

沉默 PARP-1 对 miR-221 表达的影响

刘嘉贤¹ , 唐焕文^{1,2} , 杜谕君³ , 云林¹ , 凌晓璇^{1,4} , 刘林华^{1,2}

(广东医学院¹ 环境与健康研究所,² 公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室,
³ 附属医院心血管中心心电图室,⁴ 公共卫生学院实验中心,广东省东莞市,523808)

摘要: 目的 探讨 PARP-1 沉默 TK6 细胞 miR-221 的表达。**方法** 以空载体 TK6 细胞为对照组, 以 PARP-1 沉默 TK6 细胞为处理组。免疫印迹法检测 PARP-1 蛋白表达量, 反转录实时荧光定量-聚合酶链反应检测 miR-221 的表达改变。**结果** PARP-1-shRNA 组细胞 PARP-1 蛋白表达量与对照组细胞 [(1.00±0.11)倍]相比, 下降了 75% ($P<0.05$), miR-221 表达量与对照组细胞 [(1.00±0.07)倍]相比, 下降了 26% ($P<0.05$)。**结论** TK6 细胞 miR-221 表达受 PARP-1 调节。

关键词: PARP-1 miR-221 TK6¹

Expression of miR-221 in PARP-1 silencing cells

Liu Jia-xian*, Tang Huan-wen, Du Yu-jun, Yun Lin, Ling Xiao-xuan, Liu Lin-hua.

(Institute for Environment and Health, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

Abstract: Objective To explore expression of miR-221 in PARP-1 silencing cells. **Methods** TK6 cells with PARP-1 silencing were sorted as treated group, while cells with empty vector as control. Expression of PARP-1 protein were detected by immunoblotting. Expression of miR-221 was detected by reverse transcription real-time RT-PCR assay. **Results** Compared with the control group, expression of PARP-1 protein reduced by 75% ($P<0.05$), while expression of miR-221 reduced by 26% ($P<0.05$). **Conclusions** Expression of miR-221 in

Corresponding author: Liu Lin-hua, **E-mail:** linhua-liu@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助 (81202231), 广东省科技计划项目 (2013B021800066)

作者简介: 刘嘉贤, 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子毒理学与职业流行病学; ; E-mail: jxliu@126.com

通讯作者: 刘林华, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 环境与分子毒理学;

E-mail: linhua-liu@163.com

TK6 cells may be regulated by PARP-1.

Key words: PARP-1 miR-221 TK6

基因表达过程受到严格的调控，基因表达调控对于生物实现自我调节、适应环境变化起非常重要的作用。聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 [Poly (ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1] 是一种广泛存在于真核细胞中的核酶，在应对遗传毒性反应过程中具有重要作用，如参与细胞凋亡、DNA 损伤的修复等过程，同时最近研究表明 PARP-1 在基因表达的调控中发挥重要作用，但是其具体机制尚不明^[1, 2]。目前国内外研究显示，受 PARP-1 调节的基因均为蛋白质编码基因，未见关于其对非编码 RNA 调节的研究。microRNA (miRNA) 是真核生物中广泛存在的一类非编码小分子核酸，具有众多的生物学功能，其正常功能的发挥需要以自身正常表达为前提。众多研究表明，miRNA 在基因表达调控中具有重要作用，但是关于其上游调节因子的研究却非常少见。本课题组前期研究发现氢醌 (Hydroquinone, HQ) 处理 TK6 细胞可引起多种生物学改变，包括 DNA 整体低甲基化、PARP-1 蛋白表达下降、抑制白血病相关 miRNA (包括 miR-221) 的表达等，提示 PARP-1 很可能影响 miR-221 的表达。本文以 PARP-1 沉默细胞为研究模型，初步探讨 PARP-1 对 miR-221 表达的影响，以期拓展 PARP-1 在基因转录方面的功能，为 miRNA 调控网络以及与其它调节因子网络整合的研究提供新发现。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 ①试剂：马血清（美国 Gibco 公司）；RPMI 1640 培养基（美国 Hyclone 公司）；TRIzol 总 RNA 提取试剂（美国 Invitrogen 公司）；逆转录试剂盒

（RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；α-

[在此处键入]

Tublin 抗体，parp-1 抗体（美国 Cell Signaling Technology 公司）；荧光定量聚合酶链反应（PCR）试剂盒（FastStart Universal SYBR Green Master，德国 Roche Applied Science 公司）。

②仪器：Nanodrop 紫外分光光度计；梯度 PCR 仪（德国 Eppendorf 公司）；ABI 7500 荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司）。

