

鸡 miR-20a 靶基因 TP53INP1 鉴定

王宁, 段逵, 宋鹤, 张潇飞, 张天目, 张文建, 闫晓红, 王守志, 李辉

(农业部鸡遗传育种重点实验室, 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 前期研究发现, 过表达 miR-17-92 基因簇能促进鸡前脂肪细胞增殖, 但作用机制尚不清楚。生物信息学分析发现, TP53INP1 是 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p 和 miR-20a 的潜在靶基因, 研究采用荧光素酶报告基因技术和基因过表达技术开展该靶基因的验证。结果表明, 过表达 miR-17-92 基因簇能显著抑制 TP53INP1 的 3' UTR 报告基因活性; 而转染 miR-20a 抑制剂能显著提高 TP53INP1 的 3' UTR 报告基因活性。将 miRNA 抑制剂分别转染到 DF1 细胞和鸡前脂肪细胞中, 采用 real-time RT-PCR 方法检测细胞 TP53INP1 基因表达变化。结果显示, miR-20a 抑制剂能促进 TP53INP1 表达, TP53INP1 是 miR-20a 的一个靶基因。

关键词: 鸡; miR-17-92 基因簇; 前脂肪细胞; TP53INP1; 基因表达

中图分类号: S831; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-9369(2015)09-0069-06

王宁, 段逵, 宋鹤, 等. 鸡 miR-20a 靶基因 TP53INP1 鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(9): 69-74.

Wang Ning, Duan Kui, Song He, et al. Identification of TP53INP1 as a targets gene of chicken miR-20a [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2015, 46(9): 69-74. (in Chinese with English abstract)

Identification of TP53INP1 as a targets gene of chicken miR-20a/WANG Ning, DUAN Kui, SONG He, ZHANG Xiaofei, ZHANG Tianmu, ZHANG Wenjian, YAN Xiaohong, WANG Shouzhi, LI Hui (Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, School of Animal Sciences and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The previous studies showed that overexpression of miR- 17- 92 cluster promoted the chicken preadipocyte proliferation, however, the underlying molecular mechanism remains unclear. Bioinformatics analysis found that TP53INP1 was a potential target gene of miR- 17- 5p and miR- 20a encoded by the miR-17-92 cluster. In the present study, we verified this bioinformatics analysis result using a luciferase reporter assay and miRNA overexpression and knockdown. The results showed that miR-17-92 cluster significantly decreased TP53INP1 3' UTR luciferase reporter activity; transfection of miR-20a inhibitor significantly decreased TP53INP1 3' UTR luciferase reporter activity. Real-time RT-PCR expression analysis showed that transfection of miR-20a inhibitor increased the endogenous TP53INP1 expression in DF1 cells and immortalized chicken preadipocytes. Taken together, these data suggest that TP53INP1 is a target gene of miR-20a.

Key words: chicken; miR-17-92 cluster; preadipocytes; TP53INP1; gene expression

miRNA 是一类非编码小 RNA 分子, 通过与靶 mRNA 不完全碱基互补配对, 导致靶基因 mRNA 降解或翻译抑制, 调控靶基因表达^[1]。miRNA 是机体发育中必不可少的小 RNA 分子, 目前很多研究证

收稿日期: 2015-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372299); 国家 863 课题(2011AA100301)

作者简介: 王宁(1964-), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail: wangning@neau.edu.cn

明, miRNA 参与动物细胞发育、增殖, 分化、凋亡及代谢等过程^[2-3]。miRNA 基因在染色体上的分布非随机, miRNA 基因紧密相邻, 排列成簇^[4-5]。miR-17-92 基因簇是目前受关注 miRNA 簇之一, 该基因簇能编码产生 miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b 和 miR-92 等成员, 该簇 miRNA 成员在多种肿瘤中高表达, 过表达会导致疾病和癌症发生^[6-7]。

人体 miR-17-92 基因簇位于 13 号染色体 *C13orf25* 上^[8], 该 miRNA 簇在动物发育和疾病发生过程中发挥重要作用, 可增加成骨细胞增殖能力^[9], 调节脂肪形成多个信号通路^[10]。本研究前期在鸡前脂肪细胞小 RNA 重测序中发现 mir-17-92 基因簇在鸡前脂肪细胞中表达^[11], 进一步研究发现, miR-17-92 基因簇过表达能促进鸡前脂肪细胞增殖(未发表)。但 miR-17-92 基因簇促进鸡脂肪细胞增殖的机制仍不清楚。

