

MicroRNA-520a通过失活AKT抑制HepG2.2.15细胞中HBV DNA复制

孙巍, 丁晓燕, 陈京龙, 李文东, 郭晓笛, 申燕军, 滕颖, 刘晓民, 魏建莹 (首都医科大学附属北京地坛医院 肿瘤科, 北京 100015)

摘要: 目的 探讨microRNA-520a (miR-520a) 抑制HepG2.2.15细胞中HBV DNA复制的机制。方法 通过Entrez Nucleotide数据库预测AKT是否为miRNA-520a的靶基因。通过RT-qPCR和Western blot验证miRNA-520a是否调控HepG2.2.15细胞中AKT的表达, 研究miRNA-520a模拟物及其抑制剂对HepG2.2.15细胞中HBV DNA转录和复制的影响。评价siRNA对AKT mRNA和蛋白表达以及HBV DNA转录和复制的作用。结果 在HepG2.2.15细胞中, AKT为miRNA-520a的靶基因, miRNA-520a通过抑制AKT表达可进一步抑制HepG2.2.15细胞中HBV DNA的转录和复制。AKT表达下调受siRNAs诱导, 同时抑制HepG2.2.15细胞中HBV的转录和复制。结论 MiRNA-520a可抑制AKT表达, 进而抑制HBV DNA转录和复制, 其可能成为治疗HBV感染的新靶点。

关键词: microRNA; 肝炎病毒, 乙型; HBV DNA; AKT

MicroRNA-520a suppresses HBV replication in HepG2.2.15 by inactivating AKT

SUN Wei, DING Xiao-yan, CHEN Jing-long, LI Wen-dong, GUO Xiao-di, SHEN Yan-jun, TENG Ying, LIU Xiao-min, WEI Jian-ying (Department of Oncology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of replication inhibition of HBV DNA in HepG2.2.15 cells through inactivated AKT regulated by miR-520a. **Methods** The online Entrez Nucleotide database was taken to identify whether AKT was the target gene of miRNA-520a. RT-qPCR and Western blot assay were applied to confirm whether miRNA-520a regulate the expression of AKT in HepG2.2.15 cells. Moreover, the effects of miRNA-520a on transcription and replication of HBV DNA in HepG2.2.15 was assessed. The roles of siRNA on the expression of AKT mRNA and protein, also HBV transcription and replication were evaluated. **Results** In HepG2.2.15 cells, AKT was the target gene of miRNA-520a, miRNA-520a could control the transcription and replication of HBV DNA by inhibiting AKT expression. AKT expression was down-regulated significantly by its siRNAs, which gave rise to a remarkable suppression of HBV transcription and replication in HepG2.2.15 cells. **Conclusions** MiRNA-520a led to the inhibition of AKT expression, and then inhibited the transcription and replication of HBV DNA. It was shown that miRNA-520a may be a novel target for treatment of HBV infection.

Key words: MicroRNA; Hepatitis B virus; HBV DNA; AKT

每年约超过75万人死于与HBV有关的感染性疾病^[1,2]。肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 作为最常见的恶性肿瘤之一, 病死率多年位居前三位。在全球55%的病例中, HCC的主要危险因素通常被认为是HBV慢性感染^[3]。诸多证据表明, miRNA与HBV生命周期及其感染能力密切

相关, HBV也可调节宿主miRNA的表达, 从而为自身存活和复制提供更有利的环境。明确HBV和miRNA间的关系有助于更有效地治疗HBV相关疾病^[3-5]。本课题组前期通过生物信息学预测和实验证实, 过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α) 是miR-520a的靶基因^[6]。有研究发现, HCC组织中microRNA-520a表达显著下调, 其可能抑制HCC

进展^[7], 通过siRNA下调PPAR α 的表达可进一步抑制HBV复制^[7]。前期研究表明, miR-520a可抑制HepG2.2.15细胞中HBV复制, 但具体机制尚未明确, 而AKT被预测为miR-520a的靶基因。因此, 本研究旨在明确通过与AKT相关的miR-520a抑制HBV复制的机制。

1 资料和方法

1.1 细胞培养 HepG2.2.15 细胞系购美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC)。培养条件: DMEM 培养基(内含 G418 抗生素、青霉素、链霉素和 FBS)、37℃、5% CO₂ 的湿润培养箱中培养。

