

鸡 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区 1196C>A 单核苷酸多态性的功能性鉴定及分析*

于莹莹^{1)**} 乔书培^{1)**} 孙婴宁^{1, 2)} 宋鹤¹⁾ 张潇飞¹⁾
闫晓红¹⁾ 李辉¹⁾ 王宁^{1)***}

¹⁾农业部鸡遗传育种重点实验室, 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室,
东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030;

²⁾齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 鸡 *IGFBP2* 基因 3'非编码区(3'UTR) 1196C>A 单核苷酸多态性(SNP)与鸡的腹脂重和腹脂率显著相关. 生物信息学分析显示, 该 SNP 恰好位于 *gga-miR-456-3p* 的一个潜在靶基因结合位点处, 提示 *IGFBP2* 基因可能是 *gga-miR-456-3p* 的一个靶基因, 且该 SNP 位点可能影响 *gga-miR-456-3p* 对 *IGFBP2* 基因表达的调控作用. 为鉴定 SNP 1196C>A 是否为功能性 SNP, 本研究分别构建了包含该 SNP 位点 C 或 A 等位基因的双荧光素酶报告基因载体, 比较分析这两个等位基因在鸡胚成纤维细胞系(DF1)和鸡前脂肪细胞中对报告基因活性和表达的影响; 利用 miRNA mimics 和 inhibitor 分析 *gga-miR-456-3p* 对不同等位基因报告基因活性以及内源性 *IGFBP2* 表达的影响. 结果发现, 在 DF1 细胞和鸡前脂肪细胞中, A 等位基因的报告基因活性和表达均显著高于 C 等位基因($P < 0.05$); *gga-miR-456-3p* 仅影响 C 等位基因的报告基因活性和表达, 而对 A 等位基因的报告基因活性没有明显影响; *gga-miR-456-3p* 调控细胞内源性 *IGFBP2* 基因的 mRNA 和蛋白质表达. 本研究证实 *IGFBP2* 基因是 *gga-miR-456-3p* 的靶基因, 其 3'UTR 区 SNP 1196C>A 是一个功能性 SNP, 它影响 *gga-miR-456-3p* 对鸡 *IGFBP2* 基因的表达调控作用. 本研究结果对于鸡的分子辅助选择育种及 *IGFBP2* 基因在脂肪沉积中调控机制的阐明具有重要意义.

关键词 鸡, *IGFBP2* 基因, 单核苷酸多态性, 3'非编码区, *gga-miR-456-3p*

学科分类号 Q75, R3, S8

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00062

类胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是一种具有广泛生物学功能的细胞因子, 因其与胰岛素结构类似而得名. IGF-1 在脂肪生成中发挥重要作用^[1]. IGF-1 能刺激间充质干细胞及前体脂肪细分为成熟脂肪细胞, 促进脂肪沉积, 并且抑制脂肪细胞的凋亡^[2]. IGF-1 通过结合其位于细胞表面的相应受体来发挥其生物学作用. IGF-1 的生物活性受类胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor binding proteins, IGFBPs) 的严密调控. IGFBPs 参与 IGF-1 的运输, 在 IGF-1 的代谢中起关键作用. 此外, IGFBPs 还能延长 IGF-1 的半衰期, 调节 IGF-1 的生物利用率^[3]. IGFBP2 是一个分子质量为 36 ku 的可溶性蛋白质, 是循环系统中含量第二多的 IGFBPs. *IGFBP2* 基因在肝脏、脂肪细胞、生殖系统和中枢神经系统中广泛表达. 基因敲除和转基因动物研究发现,

IGFBP2 在胰腺、骨骼、心血管、肾脏等脏器的发育以及肺癌、前列腺癌等多种癌症的发生中发挥重要作用^[4-9].

IGFBP2 通过自分泌和内分泌两种方式发挥作用^[10-11]. *IGFBP2* 是白色前体脂肪细胞分泌的主要 IGFBPs^[12]. 最新研究结果表明, *IGFBP2* 在脂肪形成过程中发挥重要作用. 体外研究显示, 过表达 *IGFBP2* 基因能抑制 3T3-L1 脂肪细胞的分化^[13], 且这种抑制作用主要与 *IGFBP2* 蛋白 C 端的肝素结合结构域(HBD)有关^[14]. 在转基因小鼠中发现, 过表

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2009CB941604), 国家肉鸡产业技术体系建设(CARS-42)和国家自然科学基金(31372299)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0451-55191770, E-mail: wangning@neau.edu.cn

收稿日期: 2014-03-07, 接受日期: 2014-06-17

达 *IGFBP2* 基因能提高胰岛素敏感性, 可以预防小鼠食源性脂肪沉积及因年龄增长引起的胰岛素抵抗^[15]. 肥胖儿童腹部皮下脂肪组织中, *IGFBP2* 基因的表达随脂肪量的增加和胰岛素敏感性的降低而增加^[16]. 人体内 *IGFBP2* 的循环水平与肥胖症和胰岛素敏感性密切相关, 目前, 医学临床上已将 *IGFBP2* 作为代谢综合征的标志物之一^[17-19].

