

miR-34b/c 启动子区单核苷酸多态性对其转录调控的影响

陈佳萍, 秦真真, 曹松玉, 胡志斌, 沈洪兵

(南京医科大学流行病与卫生统计学系, 南京医科大学肿瘤中心, 江苏 南京 211166)

摘要: [目的] 研究 miR-34b/c 启动子区单核苷酸多态 rs4938723 (T/C) 对其转录调控的影响。[方法] 构建含有不同基因型 miR-34b/c 启动子区的报告基因表达载体 pGL3-basic-miR34b/c-T 和 pGL3-basic-miR34b/c-C, 分别与内参质粒 SV40 共转染于 Hela, A549 和 CHO 三种细胞后进行荧光素酶活性分析。[结果] pGL3-basic-miR34b/c-C 等位基因组荧光素酶相对活性与 pGL3-promoter-miR30C-T 组等位基因相比, 均有显著升高 ($P < 0.01$)。[结论] 荧光素酶活性强弱间接反映了 miRNA 启动子区遗传变异对转录活性的影响, 当 miR-34b/c 启动子区 rs4938723 位点为 C 时, 可以更为有效地增加 miR-34b/c 的转录产物, 从而在转录水平上调控 miRNA 的表达。

关键词: miR-34b/c; 启动子区; 单核苷酸多态性

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)11-0835-05

Impact of Single Nucleotide Polymorphism in the Promoter Region of miR-34b/c on Regulation of miR-34b/c Transcription

CHEN Jia-ping, QIN Zhen-zhen, CAO Song-yu, et al.

(Cancer Center of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the impact of a common polymorphism rs4938723 (T/C) in promoter region of miR-34b/c on the regulation of miR-34b/c transcription. [Methods] The pGL3-basic-miR34b/c-T and pGL3-basic-miR34b/c-C luciferase plasmids were created containing T or C allele of miR-34b/c promoter region. Then the two plasmids contained T or C allele were transfected respectively into Hela, A549 and CHO cells to detect the transcription activity of miR-34b/c. [Results] pGL3-basic-miR34b/c-C construct group showed significantly higher levels of luciferase expression compared with pGL3-basic-miR34b/c-T construct group ($P < 0.01$). [Conclusion] The miR34b/c transcript product could be effectively increased while the miR-34b/c carrying the rs4938723 C allele.

Subject words: miR-34b/c; promoter region; single nucleotide polymorphism

microRNAs (miRNAs) 是一类长约 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 广泛分布在病毒、植物和高等哺乳动物中, 进化上高度保守。作为一类不编码蛋白质的 RNA, miRNAs 在生物体的生长发育过程中发挥了非常重要的调控作用。研究表明, miRNAs 主要通过和靶基因完全或不完全互补结合, 促进靶基因 mRNA 降解或抑制翻译而调节基因的表达。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30730080); 国家自然科学基金青年基金项目(81102179)。

通讯作者: 沈洪兵, 副校长, 教授, 博士生导师, 博士; 南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系, 江苏省南京市江宁区天元东路 818 号(211166); E-mail: hbshen@njmu.edu.cn。

收稿日期: 2012-07-11; **修回日期:** 2012-09-27

达。作为基因表达的负调控因子, 每个 miRNA 可以调节数百个靶基因, 其在细胞增殖、分化、凋亡及发育、器官形成等一系列重要生命过程中发挥着重要作用^[1-3]。最近的研究表明, miRNAs 表达失调与肿瘤的发生发展密切相关, 其作用具有广泛性和复杂性, 已经发现的人类 miRNAs 大部分(52%)位于已知的肿瘤相关基因组区域内或已知的基因脆性位点^[4]。同时发现, miRNAs 的表达失调是恶性肿瘤的共有现象, 可以导致细胞的恶性转化^[5]。

miR-34 家族是进化中一类高度保守的 miRNA 家族, 广泛存在于节肢动物、线虫纲动物及哺乳动物

中。人类 miR-34 家族主要包含以下 3 个成员:miR-34a、miR-34b 和 miR-34c。其中 *miR-34a* 基因位于 1p36, 单独转录表达, 而 *miR-34b* 和 *miR-34c* 则是作为一个基因簇共同转录表达^[6]。多项研究表明, miR-34 家族与 *p53* 基因之间形成正反馈网络在 *p53* 介导的细胞周期和细胞凋亡调控网络发挥着重要作用^[6,7]。同时, Corney 等^[8]研究结果表明, miR-34 家族可靶向作用于多条肿瘤相关通路的基因, 如 *CDK4/6*、*Cyclin E2*、*MET*、*Bcl-2* 等在内的近百个下游靶基因, 与肿瘤发生发展密切相关。

