

## MicroRNA-34a 调控细胞衰老的研究\*

杨鸣鸣, 范雪娇, 杜文婷, 任鹏亮, 刘 戟<sup>△</sup>

四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨微 RNA-34a(miRNA-34a)对细胞通过调控沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 1(SIRT1)的表达,从而引起细胞衰老的作用。方法 构建 pre-miRNA-34a 表达载体,并将其和一个不针对任何基因的微小 RNA-1792(miRNA-1792)表达载体(其他实验室赠送)分别转染至 HEK293 和 HUVEC 细胞内,用 RT-PCR、Western blot 检测各细胞组 SIRT1 mRNA 与蛋白表达水平,以未转染的细胞为对照;将 HUVEC 细胞分为转染不同质粒、未转染质粒和用 SIRT1 激活剂白藜芦醇(终浓度 1  $\mu$ mol/L,作用 2 h)处理 HUVEC 细胞(HUVEC-Res)组,中性彗星电泳分析 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 2 h 后 4 组 HUVEC 细胞的双链损伤情况;用阿霉素处理上述 4 组 HUVEC 细胞 2 h, $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -gal)染色检测各细胞不同时间点的衰老情况。结果 测序结果表明 pre-miRNA-34a 表达载体构建成功;RT-PCR、Western blot 显示 HEK293-pre-miRNA-34a 和 HUVEC-pre-miRNA-34a 中 SIRT1 mRNA 和蛋白质表达的水平明显下降( $P<0.001$ );中性彗星电泳检测发现经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后,HUVEC-Res 组 DNA 损伤最轻,而 HUVEC-miRNA-34a 组 DNA 损伤程度最为严重;SA- $\beta$ -gal 染色显示 DNA 损伤后 HUVEC-miRNA-34a 衰老程度较其它 3 组严重,而 HUVEC-Res 组的衰老程度最为轻微。结论 miRNA-34a 通过抑制 SIRT1 表达调控细胞衰老。

**【关键词】** miRNA-34a SIRT1 细胞衰老 DNA 损伤

**Research on Regulation of Cell Senescence by MiRNA-34a** YANG Ming-ming, FAN Xue-jiao, DU Wen-ting, REN Peng-liang, LIU Ji<sup>△</sup>. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: liuji6103@scu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To determine miRNA-34a regulated cell senescence indirectly through targeting silent mating-type information regulation 2 homologue 1 (SIRT1) *in vitro* experiment. **Methods** A constructed pre-miRNA-34a expression vector and a miRNA-1792 expression vector (not directly against any gene) were transfected into HEK293 and HUVEC cell lines respectively. The expression levels of SIRT1 in each cell groups were detected by RT-PCR and Western blot. The HUVEC cells were divided into different group: transfected with pre-miRNA-34a expression vector (HUVEC-pre-miRNA-34a), transfected with miRNA-1792 expression vector (HUVEC-pre-miRNA-1792), treated HUVEC cell with SIRT1 activator resveratrol (final concentration 1  $\mu$ mol/L, treatment for 2 h)(HUVEC-Res), and HUVEC cells without any treatment as the control. Comet assay was applied to detect the oxidative damage of above-mentioned cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment for 2 h, and beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining was used to detect the senescence of them in different time points after doxorubicin treatment for 2 h. **Results** Pre-miRNA-34a expression vector was constructed successfully by sequencing confirmation. RT-PCR and Western blot indicated that the overexpression of miRNA-34a down regulated mRNA and protein level of SIRT1 in HEK293-miRNA-34a and HUVEC-miRNA-34a cell groups ( $P<0.001$ ). Comet assay revealed that HUVEC-miRNA-34a cell group was the most sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, and the DNA damage of HUVEC-Res cell group was the most minor. HUVEC-miRNA-34a cell group displayed higher frequency of SA- $\beta$ -gal staining than that of other cell groups. **Conclusion** miRNA-34a regulated cell senescence indirectly through targeting SIRT1.