与哺乳动物相似, 禽类 *IGFBP2* 也包含 RGD (Arg-Gly-Asp, RGD) 结构域和 ATTTA 结构域. 鸡 *IGFBP2* 基因位于 7 号染色体, 由 4 个外显子和 3 个内含子构成, 其 3'UTR 序列长约 1.1 kb, 比人、鼠及绵羊 *IGFBP2* 基因的 3'UTR 长. 鸡 *IGFBP2* 基因在脂肪组织生长发育过程中持续表达^[20]. 本实验室前期的研究, 在鸡 7 号染色体上定位了 1 个显著影响鸡腹脂重和腹脂率的 QTL, 其中 *IGFBP2* 是该区域唯一功能已知的基因^[21]. 此外, 前期的基因多态性研究发现, 鸡 *IGFBP2* 基因的 3'UTR 区存在一个 SNP 位点(1196C>A), 该 SNP 与鸡腹脂重和腹脂率显著相关^[22]. 生物信息分析显示, 鸡 *IGFBP2* 基因 3'UTR SNP (1196C>A) 是 *gga-miR-456-3p* 的一个潜在靶基因结合位点, 推测该 SNP 可能是一个功能性 SNP. 为此, 本研究开展了 SNP 1196C>A 的功能性鉴定及分析. 研究结果表明, *IGFBP2* 基因是 *gga-miR-456-3p* 的靶基因, 其 3'UTR SNP 1196C>A 影响 *gga-miR-456-3p* 对 *IGFBP2* 基因表达的调控.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株、细胞株及基因组 DNA

本研究选用的克隆载体 pEasy-T1 simple vector

及菌株 Top10 均购自全式金公司(北京); 荧光素酶双报告基因载体 psiCHECK™-2 vector 购自 Promega 公司(美国); 鸡胚成纤维细胞系(DF1)购自上海生命科学研究院细胞资源中心; 鸡基因组为本实验室保存的第 10 代东北农业大学高、低脂双向选择系肉仔鸡基因组 DNA.

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司(美国); DNA 纯化回收试剂盒、质粒小量制备试剂盒购自 Axygen 公司(杭州); PureLink™ RNA Micro Kit、Opti-MEM®、Trizol Reagent、Lipofectamine 2000 均购自 Invitrogen 公司(美国); 胎牛血清、DMEMF12 购自 Gibco 公司(美国); FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 购自 Roche 公司(德国); PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自 Takara 公司(大连); Dual-Luciferase® Reporter Assay System、ImProm- II™ Reverse Transcription System 为 Promega 公司产品(美国); 兔抗人 *IGFBP2* 多克隆抗体(sc-13096)购自 Santa Cruz 公司(美国); 鼠源 β -Actin 单克隆抗体(AA128)、ECL 显色液、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔抗体(A0208)及辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠抗体(A0216)均购自碧云天生物技术公司(上海).

1.1.3 引物设计及合成

IGFBP2 基因 3'UTR 区的克隆引物: 参照 NCBI 数据库中鸡 *IGFBP2* 基因序列(NM_205359), 设计包含 SNP(1196C>A)的 3'UTR 区克隆引物 *IGFBP2*-F1/*IGFBP2*-R1(表 1), 上、下游引物分别携带 *Not* I 和 *Xho* I 酶切位点. 另外, 设计 *IGFBP2* 基因表达的检测引物 *IGFBP2*-F2/*IGFBP2*-R2(表 1);

Table 1 Primer sequences, annealing temperatures and product size

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Product size	Annealing temperature
<i>IGFBP2</i> -F1	CCTCGAGGAGGGACTGCTTCCAATAG	110	49.1
<i>IGFBP2</i> -R1	TTGCGGCCGCAAGCAGGAAGATGCCACAAA		
<i>IGFBP2</i> -F2	GAGCAGCACCGGCAGATG	151	63.5
<i>IGFBP2</i> -R2	TACAGGCCATGCTTGTCACA		
hRluc-F	TGATCGAGTCCTGGGACGA	265	62
hRluc-R	ACAATCTGGACGACGTCGGG		
hFluc-F	CCAACCTGTTCAGCTTCTTC	254	63
hFluc-R	ACCTTGGCCTCGAAGAATGG		
NONO-F	AGAAGCAGCAGCAAGAAC	151	65
NONO-R	TCCTCCATCCTCCTCAGT		

参照 NCBI 数据库中鸡 *NONO* 基因序列 (NM_001031532), 设计内参基因 *NONO* 表达检测引物 NONO-F/NONO-R; 参照 psiCHECK™-2 vector 序列, 分别设计海肾荧光素酶基因(*hRluc*)表达检测引物及以萤火虫荧光素酶基因(*hFluc*)表达检测引物: hRluc-F/hRluc-R(表 1)和 hFluc-F/hFluc-R(表 1). 所有引物均利用 Primer Premier 5.0 软件进行设计, 引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成.

1.1.4 miRNA 模拟物及抑制剂的设计与合成

参照 miRBase 数据库(miRBase database, <http://www.mirbase.org>)中 gga-miR-456-3p(MIMAT0003777) 的序列, 设计并合成 gga-miR-456-3p 抑制剂(miR-456-3p inhibitor)、模拟物(miR-456-3p mimics)及无关干扰片段 NC. 模拟物、抑制剂及 NC 的合成由上海英骏生物技术有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 荧光素酶双报告基因载体的构建

从第 10 代东北农业大学高、低脂双向选择系肉仔鸡中挑选不同等位基因的纯合个体, 以其基因组 DNA 为模板, 利用 2×Pfuamastermix DNA 聚合酶, 扩增鸡 *IGFBP2* 基因的 3'UTR 区(包含 1196C>A 位点). PCR 扩增反应体系: 上下游引物 *IGFBP2*-F1/*IGFBP2*-R1 各 1 μl(10 μmol/L), 10×PCR 缓冲液 5 μl, dNTPs 5 μl (2.5 mmol/L), 2×Pfuamastermix DNA 聚合酶 0.5 μl, DNA 模板 5 μl (50 mg/L), 无菌水 32.5 μl. 最佳反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 49.1℃ 30 s, 72℃ 40 s, 33 个循环, 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存. PCR 扩增获得两端带有 *Not* I 和 *Xho* I 的 *IGFBP2*-A 和 *IGFBP2*-C 片段(A 和 C 分别代表 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区 1196C>A 的不同等位基因), 分别克隆到 pEasy-T1 simple vector 载体. 菌落经 PCR 鉴定和质粒 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定无误后, 送上海英骏生物公司测序. 阳性重组质粒分别命名为 T-*IGFBP2*-A 和 T-*IGFBP2*-C. 利用 *Not* I 和 *Xho* I 分别双酶切 T-*IGFBP2*-A 和 T-*IGFBP2*-C, 琼脂糖凝胶电泳纯化, 分别获得 110 bp 大小的 *IGFBP2*-A 和 *IGFBP2*-C 3'UTR 区片段. 同样采用 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切 psiCHECK™-2 vector, 纯化后分别与 *IGFBP2*-A 和 *IGFBP2*-C 3'UTR 区片段连接, 获得不同等位基因的 3'UTR 区双报告基因载体. 将酶切和测序鉴定无误的报告载体分别命名为 psi-*IGFBP2*-A 和 psi-*IGFBP2*-C.