单核苷酸多态性(SNP)是人类基因组中最常见的遗传变异之一, *miRNA* 基因及其附近区域的遗传变异可能通过影响 *miRNA* 的成熟进程而发挥其功能^[9-11]。本研究通过对 *miR-34* 基因及其启动子区域在人类 SNP 数据库中进行相关搜索和比对, 筛选到位于 miR-34b/c 启动子区单核苷酸多态性 rs4938723(T/C)。生物信息学软件预测结果表明, 该 *miRNA* 启动子区 SNP(T/C)改变可能会影响其与转录因子 GATA 的结合, 从而发挥其生物学调控作用。本研究通过构建含有不同基因型 miR-34b/c 启动子区的报告基因表达载体, 利用双荧光素酶报告基因系统研究了 miR-34b/c 启动子区 SNP 位点对 miR-34b/c 的转录调控功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

pGL3-Basic、pRL-SV40 质粒购自 Invitrogen 公司, 定点突变试剂盒购自上海赛百盛生物技术公司, 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司。Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒等均为 Takara 公司产品。Hela 细胞、A549 及 CHO 细胞为本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 miR-34b/c 启动子序列报告基因载体构建与鉴定

根据 UCSC Genome Browser 数据库提示, rs4938723 多态位点位于 miR-34b/c 的启动子区, 距转录起始位点上游-423bp 处。因此本研究设计的

报告基因质粒将 miR-34b/c 启动子区(-874bp, +312bp)序列装入不含启动子的 pGL3-Basic 报告基因载体中。

构建含有 miR-34b 启动子序列的 pGL3-Basic 载体, 通过 PCR 扩增人 miR-34b 启动子区序列基因片段, 所用引物序列为: F: 5' - CCTAGCTAG-CATTGAATGATCCAGATGACC -3'; R: 5' - ATG-CAAGCTTACTTCCTTCACGCCAGGC -3'。PCR 反应条件为: 95℃ 5min, 95℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 2min, 35 个循环后于 72℃ 延伸 10min。目的片断切胶回收后用 *Nhe* I 和 *Hind* III 双酶切后装入 pGL3-Basic 载体, 转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞并挑取阳性克隆测序, 测序结果和 miR-34b/c 启动子区序列用 Blast 程序进行比对分析。采用赛百盛定点突变试剂盒对构建成功的质粒载体进行定点突变, 构建含有不同 SNP 位点(T/C)miR-34b 侧翼序列的相应载体, 分别命名为 pGL3-basic-miR34b/c-T 和 pGL3-basic-miR34b/c-C。

1.2.2 细胞培养及转染

将生长状态良好的 Hela、A549 及 CHO 细胞分别接种于 24 孔板中, 参照脂质体 Lipofectamine™ 2000 说明书进行细胞转染。质粒+质粒共转染分组情况为: pGL3-Basic 空载体+ pRL-SV40、pGL3-basic-miR34b/c-T+ pRL-SV40 和 pGL3-basic-miR34b/c-C+ pRL-SV40。每组做 3 个平行实验, 重复 3 次, 转染 24h 后收集细胞并进行荧光素酶活性检测。

1.2.3 双荧光素酶活性测定

按 Promega 公司提供的双荧光素酶报告基因检测方法进行, 用 1×PBS 洗涤细胞 2 次, 每孔加入 200 μ l PLB 细胞裂解液收集细胞, 反复冻融后 12 000r/min 4℃离心 5min。吸取 20 μ l 细胞裂解的上清液加入 100 μ l 荧光素酶底物(LAR II), 混合后用化学发光计测定荧光素酶的发光值, 再加入 100 μ l 的反应终止液(Stop & Glo), 测定作为内标的 pRL-SV40 荧光素酶的发光值, 两者的比值即为荧光素酶的相对活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据的比较采用 *t* 检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 构建的 miR-34b/c 报告基因载体的验证及定点突变

