

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.002

## MicroRNA-122 调控的 TK 基因有效降低 TK/GCV 治疗系统的肝毒性

王刚<sup>1</sup>,董小岩<sup>2</sup>,田文洪<sup>1</sup>,尉迟捷<sup>1</sup>,胡键阳<sup>3</sup>,付昕阳<sup>4</sup>,柳云帆<sup>1</sup>,谭文杰<sup>1</sup>,吴小兵<sup>1</sup>(1. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室,北京,100052; 2. 复旦大学 生命科学学院 遗传工程国家重点实验室,上海 200433; 3. 宁夏医科大学附属医院 肝胆外科,宁夏 银川 750004; 4. 开平市中心医院 泌尿外科,广东 开平 529300)

**[摘要]** 目的:探讨利用肝脏特异性 microRNA-122(miR-122)调控外源基因在肝细胞的表达,减轻单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶和更昔洛韦(herpes simplex virus type 1-thymidine kinase/gancyclovir,TK/GCV)治疗系统的肝毒性。方法:通过在相应基因的 3'非翻译区(3'UTR)插入 miR-122 靶序列,构建 miR-122 调控的 pEGFP-122T、pLuc-122T 和 pTK-122T 表达载体,分别转染 miR-122 阳性的 Huh7 肝癌细胞和 miR-122 阴性的 HeLa 宫颈癌细胞,观察细胞中报告基因的表达及 TK/GCV 的细胞毒杀伤作用。水动力法分别注射上述质粒至小鼠体内,冰冻切片和活体成像观察肝脏 EGFP 和 Luc 的表达,通过小鼠血清 ALT、体质量变化、存活率和肝脏病理变化评价 TK/GCV 系统的肝毒性。结果:在 Huh7 细胞,miR-122 靶序列的插入抑制了 EGFP 的表达和 Luc 的活性,减轻 TK/GCV 的毒性杀伤;而在 HeLa 细胞,miR-122 靶序列的插入对报告基因表达和 TK/GCV 的杀伤无影响。体内实验结果显示,pEGFP-122T 处理组的肝细胞不表达 EGFP,而 pEGFP 处理组的肝细胞有 30% 高表达 EGFP;与 pLuc 处理组相比,pLuc-122T 处理组的 Luc 活性下调了 33.70%。pTK 处理组小鼠血清 ALT 显著升高、体质量进行性下降、肝脏出现明显病理损伤,进而引起小鼠死亡;而 pTK-122T 处理组小鼠血清 ALT 正常、无体质量下降、肝脏切片未见病理改变。结论:miR-122 靶序列的插入可抑制外源基因在肝脏的表达,并可有效地降低 TK/GCV 系统的肝毒性。

**[关键词]** microRNA-122;胸苷激酶;肝毒性;肝肿瘤;宫颈肿瘤;自杀基因治疗

**[中图分类号]** R735.7; R737.33; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)05-0492-07

## MicroRNA-122-regulated TK gene effectively inhibits liver toxicity of TK/GCV therapy system

WANG Gang<sup>1</sup>, DONG Xiao-yan<sup>2</sup>, TIAN Wen-hong<sup>1</sup>, YUCHI Jie<sup>1</sup>, HU Jian-yang<sup>3</sup>, FU Xin-yang<sup>4</sup>, LIU Yun-fan<sup>1</sup>, TAN Wen-jie<sup>1</sup>, WU Xiao-bing<sup>1</sup>(1. National Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China; 2. National Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China; 4. Department of Urology, Kaiping Center Hospital, Kaiping 529300, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the regulatory effect of liver-specific microRNA-122(miR-122) on the expression of exogenous genes and its role in decreasing the liver toxicity of herpes simplex virus type 1-thymidine kinase/gancyclovir (TK/GCV) therapy system. **Methods:** MiR-122-regulated pEGFP-122T, pLuc-122T or pTK-122T plasmids were constructed by inserting miR-122 targeting sequence into the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the corresponding genes, and the plasmids were then transfected into miR-122-positive Huh7 and miR-122-negative HeLa cells, then the expression of reporter genes and the hepatotoxicity of TK/GCV system were observed. After hydrodynamic delivery of relevant plasmids into mouse liver, the expressions of EGFP and Luc were analyzed by fluorescence microscopy and *in vivo* bioluminescent imaging; and the hepatotoxicity of TK/GCV system on mice was evaluated by serum ALT, weight, survival and he-

**[基金项目]** 国家科技重大专项基金资助项目(No. 2008ZX10002-023, No. 2008ZX10001-012);病毒基因工程国家重点实验室自主课题项目(No. 2008-S-0003)。Project supported by the Special Key Program of Science and Technology of China (No. 2008ZX10002-023, No. 2008ZX10001-012), and the Self-selected Research Program from National Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering (No. 2008-S-0003)

