

www.pibb.ac.cn

# LncRNA-GAS5 抑制 miR-21 介导的 非完全匹配靶 mRNA 降解 \*

郑 伟 董 洁 李少华 丁红梅 李 慧 黃皑雪 夏 伟 白琛俊 郭晓华 李 达 耿 介 李 洁\*\* 邵宁生\*\* (军事医学科学院基础医学研究所,北京100850)

摘要 LncRNA-GAS5 作为 miR-21 的"分子海绵",通过"吸收" miR-21 从而调控 miR-21 对靶基因的抑制.此外,miR-21 直接调控非完全匹配靶基因 PTEN 和 TPM1 的表达.我们首先在 HEK293T 和 HeLa 细胞中确认,miR-21 通过碱基互补配对 调控非完全匹配靶基因 PTEN 和 TPM1 的蛋白表达,但不影响 PTEN 和 TPM1 mRNA 的水平.此外,过表达 miR-21 后,qRT-PCR 检测 PTEN 和 TPM1 mRNA 的半衰期,发现它们的半衰期显著缩短,miR-21 加速 PTEN 和 TPM1 mRNA 的降解. 通过转染 lncRNA-GAS5 的过表达质粒,发现 lncRNA-GAS5 竞争性地与 miR-21 结合能够延长 PTEN 和 TPM1 mRNA 的降解. 期,而 miR-21 与 lncRNA-GAS5 碱基互补配对结合后,又对 lncRNA-GAS5 存在调节作用,减弱 lncRNA-GAS5 的稳定性并 加速 lncRNA-GAS5 的降解.LncRNA-GAS5 作为 miR-21 的"分子海绵"能够抑制 miR-21 对非完全匹配靶 mRNA PTEN 和 TPM1 的降解,同时,miR-21 与 lncRNA-GAS5 结合后又存在对 lncRNA-GAS5 的反馈调节,这些相互作用机制的发现有助 于了解 lncRNA、miRNA、mRNA之间这个复杂又精细的调控环路.

关键词 LncRNA-GAS5, miR-21, PTEN, TPM1, RNA 稳定性 学科分类号 Q522 DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0113

自从第一个功能性的小 RNA(small RNAs)被发现以来,研究者已经从动物、植物、真菌甚至病毒中鉴定出成千上万的 miRNA (microRNAs)<sup>[1-2]</sup>. miRNA 指的是长度 23 nt 左右的非编码 RNA,现 已发现 miRNA 通过碱基互补配对的方式靶向编码 蛋白质的 mRNA,介导基因转录后途径的沉默<sup>[3]</sup>. 研究发现,miRNA 能够调控大部分编码蛋白质的 基因,而且基因组中超过 30%的基因受到 miRNA 靶向调控.miRNA 能够参与包括细胞增殖、迁移、 分化、调亡和肿瘤发生等多项生物学过程<sup>[4]</sup>.

因为 miRNA 与 mRNA 之间最少 6 个碱基的互补配对就足够介导 miRNA 靶向 mRNA 分子<sup>[5]</sup>,所以一个 mRNA 可以受到多个 miRNA 的调控,而一个 miRNA 又可以靶向多个 mRNA<sup>[6]</sup>. miRNA 作用于基因的转录后水平调控<sup>[3]</sup>,多细胞动物的 miRNA 能够直接在碱基完全匹配的位点引起 Ago 蛋白介 导 mRNA 剪切<sup>[7-9]</sup>. 但更多的情况下, miRNA 与 mRNA 形成非完全匹配或部分匹配配对, 介导的 mRNA 的翻译抑制<sup>[8]</sup>、mRNA 结构的不稳定或者两 者的共同作用<sup>[10]</sup>,研究发现,一些 miRNA 造成的 翻译起始抑制和 mRNA poly(A)尾的去除是 miRNA 沉默非完全匹配 mRNA 的主要作用机制<sup>[11-12]</sup>.

研究发现 miR-21 在胰腺癌、脑癌、胃癌、乳 腺癌、肺癌、前列腺癌等多种癌症均表达异常<sup>[13-14]</sup>. miR-21 在体外培养及动物模型均被证明是一种原 癌 基因, 其 靶 向 包 括 PTEN、TPM1、Pdcd4、

- \*\* 通讯联系人. Tel: 010-66932313
- 邵宁生. E-mail: shaonsh@hotmail.com
- 李 洁. E-mail: jannbio@163.com
- 收稿日期: 2017-03-26, 接受日期: 2017-06-27

<sup>\*</sup>国家自然科学基金资助项目(31370794, 31570817, 31200566).

Spry1 和 Spry2 等多个与细胞增殖、生长、侵袭、 凋亡相关的基因<sup>[15-19]</sup>. 根据 miRecord 的数据,实验 证实 miR-21 的靶 mRNA 至少已有 42 个,而且依 然不断有新的靶基因被证实,但是 miR-21 对癌症 的发生与发展的确切作用机制并不清楚<sup>[20]</sup>.

