

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00616

转化生长因子 β 调控 miR-200b-200a-429 启动子活性

韩敬明, 白久旭, 张晓玲, 崔汉民, 李 旭, 曹 宁*

沈阳军区总医院血液净化科, 沈阳 110015

[摘要] 目的 探讨转化生长因子 β (TGF- β) 对 miR-200b-200a-429 簇表达的影响, 对其调控机制作初步研究。

方法 使用 RT-PCR 方法检测 TGF- β 对人肾小管上皮细胞 HK-2 miR-200a、miR-200b 和 miR-429 表达的影响。PCR 方法扩增出 miR-200b-200a-429 簇启动子序列, 构建 miR-200b-200a-429 启动子荧光素酶报告基因表达载体, 转染至 HK-2 细胞, 检测其荧光素酶活性。观察 TGF- β 对 miR-200b-200a-429 转录的表达调控。结果 实时定量 PCR 检测结果显示 TGF- β 作用细胞 24 h 后下调了 miR-200a、miR-200b 和 miR-429 的表达。成功构建 miR-200b-200a-429 启动子荧光素酶表达载体, 测序正确, 然后利用双荧光素酶报告基因系统证实构建的报告基因载体启动子具有活性, 发现 TGF- β 可以抑制 miR-200b-200a-429 启动子活性 ($P < 0.05$)。结论 TGF- β 可以调控 miR-200b-200a-429 启动子的活性。

[关键词] miR-200b-200a-429; 转化生长因子 β ; 转录调控; 启动子

[中图分类号] R 394.64 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2014)06-0616-05

Transforming growth factor- β regulates activity of miR-200b-200a-429 promoter

HAN Jing-ming, BAI Jiu-xu, ZHANG Xiao-ling, CUI Han-min, LI Xu, CAO Ning*

Department of Blood Purification, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110015, Liaoning, China

[Abstract] Objective To investigate the regulatory effect of transforming growth factor- β (TGF- β) on miR-200b-200a-429 expression and the related mechanism. Methods RT-PCR was used to examine the expression of miR-200a, miR-200b and miR-429 in HK-2 cells treated with TGF- β . The miR-200b-200a-429 promoter was amplified by PCR and was cloned into pGL3 basic vector, which was then transfected into HK-2 cells and the luciferase activity of miR-200b-200a-429 gene promoter was detected by luminometer. Results Results of RT-PCR showed that TGF- β down-regulated miR-200a, miR-200b and miR-429 in HK-2 cells 24 h after TGF- β treatment. Vector of pGL3- miR-200b-200a-429-promoter was constructed successfully and was confirmed by sequencing. Dual-Luciferase reporter gene system was used to verify the promoter activity of the constructed reporter gene vector. TGF- β was found to significantly inhibit the activities of miR-200b-200a-429 promoter in HK-2 cells ($P < 0.05$). Conclusion TGF- β may regulate the activity of miR-200b-200a-429 promoter.

[Key words] miR-200b-200a-429; transforming growth factor beta; transcriptional regulation; promoter

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(6):616-620]

肾小管上皮细胞失去自身的细胞特性而获得肌成纤维细胞的特性, 属于上皮-间质细胞转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)。EMT 在肾脏纤维化的发生和发展中起重要作用, 抑制或逆转 EMT 的发生和发展, 已成为控制肾脏纤维化的重要途径之一^[1]。转化生长因子 β (TGF- β) 通过结合上皮细胞表面的受体, 经过 Notch、 β -catenin 等信号途

径活化 EMT 相关转录因子, 导致 EMT 的发生^[2-3]。研究发现多种 miRNA 参与 EMT 的调控, 可能在 EMT 的发展进程中发挥重要作用^[4]。证据表明 miR-200 家族通过下调 ZEB 基因调控 EMT, 随着对 miRNA 参与细胞表型转化中研究的不断深入, 逐渐发现 miR-200 家族在 EMT 过程中起着关键性的作用^[5-6]。研究报道 TGF- β 诱导人角质化细胞 EMT

[收稿日期] 2013-11-12 [接受日期] 2014-03-01

[基金项目] 辽宁省科技攻关课题 (2012408002), 全军医学科技青年培育项目 (13QNP002)。Supported by Program for Tackling Scientific and Technological Problems of Liaoning Province (2012408002) and PLA Youth Training Project for Medical Science (13QNP002)。

[作者简介] 韩敬明, 副主任医师。Tel: 024-28851193, E-mail: baijiuxu@aliyun.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 024-28851193, E-mail: cn88860068@sohu.com