**[作者简介]** 王刚(1976-),男,河北省遵化市人,博士生,主要研究方向为病毒基因元件的开发和利用。E-mail:wanggangcdc@gmail.com

**[通信作者]** 吴小兵(WU Xiao-bing, corresponding author),E-mail:wuxb0168@vip.sina.com

patic histology. **Results:** In Huh7 cells, the EGFP expression and Luc activity were inhibited by miR-122 targeting sequence insertion, and pTK-122T-transfected Huh7 cells showed resistance to cytotoxicity of TK/GCV system; whereas in HeLa cells, the expression of reporter genes and the cytotoxicity of TK/GCV system were not influenced. *In vivo* results showed that hepatocytes in pEGFP-122T-treated mice did not express EGFP, but 30% hepatocytes in pEGFP-treated mice expressed high level of EGFP; the Luc activity was significantly down-regulated in pLuc-122T-treated mice compared to pLuc-treated mice. Hydrodynamic injection of pTK-122T caused no increase of serum ALT level or decrease of body weight, liver toxicity of GCV treatment, while significant increase of serum ALT level, decrease of body weight and severe liver damages were found in the pTK-treated mice. **Conclusion:** MiR-122 targeting sequence insertion can inhibit the expression of exogenous genes in the liver, and can effectively decrease the hepatotoxicity of TK/GCV system.

[ **Key words** ] microRNA-122; thymidine kinase; hepatotoxicity; hepatic neoplasmas; cervical neoplasmas; suicide gene therapy

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17( 5 ): 492-498 ]

单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶和更昔洛韦( herpes simplex virus type1-thymidine kinase/gancyclovir, TK/GCV)治疗系统广泛应用于肝癌和其他肿瘤的自杀基因治疗( suicide gene therapy)<sup>[1]</sup>,但由于自杀基因在正常肝细胞的表达会造成严重肝毒性<sup>[2-3]</sup>,从而限制了 TK/GCV 系统的应用。因此,控制 TK 基因在正常肝细胞的表达,避免其肝毒性是 TK/GCV 自杀基因系统用于肿瘤治疗时需要解决的问题。microRNA( miRNA )是一种小的内源性非编码 RNA 分子,由 19 ~ 23 个核苷酸组成<sup>[4-5]</sup>。miRNA 与靶 mRNA 的 3'非翻译区( 3'-UTR )的互补序列结合,通过翻译水平的抑制或降解靶 mRNA 调节靶蛋白的表达<sup>[5-7]</sup>。研究<sup>[8-10]</sup>发现,miR-122 特异性在肝细胞中高表达,因此,在 TK 基因的 3'-UTR 插入 miR-122 的互补序列,可以利用肝脏内源性的 miR-122 限制 TK 基因在正常肝细胞的表达,从而减少 TK/GCV 系统的肝毒性。本实验构建 miR-122 调控的增强型绿色荧光蛋白( EGFP)、萤火虫荧光素酶( Luc )两种报告基因和 TK 自杀基因,在肝癌 Huh7 细胞中评价 miR-122 的对报告基因和自杀基因的调节功能以及对细胞的保护;利用水动力方法在小鼠体内研究肝脏 miR-122 对报告基因和自杀基因的调控能力,以期评价 miR-122 作为负调控元件用于减轻 TK/GCV 系统肝毒性的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与实验材料

EGFP、Luc 和 TK 腺相关病毒表达载体 pEGFP、pLuc 和 pTK( 图 1A )由本室构建并保存,以上载体均由 CAG 启动子( CMV early enhancer/chicken  $\beta$  actin promoter )调控,含有 BGH 加尾信号( bovine growth hormone polyA signal ),在表达框的两侧包含

腺相关病毒 2 型( AAV2 )的反向末端重复序列( inverted terminal repeats, ITR)。肝癌 Huh7 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞购自美国 ATCC,由本室保存。4 ~ 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所( 动物合格证号为 SCXK11000006 )。限制酶和连接酶购自 NEB 公司,质粒大提试剂盒购自 Qiagen 公司,DMEM 培养基和胎牛血清购自北京五加和分子医学研究所有限公司,脂质体 lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,萤火虫荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司,MTI[ 3-( 4, 5 )-dimethylthiaziazolo ( -z-y1 )-3, 5-di-phenyltetrazoliumromide ] 购自 Sigma 公司,ALT 检测试剂盒购自 Human Gmbh 公司。