构建的表达载体重组质粒 pGL3-basic-miR34b/c 经回收后测序验证,以确认克隆的正确并防止突变的产生。所构建的 pGL3-basic-miR34b/c 经测序验证 rs4938723 位点为 C,该载体命名为 pGL3-basic-miR34b/c-C。对构建成功的质粒 pGL3-basic-miR34b/c-C 进行定点突变(C→T),测序结果证明定点突变成功(图 1)。最终构建成含有不同 SNP 位点(T/C)的 miR34b/c 启动子序列载体,分别命名为 pGL3-basic-miR34b/c-T 和 pGL3-basic-miR34b/c-C。

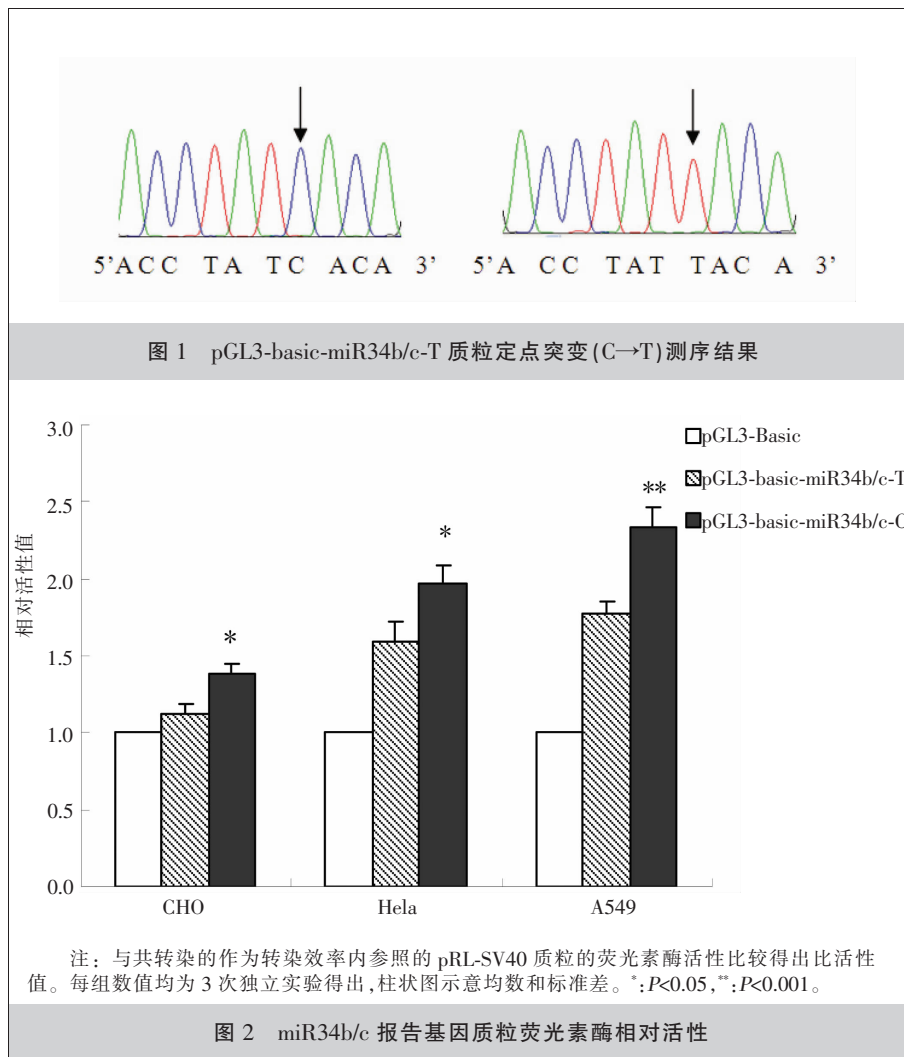
2.2 重组质粒与 pRL-SV40 共转染后荧光素酶报告基因表达

将 pGL3-Basic 空质粒、pGL3-basic-miR34b/c-T

和 pGL3-basic-miR34b/c-C 质粒分别与 pRL-SV40 内参质粒共转染于 A549、Hela 和 CHO 细胞中,采用双荧光素酶报告基因检测各表达质粒的荧光素酶的相对活性。在 3 种细胞系中,将 pGL3-Basic 空质粒组荧光素酶相对活性值设定为 1,结果显示,在 CHO 细胞中,pGL3-basic-miR34b/c-C 组荧光素酶相对活性为 1.383 ± 0.059 ,较 pGL3-basic-miR34b/c-T 组 (1.125 ± 0.056)显著升高 ($P=0.0054$);在 Hela 细胞转染实验中,pGL3-basic-miR34b/c-C 组荧光素酶相对活性为 1.97 ± 0.116 ,较 pGL3-basic-miR34b/c-T 组 (1.588 ± 0.138)显著升高 ($P=0.0054$);在 A549 细胞转染实验中,pGL3-basic-miR34b/c-C 组荧光素酶相对活性为 2.339 ± 0.129 ,较 pGL3-basic-miR34b/c-T 组 (1.776 ± 0.075)显著升高 ($P=0.0003$)。见图 2。