1.2.2 鸡胚成纤维细胞系(DF1)的培养

DF1 细胞培养于添加了 10%胎牛血清及终浓度为 100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM/F12 培养基, 置于温度为 37℃、CO₂ 浓度为 5%和相对湿度为 90%的细胞培养箱中培养.

1.2.3 鸡前脂肪细胞(stromal-vascular cells, SV)的分离与培养

选取 12 日龄 AA 肉仔鸡, 无菌采集腹部脂肪组织(3~5 g), PBS 清洗 2 遍后, 剪碎, 用 2 g/L 的 I 型胶原酶 37℃ 消化 65 min, 每隔 5 min 上下颠倒混匀一次. 然后将消化后的组织液依次通过 100 μm 和 600 μm 的滤网, 除去未消化的组织块. 收集过滤后的组织消化液, 2 000 g 离心 10 min. 弃去上层液体, 下层沉淀的细胞经过红细胞裂解液处理后, 2 000 g 离心 10 min, 获得鸡前脂肪细胞. 鸡前脂肪细胞的培养条件与 DF1 细胞相同.

1.2.4 DF1 细胞 *IGFBP2* 基因 SNP(1196C>A)的检测

以 DF1 细胞 cDNA 为模板, 利用 *IGFBP2* 基因克隆引物(*IGFBP2*-F1/*IGFBP2*-R1)进行 PCR 扩增测序, 根据测序峰图判断 DF1 细胞 *IGFBP2* 基因 SNP (1196C>A)的基因型.

1.2.5 报告基因活性分析

将 DF1 细胞接种至 12 孔板(2.5×10⁵ 个/孔)中, 待汇合度达 80%~90%时, 将 psi-*IGFBP2*-A 和 psi-*IGFBP2*-C 两种不同等位基因载体质粒分别转染 DF1 细胞, 转染试剂为 Lipofectamine 2000, 质粒质量为 1 μg/孔, 转染后细胞培养于 Opti-MEM® medium 中, 4~6 h 后换为添加 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基. 转染 24 h 后, 收集细胞裂解液, 按照双荧光素酶检测试剂盒说明书操作, 采用化学单管检测仪分别测定各组的海肾和萤火虫(内参)荧光素酶活性, 分析比较不同等位基因的报告基因载体活性. 本实验还在鸡前脂肪细胞(SV)中进行重复. 另外, 我们采用 12 孔细胞培养板培养 DF1 细胞, 每孔接种 2.5×10⁵ 个细胞, 汇合度达 30%~40%时, 将 psi-*IGFBP2*-A 和 psi-*IGFBP2*-C 分别与 gga-miR-456-3p inhibitor、gga-miR-456-3p mimics 及无关干扰片段 NC 共转染细胞, 检测双荧光素报告基因活性, 分析 gga-miR-456-3p 对 psi-*IGFBP2*-A 和 psi-*IGFBP2*-C 报告基因活性的影响. 上述实验均做 3 次独立重复.

1.2.6 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

将两种不同基因型报告基因载体 psi-*IGFBP2*-A

和 psi-IGFBP2-C, 分别转染已接种至 6 孔板中汇合度达到 80%~90% 的 DF1 细胞, 转染试剂为 Lipofectamine 2000, 质粒质量为 2.5 μg/孔. 24 h 后收集细胞. 利用 Trizol 法提取细胞的总 RNA, 将 RNA 样品统一调到 200 μg/L. 按照 PureLink™ RNA Micro Kit、ImProm- II™ Reverse Transcription System 试剂盒说明书进行 RNA 纯化和反转录, 采用 qRT-PCR 检测海肾荧光素和萤火虫荧光素酶 mRNA 的表达, 萤火虫荧光素酶基因作为内参基因, 本试验也在鸡前脂肪细胞(SV)中进行重复. 采用 6 孔细胞培养板培养 DF1 细胞, 待细胞汇合度达 30%~40%, 将 gga-miR-456-3p inhibitor、gga-miR-456-3p mimics 及无关干扰片段 NC 分别转染细胞, 24 h 后收集细胞, 提取细胞总 RNA, 纯化并反转录, 采用 qRT-PCR 检测内源性 IGFBP2 基因和 NONO 基因的表达, 其中, 以 NONO 基因的表达为内参. 以上实验均进行 3 次独立重复实验.

1.2.7 蛋白质印迹分析

将 DF1 细胞接种至 6 孔板中, 待细胞汇合至 30%~40% 时, 利用 Lipofectamine 2000, 将 gga-miR-456-3p inhibitor、gga-miR-456-3p mimics 及无关干扰片段 NC 分别转染 DF1 细胞, 48h 后裂解细胞, 分别获得 miR-456-3p inhibitor、miR-456-3p mimics 及 NC 转染细胞的裂解液. 用 BIO-RAD 公司的 Mini-PROTEAN3 电泳系统, 进行 SDS-PAGE. 电泳结束后, 采用 BIO-RAD 公司的 Mini Trans-Blot 系统, 将蛋白质样品由 PAGE 胶上转移至孔径为 0.22 μm 的 NC 膜. 用含有 5% 脱脂乳的 PBST(含 0.05% 吐温的 PBS), 将 NC 膜室温封

闭 2 h. 然后洗去膜上的封闭液, 将膜孵育在含有 β-Actin 抗体(稀释浓度为 1:100) 2 h; IGFBP2 抗体(稀释浓度为 1:300)的 PBST 溶液, 4℃ 过夜, 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 然后, 将膜孵育在含辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体(稀释浓度为 1:5 000)的 PBST 溶液中, 置于水平摇床上, 室温孵育 1 h. 用 PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 之后进行常规 ECL 显色.