1.2 PARP-1 沉默 TK6 细胞模型^[3] TK6 细胞为四川大学华西医学院张立实教授馈赠。PARP-1 沉默 TK6 细胞由前期研究建立^[3]。以空载体 TK6 细胞为对照组，以 PARP-1 沉默 TK6 细胞为处理组。

1.3 细胞总 RNA 提取 细胞总 RNA 提取按照 TRIzol 产品说明书进行。总 RNA 纯度和含量用 Nanodrop 紫外分光光度计进行测定，并用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.4 实时荧光定量-PCR（qRT-PCR）检测 miR-221 的表达 以上述 RNA 样品为模板，经逆转法分别合成 miR-221 和 miR-126（作为对照 miRNA）的第 1 互补链，之后对 miR-221 和 miR-126 的表达量进行 qRT-PCR 检测，反转录引物和 PCR 引物见表 1，由上海英俊公司合成。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行定量分析，以 U6 snRNA 为内参基因校正上样量，试验重复 3 次。倍数改变= $2^{-\Delta\Delta CT}$ ，其中 $\Delta\Delta CT=\Delta CT_{处理}-\Delta CT_{对照}$ ， $\Delta CT=CT_{目的基因}-CT_{U6}$ 。

表 1 PCR 引物序列^[4, 5]

引物名称	引物序列（5'-3'）
miR-221 反转录	GCGAGGCGGTGGCAGTGGAAGCGTGATTTATTCACCGCCTCGCGAAACCCA
miR-221 上游	GTGCTGCGATAAGCTACATTGTCTGCTG
miRNA 通用下游	GCTGTGGCAGTGGAAGCGTGATTTATT
miR-126 反转录	GCGAGGCGGTGGCAGTGGAAGCGTGATTTATTCACCGCCTCGCCGATTAT
miR-126 上游	GGAAGTAGACTGTCGTACCGTGAGTAATAATGC
U6 反转录	AAAATATGGAACGCTTCACG

[在此处键入]

U6 上游	CGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAAC
U6 下游	GCTTCACGAATTGCGTGTTCATCCTTGC

1.5 免疫印迹 细胞裂解液冰浴细胞 5 min 提取总蛋白后，用 Bicinchoninic acid（BCA）法对总蛋白进行定量。PARP-1 蛋白定量用蛋白质免疫印迹法，总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将蛋白以恒定电流转至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉 37 °C封闭 30 min，一抗 4 °C孵育过夜，洗脱，二抗室温孵育 1 h，洗脱。PVDF 膜用增强化学发光显影 X 胶片，暗室曝光，实验重复 3 次。底片扫描后，使用 Quantity One 软件进行定量分析，以 α -Tublin 对上样误差进行校正。

1.6 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 16.0 统计软件进行 *t* 检验，*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PARP-1沉默细胞鉴定

图1显示，与对照组细胞shRNA-CTR [(1.00±0.11)倍]相比，PARP-1-shRNA组细胞 PARP-1蛋白表达量为（0.25±0.10）倍，下降了75%（*P*<0.05）,表明该由杨慧等^[3]建立细胞 PARP-1沉默效果良好。

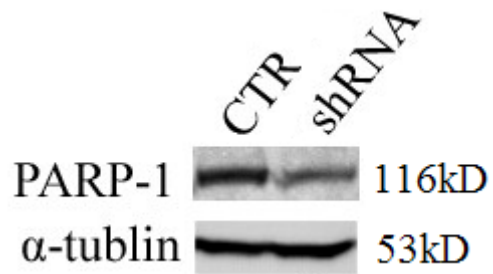


图1 细胞PARP-1蛋白的表达

2.2 生物信息学分析

[在此处键入]

图2所示，miR-221启动子序列存在3个与PARP-1靶DNA序列（TCGATC）^[6]互补的碱基序列，而miR-126启动子序列没有该互补序列，表明PARP-1有调控miR-221的可能性。



图 2 ‘AGCTAG’ in the miR-221 promoter

2.3 PARP-1沉默细胞miR-221表达改变

表2显示，与对照组细胞shRNA-CTR[(1.00±0.07)倍]相比，PARP-1-shRNA组细胞miR-221表达量为（0.74±0.03）倍，下降了26%（*P*<0.05），而对照miRNA miR-126的表达没有明显改变（*P*>0.05），表明miR-221的表达是受PARP-1影响的。

表 2 沉默 PARP-1 对细胞 miR-221 和 miR-126 表达量的影响（n=3， $\bar{x} \pm s$ ，倍数）

分组	miR-221	miR-126
shRNA-CTR	1.00±0.07	1.00±0.08
PARP-1-shRNA	0.74±0.10*	0.98±0.04