图 1 载体结构示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of vectors

A:pEGFP, pLuc, pTK; B:pEGFP-122T, pLuc-122T, pTK-122T

### 1.2 miR-122 调控的报告基因和 TK 基因的构建

miR-122 调控的 EGFP 表达载体命名为 pEGFP-122T( 图 1B ),在 EGFP 基因的 3'-UTR 中插入 4 个与成熟 miR-122 完全互补的靶序列。构建方法为:合成含有 4 个 miR-122 靶序列的寡核苷酸,其上游序列: 5'-AATTCCAAACACCATTGTCACACTCCAAG ACCAAACACCATTGTCACACTCCAAGACCAAACAC CATTGTCACACTCCAAGACCAAACACCATTGTCACA CTCCAA-3';下游序列为 5'-GATCTTGGAGTGTGA CAATGGTGTTTGGTCTG GAGTGTGACAATGGTGT

TGGTCTTGGAGTGTGACAATGGTGTGGTCTTGGAGTGTGACAATGGTGTGG-3' (划线部分为 miR-122 的互补序列), 95 °C 变性, 室温退火, 通过 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切位点克隆入 pEGFP 载体中 *EGFP* 基因的 3'-UTR。miR-122 调控的 *Luc* 或 *TK* 载体分别命名为 pLuc-122T 和 pTK-122T, 在 *Luc* 或 *TK* 基因的 3'-UTR 中均含有 4 个 miR-122 的靶序列。pLuc-122T 和 pTK-122T 构建方法同 pEGFP-122T (图 1B)。

1.3 细胞培养和转染

Huh7 细胞和 HeLa 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养; 转染使用 Lipofectamine™ 2000, 按说明书进行操作。

1.4 荧光素酶活性检测 miR-122 调控的 *Luc* 基因的体外表达

Huh7 细胞和 HeLa 细胞中荧光素酶活性使用商品化的荧光素酶检测试剂盒, 按照说明书进行检测。裂解细胞并加入底物后, 使用发光检测仪 (Modulus™ Luminometer) 测定其相对光强度单位 (relative light unit, RLU)。

1.5 MTT 法检测 miR-122 调控的自杀基因的体外杀伤活性

pTK-122T 或 pTK 转染 Huh7 细胞和 HeLa 细胞, 用 150 μl 含有不同质量浓度 (0 ~ 1 000 μg/ml) GCV 的培养基于 96 孔板中培养; 培养至第 7 天, 每孔加入 20 μl 的 MTT 溶液 (5 mg/ml), 继续培养 3 h; 弃掉上清, 每孔加入 100 μl 的二甲基亚砷, 孵育 30 min 后, 使用全波长酶标仪 (Thermo) 检测 570 nm 处的 *D* 值, 计算存活率。存活率 (%) = (实验组 *D* 值/对照组 *D* 值) × 100 %。

1.6 水动力法小鼠体内转染 *EGFP* 基因并检测其体内表达

取小鼠体重 10 % 的生理盐水, 将 10 μg 的 pEGFP-122T 及其对照 pEGFP 分别溶于其中, 并于 5 ~ 7 s 内经小鼠尾静脉快速注射入体内; 注射后 24 h, 取小鼠肝脏制作冰冻切片, 于荧光显微镜下观察 *EGFP* 的表达。

1.7 水动力法小鼠体内转染 *Luc* 基因和活体成像检测其体内表达

水动力法 (见 1.6) 注射 10 μg 的 pLuc-122T 及其对照 pLuc 至小鼠体内; 注射后 24 h, 使用 IVIS 小动物成像系统 (Xenogen) 进行活体成像研究。具体操作为: 小鼠腹腔注射适量的 *D*-荧光素 (150 mg/kg), 放入系统的麻醉室中麻醉, 10 min 后 CCD 系统收集光子 5 s。

1.8 转染 *TK* 基因和 *GCV/TK* 自杀基因后小鼠肝毒

性的检测

水动力法 (见 1.6) 注射 10 μg 的 pTK-122T 及其对照 pTK 至小鼠体内, 每组各 7 只; 然后每天腹腔注射适量 GCV (50 mg/kg), 共 14 d; 每天检测体质量; 注射后 6、10、14 d 尾静脉采血, 室温自然凝固, 1 200 × *g* 离心 10 min, 收集血清, 使用商品化试剂盒和自动生化分析仪 (Toshiba) 检测血清中 ALT 水平; 注射后 14 d, 取不同部位小鼠肝脏, 固定肝组织, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续切片, H-E 染色后于光镜下观察并照相。