1.2.8 数据分析

运用 SAS 9.2 软件(SAS Institute Inc)分析实验数据, 数据结果表示为 $\bar{x} \pm s$, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著.

2 结果与分析

2.1 IGFBP2 基因 3'UTR 区的报告基因载体的构建

为验证 IGFBP2 基因 3'UTR 区的 SNP(1196C>A) 是否为功能性 SNP, 以第 10 代东北农业大学高、低脂双向选择系肉仔鸡 1196C>A 不同等位基因的纯合个体的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 IGFBP2 基因的 3'UTR 区(1160~1269, 包含 1196C>A 位点), 获得 110 bp 的目的片段. 利用 T 载体克隆和测序, 证明已成功获得 IGFBP2 基因 3'UTR 1196C>A 位点的 C 和 A 两个等位基因的克隆片段(图 1a). 双酶切阳性重组质粒, 纯化回收 IGFBP2 基因 3'UTR 区克隆片段, 并插入双报告基因载体 psiCHECK™-2 vector, 获得 A 等位基因报告基因载体 (psi-IGFBP2-A) 和 C 等位基因报告基因载体 (psi-IGFBP2-C)(图 1b). 双酶切鉴定及测序验证无误后, 用于后续研究.

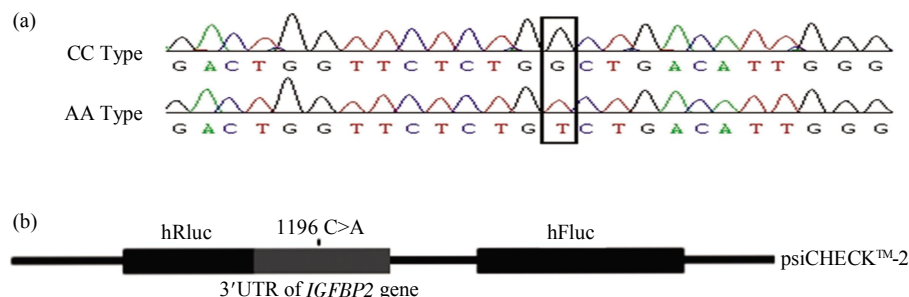


Fig. 1 Sequencing and schematic diagram of the 3'UTR reporter constructs of chicken IGFBP2

(a) Sequencing electropherograms of the two individual alleles of 1196 C>A of chicken IGFBP2 3'UTR region. (b) The schematic diagram of 3'UTR reporter constructs of chicken IGFBP2 (containing 1196 C>A). hRluc, Renilla luciferase; hFluc, Firefly luciferase.

2.2 *IGFBP2* 基因不同等位基因的双荧光素酶报告基因活性检测

为保证实验结果准确可靠,我们分别在鸡前脂肪细胞和 DF1 细胞中比较了 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区 SNP(1196C>A)的两个不同等位基因(A 和 C)对报告基因活性的影响. 双荧光素酶报告基因检测结果显示,在鸡前脂肪细胞和 DF1 细胞中, A 和 C 等位基因的报告基因载体活性存在显著差异($P < 0.05$),都表现为 A 等位基因的报告基因活性显著高于 C 等位基因, A 等位基因的报告基因活性在鸡前脂肪细胞及 DF1 细胞中分别是 C 等位基因的 1.23 和 1.46 倍(图 2a),说明 SNP 1196C>A 影响报

告基因活性(蛋白质表达). 为了进一步确定 SNP 1196C>A 是否影响报告基因转录后的调控,我们以萤火虫荧光素酶基因作为内参基因^[23],利用 qRT-PCR 方法,分析了 *IGFBP2* 基因的 A 和 C 两个等位基因的海肾荧光素酶报告基因在 mRNA 水平上的差异. 结果发现,在鸡前脂肪细胞和 DF1 细胞中, A 等位基因的 mRNA 水平均显著高于 C 等位基因($P < 0.05$)(图 2b),说明该 SNP 影响 *IGFBP2* 基因转录后的调控. 上述结果说明鸡 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区的 SNP(1196C>A)为功能性 SNP.

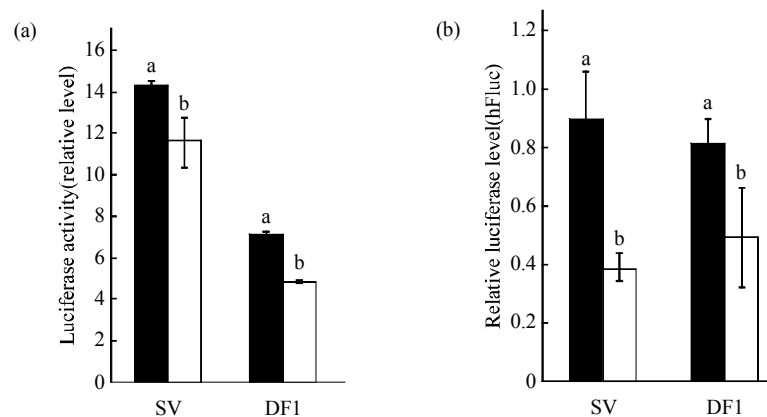


Fig. 2 Relative luciferase activities and expression levels in DF1 cells and chicken preadipocytes transfected with 3'UTR reporter constructs with different alleles of 1196 C>A

(a) Relative luciferase activities of 3'UTR reporter constructs with different alleles of *IGFBP2* 1196 C>A; the relative luciferase activity was calculated as the ratio of Renilla to firefly luciferase. (b) qRT-PCR analysis of the relative luciferase expression level in DF1 cells and chicken preadipocytes transfected with 3'UTR reporter constructs with different alleles of 1196 C>A, and the firefly luciferase was used as an internal control. SV stands for chicken preadipocytes; DF1 stands for chicken embryo fibroblasts. 1196A and 1196C represent the two individual alleles of *IGFBP2* gene 1196C>A. Each measurement represents the average of three independent assays using independent plasmid preparations; different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). ■: 1196A; □: 1196C.