过程中一些 miRNA 表达谱发生变化,提示 TGF- β 可能通过调控 miRNA 表达参与 EMT^[7]。但是目前关于 TGF- β 调节的 miR-200 家族表达机制研究鲜有报道。本研究通过在基因转录水平探讨 TGF- β 和 miR-200 家族的关系,为 miR-200 家族转录调控机制研究奠定初步理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器 TRIzol(Invitrogen 公司),miScript Reverse Transcription Kit(Qiagen 公司),SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II、T₄ DNA 连接酶、高保真酶 PRIME STAR、限制性内切酶 *Xho* I、*Nco* I、*Nhe* I 和 *Hind* III(TaKaRa 公司),*E. coli* DH5 α (本实验室保存),柱式 DNA 胶回收试剂盒、柱式小量质粒 DNA 纯化试剂盒(Axygen 公司),基因组 DNA 提取试剂盒(Omega 公司),pGL3-Basic 载体、Dual-

Luciferase Reporter1000 Assay System (Promega 公司),脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),人胚胎肾(human embryonic kidney, HEK)293 细胞系、人肾小管上皮细胞(HK-2,本实验室保存),胎牛血清(FBS,杭州四季青生物工程材料有限公司),DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基(Gibco 公司),TGF- β (R&D 公司)。Synergy 2 多功能酶标仪(Biotek 公司)。

1.2 基因组 DNA 的提取 按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书的具体步骤提取 HK-2 细胞基因组 DNA。

1.3 引物设计和 PCR 扩增 miR-200b-200a-429 基因 依据文献^[16]报道设计 miR-200b-200a-429 启动子及截短体的引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,见表 1。

表 1 miR-200b-200a-429 启动子引物
Tab 1 Primer of miR-200b-200a-429 promoter

Primer	Sequence(5'-3')
-1 574/+120F	ACC TGC TAG CCA TTC CCG GAC AGT CAC AG
-1 574/+120R	CAG GAG ATC TCC TGG CAC AGG AAG TCA GTT
-321/+120F	GTG GGC TAG CAG AGG TGG AGA GGC GAG AGT
-158/+19F	ATC GGC TAG CCT GCG TCA CCG TCA CT
-110/+19F	GTG AGC TAG CCA GGG GAC ACA CCT GTC G
-158/+19R	TGG AAG ATC TGG GGC CTC GGG AGG GAA GAG

扩增 1 600 bp 左右片段引物为:上游-1 574/+120F,下游-1 574/+120R;扩增片段 400 bp:上游-321/+120F,下游-1 574/+120R;扩增片段 300 bp:上游-321/+120F,下游-158/+19R;扩增片段 200 bp:上游-158/+19F,下游-158/+19R;扩增片段 100 bp:上游-110/+19F,下游-158/+19R。其酶切位点分别为 *Nhe* I、*Bgl* II。以从 HK-2 细胞提取的基因组 DNA 为模板,PCR 进行扩增 miR-200b-200a-429 启动子及其截短体。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化 PCR 产物。

1.4 miR-200b-200a-429 启动子报告基因载体的构建 将纯化后的 PCR 产物经 *Nhe* I、*Hind* III 双酶切,回收酶切产物,利用 T₄ DNA 连接酶将回收产物与双酶切后的 pGL3-Basic 载体连接,转化至 *E. coli*

DH5 α 扩增,提取质粒后双酶切鉴定,将鉴定正确的质粒送上海生工生物工程技术有限公司进行 DNA 测序。

1.5 检测报告基因荧光素酶表达活性 将 HK-2 和 HEK293 细胞分别接种到 48 孔板,培养 24 h 后待细胞生长至融合度大于 80% 时进行转染。将重组的荧光素酶报告基因载体 pGL3-miR-200-promoter、pGL3-Basic、内参质粒 pRL-TK 共转染 HK-2 细胞,每种载体平行做 3 复孔,报告基因载体每孔 100 ng,pRL-TK 每孔 5 ng,具体步骤见 Lipofectamine 2000 说明书。24 h 后加入工作液浓度为 5 ng/mL TGF- β 的培养液刺激,以正常培养液培养的细胞作为对照。转染 48 h 后裂解细胞并收取细胞裂解液,利用 Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System 检测荧光素酶活性值。

1.6 TGF- β 刺激 HK-2 细胞 将用 RPMI 1640

(10% FBS)培养液培养的 HK-2 细胞,传代到 T25 细胞培养瓶中,细胞融合率达到 70%时,取指数生长期的细胞弃去培养液,加入工作液浓度为 5 ng/mL TGF-β 的培养液,以正常培养液培养的细胞作为对照,放入 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后提取细胞总 RNA。

