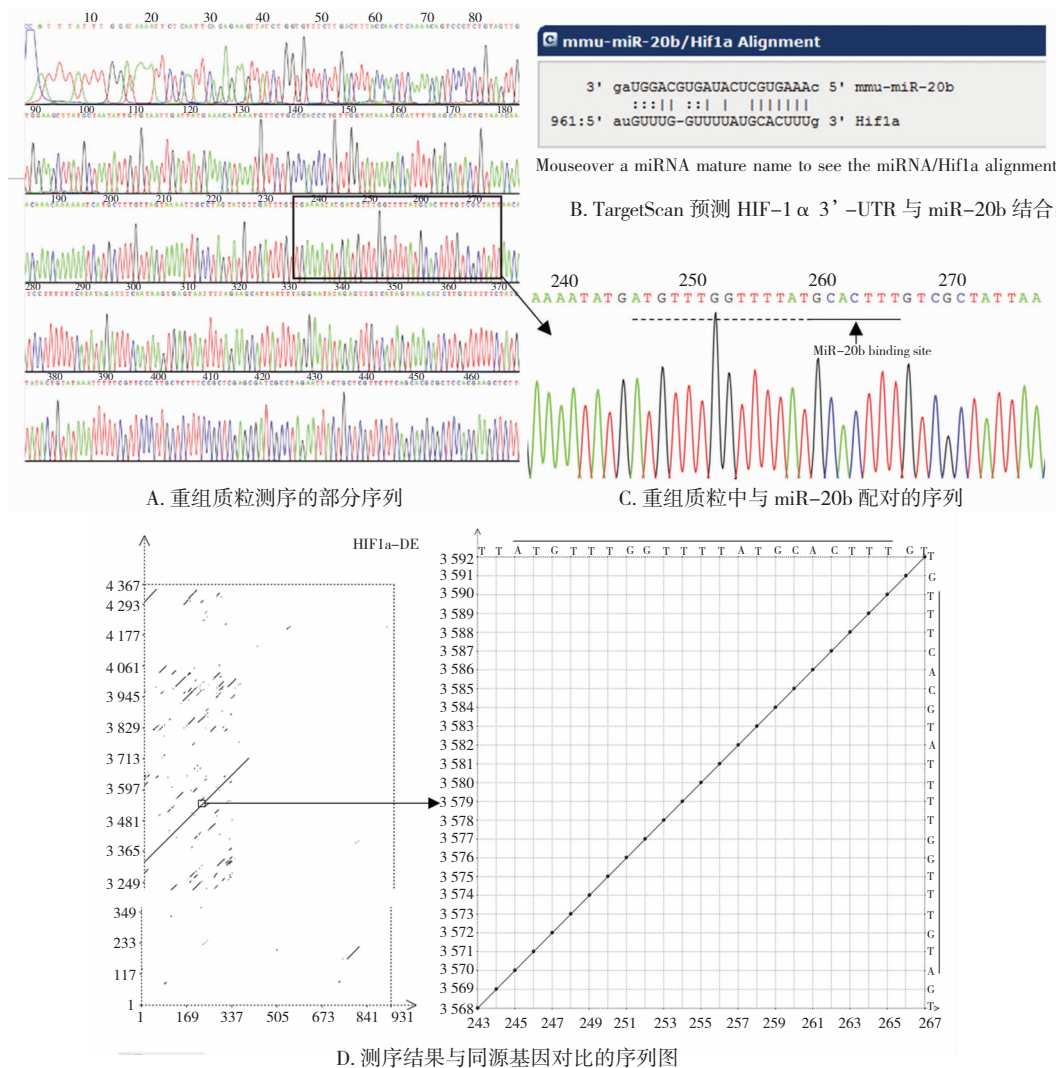


图 2 测序结果及同源序列对比

Fig.2 Sequencing results and homologous sequence comparison

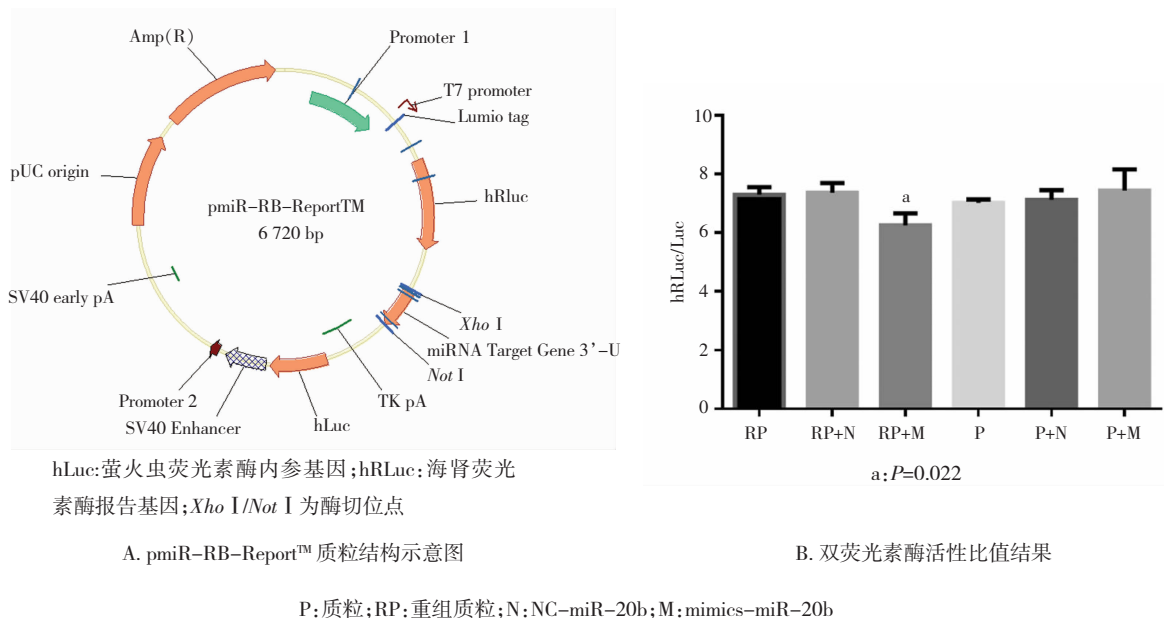


图3 质粒结构示意图及 MiR-20b 对双荧光素酶基因报告系统的荧光素酶活性的影响

Fig.3 Structure diagram of pmiR-RB-Report™ plasmid and effect of miR-20b on the luciferase activity of gene reporter system

表2 双荧光素酶活性检测的比值结果 (hRLuc/Luc)

Tab.2 Results of dual-luciferase ratios (hRLuc/Luc)

组别	比值	组别	比值
RP	7.293 ± 0.260	P	7.020 ± 0.115
RP+N	7.359 ± 0.337	P+N	7.119 ± 0.336
RP+M	6.253 ± 0.410	P+M	7.439 ± 0.725
<i>F</i> 值	18.570	<i>F</i> 值	0.662
<i>P</i> 值	0.003	<i>P</i> 值	0.550

注: P, 质粒; RP: 重组质粒; N: NC-miR-20b; M: mimics-miR-20b; 每个组别是 3×3 次实验的 $\bar{x}$ 和 s

3 讨论

本研究利用 TargetScan 和 miRanda 软件预测到 HIF-1 α 的 mRNA 3'-UTR 区存在 miR-20b 的结合位点,并且成功构建了含有 HIF-1 α 3'-UTR 基因的基因报告载体系统 pmiR-RB-Report™-HIF-1 α 3'-UTR,实验结果证明 miR-20b 可以和 HIF-1 α 的 mRNA 3'-UTR 区结合,抑制 hRLuc 基因的表达。本实验中采用的是双荧光素酶基因报告系统,同时含有内参基因 hLuc 和报告基因 hRLuc,相对于其他单个荧光素酶系统检测的方法,具有以下优势:避免了不是同期细胞导致的测量误差;减少了试剂的消耗和工作量;同时不用考虑转染效率对荧光素酶活