**【Key words】** miRNA-34a SIRT1 Cell senescence DNA damage

微 RNA(microRNA, miRNA)是近几年继小分

子干扰(siRNA)之后非编码 RNA 研究的又一热点。miRNA 是一类长度约为 20~25 nt 的单链小分子 RNA(少数小于 20 nt),通过与靶 mRNA 的特异性结合,在转录后水平上对基因表达进行调控。越来越多研究表明 miRNA 参与细胞衰老进程<sup>[1,2]</sup>。

\* 教育部博士点基金新教师项目(No. 20070610124)和教育部留学回国人员启动基金项目(No. 2008890-19-11)资助

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: liuji6103@scu.edu.cn

miRNA 微阵列结果显示,哺乳动物体内 miRNA-34a 表达水平随年龄增大而升高,但作用机制尚不明确。Sirtuin 蛋白家族(SIR)是进化过程中非常保守的蛋白酶,研究显示,SIR2 通过介导基因沉默稳定基因组,并延长机体寿命。哺乳动物有 7 个 SIR2 同源基因,其中沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 1(SIRT1)是与 SIR2 同源性最高的依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)的组蛋白 III 类去乙酰化酶,参与细胞能量代谢、基因转录、染色质沉默及调控细胞氧化、凋亡、老化等生命进程。通过查询 miRNA 靶标数据库 miRNABase<sup>[3]</sup>、miRNAGen<sup>[4]</sup> 等,我们推测 3' 末端非翻译区(SIRT1-3'UTR)可能是 miRNA-34a 作用的下游靶基因,共同参与细胞衰老的调控。为探讨 miRNA-34a 对细胞衰老的影响,本研究通过构建外源性 pre-miRNA-34a 表达载体,检测转染细胞 SIRT1 表达水平;采用彗星电泳、 $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -gal)染色观察 DNA 损伤及细胞的衰老情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株、细胞系** MDH1-PGK-GFP\_2.0 载体、MDH1-PGK-GFP\_2.0-pre-miRNA-1792 表达载体(四川大学华西基础医学与法医学院生物医学工程系赠送);DH5 $\alpha$ (北京天根生化科技有限公司);HEK293(四川大学生物治疗国家重点实验室赠送);HUVEC(四川大学华西药学院赠送)。

**1.1.2 主要试剂与材料** 限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I (Fermentas,CAN);质粒小量抽提试剂盒及琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(北京博迈德);白藜芦醇、阿霉素(Sigma,USA);TRIZOL Reagent、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen,USA);兔抗人 SIRT1 多克隆抗体、 $\beta$ -actin(SantaCruz,USA);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物科技有限公司);发光底物显色液、BeyoRT M-MuLV 反转录酶、SA- $\beta$ -gal 染色试剂盒(碧云天生物技术公司);4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)(Amresco,USA);其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 pre-miRNA-34a 载体的设计与构建** 根据 ensemble 网站提供的 miRNA-34a 序列,利用 Primer5 引物设计软件自行设计引物,选择 MDH1-PGK-GFP\_2.0 载体中的 *Xho* I、*Eco*R I 为酶切位点。引物序列:上游引物 5'-CCG-CTCGAG(*Xho*

I)-CTCCTGCATCCTTTCTTTCC-3';下游引物 5'-CCG-GAATTC (*Eco*R I)-TTCCGAAGTCCTGGCGTCT-3'。设计完成后,将上述序列交由上海生工公司合成。利用合成好的引物,以人类细胞基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增出与设计相符的 pre-miRNA-34a 片段(272 bp),将 PCR 产物克隆到经 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切的 MDH1-PGK-GFP\_2.0 载体中并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,通过氨苄霉素筛选,*Eco*R I、*Xho* I 双酶切和 PCR 验证,华大公司基因测序鉴定,证明获得组装成功的重组质粒,即 MDH1-PGK-GFP\_2.0-pre-miRNA-34a 表达载体。