1.7 实时定量 PCR 按照 Qiagen 公司的试剂盒说明书步骤提取细胞总 RNA 并进行 miRNA 的反转录。配制 PCR 反应液后上荧光实时定量 PCR 仪 (ABI 7500) 进行反应。PCR 条件:95℃ 10 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,45 个循环。PCR 反应体系:SYBR Premix Ex Taq™ II (2×) 10 μL, miRNA Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, Universal adaptor PCR Primer 0.4 μL, DNA 模板 1 μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL, dH₂O (灭菌蒸馏水) 8.8 μL, 共计 20 μL。

实时定量 PCR 中所用的引物序列 hsa-miR-200a primer 引物 5'-TAA CAC TGT CTG GTA ACG ATG T-3'; has-miR-200b primer 引物 5'-TAA TAC TGC CTG GTA ATG ATG A-3'; hsa-miR-429 primer 引物 5'-TAA TAC TGT CTG GTA AAA CCG T-3'; 内参 U6 forward 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', reverse 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

1.8 TFSEARCH 软件分析 miR-200b-200a-429 启动子-110/19 区域序列 登录 <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>, 在线输入 miR-200b-200a-429 启动子-110/19 区域序列, 分析启动子-110/19 区域序列的转录因子结合位点。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 15.0 统计学软件分析数据。采用 *t* 检验或方差分析进行组间比较, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 TGF-β 对 HK-2 细胞 miR-200a、miR-200b 和 miR-429 表达的影响 TGF-β(5 ng/mL)刺激 HK-2 细胞,24 h 后收集细胞总 RNA,用实时定量 PCR 检测 miR-200a、miR-200b 和 miR-429 表达。结果显示 TGF-β 作用细胞 24 h 后下调 miR-200a、miR-200b 和 miR-429 的表达,与对照组相比分别下调了 51%、62%和 42%。

2.2 miR-200b-200a-429 启动子报告基因表达载体的构建和鉴定 根据 miR-200b-200a-429 启动子序列设计截短体引物,利用 PCR 扩增出 1 600、400、300、200、100 bp 左右的目的片段(图 1)。其中 pGL3 -321/+19 为 2 个条带,对 2 个条带分别测序鉴定,测序结果显示上面条带为目的片段,将测序正确的 PCR 产物克隆到质粒载体。

2.3 miR-200b-200a-429 启动子报告基因荧光素酶活性的检测 将构建好的 pGL3-1 574/+120、截短报告基因载体、pGL3-basic(阴性对照)与内参质粒 pRL-TK 共转染至 HEK293 和 HK-2 细胞,48 h 后利用双荧光素酶报告系统检测启动子活性,结果显示 miR-200b-200a-429 启动子载体在 HK-2 细胞中能够检测出荧光素酶活性,在 HEK293 细胞中几乎不能检测出荧光素酶活性,两者间差异有统计学意义(*P*<0.05)。pGL3-1 574/+120 载体逐渐截短后,检测显示荧光素酶活性也依次递减(图 2)。

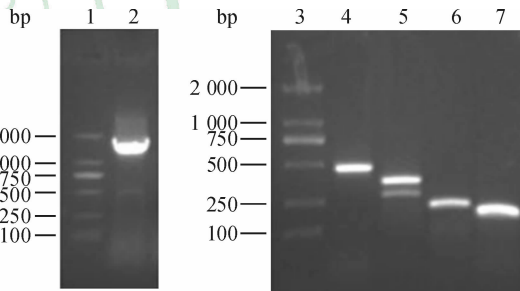


图 1 miR-200b-200a-429 启动子及截短体 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of miR-200b-200a-429 promoter and PCR products of truncated product

1,3: DL2000; 2: pGL3 -1 574/+120; 4: pGL3 -321/+120; 5: pGL3 -321/+19; 6: pGL3 -158/+19; 7: pGL3 -110/+19

2.4 TGF-β 对 miR-200b-200a-429 启动子活性的影响及启动子序列分析 pGL3 -1 574/+120、截短报告基因载体、pGL3-basic(阴性对照)与内参质粒 pRL-TK 共转染至 HK-2 细胞,24 h 后加入 TGF-β(5 ng/mL),刺激 24 h 后检测启动子荧光素酶活性,结果显示 TGF-β 能够抑制启动子和各截短体的报告基因活性(*P*<0.05,图 3)。提示 miR-200b-200a-429 启动子区域的-110/+19 区间有可能存在被 TGF-β 调控的作用元件。