1.2 主要试剂 Lipofectamine 2000、mirVanaTM miRNA 分离试剂盒、miRNA 前体和抑制剂以及 TaqMan miRNA 分析试剂盒购自 Life Technologies 公司。用于检测 AKT 的 3'-UTR 荧光素酶报告基因检测试剂盒(S900042)购自 SwitchGear 公司。用于细胞增殖的测定试剂盒购自 Pro mega 公司。AKT 的干扰 siRNA(sc-38910)及对照 siRNA(sc-37077)购自 Santa Cruz 公司。人 miR-520a 前体购自 Applied Biosystems 公司(KIT 001168), 抗 miR-520a(GS574467)及阴性对照(NC)(SI03650325)购自 QIAGEN。根据 Lipofectamine 2000 说明, 转染 miR-520a 的前体或抑制剂以及 AKT siRNA。

1.3 定量逆转录聚合酶链式反应 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 随后进行反转录。使用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 检测系统进行定量逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 以 GAPDH 为内参。使用 qRT-PCR 确定内源性 miR-520a 的表达水平, 并使用 RNU6B 对数据进行标准化, 序列见表 1。

1.4 Western blot 从裂解细胞中提取总蛋白并测定蛋白浓度。使用 BioRad 系统进行 Western blot 分析。抗 β -actin 和 AKT 为一抗, 购自 Santa Cruz 公司。二抗为缀合的辣根过氧化物酶, 购自 CST。使用 ECL 法检测蛋白条带。

1.5 HBV DNA 的检测 应用 miR-520a 抑制剂或模拟物转染后, 分别在第 12 h、24 h、36 h 和 48 h 收集培

养的 HepG2.2.15 细胞上清液。用 HBsAg Diagnose Kit 和 HBeAg Diagnose Kit 分别检测 HepG2.2.15 细胞上清液中 HBsAg 和 HBeAg 水平, 试剂盒购自中国上海科华生物技术公司。用 miR-520a 的模拟物或抑制剂转染后, 在感染后的第 12 h、24 h、36 h 和 48 h 从病毒核心颗粒中提取细胞内 HBV DNA^[7]。从细胞裂解物中除去细胞核和细胞碎片, 用微球菌核酸酶在 37℃ 消化上清液 2 h。病毒 DNA 分离后用 RT-PCR 方法测定^[8]。

1.6 荧光素酶报告分析 通过对 miRNA 靶标预测的鉴定试验, 从 HepG2.2.15 细胞基因组 DNA 中通过 PCR 扩增预测具有靶位点的 miR-520a 的 3'-UTRs 区域, 然后将其克隆到 pGL4 质粒中。使用 Lipofectamine TM 2000 将 miRNA 抑制剂或模拟物及阴性对照转染到 HepG2.2.15 细胞中。使用双荧光素酶报告测定系统分析荧光素酶的活性。

1.7 统计学处理 使用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用 *t* 检验或方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-520a 抑制 HepG2.2.15 中 AKT 的表达 miR-520a 处理的 HepG2.2.15 中 3'-UTR AKT 荧光素酶相对活性显著低于对照组($t = 0.023, P = 0.001$), 表明 miR-520a 直接与 AKT 的 mRNA 相结合, 见图 1A。Western blot 蛋白免疫印迹试验表明, miR-520a 抑制 HepG2.2.15 中 AKT 的表达(图 1B)。

2.2 MiR-520a 抑制 HBsAg、HBeAg 的表达及 HBV DNA 的复制 miR-520a 可显著抑制 HBV 的复制, miR-520a 模拟物可显著抑制 HBsAg 和 HBeAg 的表达, 见图 2。HepG2.2.15 细胞中, miR-520a 以时间依赖方式显著抑制 HBV DNA 复制, 见图 3。miR-520a 抑制剂可有效激活 HBV DNA 的复制, 使 HBsAg 和 HBeAg 表达水平显著增加(图 2)或以时间依赖性方式显著激活 HBV DNA 的复制(图 3)。以上结果均表明 miR-520a 以时间依赖性方式抑制 HBV DNA 的复制。