**1.2.2 细胞的培养与转染** 分别用含 10%和 20%胎牛血清的 DMEM 培养 HEK293 和 HUVEC 细胞,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下培养。用 0.25%胰酶消化传代,以 1.5 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔接种培养在 6 孔板中,16 h 后利用脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 将 MDH1-PGK-GFP\_2.0-pre-miRNA-34a 表达载体转染 HEK293 细胞(HEK293-pre-miRNA-34a)和 HUVEC 细胞(HUVEC-pre-miRNA-34a),置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h 后,通过荧光倒置显微镜观察质粒 DNA 的转染效果。

**1.2.3 RT-PCR 检测沉默效果** 采用 RT-PCR 检测转染表达载体的 HEK293 和 HUVEC 细胞 SIRT1 mRNA 的表达,以未转染细胞为对照。Trizol 法抽提细胞总 RNA,取 2  $\mu$ g RNA 反转录制备 cDNA。SIRT1 的 RT-PCR primer(目的产物 222 bp):Forward 5'-GCTGATGAACCGCTTGCTAT-3',Reverse 5'-AATGCAGATGAGGCAAAGGT-3'。 $\beta$ -actin 的 RT-PCR primer(目的产物为 194 bp):Forward 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3',Reverse 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 45 s,50 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,上述条件循环 30 次;最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。SIRT1 mRNA 相对含量用 SIRT1/ $\beta$ -actin 灰度比值表示。

**1.2.4 Western blot 检测沉默效果** 采用 Western blot 检测转染表达载体的 HEK293 和 HUVEC 细胞 SIRT1 蛋白质的表达,以未转染细胞为对照。用 RIPA 裂解液裂解各细胞,提取总蛋白,用 BCA 法测各组蛋白浓度,制备 100 g/L SDS-PAGE,每泳道加总蛋白量 45  $\mu$ g,进行 90 V/150 V 恒压电泳,经 0.8~1 mA/cm<sup>2</sup>、30 min 半干转移到 PVDF 膜上,加 5%BSA/TBST 室温封闭 2 h,分别

加入 1:1000 稀释的一抗兔抗 SIRT1 多克隆抗体及一抗鼠抗  $\beta$ -actin 抗体,4 °C 过夜, TBST 洗涤后, 将 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗加入含 SIRT1 和  $\beta$ -actin PVDF 膜中,37 °C 孵育 1.5 h, TBST 洗涤, ECL 化学发光试剂显影。SIRT1 蛋白相对含量用 SIRT1/ $\beta$ -actin 灰度比值表示。

**1.2.5 彗星电泳** 将 HUVEC 细胞分为 4 组: 转染 MDH1-PGK-GFP\_2.0-pre-miRNA-34a 表达载体组 (HUVEC-pre-miRNA-34a)、转染不针对任何基因的对照 MDH1-PGK-GFP\_2.0-miRNA-1792 表达载体组 (HUVEC-pre-miRNA-1792)、用 SIRT1 激活剂白藜芦醇 (终浓度 1  $\mu$ mol/L, 处理 2 h) 处理组 (HUVEC-Res) 以及不做任何处理的细胞组 (HUVEC)。选取 2 个时间点: 用 400  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  处理细胞 2 h ( $H_2O_2$ +2 h) 以及处理 2 h 后换成正常培养基 2 h ( $H_2O_2$ -2 h)。将上述各组各时间点的细胞离心重悬制备成细胞悬液。先将 10 g/L 普通熔点琼脂糖铺于毛玻片上, 再将 40 °C 预热的 0.5 g/L 低熔点琼脂糖 75  $\mu$ L 与 5~10  $\mu$ L 细胞悬液混匀后铺第二层, 立即盖上盖玻片, 置 4 °C 固化 5 min; 移去盖玻片后将标本浸入裂解液 4 °C 避光 2 h, 取出载玻片, 置入电泳槽中, 避光解旋 20 min。25 V, 300 mA, 电泳 30 min。冰冷 PBS 洗 3 次, 5  $\mu$ g/mL DAPI 染色, 荧光显微镜下观察。