在过去的十年间,对 IncRNA 功能的研究已经 取得了较大的进展,但仅仅有一小部分 lncRNA 的 功能被鉴定出来<sup>[21]</sup>.最近, lncRNA 作为 ceRNA (competitive endogenous RNA, 竞争性内源 RNA), 又称作 miRNA "分子海绵"的功能已经引起了研 究者极大的兴趣. CeRNA 指的是 RNA 分子含有 miRNA 的碱基互补区域,作为一个诱饵分子"吸 收"miRNA,从而抑制miRNA 对靶mRNA的沉 默效应. 长非编码 RNA GAS5(lncRNA-GAS5)最初 是通过使用差减杂交技术(subtraction hybridization) 从小鼠胚胎成纤维细胞 NIH 3T3 分离鉴定出来的<sup>[22]</sup>. 随后也迅速鉴定出人 lncRNA-GAS5, 人 GAS5 基 因内含子中编码9种不同的 snoRNA (small nucleolar RNA,核仁小 RNA),研究发现 lncRNA-GAS5 表达与细胞的接触抑制和血清饥饿存在较大 的联系,而且证明是一种抑癌因子[23].但是, LncRNA-GAS5 如何调控肿瘤发生的确切分子机制 还有待进一步研究. 在 GAS5 转录本外显子 4 的位 置有一个 miR-21 的结合位点, 而且有报道 IncRNA-GAS5 能够作为 miR-21 的一种"分子海 绵",通过此作用影响 miR-21 靶基因的表达[15].

miRNA 与 mRNA 之间的碱基完全匹配将引起 mRNA 的剪切,而且能够检测出 mRNA 水平的下 调,然而,miRNA 对非完全匹配靶 mRNA 水平没 有显著影响. LncRNA 作为 miRNA"分子海绵" 的发现, lncRNA 在 miRNA 对非完全匹配靶 mRNA 的调控中起到了什么作用引起了我们的兴 趣. 已有研究报道 PTEN 和 TPM1 是 miR-21 的非 完全匹配靶基因[18, 24-25].本研究旨在证实 lncRNA-GAS5 能够通过与 miR-21 相互作用影响非 完全匹配靶 mRNA 的稳定性. 我们发现, IncRNA-GAS5、miR-21 和 miRNA-21 的靶 mRNA 存在相互的负反馈调节环路, IncRNA-GAS5 通过 其 miRNA"分子海绵"作用能够直接与 miR-21 相 互作用,以此调控 miR-21 靶 mRNA 的稳定性,而 miR-21 在与 lncRNA-GAS5 结合后, 又能降低 GAS5 稳定性,加速其降解.

### 1 材料与方法

### 1.1 材料

HEK293T 和 HeLa 细胞株及 pcDNA6.0b 载体 均为本实验室保存. DMEM 培养基购自 Gibco 公 司,细胞培养瓶和12孔细胞培养板购自Thermo 公司, TRIzol 试剂购自 Sigma 公司, 反转录酶购 自 Promega 公司, dNTP 购自天根公司, RNA 酶抑 制剂购自 Thermo 公司,实时荧光定量检测试剂 SYBR Green mix 购自 Toyobo 公司, 琼脂糖购自 Lonza 公司, Tris base 和甘氨酸购自 Novon 公司, 异丙醇、氯仿、无水乙醇产自国药集团. PCR 引 物、反转录引物和 qPCR 引物均由生工公司合成, miR-21 模拟物(miR-21 mimic)、对照(NC)以及 miR-21 抑制剂(miR-21 inhibitor)、对照均由广州锐 博公司合成. Phusion DNA 扩增酶购自 Thermo 公 司,限制性内切酶均购自 Thermo 公司, T4 连接酶 和基因组提取试剂盒购自天根公司,切胶回收和质 粒提取试剂盒购自 Thermo 公司.

### 1.2 细胞培养

HEK293T 和 HeLa 细胞使用含有 10%胎牛血 清的 DMEM 高糖培养基,在条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养.

### 1.3 LncRNA-GAS5 表达载体构建

通过使用 RT-PCR 技术,上游引物为 GAS5-F1(5' CGGGGTACCTTTCGAGGTAGGAGT-CGACT 3'),下游引物为 GAS5-R1(5' ATAAGAA-TGCGGCCGCTGGATTGCAAAAATTTATTAA 3'), 扩增人 GAS5 全长序列,并将目的片段克隆入表达 载体 pcDNA6.0b(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 并命名为 pcDNA6-GAS5.

### 1.4 细胞转染

将 HEK293T 和 HeLa 细胞接种于 12 孔板中, 24 h 后取 1 μg pcDNA6、pcDNA6-GAS5 质粒稀释 于 100 μl无血清 DMEM 中后,分别与含有 3 μl Lipofectamine 2000 转染试剂的 100 μl无血清 DMEM 培养基混合,室温孵育 20 min 后加入到相 应的细胞培养孔中,培养 5 h 后更换含 10%胎牛血 清培养基继续培养 48 h.

将生长良好的 HeLa 细胞和 HEK293T 细胞接 种于 12 孔板中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h. 按照 Lipofectamine 2000 说明书将 50 pmol miR-21 mimic、NC 或 100 pmol miR-21 inhibitor、 NC 分别稀释于 100 µl无血清 DMEM 培养基中, 与含有 3 µl Lipofectamine 2000 转染试剂的 100 µl 无血清 DMEM 培养基混合,室温孵育 20 min后加 入到相应的细胞培养孔中,同时使用终浓度为 10 mg/L 的放线菌素 D 抑制细胞转录, 分别收取 5 个时间点的细胞总 RNA 待检测.