3 讨论

2002 年 11 月 Calin 首次报道 miRNAs 异常与肿瘤相关,已有越来越多的证据显示 miRNAs 在肿瘤的发生发展中起着重要的作用。研究表明,miRNAs 可通过调节原癌基因/抑癌基因的表达参与肿瘤的发生形成,其差异表达可作为肿瘤早期诊断、疗效、预后评估的指标,有望成为肿瘤治疗的新靶点^[5]。近年来越来越多的研究表明,miRNAs 基因中的 SNPs 可影响成熟 miRNA 的成熟进程和 miRNA 的结构、miRNA 与靶基因的识别等,使 miRNA 调控网络发生异常,从而参与肿瘤的发生发展^[9-11]。本课题组前期的研究表明,位于 has-miR-196a2 成熟区的 rs11614913 位点(T/C)改变可影响前体 pre-miR-196a2 加工为成熟-miR-196a2 中的过程,细胞实验结果提示,该遗传变异还影



响 hsa-mir-196a2 与靶基因 *LSP1* 的结合。同时,本课题组在以病例—对照研究为基础的遗传关联研究结果中发现,rs11614913 多态的突变等位基因可以导致肺癌和乳腺癌的发病风险增加,引起非小细胞肺癌(NSCLC)死亡风险提高 76%,中位生存时间减少 5.9 个月^[10,12-13]。截至目前为止,rs11614913 多态位点已在大量研究中报道与肺癌、乳腺癌、胃癌、食管癌、肝癌等多种肿瘤的发病风险密切相关^[10,12-17]。另外,本课题组对 miRNA 前体区域遗传变异与 NSCLC 死亡风险关系研究中发现,位于 has-miR-30c-1 前体区的 rs928508 可以影响 pre-和成熟 miR-30c-1 的表达,但是不影响 pri-miR-30c-1 和它的宿主基因 *nuclear transcription factor Y (NFYC)* 的表达,表明该多态位点可能影响 pri-miR-30c-1 到 pre-miR-30c-1 的转化进程,而 pri-miR-30c-1 应该是和 NFYC 共表达^[11]。