**1.2.6 衰老染色** 细胞分组同 1.2.5, 用 24 孔板培养各组细胞, 取阿霉素 (DOX 1  $\mu$ mol/L) 处理对数生长期的细胞 2 h 后换成正常培养基继续培养, 将上述细胞在 24 h、72 h、120 h 3 个时间点用 SA- $\beta$ -gal 试剂盒进行染色, 普通光学显微镜下观察, 细胞产生蓝色沉淀为阳性 (即衰老细胞), 并对衰老细胞所占的百分比进行计数。

**1.2.7 统计学方法** 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组载体构建转染结果

MDH1-PGK-GFP\_2.0-pre-miRNA-34a 重组载体经测序鉴定与预期结果一致。

MDH1-PGK-GFP\_2.0 载体质粒转染细胞 24 h 后, 荧光显微镜观察显示 90% 以上的细胞中有质粒 DNA 的导入。

### 2.2 RT-PCR 和 Western blot 检测转染重组载体后 SIRT1 mRNA 和蛋白的表达

由图 1 及表 1 可见: HEK293-pre-miRNA-34a 与 HUVEC-pre-miRNA-34a 组 SIRT1 mRNA 和蛋白质表达丰度明显下调 ( $P < 0.001$ ), 表明 miRNA-34a 对 SIRT1 表达的靶向下调作用。

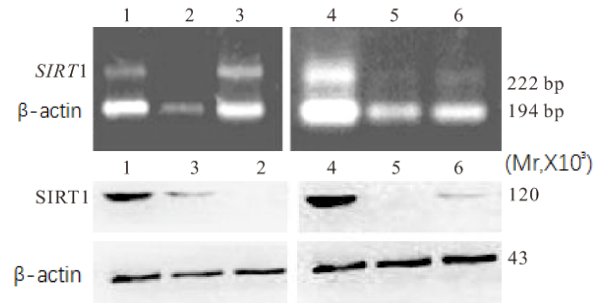


图 1 HEK293、HUVEC 各组细胞 SIRT1 的表达水平

Fig 1 SIRT1 expression level in HEK293, HUVEC groups

1: HEK293; 2: HEK293-pre-miRNA-34a; 3: HEK293-pre-miRNA-1792; 4: HUVEC; 5: HUVEC-pre-miRNA-34a; 6: HUVEC-pre-miRNA-1792

表 1 HEK293、HUVEC 各组细胞 SIRT1 的表达水平 ( $n=5$ )

Table 1 SIRT1 expression level in HEK293, HUVEC groups ( $n=5$ )

	SIRT1/ $\beta$ -actin mRNA	SIRT1/ $\beta$ -actin protein
HEK293	0.78 $\pm$ 0.06*	0.83 $\pm$ 0.04*
HEK293-pre-miRNA-34a	0.25 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.03
HEK293-pre-miRNA-1792	0.70 $\pm$ 0.05*	0.76 $\pm$ 0.05*
HUVEC	0.92 $\pm$ 0.05 $\Delta$	0.95 $\pm$ 0.02 $\Delta$
HUVEC-pre-miRNA-34a	0.41 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.03
HUVEC-pre-miRNA-1792	0.80 $\pm$ 0.03 $\Delta$	0.91 $\pm$ 0.02 $\Delta$

\*  $P < 0.001$ , vs. HEK293-pre-miRNA-34a group;  $\Delta$   $P < 0.001$ , vs. HUVEC-pre-miRNA-34a group

### 2.3 彗星电泳结果

经  $H_2O_2$  处理 2 h 后 HUVEC-miRNA-34a DNA 损伤程度最严重, 彗尾明显, 而 HUVEC-Res 无明显彗尾, 损伤相对其他两组较轻。  $H_2O_2$  处理后换成正常培养基, 同样可以观察到每组不同程度的损伤, 说明即使 DNA 损伤剂消除, 当细胞内一些修复蛋白相关因子如 SIRT1 被沉默后, DNA 损伤事件仍然存在 (图 2)。