接种状态良好的 HEK293T 和 HeLa 细胞于 12 孔板中培养 24 h,将 0.5 µg pcDNA6-GAS5 或 pcDNA6.0b 稀释于 100 µl无血清 DMEM 中, 与含 有 3 µl Lipofectamine 2000 转染试剂的 100 µl无血 清 DMEM 培养基混匀, 室温孵育 20 min后加入到 相应的细胞培养孔中,培养5h后更换含10%胎 牛血清培养基继续培养 24 h, 然后使用终浓度为 10 mg/L 的放线菌素 D 抑制细胞转录,并收取细胞 总 RNA.

HEK293T 和 HeLa 细胞种于 12 孔板中, 24 h 后,将 0.5 µg pcDNA6-GAS5 或 pcDNA6.0b 和 100 pmol miR-21 inhibitor 与 100 µl无血清 DMEM 培养基混合,与含有 3 µl Lipofectamine 2000 转染 试剂的 100 μl无血清 DMEM 培养基混合,室温孵 育 20 min 后加入到相应的细胞培养孔中,同时使 用终浓度为 10 mg/L 的放线菌素 D 抑制细胞转录, 分别收取5个时间点的细胞总RNA待检测.

### 1.5 蛋白质印迹 (Western blot) 分析

PTEN 单抗购自 Proteintech 公司 (Rosemont, IL, USA), TPM1 多抗购自 ABclonal (Woburn, MA, USA). GAPDH 抗体购自中杉金桥公司 (ZSGB-BIO, Beijing, China), 使用 ProteoJET™细 胞裂解液(ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA)提取细胞总蛋白,总蛋白使用 12% SDS-PAGE 分离后,将蛋白质条带转移至 PVDF 膜 (millipore, Bedford, MA, USA)上, 5% TBST 配 制的脱脂牛奶室温封闭1h,4℃一抗孵育过夜, TBST 洗膜 3 次共 15 min, HRP 标记的二抗 (CoWin Biotech, Beijing, China) 室温孵育1h, ECL 显影.

### 1.6 实时荧光定量 qRT-PCR 分析

按照 Trizol 试剂(Sigma 公司)说明书提取细胞 总 RNA. 将所提取的 RNA 稀释至 1/50, 在紫外分 光光度计上检测 RNA 的浓度以及 A 260/A 280 值. 取 1μg RNA 用 1%琼脂糖电泳鉴定 RNA 的完整性. 取1µg RNA 反转录合成 cDNA. 利用 Stratagene 公司 Mx3000P qPCR 仪检测 RNA 水平. qPCR 反

应体系如下: 1 µl cDNA, 1 µl特异引物(表 1), 2× qPCR SYBR Green mix 10 µl, ddH2O 8 µl. 反应条 件: 预变性 95℃ 3 min, 变性 95℃ 15 s, 退火 56℃ 20 s, 延伸 72℃ 20s, 40 个循环, 采集熔解曲 线. 使用 Mx3000P 软件进行结果分析.

Table 1 qPCR primers used in this study

Primers	Sequences(5' $\rightarrow$ 3')
PTEN-F	GCGTGCAGATAATGACAAGG
PTEN-R	GGATTTGACGGCTCCTCTAC
TPM1-F	TTGAGAGTCGAGCCCAAAAAG
TPM1-R	CATATTTGCGGTCGGCATCTT
VASN-F	GAGAGCCACGTCACACTGG
VASN-R	CAAAGTCGGCGTAGTCAAGC
GAS5-F	CCCAAGGAAGGATGAG
GAS5-R	ACCAGGAGCAGAACCA
GAPDH-F	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAA
GAPDH-R	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT
hsa-miR-21-F	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
hsa-miR-21-R	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

### 1.7 统计分析

所有结果均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,数据比较分析使用 Student's t test 检验, P<0.05 视为具有统计学差异.

#### 2 结 果

### 2.1 MiR-21 靶向 PTEN 和 TPM1 mRNA 并调控 其蛋白质表达

己有报道证实 PTEN 和 TPM1 作为 miR-21 的 非完全匹配靶 mRNA<sup>[18, 24-25]</sup>. 生物信息学分析确认 PTEN 的 3' UTR 和 TPM1 的 3' UTR 区域含有 miR-21 的结合位点(图 1a). 为了检测 miR-21 对非 完全匹配靶 mRNA PTEN 和 TPM1 的影响,分别 将 50 pmol miR-21 mimic 和 NC 转染 HEK293T 细 胞和 HeLa 细胞,转染 48 h 后提取细胞的总 RNA, 1%琼脂糖电泳检测细胞总 RNA 完整性,证明所提 总 RNA 质量良好,进行反转录获得 cDNA 后,进 行实时荧光定量 PCR 检测.实验结果表明,相对 于对照组,转染miR-21 mimic 进行过表达 miR-21, PTEN 和 TPM1 mRNA 水平无明显变化 (图 1b).