1.9 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 两组间比较采用独立样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 和 *P* < 0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 含 miR-122 靶序列的报告基因在 miR-122 阳性的 Huh7 细胞中的表达受到抑制

pEGFP-122T 和 pEGFP 转染 Huh7 细胞和 HeLa 细胞 24 h 后显示, 在 miR-122 阳性的 Huh7 细胞<sup>[9,11]</sup>, pEGFP-122T 转染组 (图 2A) 的 EGFP 的表达较 pEGFP 对照组 (图 2B) 明显下降; 但在 miR-122 阴性的 HeLa 细胞<sup>[11-12]</sup>, pEGFP-122T 转染组 (图 2C) 与对照组 (图 2D) EGFP 的表达无差异。pLuc-122T 和 pLuc 转染 Huh7 细胞和 HeLa 细胞 24 h 后发现, 在 Huh7 细胞, pLuc-122T 转染组 [(299.278 ± 49.335) RLU] 与对照组 pLuc [(1 358.887 ± 130.857) RLU] 相比, 荧光素酶活性显著下调 (*P* < 0.01); 而在 HeLa 细胞, pLuc-122T 和 pLuc 转染组荧光素酶活性分别为 (3 351.732 ± 389.033) RLU 和 (3 498.432 ± 335.265) RLU, 两者无差异 (*P* > 0.05)。

2.2 miR-122 靶序列的插入抑制 TK/GCV 自杀基因治疗系统对 Huh7 细胞的毒性杀伤

pTK-122T 和 pTK 转染 Huh7 细胞和 HeLa 细胞, 给予不同剂量 GCV 7 d 后, MTT 法检测细胞存活情况。结果显示, 随 GCV 剂量的增加, Huh-7 和 HeLa 细胞存活率下降; 且 GCV 剂量为 0.1 ~ 10 μg/ml 时, pTK-122T 转染的 Huh7 细胞存活率明显高于 pTK 转染组, 约为 pTK 组的 2 倍 (*P* < 0.05, 图 3A); 而在 HeLa 细胞, 转染 pTK-122T 和 pTK 均有效杀伤了细胞, 两组细胞存活率在所有的 GCV 剂量组均无差异 (*P* > 0.05, 图 3B)。

2.3 含 miR-122 靶序列的报告基因在小鼠肝脏的表达受到明显抑制

水动力法转染 pEGFP 和 pEGFP-122T 至小鼠体

内 24 h 后,荧光显微镜观察肝脏冰冻切片。结果显示,在 pEGFP 注射组,约 30% 肝细胞高表达 EGFP (图 4A);而在 pEGFP-122T 注射组未见 EGFP 表达阳性的肝细胞(图 4B),与未处理的对照小鼠肝脏切片(图 4C)无明显差异。水动力法转染 pLuc 和 pLuc-122T 至小鼠 24 h 后,活体成像结果显示,荧光素酶的表达集中在肝脏部位,其中 pLuc 注射组荧光素酶活性为  $2.44 \times 10^8$  RLU;而 pLuc-122T 注射组荧光素酶活性为  $7.24 \times 10^6$  RLU,后者是前者的 33.70 倍(图 5)。

2.4 miR-122 靶序列插入有效减轻了 TK/GCV 自杀基因治疗造成的小鼠肝毒性

水动力法转染 pTK-122T 和 pTK 至小鼠体内,连续给予 GCV 14 d,通过血清 ALT 水平、体质量变化、存活情况和病理等指标评价各组的肝毒性,以单纯 NS 注射组小鼠作为对照组。血清 ALT 检测结果(图 6)显示,GCV 给药后 6、10 和 14 d,pTK 注射组 ALT 出现了显著的升高,均明显超出正常值范围,分别为 NS 对照组的 5.93 倍、27.12 倍和 26.63 倍 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),提示 TK/GCV 自杀基因治

疗系统严重损伤了小鼠肝脏;而 pTK-122T 注射组小鼠 ALT 未出现升高,无一例超出正常值范围,与 NS 对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

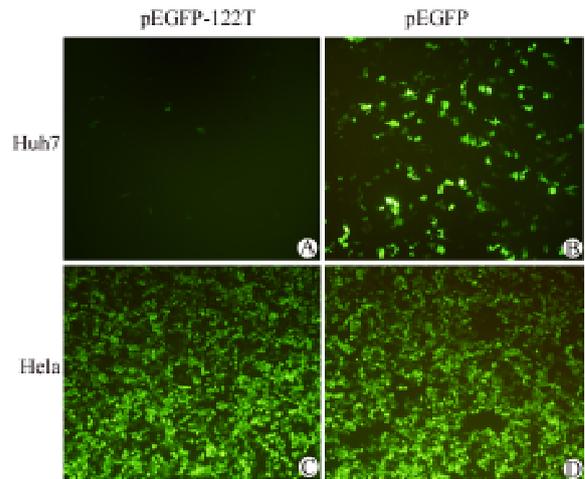


图 2 MiR-122 调控的 EGFP 报告基因在 Huh7 和 HeLa 细胞中的表达 (×100)  
Fig. 2 Expression of miR-122-regulated EGFP reporter gene in Huh7 and HeLa cells (×100)