2.3 AKT 功能与 HBV DNA 复制有关 AKT 特异性

表 1 各检测模板的目标序列

目的基因	目标序列
micro-520a	5'-UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG-3'
RNU6B	5'-CGCAAGGAUGACACGCAAAUUCGUGAAGCGUCCAUAUUUUU-3'
RNU48	5'-GAUGACCCAGGUAACUCUGAGUGUGUCGUGAUGCCAUCACCGCAGCGCUCUGACC-3'

注: 以 RNU6B 和 RNU48 为内参进行试验的质量控制

siRNA 可诱导 AKT 表达水平显著下调（图 4A、4B），HepG2.2.15 细胞中 AKT 表达水平降低可能 是以时间依赖方式显著抑制 HBV DNA 的复制（图 4C ~ 4E）。

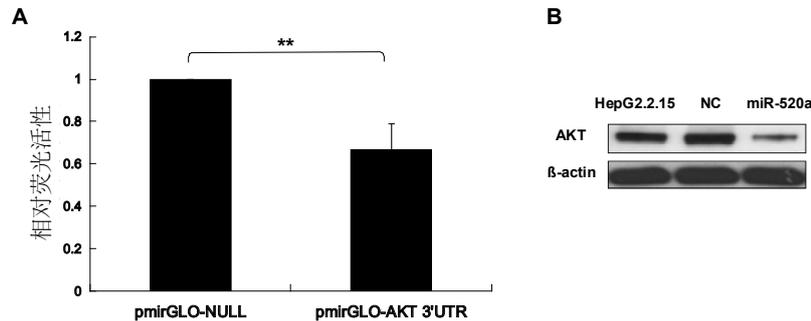


图 1 MiR-520a 抑制 HepG2.2.15 细胞中 AKT mRNA 及其蛋白的表达

注：A 为荧光素酶报告基因检测结果，与对照组相比，用 miR-520a 转染的 HepG2.2.15 中 AKT 的 3'-UTR 荧光素酶相对活性显著降低 ($t = 0.023$, $P = 0.001$)，表明 AKT mRNA 是 miR-520a 的直接目标；B 为 Western Blot 蛋白免疫印迹试验结果，表明 miR-520a 抑制 HepG2.2.15 中 AKT 的表达；** $P < 0.01$