为了研究 miR-21 对 PTEN 和 TPM1 蛋白表达 的影响,分别将 50 pmol miR-21 mimic 和 NC 或 100 pmol miR-21 inhibitor 和 NC 转染 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞,转染 48 h 后提取细胞的总蛋白, BCA 法对细胞总蛋白进行定量,蛋白质印迹法检测 2 种细胞 PTEN 和 TPM1 蛋白质表达水平.结果显示,相比较于对照组,在 2 种细胞内过表达miR-21 组 PTEN 和 TPM1 的蛋白质表达水平显著降低,而使用 miR-21 inhibitor 组 PTEN 和 TPM1

的蛋白质表达水平上升(图 1c).这些结果表明,在 HEK293T 和 HeLa 细胞内,PTEN 和 TPM1 作为 miR-21 的非完全匹配靶基因,其蛋白质的表达水 平受到 miR-21 的调控.类似的结果,改变 miR-21 的水平不影响 PTEN 和 TPM1 的 mRNA 水平但影 响其蛋白质表达,已经在其他的细胞系或组织中有 报道<sup>[18,24-25]</sup>.



#### Fig. 1 MicroRNA-21 targets the PTEN and TPM1 mRNAs and regulates their protein expression

(a) Predicted miR-21 binding sites located in the 3' UTRs of the human PTEN and TPM1 mRNAs. (b) Quantitative RT-PCR analysis of PTEN and TPM1 mRNA expression in HEK293T and HeLa cells at 48 h after transfection with miR-21 mimic. Expression of PTEN and TPM1 were normalized to the internal control GAPDH. (c) Western blot analysis of PTEN and TPM1 protein expression in HEK293T and HeLa cells transfected with miR-21 mimic or miR-21 inhibitor. NC, negative control; miR-21, miR-21 mimic; IG, inhibition group (miR-21 inhibitor).

### 2.2 miR-21 加速 PTEN 和 TPM1 mRNA 降解

研究报道,大部分 miRNA 具有较长的半衰期,其稳定性较强<sup>[26-27]</sup>,我们在 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞检测 miR-21 的半衰期.HEK293T 和 HeLa 细胞接种于 12 孔板,培养 24 h 后,使用放线菌素 D (10 mg/L)抑制细胞转录,分别收取抑制转录后 5 个时间点(0、4、8、12、24 h)的细胞总

RNA,紫外分光光度计检测 RNA 浓度,琼脂糖电 泳检测 RNA 质量,然后进行反转录,随后使用实 时荧光定量 PCR 技术检测 2 种细胞各个时间点 miR-21 水平(图 2a).实验结果显示,在 2 种细胞 内,miR-21 的半衰期均大于 24 h,miR-21 稳定性 较强,这就消除了进一步研究 miR-21 对非完全匹 配 靶 mRNA PTEN 和 TPM1 稳定性的影响时, miR-21 自身稳定性对实验结果造成的影响.

在 HEK293T 和 HeLa 细胞中转染 miR-21 mimic 和 NC,同时使用放线菌素 D(10 mg/L)抑制 细胞转录,收取 5 个时间点(转染后 0、4、8、12、24 h)细胞总 RNA,1%琼脂糖检测 RNA 完整性,结果显示 RNA 完整性良好,反转录获得 cDNA 后,使用实时荧光定量 PCR 检测转染 NC组与miR-21 mimic 组 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞各个

时间点 PTEN 和 TPM1 水平(图 2b);同时在 2 种细胞检测各个时间点非 miR-21 靶 mRNA VASN 的水平(图 2c). 上述结果发现,在 2 种细胞,相比较于对照组,转染 miR-21 mimic 组 PTEN 和 TPM1 的半衰期明显减短,PTEN 和 TPM1 的降解速率显著增加,非完全匹配靶 mRNA PTEN 和 TPM1 与miR-21 结合后,miR-21 能够影响它们的 RNA 稳定性,加速其分子的降解.



#### Fig. 2 MicroRNA-21 accelerates PTEN and TPM1 mRNA decay

(a) Real-time PCR analysis of the half-life of miR-21 in HEK293T and HeLa cells treated with actinomycin D. Relative levels at 0 h were normalized to 1. U6 snRNA served as an internal miRNA control. (b) Quantitative RT-PCR analysis of the half-lives of PTEN and TPM1 mRNAs in HEK293T and HeLa cells transfected with miR-21 mimic (50 nmol/L) then treated with actinomycin D (10 mg/L). Cells were harvested at five time points, and total RNA was isolated and reverse transcribed. (c) Quantitative RT-PCR analysis of the half-life of VASN mRNA in HEK293T and HeLa cells. GAPDH mRNA was used as a normalization control for mRNAs. NC, negative control; miR-21, miR-21 mimic. - : NC; - : miR-21.

为了更加有力地证实 miR-21 能够加速 PTEN 和 TPM1 的降解, HEK293T 细胞和 HeLa 细胞转 染 50 pmol miR-21 mimic 24 h, 然后转染 100 pmol miR-21 inhibitor 和 NC, 同时使用放线菌素 D 抑制 细胞转录, 收取 5 个时间点细胞总 RNA, qRT-PCR 检测两种细胞各个时间点 PTEN 和 TPM1 水平(图 3). 实验结果显示,相比与对照组, miR-21 inhibitor 能够延长 PTEN 和 TPM1 的半衰 期,增加它们的稳定性.