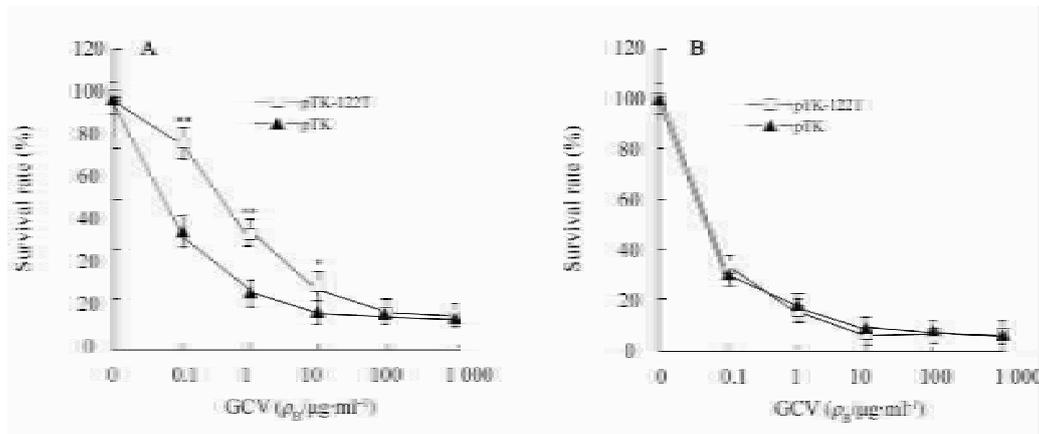


图 3 MiR-122 调控的 TK 基因对 Huh7 和 HeLa 细胞的毒性杀伤  
Fig. 3 Cytotoxicity of miR-122-regulated TK gene against Huh7 and HeLa cells  
A: Huh7 cells; B: HeLa cells. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs pTK

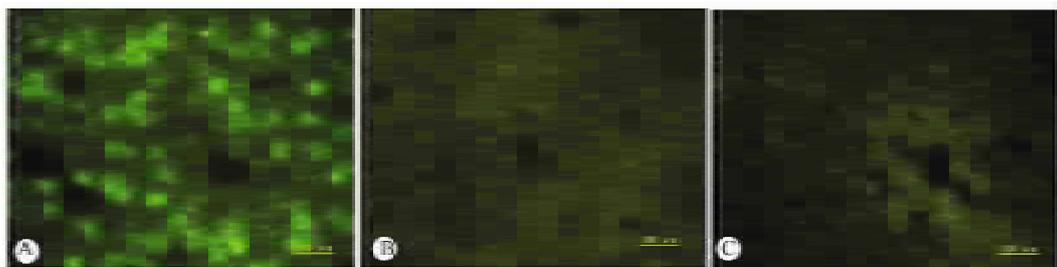


图 4 肝脏 miR-122 抑制 miR-122 调控的 EGFP 报告基因的表达 (×100)  
Fig. 4 MiR-122 in liver inhibited expression of miR-122-regulated EGFP reporter gene  
A: pEGFP; B: pEGFP-122T; C: Untreated

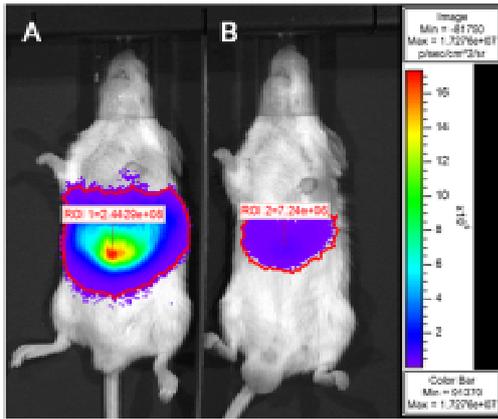


图 5 体内 miR-122 对 miR-122 调控的 *Luc* 报告基因表达的调控

Fig. 5 Effect of miR-122 on expression of miR-122-regulated *Luc* reporter gene *in vivo*

A: pLuc-treated mice; B: pLuc-122T-treated mice

小鼠体质量检测(图7)显示,从给药后第2天开始,pTK注射组的体质量出现进行性的显著下降( $P < 0.05$ );而 pTK-122T 注射组体重未出现下降,其增长情况与 NS 对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。在 pTK 注射组的 7 只小鼠中,有 1 只小鼠在第 11 天出现死亡;而 pTK-122T 注射组无死亡情况发生。给药后 14 d 的肝脏病理结果(图8)显示,pTK-122T 注射组和 pTK 注射组出现显著差异,其中 pTK 注射组所有肝切片均出现严重的肝脏损伤,包括肝细胞肿大、变性坏死和炎性细胞浸润;而 pTK-122T 注射组肝切片均未发现病理改变,与 NS 对照组无明显差异。