### 2.4 SA- $\beta$ -gal 衰老染色结果

由图 3 可见, 4 组 HUVEC 细胞经过 DOX (1  $\mu$ mol/L) 处理后在 3 个不同时间点可观察到 SA- $\beta$ -gal 阳性细胞中的蓝色沉淀物, 其中 HUVEC-miRNA-34a 组蓝色沉淀物最为明显, 细胞呈衰老形态, 细胞皱缩, 细胞膜通透性、脆性增加, 阳性率最高, HUVEC-Res 组阳性率最低, 对照组 HUVEC-miRNA-1792 与 HUVEC 细胞阳性率介于两者之

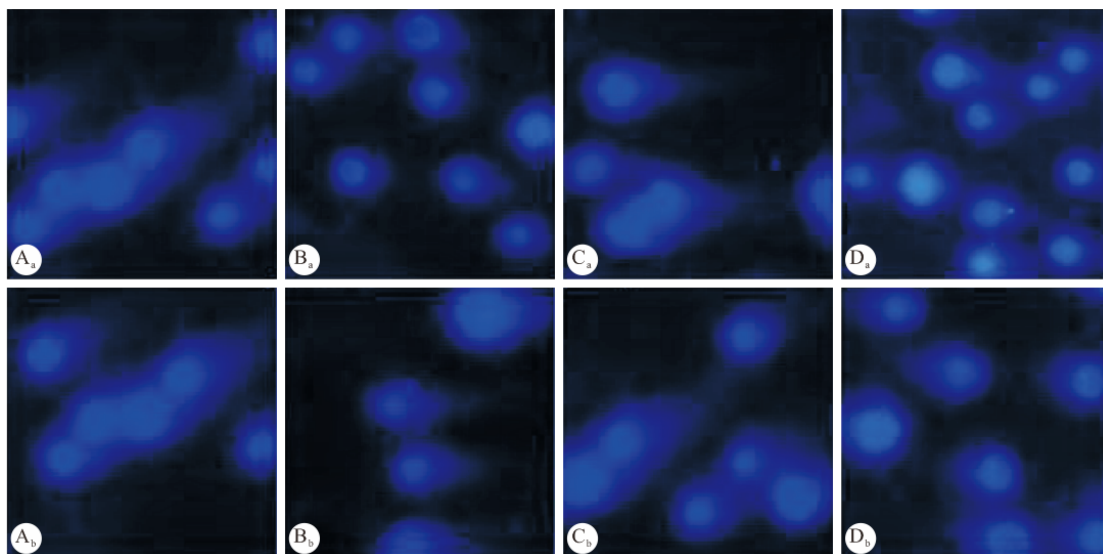


图2 中性彗星电泳分析图。×200

Fig 2 Analysis chart of the neutral comet electrophoresis. ×200

A: HUVEC-miRNA-34a group; B: HUVEC-Res group; C: HUVEC-miRNA-1792 group; D: HUVEC group; a:  $H_2O_2$  treated 2 h ( $H_2O_2+2$  h); b: Changed medium after  $H_2O_2$  treatment 2 h ( $H_2O_2-2$  h)