性比值的影响。此外,只需要一种质粒载体,这大大减少了试验的步骤。因此,这种双荧光素酶基因报告系统的应用正成为一种趋势。

MicroRNA 是一种高度保守的非编码性 RNA 片段,可以在转录后水平调控靶基因的表达^[13],因此,将 microRNA 作为一种新型的靶向治疗药物将会是未来医药界研究的重要方向之一。本研究旨在探究 miR-20b 对 HIF-1 α 的调控主要机制,通过多个软件预测和实验证明,本研究发现 miR-20b 具有靶向 HIF-1 α 3'-UTR 区负向调控其表达的作用,这将有助于进一步探索 miR-20b 在肿瘤发生及炎症反应过程中的重要作用。在肿瘤组织中,由于组织对物质的需求量很大,导致低氧环境的产生,此时,由于机体和组织的应激作用,HIFs 大量产生会促使新生血管的生成,加快肿瘤细胞的侵袭和转移^[14-15],而 miR-20b 过表达可以负向调控 HIF-1 α 的生成,抑制肿瘤细胞的侵袭和增殖等^[10-11]。因此,明确 miR-20b 对 HIF-1 α 的具体调控机制将会对探索肿瘤的治疗途径具有重要的意义。

本研究成功构建了 HIF-1 α 的双荧光素酶基因报告系统,并证明 miR-20b 可以直接靶向结合到 HIF-1 α mRNA 3'-UTR 区,调控其表达。本研究将为探索新的抗肿瘤治疗方法提供重要的理论和实

验依据。

参 考 文 献

- [1] Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, et al. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis[J]. IUBMB Life, 2015, 67(3): 145–159.
- [2] Fagenholz SP, Harris NS. Hypoxia and inflammation[J]. N Engl J Med, 2011, 364(20): 1976.
- [3] Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors — similar but not identical[J]. Mol Cells, 2010, 29(5): 435–442.
- [4] Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs[J]. FASEB J, 2003, 17(2): 271–273.
- [5] Zhang W, Petrovic JM, Callaghan D, et al. Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1 β (IL-1 β) in astrocyte cultures[J]. J Neuroimmunol, 2006, 174(1–2): 63–73.
- [6] Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, et al. Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor(HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia[J]. Cancer Res, 2006, 66(13): 6683–6691.
- [7] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1[J]. Nat Med, 2004, 10(8): 858–864.
- [8] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281–297.
- [9] Xue TM, Tao LD, Zhang M, et al. Clinicopathological significance of microRNA-20b expression in hepatocellular carcinoma and regulation of HIF-1 α and VEGF effect on cell biological behaviour[J]. Dis Markers, 2015, 2015(12): 325176.
- [10] Liu M, Wang D, Li N. MicroRNA-20b downregulates HIF-1 α and inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells[J]. Oncol Res, 2016, 23(5): 257–266.
- [11] Cascio S, D'Andrea A, Ferla R, et al. miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 α and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2010, 224(1): 242.
- [12] Zhang Y, Verbeek FJ. Comparison and integration of target prediction algorithms for microRNA studies[J]. J Integr Bio Inform, 2010, 7(3): 169–181.
- [13] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. Nature, 2005, 433(7027): 769–773.
- [14] Jing SW, Wang YD, Kuroda M, et al. HIF-1 α contributes to hypoxia-induced invasion and metastasis of esophageal carcinoma via inhibiting E-cadherin and promoting MMP-2 expression[J]. Acta Med Okayama, 2012, 66(5): 399–407.
- [15] Chang CC, Lin BR, Chen ST, et al. HDAC2 promotes cell migration/invasion abilities through HIF-1 α stabilization in human oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2011, 40(7): 567–575.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》

在线投稿网址: cyxb.alljournals.ac.cn