2.3 生物信息学分析

上述实验研究已证实 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区的 SNP(1196C>A)影响报告基因的转录后调控. 为进一步阐明其作用机制,我们利用 UTRdb (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/>)、Motif Search (<http://motifsearch.com/>)、Microinspector (<http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/>)、TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)和 miRBase (<http://www.mirbase.org/>)等分析软件,开展了 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区的生物信息学分析,结果发现,SNP 1196C>A 恰好位于 *gga-miR-*

456-3p 的一个潜在的结合区内,该结合区不位于 *gga-miR-456-3p* 种子序列的结合区,而是位于种子序列结合区的附近,1196C>A 的 C 等位基因能与 *gga-miR-456-3p* 的第 14 个核苷酸互补(图 3). 已有研究显示,miRNA 5'端的第 12~17 个核苷酸,尤其是第 13~16 个核苷酸对 miRNA 与靶基因 3'UTR 区的结合有重要促进作用^[24]. 这提示 1196C>A 可能影响 *gga-miR-456-3p* 与 *IGFBP2* mRNA 结合的稳定性,从而影响 *IGFBP2* 基因的表达调控.

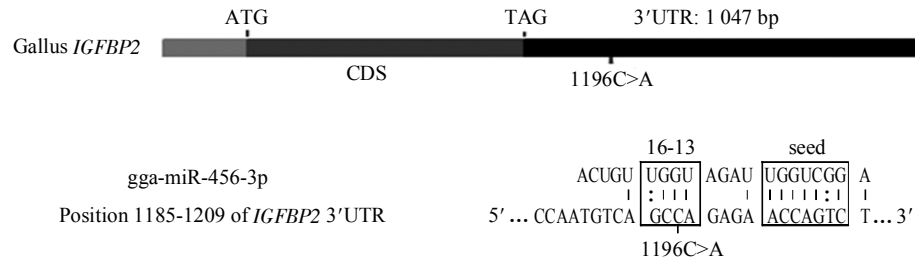


Fig. 3 The schematic representation of *IGFBP2* mRNA structure and a predicted *gga-miR-456-3p* binding site located at its 3'UTR

Microinspector and TargetScan softwares were used to predict miRNA binding sites. 1196C>A is located at a potential *gga-miR-456-3p* binding site at the 3'UTR of *IGFBP2*, the allele C is shown in the figure.

2.4 *gga-miR-456-3p* 靶向调控 *IGFBP2* 基因表达的验证

为验证 SNP(1196C>A)是否影响 *gga-miR-456-3p* 对 *IGFBP2* 基因的表达, 我们设计合成了 *gga-miR-456-3p* 的 inhibitor、mimics 及无关干扰片段 NC, 并将其分别与不同等位基因的报告基因载体质粒共转染 DF1 细胞, 检测双荧光素酶报告基因活性. 结果显示, 与 NC 组相比, *gga-miR-456-3p* 的 inhibitor 和 mimics 对 psi-*IGFBP2*-A 海肾荧光素酶报告基因活性的影响均无显著差异, 但是 *gga-miR-456-3p* 的 inhibitor 能显著地增加 psi-*IGFBP2*-C 海肾荧光素酶报告基因活性, 而 *gga-miR-456-3p* 的 mimics 可显著地降低 psi-*IGFBP2*-C 海肾荧光素酶报告基因活性(图 4).

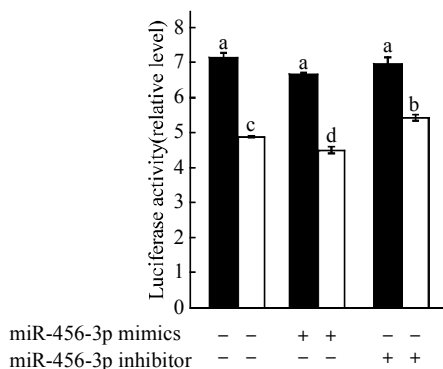


Fig. 4 The effect of *gga-miR-456-3p* on the activity of 3'UTR reporter constructs of allele 1196A and 1196C

1196A and 1196C stand for two individual alleles of *IGFBP2* 1196C>A. + denotes DF1 cells transfected with miR-456-3p inhibitor or mimics; - denotes DF1 cells transfected with negative control (NC). The relative luciferase activity was calculated as the ratio of Renilla to firefly luciferase. Each measurement represents the average of three independent assays using independent plasmid preparations; different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). ■: 1196A; □: 1196C.

报告基因活性分析结果说明, *gga-miR-456-3p* 调控 *IGFBP2* 基因的表达, *IGFBP2* 基因 3' UTR 区的 SNP(1196C>A) 影响 *gga-miR-456-3p* 的调控作用, 与 A 等位基因相比, C 等位基因更有利于 *gga-miR-456-3p* 发挥负调控作用, 这一结果与理论预期一致.

为了解 *gga-miR-456-3p* 对细胞内源性 *IGFBP2* 基因表达的影响. 我们利用常规 PCR, 扩增克隆了 DF1 细胞 *IGFBP2* 基因 3' UTR 区(包含 SNP 1196C>A), 测序结果分析显示, DF1 细胞 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区 SNP(1196C>A)为纯合型 CC. 由于报告基因实验发现 *gga-miR-456-3p* 作用于 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区 1196C>A 的 C 等位基因, 因此, 我们利用 *gga-miR-456* inhibitor、mimics 及无关干扰片段 NC 分别转染 DF1 细胞, 检测 DF1 细胞内源性 *IGFBP2* 基因的表达情况. 实验结果与预期一致, 与 NC 组相比, 转染 *gga-miR-456* mimics 能显著降低 DF1 细胞中 *IGFBP2* 基因 mRNA 的相对表达量, 而转染 *gga-miR-456* inhibitor 能显著提高 *IGFBP2* 基因 mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$)(图 5a). Western blot 检测结果与 qRT-PCR 结果一致, 与 NC 组相比, 转染 mimics 能下调 DF1 细胞中 *IGFBP2* 蛋白的表达水平, 而转染 inhibitor 可上调 DF1 细胞中 *IGFBP2* 蛋白的表达水平(图 5b). 内源性 *IGFBP2* 基因的表达分析与报告基因分析结果都证实, *IGFBP2* 是 *gga-miR-456-3p* 的一个靶基因, 其 3' UTR 的 SNP (1196C>A)影响 *gga-miR-456-3p* 对 *IGFBP2* 基因的表达调控.