上述实验结果证实在 HEK293T 和 HeLa 细胞中, miR-21 能够加速其非完全匹配靶 mRNA PTEN 和 TPM1 的降解.



Fig. 3 MicroRNA-21 inhibitor attenuates PTEN and TPM1 mRNA decay

HEK293T and HeLa cells were transfected with 50 nmol/L miR-21 mimic, incubated for 24 h, transfected with 100 nmol/L miR-21 inhibitor and treated with actinomycin D (10 mg/L). Cells were harvested at five time points, and total RNA was isolated and reverse transcribed. Quantitative real-time PCR analysis was used to measure the half-lives of the PTEN and TPM1 mRNAs. NC, negative control; Anti-miR-21, miR-21 inhibitor.  $\bullet - \bullet : NC; \blacksquare - \blacksquare :$  Anti-miR-21.

### 2.3 LncRNA-GAS5 增强 PTEN 和 TPM1 mRNA 稳定性

最近研究表明 lncRNA 能够作为 miRNA 内源 的"分子海绵"吸收 miRNA,从而影响 miRNA 对 下游基因的调控.有研究报道,lncRNA-GAS5 能 够作为 miR-21 的天然"分子海绵"<sup>[28]</sup>.因此,我 们打算以 lncRNA-GAS5 作为 miR-21"分子海绵" 入手,探究 lnRNA-GAS5 能够通过其 miR-21"分 子海绵"的功能调控 miR-21 非完全匹配靶 mRNA 的稳定性.生物信息学分析,lncRNA-GAS5 包含 miR-21 的结合位点(图 4a);构建完成 lncRNA-GAS5 表达质粒,HEK293T 和 HeLa 细胞转染 0.5 µg pcDNA6-GAS5,qRT-PCR 检测 lncRNA-GAS5 的表达(图 4b).

为了探究 lncRNA-GAS5 对 PTEN 和 TPM1 mRNA 稳定性的影响,HEK293T 细胞和 HeLa 转 染 0.5 µg pcDNA6-GAS5 过表达质粒,过表达 24 h 后,使用放线菌素 D 抑制细胞转录,收取 5 个时间点的细胞总 RNA,qRT-PCR 检测两种细胞各个时间点 PTEN 和 TPM1 的 mRNA 水平(图 4c).结果显示,在 HEK293T 和 HeLa 内过表达 lncRNA-GAS5 延长了 PTEN 和 TPM1 的半衰期,增强了它们的 RNA 稳定性.

### 2.4 IncRNA-GAS5 通过与 miR-21 直接相互作用 影响 PTEN 和 TPM1 mRNA 的稳定性

因为 miRNA 和 mRNA 之间形成大于 6 个碱基 配对的非完全匹配就可以导致 mRNA 的沉默效应, 而且 1 个 mRNA 可能被多个 miRNA 靶向, 1 个 miRNA 又可以靶向多个 mRNA<sup>[19-20]</sup>.为了证实我 们的理论, lncRNA-GAS5 调控 miR-21 非完全匹配 mRNA 是通过其 miR-21 的"分子海绵"的作用, 研究 lncRNA-GAS5 延长 PTEN 和 TPM1 mRNA 的 半衰期是否是通过与 miR-21 的直接相互作用就显 得相当重要. (a) ACAGGCAUUAGACAGA - AAGCUG 3' GAS5 5' AGUUGUAGUCAGACUAUUCGAU 5' Hsa-miR-21 3' (b) HEK293T HeI a 600 Relative GAS5 expression 140 Relative GAS5 expression 120 500 100 400 80 300 60 200 40 100 20 0 NC pcDNA6-GAS5 NC pcDNA6-GAS5 (c) HEK293T HEK293T 1.2 1.0 8.0 expression 0.4 0.2 0 0 1.2 Relative TPM1 expression 1.0 0.8 0.6 0.4 0.2 0 0 4 8 12 24 0 4 8 12 24 t/h t/h Relative PTEN expression HeLa Relative TPM1 expression HeLa 1.2 1.2 1.0 1.0 0.8 0.8 0.6 0.6 0.4 0.4 0.2 0.2 0 0 24 0 4 8 12 24 0 4 8 12 t/h t/h

Fig. 4 GAS5 increases the stability of PTEN and TPM1 mRNAs

(a) Predicted miR-21 binding sites within lncRNA-GAS5. (b) HEK293T and HeLa cells were transfected with pcDNA6 or pcDNA6-GAS5, and GAS5 mRNA expression was quantified by qRT-PCR at 48 h. GAPDH mRNA was used as a normalization control for mRNAs. (c) HEK293T and HeLa cells were transfected with pcDNA6-GAS5 or pcDNA6 for 24 h, then treated with actinomycin D (10 mg/L). Total RNA was isolated at five time points and qRT-PCR was performed to measure the half-lives of the PTEN and TPM1 mRNAs. NC, pdDNA6; GAS5, pcDNA6-GAS5. \*P < 0.05 are considered statistically significant.  $\bullet - \bullet$ : NC(pcDNA6);  $\blacksquare - \blacksquare$ : GAS5.