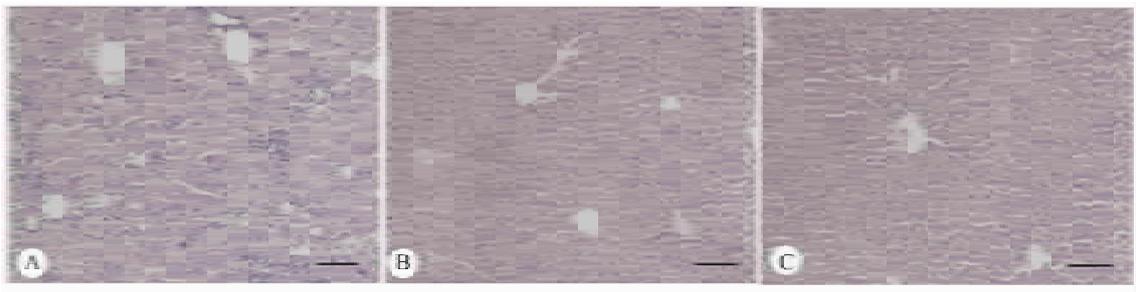


图 8 MiR-122 调控的 *TK* 基因转染后小鼠肝脏病理改变( ×100 )

Fig. 8 Histological change of liver after mice transfected with miR-122-regulated *TK* gene( ×100 )

A: pTK-treated mice; B: pTK-122T-treated mice; C: NS-treated mice

### 3 讨论

*TK/GCV* 自杀基因治疗不仅可以杀死转染 *TK*

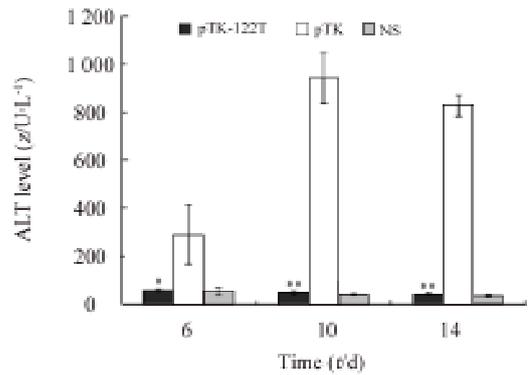


图 6 MiR-122 调控的 *TK* 基因处理后小鼠血清 ALT 水平

Fig. 6 Serum ALT levels of mice treated with miR-122-regulated *TK* gene

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs pTK

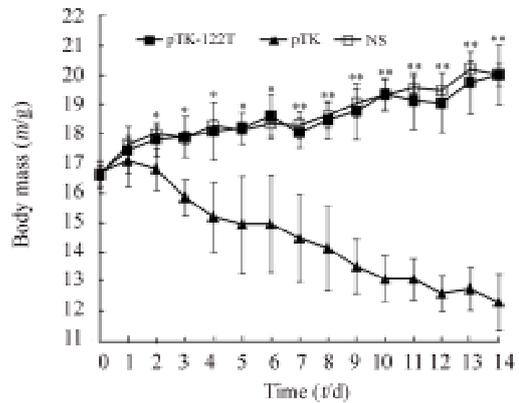


图 7 MiR-122 调控的 *TK* 基因处理后小鼠体质量的变化

Fig. 7 Mass of mice treated with miR-122-regulated *TK* gene

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs pTK

基因的肿瘤细胞,还可通过旁观者效应杀死未转染的肿瘤细胞,在大量肿瘤模型治疗实验中取得了令人鼓舞的效果,是一种很有前途的基因治疗方法。

但是 TK/GCV 系统用于肝癌治疗时,自杀基因在正常肝细胞的表达会造成严重肝毒性;即使在非肝脏肿瘤的 TK 基因治疗中,常用的腺病毒和腺相关病毒载体常具有一定嗜肝性,会造成自杀基因“漏入”肝脏,从而造成肝脏损伤。肿瘤特异启动子被用于控制自杀基因在肿瘤细胞靶向表达,抑制其肝毒性,但这些启动子常具有表达效率低和选择性差的特点,使之不能有效杀伤肿瘤或不能很好避免肝毒性<sup>[13-14]</sup>。寻找更好的自杀基因表达调控元件,避免其肝毒性是 TK/GCV 自杀基因系统用于肿瘤治疗的重要问题。