miR-34 家族可以通过调节 *CDK4/6*、*Cyclin E2*、*MET*、*Bcl-2* 等相关靶基因的活性而影响细胞内的多种调控进程,如细胞周期、细胞衰老及细胞凋亡等^[7,8]。miR-34b 和 miR-34c 是 miR-34 家族的重要成员,其表达失调可能与多种肿瘤的发生发展密切相关^[18-20]。本研究通过对 NCBI 中人类 SNP 数据库进行相关搜索及比对,筛选到位于 miR-34b/c 启动子区-423bp 单核苷酸多态性 rs4938723 (T/C),生物信息学结果提示该多态位点影响 GATA 转录因子的结合,可能通过影响 miR-34b 成熟过程中的转录进程而发挥其生物学功能。前期本课题组在以人群为基础的病例—对照研究中,我们发现携带 rs4938723 变异基因型(TC/CC)者与携带 rs4938723 野生基因型(TT)个体相比,发生肝癌的风险增加了 40%^[21]。在本研究中,我们采用构建含不同基因型 miR-34b/c 的报告基因表达载体,利用双荧光素酶报告基因系统研究了 miR-34b/c SNP 位点对 miR-34b/c 的转录调控作用。细胞实验结果显示,在 A549、Hela 和 CHO 三个细胞系中,pGL3-basic-miR34b/c-C 组荧光素酶相对活性较 pGL3-basic-miR34b/c-T 显著升高($P<0.01$)。由于将含有 rs4938723 (T/C)多态位点的 miR-34b/c 启动子区序列接入 pGL3-Basic 载体中,所以荧光素酶活性强弱间接反映了 miR-34b/c 启动子区遗传变异对其转录活性的影响。本研究表明,miR-34b/c 启动子区遗传变异可以在转录水平上

有效调控其表达,为进一步深入研究 miR-34b/c 在肿瘤发生、发展中的作用及其机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 862-864.
- [2] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [3] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 858-862.
- [4] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [5] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838.
- [6] He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1130-1134.
- [7] Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G₁-arrest [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(13): 1586-1593.
- [8] Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, et al. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8433-8438.
- [9] Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(6): 389-402.
- [10] Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(7): 2600-2608.
- [11] Hu Z, Shu Y, Chen Y, et al. Genetic polymorphisms in the precursor microRNA flanking region and non-small cell lung cancer survival [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(5): 641-648.
- [12] Hu ZB, Liang J, Wang ZW, et al. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women [J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(1): 79-84.

- [13] Tian T, Shu Y, Chen J, et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(4):1183-1187.
- [14] Hoffman AE, Zheng T, Yi C, et al. MicroRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis[J]. Cancer Res, 2009, 69(14): 5970-5977.
- [15] Peng S, Kuang ZS, Sheng CY, et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population [J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(8): 2288-2293.
- [16] Wang K, Guo H, Hu HM, et al. A functional variation in pre-microRNA-196a is associated with susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma risk in Chinese Han [J]. Biomarkers, 2010, 15(7):614-618.
- [17] Qi P, Dou TH, Geng L, et al. Association of a variant in MIR196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Hum Immunol, 2010, 71(6):621-626.
- [18] Svoboda M, Sana J, Redova M, et al. miR-34b is associated with clinical outcome in triple-negative breast cancer patients [J]. Diagn Pathol, 2012, 7:31.
- [19] Hiroki E, Suzuki F, Akahira JI, et al. MicroRNA-34b functions as a potential tumor suppressor in endometrial serous adenocarcinoma [J]. Int J Cancer, 2012, 131 (4): E395-E404.
- [20] Tanaka N, Toyooka S, Soh J, et al. Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2012, 76 (1):32-38.
- [21] Xu Y, Liu L, Liu J, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma [J]. Int J Cancer, 2011, 128(2):412-417.

《2012 中国肿瘤登记年报》出版启事

为全面推进我国肿瘤登记工作，全国肿瘤登记中心建立了中国肿瘤登记年报制度，自2008年开始出版了历年的中国肿瘤登记年报，为我国肿瘤的预防与控制提供了科学依据。2012年全国肿瘤登记中心收到全国104个肿瘤登记处2009年肿瘤登记数据。通过对上报数据质量的综合审核，有72个登记处的数据入选《2012中国肿瘤登记年报》，以反映2009年我国肿瘤登记覆盖地区恶性肿瘤的发病与死亡水平。入选资料覆盖人口达8547万，包括31个城市地区（5749万）和41个农村地区（2798万）。年报内容共分五个部分，第一部分为概述；第二部分是数据质量；第三、四部分列出主要分析结果；第五部分是附录，包括数据列表以及登记工作的流程、统计方法和指标。

《2012中国肿瘤登记年报》现已由军事医学科学出版社出版，主编赫捷、陈万青，毛伟敏、夏庆民担任主审。