为了更加明确 miR-21 在整个环路中所扮演的 角色,我们在 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞中共转 染 100 pmol miR-21 inhibitor 和 0.5 μg pcDNA6-GAS5 或 pcDNA6.0b,转染 24 h 后,使用放线菌素 D 抑制细胞转录,收取 5 个时间点的细胞总 RNA, qRT-PCR 检测两种细胞各个时间点 PTEN 和 TPM1 mRNA 水平(图 5). 实验结果表明,在使用 miR-21 inhibitor 封闭了 miR-21 之后,过表达 lncRNA-GAS5并不能明显地改变 PTEN 和 TPM1 的 mRNA 稳定性.这提示,lncRNA-GAS5 通过竞 争性地与 miR-21 结合,以此增强 PTEN 和 TPM1 的 mRNA 稳定性.换言之,lncRNA-GAS5 能够抑 制由 miR-21 介导的非完全匹配靶 mRNA PTEN 和 TPM1 的降解作用. **HEK293T** 

8

t/h HeLa



HeLa

Relative PTEN expression Relative TPM1 expression 4 8 12 8 12 t/h t/h Fig. 5 Overexpressing GAS5 and blocking miR-21 does not significantly affect PTEN and TPM1 mRNA stability HEK293T and HeLa cells were co-transfected with pcDNA6 or pcDNA6-GAS5 and miR-21 inhibitor, cultured for 24 h, then cells were treated with actinomycin D (10 mg/L). Total RNA was isolated at five time points and qRT-PCR was performed to quantify the half-lives of the PTEN and TPM1 mRNAs. NC, pcDNA6 and miR-21 inhibitor; GAS5, pcDNA6-GAS5 and miR-21 inhibitor. • - •: NC; = - =: GAS5.

24

1.2

1.0

0.8

0.6

0.4

0.2

0

0

4

### 2.5 miR-21 加速细胞内源 IncRNA-GAS5 的降解

1.2

1.0

0.8

0.6

0.4

0.2

0

0

0

4

LncRNA-GAS5 含有 miR-21 的结合位点,而 且 lncRNA 与 mRNA 在结构上较为相似,为了探 究 lncRNA-GAS5 结合 miR-21 之后 GAS5 的命运 变化,我们在HEK293T和HeLa细胞中转染 miR-21mimic 和 NC,同时使用放线菌素 D 抑制细 胞转录, 收取 5 个时间点(转染后 0、4、8、12、 24 h)细胞总 RNA, 1%琼脂糖检测 RNA 完整性, 结果显示 RNA 完整性良好,反转录获得 cDNA

后,使用实时荧光定量 PCR 检测转染 NC 组与 miR-21 mimic 组 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞(图 6) 各个时间点 lncRNA-GAS5 水平.结果发现,在两 种细胞,相比较于对照组,转染 miR-21 mimic 组 lncRNA-GAS5 的半衰期明显减短, lncRNA-GAS5 的降解速率显著增加, lncRNA-GAS5 与 miR-21 竞 争结合后, miR-21 能够与 lncRNA-GAS5 结合影 响其稳定性,加速细胞内源 lncRNA-GAS5 分子的 降解.

24





Quantitative RT-PCR analysis of the half-lives of lncRNA-GAS5 in HEK293T and HeLa cells transfected with miR-21 mimic (50 nmol/L) then treated with actinomycin D (10 mg/L). Cells were harvested at five time points, and total RNA was isolated and reverse transcribed. NC, negative control; miR-21, miR-21 mimic. ◆—◆: NC; ■—■: miR-21.

### 3 讨 论

在动物细胞中, miRNA 直接介导完全匹配靶 mRNA 的剪切,从而导致靶 mRNA 迅速降解[28-29]. miRNA 介导的非完全匹配靶 mRNA 的转录抑制, 而对完全匹配靶 mRNA 造成的剪切沉默效应分别 代表了不同的基因调节途径<sup>130</sup>.近来有一些学者认 为,miRNA 对非完全匹配靶 mRNA 的沉默作用是 通过直接的翻译抑制,降低靶 mRNA的稳定性, 或者是两者的共同作用导致的. 已有报道显示, miRNA 例如 miR-12a、miR-125b 和 let-7 能够导致 它们非完全匹配靶 mRNA 的稳定性降低<sup>[12]</sup>. 但究 竟多少匹配数目或匹配率就能介导 mRNA 的剪切 或者翻译抑制之间转化还需要进一步的研究. 因为 miRNA 非完全匹配机制的存在,非常大比例的 mRNA 受到 miRNA 的调控,而且 6 个以上的碱基 配对就可以介导 miRNA 非完全匹配机制导致的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的发生, 所以 miRNA 引起的 RNA 干扰的脱靶效应(off-target)不 容忽视,尤其在临床开发应用 miRNA 时,更应引 起研究者的重视.

miRNA 通过加速非完全匹配靶 mRNA 降解 影响 mRNA 的稳定性,以达到调控基因的表达. 非完全匹配靶基因的蛋白质水平的下调可以直接被 检测到,但是mRNA水平的变化就没有明显变化, 文献报道的 miR-21 能够调控 PTEN 和 TPM1 的 蛋白表达,但是相应的 mRNA 水平确没有显著变 化[18, 24-25]. 研究发现, miRNA 对非完全匹配 mRNA 能够介导靶 mRNA 的脱腺苷化,从而影响 mRNA 的稳定性.我们的研究证实,人为抑制细胞的转 录,miRNA 的过表达就能引起靶 mRNA 的快速降 解.那么,不抑制细胞的转录而过表达 miRNA, 非完全匹配靶 mRNA 是如何保持水平不变呢?我 们推测,相比较于 miRNA 对于完全匹配 mRNA 的 剪切降解, 脱腺苷化所造成的非完全匹配靶 mRNA 的降解效率较低,那么有可能 mRNA 由于 降解造成的减少,快速地被新转录出来的 mRNA 所恢复,但我们的推测还需进一步的研究及实验结 果支持.