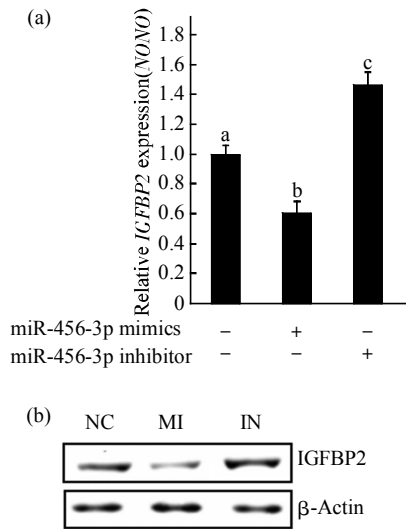


Fig. 5 The effect of gga-miR-456-3p on the endogenous *IGFBP2* gene expression

(a) The qRT-PCR analysis of the effect of miR-456-3p on the endogenous *IGFBP2* gene expression in DF1 cells. The *NO/NO* gene was used as an internal control. (b) Western blot analysis of the effect of miR-456-3p on *IGFBP2* protein expression. β -Actin was used as a loading control. + denotes DF1 cells transfected with miR-456-3p inhibitor or mimics; - denotes DF1 cells transfected with negative control (NC). MI: miR-456-3p mimics treatment group; IN: miR-456-3p inhibitor treatment group; NC: Negative control treatment group. Each measurement represents the average of three independent assays using independent plasmid preparations; different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

真核生物 mRNA 的 3'UTR 在基因表达调控中起着重要作用, 它不仅能调控 mRNA 的体内稳定性、降解速率及亚细胞定位, 还能调控翻译效率等^[25]. mRNA 的 3'UTR 区除 poly(A) 加尾信号外, 还存在富含 AU 元件(AU-rich element, ARE)、富含 GU 元件(GU-rich element, GRE)、铁反应元件(iron-responsive element, IRE)、富含 CU 元件(CU-rich element, CURE)及富含 CA 元件(CA-rich elements, CAREs)等 100 多种顺式调控元件, 这些调控元件在基因表达调控中发挥重要的作用^[26-30]. MicroRNA (miRNA) 是一类单链非编码小 RNA 分子, 是一类新发现的重要反式调控因子, 通过与靶基因 mRNA 完全或不完全互补配对, 导致靶基因 mRNA 降解或者抑制蛋白质翻译, 从而调控靶基因的表达^[31]. 3'UTR 区是 miRNA 的主要结合区,

miRNA 靶基因结合位点的突变能够影响 miRNA 对其靶基因表达的调控, 导致基因表达和性状改变^[32-33].

序列分析显示, 鸡 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区存在 ARE 等多个调控元件, 但是, 1196C>A 并不位于上述已知的顺式调控元件内. 与哺乳动物相比, 鸡 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区长约 1.1 kb, 而人和鼠 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区的长度仅约 300 bp, 提示鸡的 *IGFBP2* 基因很可能受到 miRNA 调控^[34]. miRNA 结合位点分析显示, 鸡 *IGFBP2* 基因的 3'UTR 区存在多个 miRNA 的结合位点, 1196C>A 位点位于 gga-miR-456-3p 的一个潜在结合区内, 提示这个 SNP 很可能是一个功能性的 SNP, 它可能影响 gga-miR-456-3p 的调控作用. 另外, 我们早期的表达谱芯片和小 RNA 高通量测序(Solexa)研究结果显示, *IGFBP2* 基因和 gga-miR-456-3p 在鸡前脂肪细胞存在共表达. 本研究发现 *IGFBP2* 基因和 gga-miR-456-3p 也在 DF1 细胞中共表达, 这些都提示 *IGFBP2* 基因和 gga-miR-456-3p 可能存在调控关系. 本研究的双荧光素酶报告基因活性分析以及 DF1 细胞内源性 *IGFBP2* 基因的表达分析结果都证实 *IGFBP2* 是 gga-miR-456-3p 的一个靶基因, 其 3'UTR 区 SNP(1196C>A) 影响 gga-miR-456-3p 的调控作用, 其中, gga-miR-456-3p 对 *IGFBP2* 的 C 等位基因表达有较强的抑制作用.

对人和鼠的研究发现, *IGFBP2* 抑制脂肪细胞分化和脂质沉积, 与此相一致, 东北农业大学低脂系肉鸡的血清 *IGFBP2* 浓度显著高于高脂系肉鸡(待发表). 这提示, 鸡 *IGFBP2* 基因很可能是导致东北农业大学高、低脂系肉鸡脂肪性状差异的重要基因之一. 本实验室的前期研究发现, *IGFBP2* 基因 1196C>A SNP 与肉鸡腹脂重和腹脂率显著相关^[2]. 本研究发现, 该 SNP(1196C>A) 影响 gga-miR-456-3p 对 *IGFBP2* 基因表达的调控作用, gga-miR-456-3p 显著降低 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区 SNP 的 C 等位基因的表达, 而对 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区 SNP 的 A 等位基因的表达影响不大. 由于 *IGFBP2* 抑制脂肪细胞分化和脂质沉积, 如果其他影响因素相同, 可以预期, 与 A 等位基因纯合型肉鸡个体相比, C 等位基因纯合型肉鸡个体应该有较高的腹脂重和腹脂率. 这一预期与我们前期研究结果相一致, 即与 C 等位基因纯合型肉鸡个体相比较, A 等位基因纯合型肉鸡个体表现出较低的腹脂重与腹脂率^[2], 这也支持 SNP(1196C>A) 是一个功能性 SNP. 脂肪性