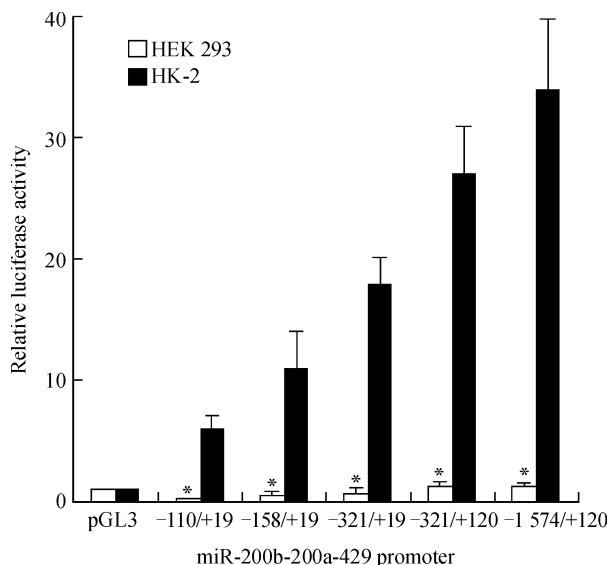


图 2 miR-200b-200a-429 启动子报告基因及截短体在 HK-2 和 HEK 293 细胞中的活性

Fig 2 Luciferase activity of miR-200b-200a-429 promoter reporter gene and truncated product in HK-2 and HEK 293 cells

* $P < 0.05$ vs HK-2 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

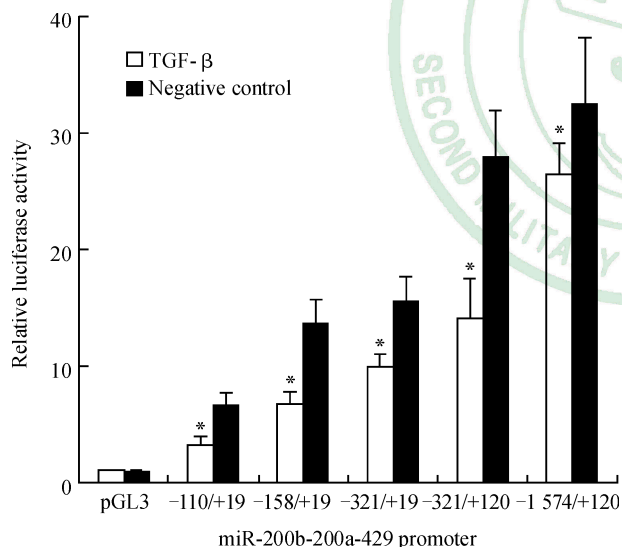


图 3 TGF- β 抑制 HK-2 细胞 miR-200b-200a-429 启动子报告基因及截短体的活性

Fig 3 TGF- β inhibited activity of miR-200b-200a-429 promoter reporter gene and truncated product in HK-2 cells

* $P < 0.05$ vs negative control. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

TFSEARCH 软件分析 miR-200b-200a-429 启动子 -110/+19 区域序列, 发现该启动子区域存在 Smad、c-Myc、c-Myb、Sp1 等重要转录因子的结合位点。

3 讨论

miRNA 是内源性小分子非编码单链 RNA, 它通过与靶 mRNA 3' 末端非编码区 (3' untranslated region, 3'-UTR) 序列特异性的互补配对发挥抑制或降解靶 mRNA 的作用。研究表明 miRNAs 参与细胞的增殖和凋亡、胚胎发育、组织器官的形成和多种疾病的发生等生理病理活动重要过程^[8]。同时研究发现 miRNAs 参与人类的疾病发生, 探讨 miRNAs 与疾病之间的关系成为当前研究的热点^[9]。miRNAs 在 EMT 的进程中起到重要的作用, 通过刺激诱导处于上皮向间充质转化的细胞和间充质细胞能够下调 miR-200 的表达, miR-200 丢失与 E-钙黏连蛋白下调相关^[10]。miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429 是 miR-200 家族成员, miR-200a、miR-200b 和 miR-429 位于人类基因组 1 号染色体, miR-200c 和 miR-141 位于人类基因组的 12 号染色体^[11]。TGF- β 在 EMT 过程中可以下调 miR-200 家族和 miR-205 的表达^[12]。我们构建了 miR-200b-200a-429 的启动子报告基因载体和截短体。结果显示 miR-200b-200a-429 启动子报告基因载体及其截短体在 HK-2 细胞中活性明显的升高, 说明这一片段具有启动子的活性。而在 HEK293 细胞中不能检测出 miR-200b-200a-429 启动子的活性, 可能由于 HK-2 细胞为上皮细胞, miR-200 家族在上皮细胞内高表达, 而 HEK293 细胞属于间充质细胞, miR-200 家族在间充质细胞表达水平低^[13]。我们推测在上皮细胞中 miR-200 启动子区域存在特异表达的调控元件。我们发现 TGF- β 能有抑制 miR-200b-200a-429 启动子和其截短体的活性, 提示启动子 -110/+19 区间可能存在被 TGF- β 调控的作用元件。