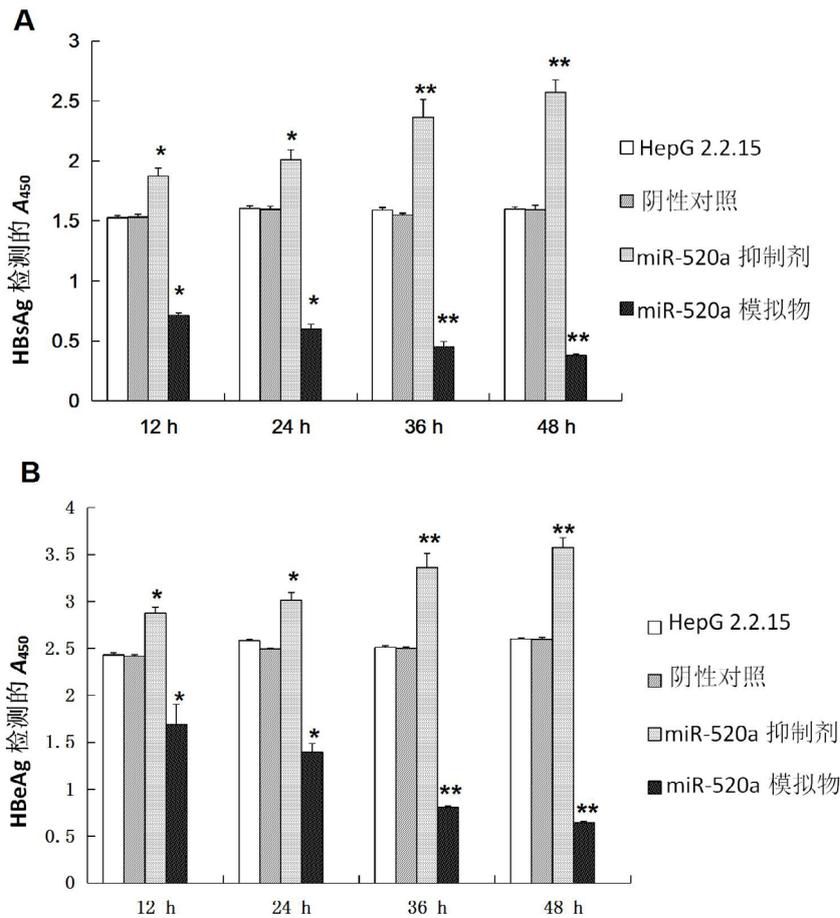


图 2 MiR-520a 抑制 HBsAg 和 HBeAg 的表达

注：A. 与对照组相比，miR-520a 抑制组和 miR-520a 组 12 h 时 t 值分别为 0.018、0.051， P 值分别为 0.031、0.018；24 h 时 t 值分别为 0.034、0.042， P 值分别为 0.022、0.013；36 h 时 t 值分别为 0.068、0.063， P 值分别为 0.008、0.006；48 h 时 t 值分别为 0.091、0.037， P 值分别为 0.001、 < 0.001 。B. 与对照组相比，miR-520a 抑制组和 miR-520a 组 12 h 时 t 值分别为 0.048、0.059， P 值分别为 0.043、0.032；24 h 时 t 值分别为 0.064、0.073， P 值分别为 0.026、0.025；36 h 时 t 值分别为 0.071、0.075， P 值分别为 0.009、0.008；48 h 时 t 值分别为 0.056、0.041， P 值分别为 0.003、0.001；* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

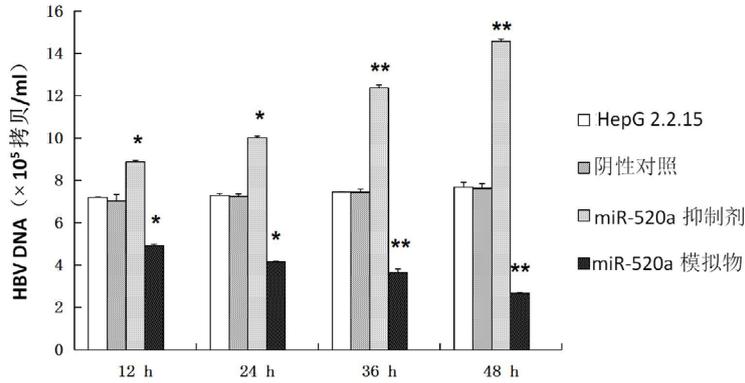


图3 MiR-520抑制HBV DNA复制

注: 与对照组相比, miR-520a 抑制组和 miR-520a 组 12 h 时 t 值分别为 0.047、0.062, P 值分别为 0.035、0.023; 24 h 时 t 值分别为 0.053、0.031, P 值分别为 0.029、0.024; 36 h 时 t 值分别为 0.028、0.079, P 值分别为 0.009、0.007; 48 h 时 t 值分别为 0.088、0.023, P 值分别为 0.005、0.003; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