长非编码 RNA 指的是长度大于 200 nt 不编码 蛋白质的一类 RNA 分子,长非编码 RNA 已经能 够参与表观遗传、转录水平、转录后水平和翻译水 平多个层次的基因表达调控<sup>[31-32]</sup>. CeRNA 也称为 miRNA"分子海绵",揭示了一类长非编码 RNA

新的调控机制,长非编码 RNA 通过"吸收" miRNA,影响 miRNA 下游功能.长非编码 RNA 的结构与 mRNA 非常相似, miRNA 靶向 mRNA 后导致基因表达的沉默,那么 miRNA 通过碱基互 补配对与长非编码 RNA 结合后会导致什么结果 呢?最近有研究报道,miRNA同样也可以调控 lncRNA 的稳定性,并通过这样的机制影响 IncRNA 丰度以及功能,已经报道证实的有 let-7 和 lincRNA-p21、miR-9 和 MALAT1、miR-34a 和 UFC1、 miR-211 和 LOC285194、 miR-124 和 LNCSCA7 以及 miR-574-5p 和 PTCSC3<sup>[33]</sup>. 以 let-7 和 lincRNA-p21 为例介绍研究者发现的机制, HuR 蛋白与 let-7/Ago2 相互作用抑制 lincRNA-p21 的表 达, 其中 HuR 蛋白和 let-7/Ago2 与 lincRNA- p21 的结合对 lincRNA-p21 的降解起到非常重要的作 用. 简言之, HuR 与 lincRNA-p21 结合, 招募 let-7/RISC,从而导致 lincRNA-p21 的降解<sup>[34]</sup>. IncRNA-GAS5 作为 miR-21 的"分子海绵",我们 的实验结果显示, miR-21 能够加速 lncRNA-GAS5 的降解,所以推测miR-21介导lncRNA-GAS5的 降解也是通过 HuR/Ago2 途径,但还需实验证实. LncRNA 和 mRNA 能够通过 miRNA 这个中间分子 实现调控作用,同时 miRNA 又可以通过影响 RNA 稳定性的方式调控 mRNA 和 lncRNA 的水平,这 些机制构成了 IncRNA、miRNA、mRNA 三者这个 复杂又精细的调控环路.

在本研究中,我们在 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞中证实了 miR-21 能够调控非完全匹配靶 mRNA PTEN 和 TPM1 蛋白水平的表达,但对 PTEN 和 TPM1 mRNA 水平无显著影响.我们发现 miR-21 可以加速 PTEN 和 TPM1 mRNA 的降解,而使用 miR-21 inhibitor 可也延长 PTEN 和 TPM1 的半衰期.此外,lncRNA-GAS5 作为 miR-21 的 "分子海绵"能够通过与 miR-21 结合增强 PTEN 和 TPM1 mRNA 的稳定性.大部分研究认为 lncRNA 通过 miRNA 的稳定性.大部分研究认为 lncRNA 通过 miRNA 的丰度;但从本研究的实验结果 来看,我们认为 lncRNA 调控 mRNA 蛋白质表达的实质是其抑制或减弱 miRNA 介导的 mRNA 降 解,导致 mRNA 稳定性的上升,最终致使 mRNA 水平和蛋白质表达的增加.

既然 miR-21 能够加速 lncRNA-GAS5 的降解, 那 么 不 同 细 胞 系 或 不 同 组 织 中 miR-21, lncRNA-GAS5 的表达是否存在相关性? 我们通过 查询非编码 RNA 数据库 NONCODE 和 miRNA 数据库 miRNAMap,比较 miR-21 和 lncRNA-GAS5 的相关性.结果显示,在 lncRNA-GAS5 高表达的 卵巢组织中,miR-21 表达水平则较低,而在 miR-21 高表达的肺、肾组织中,lncRNA-GAS5 的 表达水平较低,提示两者表达可能存在一定的相关 性,相关研究还有待于今后进一步开展.