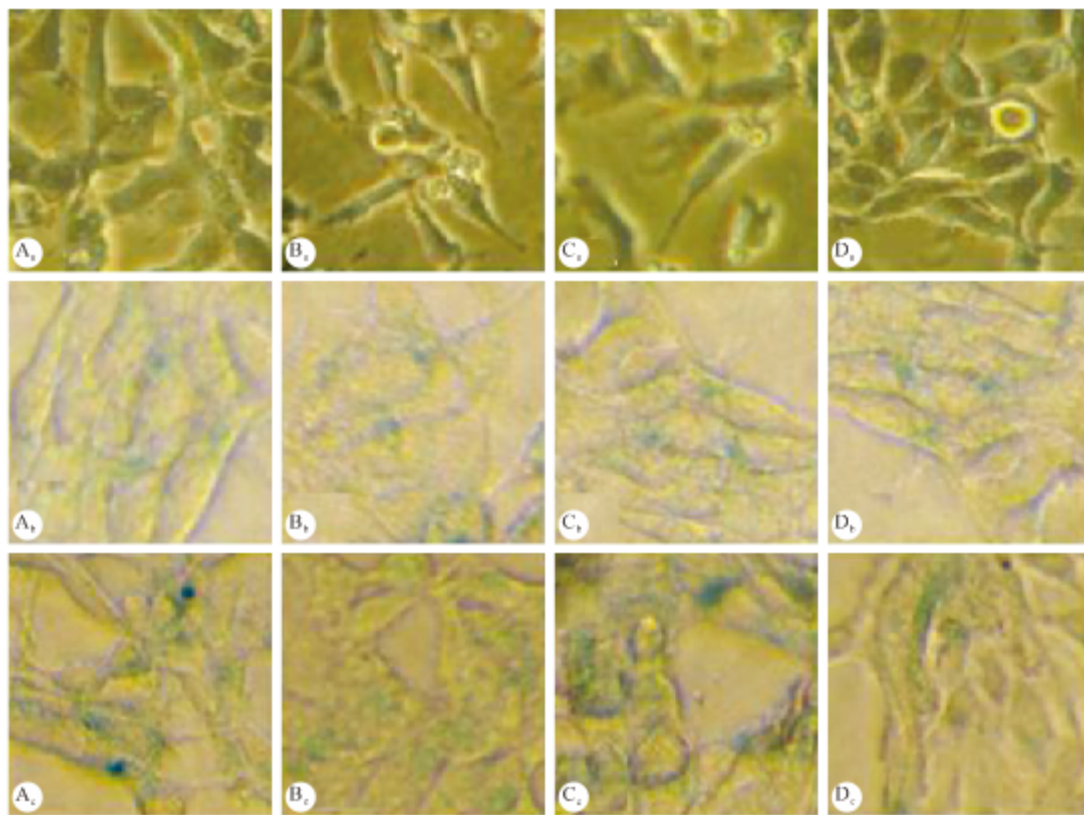


图3 HUVEC细胞的衰老情况。SA-β-gal染色 ×200

Fig 3 The senescence of HUVE cells. SA-β-gal staining ×200

A: HUVEC-miRNA-34a group; B: HUVEC-miRNA-1792 group; C: HUVEC-Res group; D: HUVEC group; a: 24 h; b: 72 h; c: 120 h

间(图3)。4组细胞的阳性率呈时间依赖性上升,在120 h时达到最高,表明 miRNA-34a 下调 SIRT1 可促进细胞衰老(表2)。

### 3 讨论

早在1993年人类就已将视野转向 miRNA 世

表 2 HUVEC 细胞 SA- $\beta$ -gal 染色的统计结果 (%)  
Table 2 The statistical result of SA- $\beta$ -gal staining for HUVEC cells SA- $\beta$ -gal (%)

Group	n	24 h	72 h	120 h
HUVEC	5	5.1 $\pm$ 2.4	11.3 $\pm$ 4.4 $\Delta$	15.5 $\pm$ 0.7 $\#$
HUVEC-miRNA34a	5	12.5 $\pm$ 3.1*	19.2 $\pm$ 3.8* $\cdot\Delta$	27.1 $\pm$ 2.7* $\cdot\#$
HUVEC-miRNA1792	5	6.7 $\pm$ 0.8	13.1 $\pm$ 3.1 $\Delta$	20.5 $\pm$ 3.8 $\#$
HUVEC-Res	5	4.5 $\pm$ 3.6	9.7 $\pm$ 2.9 $\Delta$	13.2 $\pm$ 4.9 $\#$

\*  $P < 0.05$ , vs. HUVEC, HUVEC-pre-miRNA-1792 and HUVEC-Res groups;  $\Delta$   $P < 0.05$ , vs. 24 h in the same group;  $\#$   $P < 0.05$ , vs. 24 h and 72 h in the same group