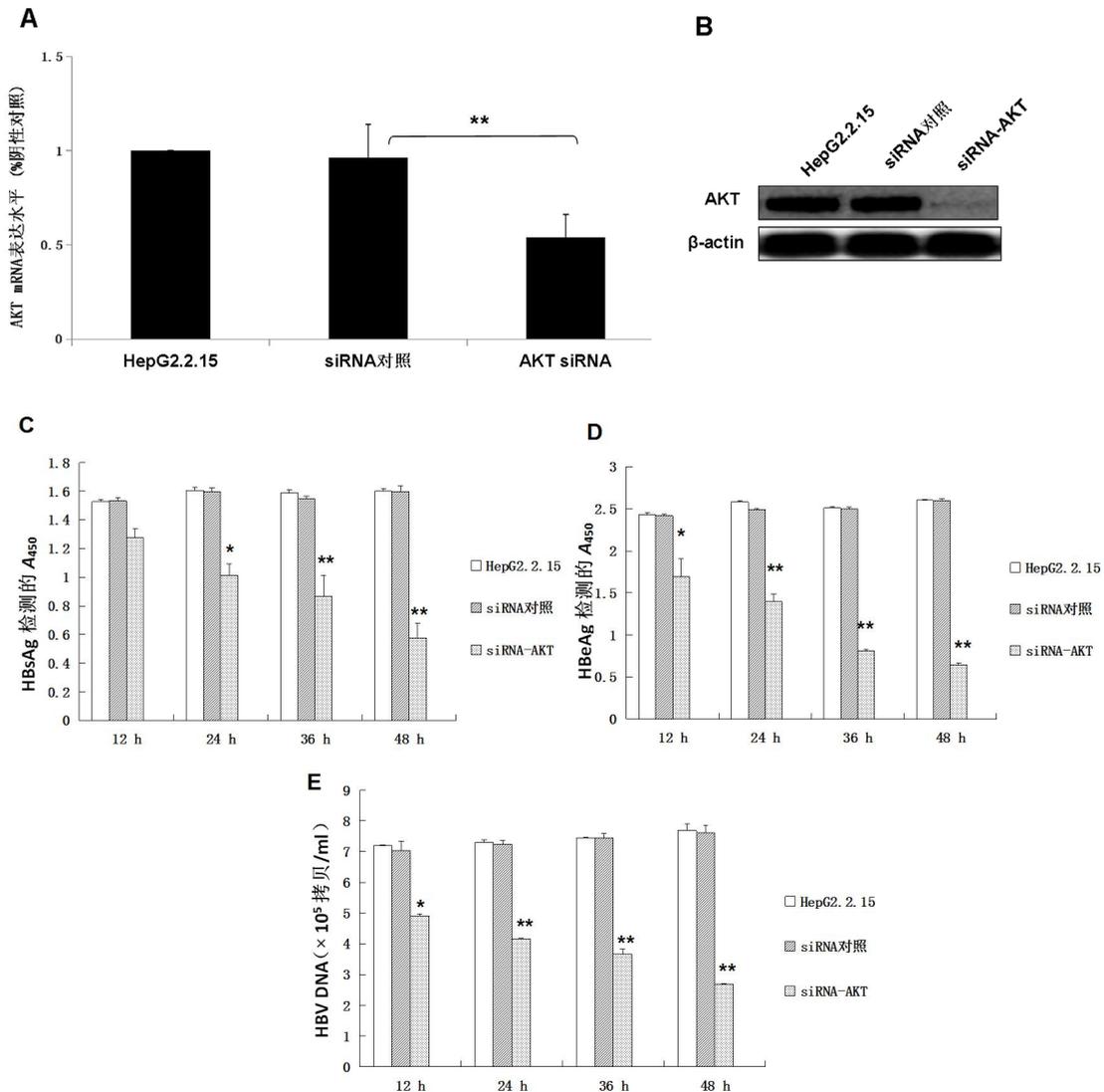


图4 siRNA 沉默 AKT 表达并抑制 HepG2.2.15 细胞中的 HBV DNA 复制

注: 用特异性干扰 AKT 表达的 siRNA 转染 HepG2.2.15 细胞 48 h 后, 分别通过半定量 RT-PCR (A) 和 Western blot (B) 分析 HepG2.2.15 细胞中 AKT mRNA (A) ($t = 0.045$, $P = 0.000$) 和蛋白 (B) 的表达水平, 均显著下调。分别在转染后 12 h、24 h、48 h 和 72 h 测定 HBsAg (C) 和 HBeAg 表达水平 (D), 与对照组相比, HBsAg 12 h、24 h、48 h 和 72 h t 值分别为 0.026、0.039、0.082、0.071, P 值分别为 0.073、0.048、0.005、0.002; HBeAg 12 h、24 h、48 h 和 72 h t 值分别为 0.034、0.052、0.063、0.044, P 值分别为 0.047、0.041、0.003、 < 0.001 。转染后 72 h 测定 HBV DNA 载量 (E), 与 siRNA 阴性对照标准化后的百分比值相比, 12 h、24 h、48 h 和 72 h t 值分别为 0.046、0.058、0.075、0.064, P 值分别为 0.039、0.028、0.007、0.003; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