近几年,越来越多的研究者成功地利用内源性 miRNA 调控外源基因的表达。在特定基因的 3'-UTR 引入 1~4 个拷贝的 miRNA 靶序列,通过内源性 miRNA 与其靶序列结合,从而下调目的基因的表达<sup>[15]</sup>。通过组织特异的 miRNA 抑制目的基因在特定组织的表达已经用于疾病的基因治疗<sup>[16-18]</sup>。Brown 等<sup>[16]</sup>在血友病 B 的基因治疗中,在 IX 因子基因的 3'-UTR 引入在造血细胞中特异性表达的 miR-142-3p 的靶序列,利用 miR-142-3p 成功抑制了 IX 因子在 APC 中的表达,避免了机体针对 IX 因子的免疫所造成的基因治疗的失败。肝脏特异性 miR-122 也被用于调控外源基因的表达<sup>[15,17-19]</sup>。Suzuki 等<sup>[17]</sup>将携带 miR-122 调控的 TK 基因的腺病毒通过瘤内注射治疗皮下接种的 B16 肿瘤,成功避免了由于腺病毒携带的 TK 基因“漏入”肝脏所造成的肝损伤。Cawood 等<sup>[18]</sup>将 miR-122 靶序列插入腺病毒早期基因 E1A 的 3'-UTR,从而抑制腺病毒在肝脏的复制,避免腺病毒的肝毒性。

本研究通过在 EGFP 和 Luc 报告基因及 TK 基因的 3'-UTR 插入 4 个完全互补的 miR-122 靶序列,构建了 miR-122 调控的报告基因和自杀基因,并在 miR-122 表达阳性的 Huh7 细胞<sup>[9,11]</sup>和表达阴性的 HeLa 细胞<sup>[11-12]</sup>中进行验证。结果证实,在 Huh7 细胞,miR-122 靶序列的插入使 EGFP 和 Luc 的表达明显下调,并提高了 TK/GCV 处理的细胞存活率;而在 HeLa 细胞,miR-122 靶序列的插入对报告基因表达和 TK/GCV 的杀伤无影响。本研究成功构建了 miR-122 调控的报告基因和自杀基因,也证实了在 3'-UTR 插入 miR-122 靶序列的报告基因的表达,可以有效和特异地被细胞中内源性 miR-122 抑制,并且 miR-122 靶序列的插入可以有效和特异地抑制 TK/GCV 自杀基因系统对 miR-122 阳性细胞的杀伤。

本研究利用水动力法将 miR-122 调控的 EGFP

和 Luc 报告基因及 TK 基因导入肝细胞,评价肝脏 miR-122 对外源基因的调控能力和 miR-122 靶序列的插入对 TK/GCV 治疗系统肝毒性的影响。通过肝脏冰冻切片发现,肝细胞 EGFP 的表达能被 miR-122 显著抑制,又通过活体动物成像检测到肝脏 miR-122 对荧光素酶活性的显著下调,从而在细胞水平和肝脏器官水平两方面评价了 miR-122 对外源基因强大的调控效果。更为重要的是,水动力法是高效率、安全的靶向肝脏的非病毒载体转染方法。通过采用水动力法转染 TK 基因,从而避免了 Suzuki 等<sup>[17]</sup>使用腺病毒时,除了 TK/GCV 系统本身,高滴度的腺病毒同时造成的肝损伤,更客观和方便地评价了 miR-122 调控的自杀基因的肝毒性。本研究表明,带有 CAG 启动子的 TK 基因水动力法导入肝脏后,TK 基因获得持续高效表达,从而造成了严重的肝损伤,甚至造成小鼠死亡。利用水动力法转染 TK 基因,成功地制作了直接导向肝脏的 TK/GCV 自杀基因治疗的肝损伤模型,可更好地评价 miR-122 作为负调控元件的效果。本研究结果证实 miR-122 靶序列的插入,可以有效避免 TK/GCV 治疗的肝毒性。

miR-122 在肝细胞中特异性表达,也是肝脏中表达最高的 miRNA 之一<sup>[8-10]</sup>。Brown 等<sup>[15]</sup>发现,有效调控外源基因的表达需要一定表达水平 miRNA;如低于阈值以下,即使完全互补的靶序列的插入也不会抑制外源基因的表达;而表达水平高的 miRNA 通常能更好抑制外源基因的表达。本研究也发现,小鼠肝脏中 miR-122 对报告基因的抑制作用和对肝细胞的保护效果均明显高于 miR-122 表达水平较低的 Huh7 细胞。因此,miR-122 在肝脏中极高的丰度使其能高效调控外源基因表达,从而有效地避免了自杀基因的肝毒性。除了自杀基因外,其他细胞毒性基因或凋亡基因,如 FASL、TNF- $\alpha$  和 TRAIL 等也可以利用 miR-122 强大的负调控机制避免其肝毒性。此外,研究发现 miR-122 在大多数肝细胞癌中低表达或不表达<sup>[20-22]</sup>,因此 miR-122 调控自杀基因可能用于清除 miR-122 低表达的肝细胞癌或转移癌。

总之,本研究显示了肝脏 miR-122 具有对外源基因强大的调控作用,是一个高效的基因治疗负调控元件,miR-122 靶序列的插入可以成功避免 TK/GCV 治疗的肝毒性。

#### [参考文献]

- [1] Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy

mediated by the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: Fifteen years of application [ J ]. *Curr Gene Ther*, 2003, 3( 1 ): 13-26.