状是多基因控制的,除了 *IGFBP2* 基因 3'UTR 区的 1196C>A 外,应该还存在其他影响鸡的脂肪性状的遗传和表观遗传变异。

基因 3'UTR 区的 SNP 影响基因表达的机制有多种方式^[35-40]。3'UTR 区的 SNP 可以影响 mRNA 的稳定性、影响 mRNA 与 miRNA 的相互作用,也可以影响 3'UTR 区的顺式调控元件与其结合蛋白的相互作用,还可以影响 3'UTR 与 5'UTR 相互作用等,这些影响最终将导致基因表达的变化和性状的改变。本研究仅发现 1196C>A SNP 影响 miRNA 对 *IGFBP2* 基因表达的调控作用,不排除 1196C>A 可能还影响其他调控方式。本研究首次证实,*IGFBP2* 是 *gga-miR-456-3p* 的靶基因,但是,*gga-miR-456-3p* 在脂肪细胞增殖和分化中的作用及其作用机制还不清楚,有待于将来做进一步的研究。

肉鸡是人类膳食中重要的蛋白质来源。肉鸡脂肪的过度蓄积不仅降低饲料转化率和分割肉的产量及质量,还会降低肉鸡的产蛋率、受精率及孵化率等。此外,肉鸡脂肪的过度蓄积也会间接引发人类肥胖症及其相关的疾病。本研究发现 *IGFBP2* 基因的 SNP(1196C>A)有望作为功能性遗传标记应用于低脂鸡的分子辅助育种。

参 考 文 献

- [1] Holly J, Sabin M, Perks C, *et al.* Adipogenesis and IGF-1. *Metab Syndr Relat Disord*, 2006, **4**(1): 43-50
- [2] Gude M F, Frystyk J, Flyvbjerg A, *et al.* The production and regulation of IGF and IGFBPs in human adipose tissue cultures. *Growth Horm IGF Res*, 2012, **22**(6): 200-205
- [3] Baxter R C. Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins: the role of serum IGFBPs in regulating IGF availability. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 1991, **372**(115): 107-114
- [4] Hill D J, Hogg J, Petrik J, *et al.* Cellular distribution and ontogeny of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding protein messenger RNAs and peptides in developing rat pancreas. *J Endocrinol*, 1999, **160**(2): 305-317
- [5] DeMambro V E, Clemmons D R, Horton L G, *et al.* Gender-specific changes in bone turnover and skeletal architecture in *igfbp-2*-null mice. *Endocrinology*, 2008, **149**(5): 2051-2061
- [6] Fornoni A, Rosenzweig S A, Lenz O, *et al.* Low insulin-like growth factor binding protein-2 expression is responsible for increased insulin receptor substrate-1 phosphorylation in mesangial cells from mice susceptible to glomerulosclerosis. *Endocrinology*, 2006, **147**(7): 3547-3554
- [7] Guo C, Lu H, Gao W, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-2 level is increased in blood of lung cancer patients and associated with poor survival. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e74973
- [8] Biemacka K, Uzoh C C, Zeng L, *et al.* Hyperglycaemia-induced chemoresistance of prostate cancer cells due to IGFBP2. *Endocr Relat Cancer*, 2013, **20**(5): 741-751
- [9] Neuhaus M L, Platz E A, Till C, *et al.* Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *Cancer Prev Res*, 2013, **6**(2): 91-99
- [10] Hoefflich A, Wu M, Mohan S, *et al.* Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology*, 1999, **140**(12): 5488-5496
- [11] Wheatcroft S B, Kearney M T. IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, **20**(4): 153-162
- [12] Boney C, Moats-Staats B, Stiles A, *et al.* Expression of insulin-like growth factor- I (IGF- I) and IGF-binding proteins during adipogenesis. *Endocrinology*, 1994, **135**(5): 1863-1868
- [13] Wheatcroft S B, Kearney M T, Shah A M, *et al.* IGF-binding protein-2 protects against the development of obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2007, **56**(2): 285-294
- [14] Xi G, Solum M A, Wai C, *et al.* The heparin-binding domains of IGFBP-2 mediate its inhibitory effect on preadipocyte differentiation and fat development in male mice. *Endocrinology*, 2013, **154**(11): 4146-4157
- [15] Heald A, Kaushal K, Siddals K, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) is a marker for the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2006, **114**(7): 371-376
- [16] Claudio M, Benjamim F, Riccardo B, *et al.* Adipocytes IGFBP-2 expression in prepubertal obese children. *Obesity*, 2010, **18**(10): 2055-2057
- [17] Arafat A M, Weickert M O, Frystyk J, *et al.* The role of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 in the insulin-mediated decrease in IGF- I bioactivity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, **94**(12): 5093-5101
- [18] Li Z, Picard F. Modulation of IGFBP2 mRNA expression in white adipose tissue upon aging and obesity. *Horm Metab Res*, 2010, **42**(11): 787-791
- [19] Ruan W, Lai M. Insulin-like growth factor binding protein: a possible marker for the metabolic syndrome?. *Acta Diabetol*, 2010, **47**(1): 5-14
- [20] Matsubara Y, Sato K, Ishii H, *et al.* Changes in mRNA expression of regulatory factors involved in adipocyte differentiation during fatty acid induced adipogenesis in chicken. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2005, **141**(1): 108-115
- [21] Li Z, Li H, Zhang H, *et al.* Identification of a single nucleotide polymorphism of the insulin-like growth factor binding protein 2 gene and its association with growth and body composition traits in the chicken. *J Anim Sci*, 2006, **84**(11): 2902-2906
- [22] Leng L, Wang S, Li Z, *et al.* A polymorphism in the 3'-flanking region of insulin-like growth factor binding protein 2 gene associated with abdominal fat in chickens. *Poult Sci*, 2009, **88**(5): 938-942
- [23] Halder K, Wieland M, Hartig J S. Predictable suppression of gene