HBV感染与HCC发生和发展密切相关。HBx蛋白(HBV X蛋白)具有多种功能:①可调控肝癌的发生,可作为反式激活因子影响核因子NF- κ B,进一步调控肝癌的转移^[9,10];②HBx可分别调控非编码RNA(ncRNA),如长ncRNAs(lncRNAs)和microRNAs,也可影响肝癌细胞的生物学功能^[11];③HBx与表观遗传修饰相关,如乙酰化和甲基化,与肝癌的发生发展密切相关^[12];④HBx与各种信号转导途径相互作用,包括转录激活因子NF- κ B或信号转导通路Wnt/ β -连环蛋白,蛋白激酶B/Akt^[13,14];⑤HBx可通过改变细胞生长和凋亡间的平衡来影响细胞存活;⑥HBx可促进HCC的进展^[15],其可通过激活AKT抑制肝细胞凋亡和HBV复制,从而在HBV复制过程中发挥关键作用。HBx通过抑制转录因子HNF4 α (肝细胞核因子4 α)的活性进一步调控HBV的复制过程,最终影响HBV的复制水平^[16]。HBx激活AKT并通过促进HBV的复制而与肝癌的发生密切相关^[14]。HBV感染在肝癌的发生发展过程中发挥至关重要的作用。因此,AKT可能是抑制HBV复制和HBV相关HCC发展的重要治疗靶点。

血清中miR-181b水平与血清HBV DNA水平有关,进而影响慢性乙型肝炎进展^[15]。为证实miRNA是否调节HepG2.2.15中AKT的表达,本研究首先应用在线软件(DIANA microT v4.0)预测了靶向AKT的miRNA。此外,通过UTR荧光素酶报告基因测定进一步证实miR-520a与AKT的3'-UTRs直接结合。结果显示,在转染miR-520a的HepG2.2.15细胞中,AKT 3'-UTR的相对荧光素酶活性显著降低,证实miR-520a直接调控其靶基因AKT的mRNA表达,进而抑制HepG2.2.15中AKT的表达。

miRNAs为非编码RNAs,是可持续存在而影响基因表达的小RNAs,可根据mRNA序列抑制mRNA靶基因的翻译或降解mRNAs来介导转录后的基因沉默^[17]。最新研究表明,miRNA参与细胞分化、发育、增殖和肿瘤发生等多种细胞过程^[18-20]。但有关miRNAs对HBV功能及对HBV相关HCC影响的研究证据非常有限。本研究结果表明,miR-520a可直接调节AKT的表达,miR-520a以时间依赖方式显著抑制HBsAg和HBeAg的表达水平以及HBV DNA的复制。miR-520a抑制剂可有效激活HBV DNA复制,并导致HBsAg和HBeAg表达水平显著上调。同时,miR-520a抑制剂也能以时间依赖方式显著激活HBV DNA的复制。这都表明AKT在HBV DNA复制中发挥关键作用。进一步应用特异性抑制

AKT表达的siRNA建立稳定转染的HepG2.2.15细胞模型,结果提示HepG2.2.15细胞中AKT表达显著下调,同时以时间依赖的方式明显抑制HBV DNA复制。

综上,本研究表明miRNA-520a诱导AKT表达下调,进一步抑制HBV DNA的转录和复制。miRNA-520a可能是HBV治疗的新靶点。miRNA-520a可在HepG2.2.15细胞中抑制与AKT信号转导途径相关的HBV复制。

参考文献

- [1] Seeger C. Control of viral transcripts as a concept for future HBV therapies[J]. *Curr Opin Virol*,2018,30:18-23.
- [2] Mizuguchi Y, Takizawa T, Uchida E. Host cellular microRNA involvement in the control of hepatitis B virus gene expression and replication[J]. *World J Hepatol*,2015,7(4):696-702.
- [3] Zhang B, Han S, Feng B, et al. Hepatitis B virus X protein-mediated non-coding RNA aberrations in the development of human hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Med*,2017,49(2):e293.
- [4] Qiu L, Tang Q, Li G, et al. Long non-coding RNAs as biomarkers and therapeutic targets: Recent insights into hepatocellular carcinoma[J]. *Life Sci*,2017,191:273-282.
- [5] Van Hees S, Michielsens P, Vanwolleghem T. Circulating predictive and diagnostic biomarkers for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*,2016,22(37):8271-8282.
- [6] Du L, Ma Y, Liu M, et al. Peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) agonists activate hepatitis B virus replication in vivo[J]. *Virology*,2017,14(1):96.
- [7] 张玉睿. microRNA-520a与HBV相关肝细胞癌临床病理学特征的相关性分析[J]. *临床肝胆病杂志*,2017,33(4):689-693.
- [8] Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA[J]. *Science*, 2005,309(5740):1577-1581.
- [9] Zhang Q, Song G, Yao L, et al. miR-3928v is induced by HBx via NF- κ B/EGFR1 and contributes to hepatocellular carcinoma malignancy by down-regulating VDAC3[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2018,37(1):14.
- [10] Liu C, Liu L, Wang X, et al. HBV X Protein induces overexpression of HERV-W env through NF- κ B in HepG2 cells[J]. *Virus Genes*, 2017,53(6):797-806.
- [11] Kong XX, Lv YR, Shao LP, et al. HBx-induced MiR-1269b in NF- κ B dependent manner upregulates cell division cycle 40 homolog (CDC40) to promote proliferation and migration in hepatoma cells[J]. *J Transl Med*,2016,14(1):189.
- [12] Fan H, Zhang H, Pascuzzi PE, et al. Hepatitis B virus X protein induces EpCAM expression via active DNA demethylation directed by RelA in complex with EZH2 and TET2[J]. *Oncogene*,2016,35(6):715-726.
- [13] Li M, Hu L, Zhu F, et al. Hepatitis B virus X protein promotes renal epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubule epithelial cells through the activation of NF- κ B[J]. *Int J Mol Med*,2016,38(2):513-520.
- [14] Zhu M, Guo J, Li W, et al. HBx induced AFP receptor expressed to activate PI3K/AKT signal to promote expression of Src in liver cells and hepatoma cells[J]. *BMC Cancer*,2015,15:362.