Smad 家族是 TGF- β 信号转导通路中关键的下游因子, 在 TGF- β 诱导 EMT 过程中发挥了重要作用^[6]。研究发现 miR-200 家族与 Smad 家族相互作用参与 EMT 的调控, Smad 能够将 TGF- β 的信号从胞膜受体转导入胞核内, 通过调节核内靶基因转录发挥 TGF- β 的生物学效应^[14]。研究发现通过 TGF- β 可以使 Smad3 与 miR-200b-200a-429 启动子区结合位点结合, 活化 Smad 蛋白, 参与调控 miR-200 家族, 最后调控 E-钙黏连蛋白的转录抑制因子

Zeb1 和 Zeb2 表达^[15]。Smad7 分子也参与 miR-200 家族的调节,其在 NRK-52E 细胞中过表达能够阻断 TGF- β 引起的 miR-200 家族的下调^[6]。因此, TGF- β 可能是依赖细胞内的 Smad 信号途径引起 miR-200 家族下调。

多种细胞和分子参与了肾脏纤维化过程,各种因素相互作用,机制十分复杂。肾小管上皮细胞 EMT 及其分子机制的研究为病理-临床联系提供了新的线索。本研究发现在肾小管上皮细胞中, TGF- β 能够增强 miR-200b-200a-429 启动子活性, TGF- β 可能通过调控 miR-200b-200a-429 启动子的活性而调节 miR-200 家族的表达。本研究为 miR-200 家族转录调控机制的研究奠定了基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Eddy A A. Molecular basis of renal fibrosis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2000,15:290-301.
- [2] Rhyu D Y, Yang Y, Ha H, Lee G T, Song J S, Uh S, et al. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005,16:667-675.
- [3] Rastaldi M P. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for the development of renal tubulointerstitial fibrosis[J]. *J Nephrol*, 2006,19:407-412.
- [4] Du R, Sun W, Xia L, Zhao A, Yu Y, Zhao L, et al. Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-34a promotes EMT by targeting the notch signaling pathway in tubular epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2012,7:e30771.
- [5] Tang O, Chen X M, Shen S, Hahn M, Pollock C A. MiRNA-200b represses transforming growth factor-beta1-induced emt and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013,304:F1266-F1273.
- [6] Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, Tan R, et al. The miR-200 family regulates TGF-beta1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012,302:F369-F379.
- [7] Wang T, Zhang L, Shi C, Sun H, Wang J, Li R, et al. TGF-beta-induced miR-21 negatively regulates the anti-proliferative activity but has no effect on EMT of TGF-beta in HaCaT cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012,44:366-376.
- [8] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004,116:281-297.
- [9] Gregory R I, Chendrimada T P, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing[J]. *Cell*, 2005,123:631-640.
- [10] Tryndyak V P, Beland F A, Pogribny I P. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2010,126:2575-2583.
- [11] Bracken C P, Gregory P A, Kolesnikoff N, Bert A G, Wang J, Shannon M F, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cancer Res*, 2008,68:7846-7854.
- [12] Gibbons D L, Lin W, Creighton C J, Rizvi Z H, Gregory P A, Goodall G J, et al. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression[J]. *Genes Dev*, 2009,23:2140-2151.
- [13] Sossey-Alaoui K, Bialkowska K, Plow E F. The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion[J]. *J Biol Chem*, 2009,284:33019-33029.
- [14] Lan H Y. Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. *Int J Biol Sci*, 2011,7:1056-1067.
- [15] Rosati J, Spallotta F, Nanni S, Grasselli A, Antonini A, Vincenti S, et al. Smad-interacting protein-1 and microRNA 200 family define a nitric oxide-dependent molecular circuitry involved in embryonic stem cell mesoderm differentiation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011,31:898-907.