- expression by 5'-UTR-based RNA quadruplexes. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(20): 6811-6817
- [24] Grimson A, Farh K K, Johnston W K, *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 2007, **27**(1): 91-105
- [25] Andken B B, Lim I, Benson G, *et al.* 3'-UTR SIRF: a database for identifying clusters of short interspersed repeats in 3' untranslated regions. *BMC Bioinformatics*, 2007, **8**: 274
- [26] Proudfoot N J. Ending the message: poly (A) signals then and now. *Genes Dev*, 2011, **25**(17): 1770-1782
- [27] Mignone F, Gissi C, Liuni S, *et al.* Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*, 2002, **3**(3): 1-10
- [28] Benjamin D, Colombi M, Stoeklin G, *et al.* A GFP-based assay for monitoring post-transcriptional regulation of ARE-mRNA turnover. *Mol Biosyst*, 2006, **2**(11): 561-567
- [29] Halees A S, Hitti E, Al-Saif M, *et al.* Global assessment of GU-rich regulatory content and function in the human transcriptome. *RNA Biol*, 2011, **8**(4): 681-691
- [30] Theil E C, Eisenstein R S. Combinatorial mRNA regulation: iron regulatory proteins and iso-iron-responsive elements (Iso-IREs). *J Biol Chem*, 2000, **275**(52): 40659-40662
- [31] Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart R A. Progress in microRNA delivery. *J Control Release*, 2013, **172**(3): 962-974
- [32] Landi D, Gemignani F, Barale R, *et al.* A catalog of polymorphisms falling in microRNA-binding regions of cancer genes. *DNA Cell Biol*, 2008, **27**(1): 35-43
- [33] Kontorovich T, Levy A, Korostishevsky M, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. *Int J Cancer*, 2010, **127**(3): 589-597
- [34] Sandberg R, Neilson J R, Sarma A, *et al.* Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science*, 2008, **320**(5883): 1643-1647
- [35] Matoukova E, Michalova E, Vojtesek B, *et al.* The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*, 2012, **9**(5): 563-576
- [36] Graybowska E A, Wilczynska A, Siedlecki J A. Breakthroughs and views: regulatory functions of 3' UTR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **288**(2): 291-295
- [37] Kuersten S, Goodwin E B. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet*, 2003, **4**(8): 626-637
- [38] Lai E C. MicroRNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, 2002, **30**(4): 363-364
- [39] Day L, Souki O A E, Albrecht A A, *et al.* Accessibility of microRNA binding sites in metastable RNA secondary structures in the presence of SNPs. *Bioinformatics*, 2014, **30**(3): 343-352
- [40] Yang L, Li Y, Cheng M, *et al.* A functional polymorphism at microRNA-629-binding site in the 3'-untranslated region of NBS1 gene confers an increased risk of lung cancer in Southern and Eastern Chinese population. *Carcinogenesis*, 2012, **33**(2): 338-347

Identification and Analysis of a Functional SNP 1196C>A in 3'UTR of Chicken *IGFBP2* Gene*

YU Ying-Ying^{1)**}, QIAO Shu-Pei^{1)**}, SUN Ying-Ning^{1,2)}, SONG He¹⁾,
ZHANG Xiao-Fei¹⁾, YAN Xiao-Hong¹⁾, LI Hui¹⁾, WANG Ning^{1)***}

¹⁾Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province; College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

²⁾College of Life Science and Agriculture Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract We previously mapped a QTL significantly influencing the abdominal fat weight and the percentage of abdominal fat of chicken on chicken chromosome 7, and *IGFBP2* is the only known gene located within this QTL region. We further found that the 1196C>A, a single nucleotide polymorphism (SNP) in 3'UTR of Chicken *IGFBP2* gene, is significantly associated with chicken abdominal fat weight and percentage of abdominal fat. Bioinformatics analysis suggests that this SNP is located at a potential binding site of gga-miR-456-3p. We hypothesized that *IGFBP2* may be a target gene of gga-miR-456-3p, and this SNP may affect the gga-miR-456-3p-mediated downregulation of *IGFBP2*. To test and decipher this hypothesis, in the present study we constructed the 3' UTR reporter vectors for the two individual alleles of the *IGFBP2* SNP (1196C>A), and compared the reporter activity between the two individual alleles in both DF1 cells and chicken preadipocytes. Using the miRNA mimics and inhibitor of gga-miR-456-3p, we further assessed the effects of gga-miR-456-3p on the reporter activity of the two individual alleles of the *IGFBP2* SNP and the endogenous *IGFBP2* expression at mRNA and protein levels in DF1 cells. The reporter assay showed that in both DF1 cells and chicken preadipocytes, allele A had higher reporter activities at protein and mRNA levels than allele C, indicating that this SNP is a functional SNP. Further studies demonstrated that in DF1 cells, gga-miR-456-3p mimics and inhibitor had effect on allele C reporter activity, but not on allele A reporter activity. Quantitative real-time RT-PCR and Western blot analyses showed that gga-miR-456-3p mimics and inhibitor regulated the endogenous expression of chicken *IGFBP2* gene at mRNA and protein levels. Taken together, our results demonstrated that *IGFBP2* gene is a target gene of gga-miR-456-3p, and the SNP 1196C>A is a functional SNP. Our findings are of great significance to the marker-assisted selection for lean chicken and clarification of gene function and regulation of chicken *IGFBP2* gene in chicken adipose development.

Key words chicken, *IGFBP2* gene, SNP, 3'UTR, gga-miR-456-3p

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00062

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2009CB941604), China Agriculture Research System (CARS-42) and The National Natural Science Foundation of China(31372299).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-451-55191770, E-mail: wangning@neau.edu.cn

Received: March 7, 2014 Accepted: June 17, 2014