- [15] Yu F, Zhou G, Li G, Chen B, et al. Serum miR-181b is correlated with hepatitis B virus replication and disease progression in chronic hepatitis B patients[J]. Dig Dis Sci,2015,60(8):2346-2352.
- [16] Chen JY, Chen YJ, Yen CJ, et al. HBx sensitizes hepatocellular carcinoma cells to lapatinib by up-regulating ErbB3[J]. Oncotarget, 2016,7(1):473-489.
- [17] Liu H, Lei C, He Q, et al. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer[J]. Mol Cancer,2018,17(1):64.
- [18] Xiao Z, Shen J, Zhang L, et al. Therapeutic targeting of noncoding RNAs in hepatocellular carcinoma: Recent progress and future prospects[J]. Oncol Lett,2018,15(3):3395-3402.
- [19] Monastyrskaya K. Functional association between regulatory RNAs and the annexins[J]. Int J Mol Sci,2018,19(2):pii: E591. doi: 10.3390/ijms19020591.
- [20] Mahdiannasser M, Karami Z. An innovative paradigm of methods in microRNAs detection: highlighting DNazymes, the illuminators[J]. Biosens Bioelectron,2018,107:123-144.

收稿日期: 2018-02-22

孙巍, 丁晓燕, 陈京龙, 等. MicroRNA-520a通过失活AKT抑制HepG2.2.15细胞中HBV DNA复制[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018,10(4):73-78.

· 编者 · 作者 · 读者 ·

《中国肝脏病杂志(电子版)》视频及幻灯文献引用格式说明

为了更好地发挥医学学术性电子期刊的文献作用,方便和规范引用电子期刊的视频文献和幻灯文献,现将文献著录和引用规范试用说明如下。

1.在制作视频及幻灯文献时体例格式应规范,片头应有片名、著作者姓名及单位,片尾应有责任编辑、制作者、出版者及其单位。

2.视频和幻灯文献引用格式标注在视频或幻灯文献播放窗口下方,方便读者引用。视频或幻灯文献著录格式:周祥福.截石位经皮肾镜取石术及经尿道前列腺电切术[J/CD].中华腔镜泌尿外科杂志:电子版,2010,4(1).

3.视频和幻灯文献科学引用相关文献。①视频文献:在正片结束后(即制作者及出版者署名前)列出本片的所有引用文献,引用文献按在视频中出现的先后顺序编码著录。②幻灯文献:作者引用的文献须随幻灯同页面标注,标注在当前页面最下方,格式:[1]刘志华,周祥福.输尿管下段结石的治疗进展[J/CD].中华腔镜泌尿外科杂志:电子版,2010,4(1):76-78.引用文献按在幻灯片中出现的先后顺序编码著录,并在幻灯课件最后再次按顺序列出所有引用文献。③文献引用具体格式依据“GB/T 7714-2005文后参考文献著录规则”(即同文本文章的文献著录格式)。

本刊编辑部