注：*与 shRNA-CTR 组比较，*P*<0.05。

3 讨论

研究显示，miRNA参与调控人类基因组70%的编码基因。miRNA主要通过靶基因 mRNA以碱基互补配对方式结合，从而发挥其负性调控基因表达的作用。PARP-1基因也在基因表达调控中发挥重要作用，可通过各种机制进行调节，如修饰组蛋白改变染色质结构，作为转录调节因子、DNA甲基化调节因子等^[1]。但是目前的研究都侧重在编码基因方面，

[在此处键入]

未见其对miRNA的调节的研究。miRNA生成过程共分3步：首先细胞核中miRNA的基因在RNA聚合酶Ⅱ作用下生成原始转录片段；然后经RNA内切酶Ⅲ Droscha剪切及一系列复杂的过程，生成miRNA前体；随后miRNA前体被转运到细胞质，被Dicer酶切割成成熟的miRNA。miRNA对比其他RNA，如信使RNA（mRNA）、转运RNA（tRNA）和核糖体RNA（rRNA）等，它们的生成过程和功能不一致，却是存在共性，即都是由DNA转录而成，都有经历相应初级转录产物和初级产物剪切的过程。那么，miRNA可能在其生成过程受到PARP-1的调控。生物信息学分析发现miR-221启动子序列存在3个与PARP-1靶DNA序列（TCGATC）^[6]互补的碱基序列，而miR-126启动子序列没有该互补序列，表明PARP-1有调控miR-221的可能性。为探索miR-221是否受到PARP-1调控，进行此次研究。

本次研究发现，PARP-1-shRNA组细胞PARP-1蛋白表达量与对照组细胞 $[(1.00\pm 0.11)$ 倍]相比，下降了75%（ $P<0.05$ ），可见杨慧等构建人PARP-1基因沉默细胞株干扰PARP-1基因表达效果良好。miR-221表达量与对照组细胞 $[(1.00\pm 0.07)$ 倍]相比，下降了26%（ $P<0.05$ ），miR-126的表达没有明显改变，可见miR-221的表达是受PARP-1影响的。

PARP-1参与细胞凋亡、DNA损伤修复、维持基因组稳定性以及调节基因转录过程等。在肿瘤的发生、发展过程中，常伴有PARP-1基因失活，导致细胞凋亡障碍、基因突变率增高和基因组稳定性下降^[7]。众多研究显示，microRNA异常表达与肿瘤发生、发展有关，miR-221也在多种肿瘤中异常表达，如白血病、肝癌和乳腺癌等^[8]。氢醌引起多种生物学改变^[9]。前期研究揭示氢醌（Hydroquinone，HQ）处理TK6细胞可引起PARP-1低表达，miR-221低表达，通过miR-221靶基因预测等论证了HQ致PARP-1基因下调机制可能与miR-221表达异常有关^[5]，但结合本次PARP-1沉默TK6细胞miR-221表达的研究，发现miR-221的表达确实受到PARP-1影响，PARP-1蛋白可能是miR-221的上游调节因子。笔者推测氢醌诱导miR-221低表达可能与PARP-1有关，PARP-1可通过自身下调来调节基因表达，但是PARP-1

[在此处键入]

1在此过程具体充当什么样的角色，有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Kraus W L, Hottiger M O. PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2013,34(6):1109-1123.
- [2] Morales J, Li L, Fattah F J, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2014,24(1):15-28.
- [3] 杨慧, 梁海荣, 陈佳佳, 等. 基于慢病毒介导RNA干扰技术的人PARP-1基因沉默细胞株构建[J]. 环境与健康杂志, 2014,31(4):288-291.
- [4] 刘林华, 凌晓璇, 唐焕文, 等. 白血病相关miRNA在氢醌处理细胞中的表达[J]. 环境与健康杂志, 2013,30(12):1051-1053.
- [5] 刘林华, 凌晓璇, 梁海荣, 等. 氢醌诱导TK6细胞miR-221表达异常致PARP-1基因下调的机制[J]. 环境与健康杂志, 2011,28(6):485-487.
- [6] Kraus WL. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008,20(3):294-302.
- [7] Weaver AN, Yang ES. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2013,3:290.
- [8] Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, et al. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy[J]. Curr Mol Med, 2012,12(1):27-33.
- [9] 沙焱, 庄志雄, 杨震宇, 等. 氢醌对人支气管上皮细胞DNA损伤及细胞周期的影响[J]. 实用预防医学, 2012,19(6):807-810.