#### 参考文献

- Cullen B R. Viruses and microRNAs. Nature Genetics, 2006, 38(6S): S25–S30
- [2] Ruvkun G. The perfect storm of tiny RNAs. Nature Medicine, 2008, 14(10): 1041–1045
- [3] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell, 2009, 136(2): 215–233
- [4] Hwang H W, Mendell J T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. British Journal of Cancer, 2006, 94(6): 776-780
- [5] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell, 2005, **120**(1): 15–20
- [6] Friedman R C, Farh K K H, Burge C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Research, 2009, 19(1): 92–105
- [7] Hutvágner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science, 2002, 297(5589): 2056–2060.
- [8] Song J J, Smith S K, Hannon G J, et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science, 2004, 305(5689): 1434–1437
- [9] Yekta S, Shih I, Bartel D P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science, 2004, 304(5670): 594–596
- [10] Lim L P, Lau N C, Garrett-Engele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature, 2005, 433(7027): 769–773
- [11] Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. Nature Reviews Genetics, 2008, 9(2): 102–114
- [12] Wu L, Fan J, Belasco J G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(11): 4034–4039
- [13] Chan J A, Krichevsky A M, Kosik K S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Research, 2005, 65(14): 6029–6033
- [14] Volinia S, Calin G A, Liu C G, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(7): 2257–2261
- [15] Zhang Z, Zhu Z, Watabe K, et al. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21. Cell Death & Differentiation, 2013, 20 (11): 1558–1568
- [16] Asangani I A, Rasheed S A K, Nikolova D A, et al. MicroRNA-21

(miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. Oncogene, 2008, **27**(15): 2128–2136

- [17] Meng F, Henson R, Wehbe Janek H, *et al.* MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology, 2007, **133**(2): 647–658
- [18] Zhu S, Si M L, Wu H, et al. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(19): 14328–14336
- [19] Sayed D, Rane S, Lypowy J, et al. MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. Molecular Biology of The Cell, 2008, 19(8): 3272–3282
- [20] Wang P, Zou F, Zhang X, et al. MicroRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. Cancer Research, 2009, 69(20): 8157–8165
- [21] Quek X C, Thomson D W, Maag J L V, et al. lncRNAdb v2.0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. Nucleic Acids Research, 2015, 43(D1): D168–D173.
- [22] Schneider C, King R M, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. Cell, 1988, 54(6): 787–793
- [23] Mourtada-Maarabouni M, Pickard M R, Hedge V L, et al. GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer. Oncogene, 2009, 28(2): 195–208
- [24] Sheng W Z, Chen Y S, Tu C T, et al. MicroRNA-21 promotes phosphatase gene and protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase expression in colorectal cancer. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22(24): 5532
- [25] Qin X, Yan L, Zhao X, et al. microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer. Oncology Letters, 2012, 4(6): 1290–1296
- [26] Zhang Z, Qin Y W, Brewer G, et al. MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2012, 3(4): 593–600
- [27] Rüegger S, Groβhans H. MicroRNA turnover: when, how, and why. Trends in Biochemical Sciences, 2012, 37(10): 436–446
- [28] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. Genes & Development, 2002, 16(6): 720–728
- [29] Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell, 2000, 101(1): 25–33
- [30] Hannon G J. RNA interference. Nature, 2002, 418(6894): 244-251
- [31] Eades G, Zhang Y S, Li Q L, et al. Long non-coding RNAs in stem cells and cancer. World J Clin Oncol, 2014, 5(2): 134–141
- [32] Qiu M T, Hu J W, Yin R, et al. Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research. Tumor Biology, 2013, 34(2): 613–620
- [33] Yoon J H, Kim J, Gorospe M. Long noncoding RNA turnover. Biochimie, 2015, 117: 15–21
- [34] Yoon J H, Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. Molecular Cell, 2012, 47(4): 648–655

## LncRNA-GAS5 Inhibits Decay of microRNA-21 Imperfect Complementary Target mRNAs\*

ZHENG Wei, DONG Jie, LI Shao-Hua, DING Hong-Mei, LI Hui, HUANG Ai-Xue, XIA Wei, BAI Chen-Jun, GUO Xiao-Hua, LI Da, GENG Jie, LI Jie<sup>\*\*</sup>, SHAO Ning-Sheng<sup>\*\*</sup> (Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract** LncRNA-GAS5 can act as a "sponge" for microRNA-21 (miR-21) by competitively sequestering miR-21 from binding target mRNAs. Moreover, miR-21 directly regulates PTEN and TPM1 *via* imperfect complementary target base pairing. We confirmed miR-21 regulates PTEN and TPM1 protein expression without significantly affecting PTEN and TPM1 mRNA expression *via* imperfect complementary target binding in HEK293T and HeLa cells. Furthermore, Overexpressing miR-21 could significantly shorten half-lives of PTEN and TPM1 mRNA expression *via* imperfect with lncRNA-GAS5 expression vector, we found lncRNA-GAS5 competitively bound miR-21 and increased the half-lives of PTEN and TPM1. Besides, miR-21 bound with lncRNA-GAS5 could lead rapid decay of lncRNA-GAS5. This study indicates lncRNA-GAS5 functions as a miR-21 " sponge" that inhibits mRNA degradation of the miR-21 imperfect complementary targets PTEN and TPM1, and miR-21 also could regulate lncRNA-GAS5 stability by base pairing. Further exploration of the mechanisms may improve our understanding of the lncRNA-miRNA-mRNA sophisticated regulatory feedback loop.

Key words lncRNA-GAS5, miR-21, PTEN, TPM1, RNA stability DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0113

<sup>\*</sup>This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31370794, 31570817, 31200566).

<sup>\*\*</sup>Corresponding author. Tel: 86-10-66932313

SHAO Ning-Sheng. E-mail: shaonsh@hotmail.com

LI Jie. E-mail: jannbio@163.com

Received: March 26, 2017 Accepted: June 27, 2017