[ 2 ] Brand K, Arnold W, Bartels T, Lieber A, Kay MA, Strauss M, et al. Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors [ J ]. *Cancer Gene Ther*, 1997, 4( 1 ): 9-16.

[ 3 ] Herraiz M, Beraza N, Solano A, Sangro B, Montoya J, Qian C, et al. Liver failure caused by herpes simplex virus thymidine kinase plus ganciclovir therapy is associated with mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA depletion [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14( 5 ): 463-472.

[ 4 ] Marquez RT, McCaffrey AP. Advances in microRNAs; Implications for gene therapists [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2008, 19( 1 ): 27-38.

[ 5 ] Newman MA, Hammond SM. Emerging paradigms of regulated microRNA processing [ J ]. *Genes Dev*, 2010, 24( 11 ): 1086-1092.

[ 6 ] Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells [ J ]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21( 3 ): 452-460.

[ 7 ] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs [ J ]. *Cell*, 2009, 136( 4 ): 642-655.

[ 8 ] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse [ J ]. *Curr Biol*, 2002, 12( 9 ): 735-739.

[ 9 ] Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1 [ J ]. *RNA Biol*, 2004, 1( 2 ): 106-113.

[ 10 ] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver [ J ]. *J Hepatol*, 2008, 48( 4 ): 648-656.

[ 11 ] Jopling CL, Norman KL, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122 [ J ]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71( 2 ): 369-376.

[ 12 ] Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, et al. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA [ J ]. *EMBO J*, 2008, 27( 24 ): 3300-3310.

[ 13 ] Brand K, Loser P, Arnold W, Bartels T, Strauss M. Tumor cell-specific transgene expression prevents liver toxicity of the adenoviral HSV-tk/GCV approach [ J ]. *Gene Ther*, 1998, 5( 10 ): 1363-1371.

[ 14 ] Kanai F, Lan KH, Shiratori Y, Tanaka T, Ohashi M, Okudaira T, et al. *In vivo* gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene [ J ]. *Cancer Res*, 1997, 57( 3 ): 461-465.

[ 15 ] Brown BD, Gentner B, Cantore A, Colleoni S, Amendola M, Zingale A, et al. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25( 12 ): 1457-1467.

[ 16 ] Brown BD, Cantore A, Annoni A, Sergi LS, Lombardo A, Della Valle P, et al. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice [ J ]. *Blood*, 2007, 110( 13 ): 4144-4152.

[ 17 ] Suzuki T, Sakurai F, Nakamura S, Kouyama E, Kawabata K, Kondoh M, et al. miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without altering antitumor effects in suicide gene therapy [ J ]. *Mol Ther*, 2008, 16( 10 ): 1719-1726.

[ 18 ] Cawood R, Chen HH, Carroll F, Bazan-Peregrino M, van Rooijen N, Seymour LW. Use of tissue-specific microRNA to control pathology of wild-type adenovirus without attenuation of its ability to kill cancer cells [ J ]. *PLoS Pathog*, 2009, 5( 5 ): e1000440.

[ 19 ] Lee TC, Lin YL, Liao JT, Su CM, Lin CC, Lin WP, et al. Utilizing liver-specific microRNA-122 to modulate replication of dengue virus replicon [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396( 3 ): 596-601.

[ 20 ] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, et al. Cyclin G<sub>1</sub> is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 13 ): 6092-6099.

[ 21 ] Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, Veronese A, Ferracin M, Sabbioni S, et al. MiR-122/cyclin G<sub>1</sub> interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells [ J ]. *Cancer Res*, 2009, 69( 14 ): 5761-5767.

[ 22 ] Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, et al. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib [ J ]. *J Biol Chem*, 2009, 284( 46 ): 32015-32027.

[ 收稿日期 ] 2010-07-28 [ 修回日期 ] 2010-09-05  
[ 本文编辑 ] 韩丹

## 本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 .....	封二
德国美天旎生物技术有限公司 .....	封三
碧迪医疗器械有限公司 .....	封四
上海先声药业有限公司 .....	前插页 I
上海医元生物基因发展有限公司 .....	前插页 II