界,然而人类对 miRNA 作用的真正了解是最近几年才开始的。越来越多的研究表明 miRNA 主要通过转录本的互相作用影响基因,下调或阻滞基因的表达<sup>[5]</sup>。衰老问题一直是世界范围内最关注的热点,众多研究者将目光投向衰老相关基因的探索,将细胞衰老所涉及的各种机制与一些衰老相关基因联系起来为抗衰老研究奠定理论基础<sup>[6,7]</sup>。衰老是一个多方面衰退并呈现疾病倾向的生理过程,尽管有越来越多的证据表明 miRNA 参与对衰老的调节,但除了最近有报道指出 miRNA-27a 在 2 型糖尿病和卵巢肿瘤中表达有差异<sup>[8,9]</sup>外,还没有其他关于这些重要 miRNA 在衰老及衰老相关疾病方面的报道,所以还需要很多进一步的工作来填补这些空白。以往关于 miRNA 与衰老关系的研究大多集中在 p53 上调 miRNA 表达进而引发细胞自噬<sup>[10,11]</sup>,而 miRNA 对于下游衰老相关基因调控方面的报道十分有限。

本研究根据已有研究成果和 miRNA 靶点预测软件推测衰老相关基因 SIRT1 可能是 miRNA-34a 直接靶位点,通过体外构建 pre-miRNA-34a 表达载体转染细胞,使其发挥类似 RNA 干扰(RNAi)效应,特异使 SIRT1 沉默,成功验证了关于 miRNA-34a 可下调下游衰老相关基因的表达的推测。彗星电泳显示,转染 miRNA-34a 表达载体后,细胞 DNA 损伤明显加重,而 SIRT1 激活剂白藜芦醇处理的细胞 DNA 损伤最为轻微,证明 miRNA-34a 介导的 SIRT1 表达沉默,影响其细胞 DNA 损伤修复相关功能,加深细胞损伤程度。衰老染色显示:随着时间的推移,各实验组细胞都不可避免的逐渐老化,然而其中 HUVEC-pre-miRNA-34a 的衰老进程明显快于其他组,表明 miRNA-34a 加快细胞衰老进程,而这种作用很可能是通过下调长寿基因 SIRT1 的表达来实现的。本实验成功构建了 pre-miRNA-34a 表达载体,证明其能够下调下游 SIRT1 的表达,进而影响细胞 DNA 损伤修复,加快细胞衰老。但是,

miRNA 对基因表达的抑制是通过类似“变光开关”的方式,而非“全或无”的方式,所以这些理论预测出的靶基因,还需要进一步验证其对通路是否有影响及影响程度。

### 参 考 文 献

- Boehm M, Slack FA. Developmental timing microRNA and its target regulate life span. *Science*, 2005; 310(5756): 1954-1957.
- Melton C, Judson RL, Billewicz R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2010; 463(7281): 621-626.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Dongen SV, et al. miRNABase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 2006; 34(Database): 140-144.
- Megraw M, Sethupathy P, Corda B, et al. miRNAGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res*, 2007; 35(Database): 149-155.
- Kim DH, Saetrom P, Sn $\varnothing$ ve O, et al. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008; 105(42): 16230-16235.
- Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell*, 2005; 120(4): 437-447.
- Vaupel JW. Biodemography of human ageing. *Nature*, 2010; 464(7288): 536-542.
- Eitan R, Kushnir M, Lithwick-yanai G, et al. Tumor microRNA expression patterns associated with resistance to platinum based chemotherapy and survival in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol*, 2009; 114(2): 253-259.
- Boehmer ED, Goral J, Fauci DE, et al. Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. *J Leukoc Biol*, 2004; 75(2): 342-349.
- Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*, 2007; 26(5): 745-752.
- He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 2007; 447(7148): 1130-1134.

(2012-07-04 收稿, 2012-09-10 修回)

编辑 沈进