TP53INP1 是一个 p53 诱导核蛋白 1, TP53INP1 能影响细胞进程, 调节细胞增殖、凋亡等^[12-13]。本研究生物信息学分析发现, *TP53INP1* 基因 3' UTR 存在 miR-17-92 基因簇成员 miR-20a 和 miR-17-5p 的集合位点, 提示 *TP53INP1* 就是 miR-17-92 基因簇的靶基因^[14]。为揭示 miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪细胞增殖的分子机制, 本研究开展鸡 miR-17-92 基因簇靶基因 *TP53INP1* 鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪组织来自东北农业大学高、低脂双向选择系 (NEAUHLF) 高脂鸡, miR-17-92 基因簇过表达质粒 pcDNA3.1-miR-17-92、鸡前脂肪细胞 (ICPA) 和胚胎成纤维细胞 (DF1) 均为农业部鸡遗传育种重点实验室保存, psiCHECK2 载体购自 Promega 公司, miR-17-5p inhibitor、miR-20a inhibitor、miR-19a inhibitor 和 miR-19b inhibitor 购自上海吉玛公司。

1.2 RNA 提取与反转录

使用 Trizol 提取东北农业大学高、低脂双向选择系 (NEAUHLF) 的高脂鸡脂肪组织, 鸡胚胎成纤维 DF1 细胞和 ICPA 细胞总 RNA, 以 A_{260}/A_{280} 比值在 (1.8~2.0) 高质量的 RNA 作为模板, 采用 Promega 反转录试剂盒合成 cDNA。

1.3 载体构建

以东北农业大学高低脂双向选择系 (NEAUHLF) 高脂鸡脂肪组织 cDNA 为模版, 使用 primer 5.0 设计引物 (见表 1), 采用 RT-PCR 扩增 TP53INP1 (NM_001030946.1) 的 3' UTR, 该片段包含 miR-17-92 基因簇成员结合位点的片段 (835 bp); 将扩增片段克隆到含有 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点的 psi-CHECK2 双荧光素酶报告基因载体上, 构建成 psi-CHECK2-TP53INP1。

表 1 RT-PCR 引物和 real-time PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR and real-time PCR

引物名称 Name	引物序列 Sequence	酶切位点 Site
TP53INP1-P1-F	5' CCTCGAGGTGGACACTTAAAGCGCAAAA 3'	<i>Xho</i> I
TP53INP1-P1-R	5' TTGCGGCCGCAAACAGACGCAAGACTGGAGAA 3'	<i>Not</i> I
TP53INP1-R1-F	5' GCACATCAAGCACAAACGG 3'	
TP53INP1-R1-R	5' TGTGATTGCGTCCGAGG 3'	
NONO-R1-F	5' AGAAGCAGCAGCAAGAAC 3'	
NONO-R1-R	5' TCCTCCATCCTCCTCAGT 3'	

1.4 细胞培养与转染

DF1 和前脂肪细胞均采用完全培养基 (DMEM/F12+10%FBS), 并在 37 °C 5% CO₂ 条件下培养。转染前, 将细胞按照每孔 1×10^4 密度接种到六孔板, 待细胞完全贴壁并生长至 70%~80% 密度时转染。细胞转染参照 Invitrogen 脂质体 2000 转染试剂说明书。将质粒分别转染至六孔板细胞中; 每孔加入

质粒 2 μg, 转染试剂 8 μL; 转染 48 h 后收集细胞, 检测荧光素酶活性。

1.5 荧光素酶活性检测

使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 公司) 分别检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性, 报告基因活性结果以萤火虫/海肾相对值表示, 所有试验均重复 3 次并计算标准差。

1.6 实时荧光定量PCR(real-time PCR)

使用 real-time PCR 仪型号为 ABI 7500。反应体系为: Roche FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)(2×) 5 μL, 上、下游引物(10 μmol · L⁻¹) 各 0.2 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 3.6 μL, 总体积 10 μL。反应条件: 95 °C 预变性 10 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 复性延伸 34 s, 共 40 个循环。溶解曲线 95 °C 15 s, 60 °C 10 min, 95 °C 15 s, 每个样品设 3 孔重复。以 *NONO* 基因为内参, 利用 2^{-ΔΔCt} 方法将原始 Ct 值转换为相对基因表达量。所用引物序列见表 1。

1.7 数据分析

数据分析采用 Student's t-test, 运用 SAS 9.2 软件完成, 数据格式表示为(平均值±标准差)。统计分析 *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 *TP53INP1* 基因 3' UTR 生物信息学分析

鸡 *TP53INP1* 基因(NM_001030946.1)的 3' UTR 长度是 4 008 bp。应用 UCSC 数据库分析发现, 鸡、猕猴、鼠、狗、大象及热带爪蟾等 *TP53INP1* 基因 3' UTR 基因组序列存在同源性较高区域(见图 1), 提示该区域可能是重要的 *TP53INP1* 表达调控元件。进一步采用在线 miRNA 靶基因分析软件 Targetscan 分析发现, 鸡 *TP53INP1* 基因 mRNA 的 3' UTR 存在 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p 和 miR-20a 的潜在靶结合位点; 比较分析显示, *TP53INP1* 基因 3' UTR 的这两个潜在 miRNA 结合位点在各物种非常保守, 这两个 miRNA 种子区结合序列在鸡、人、鼠、猪等动物中完全相同(见图 2)。

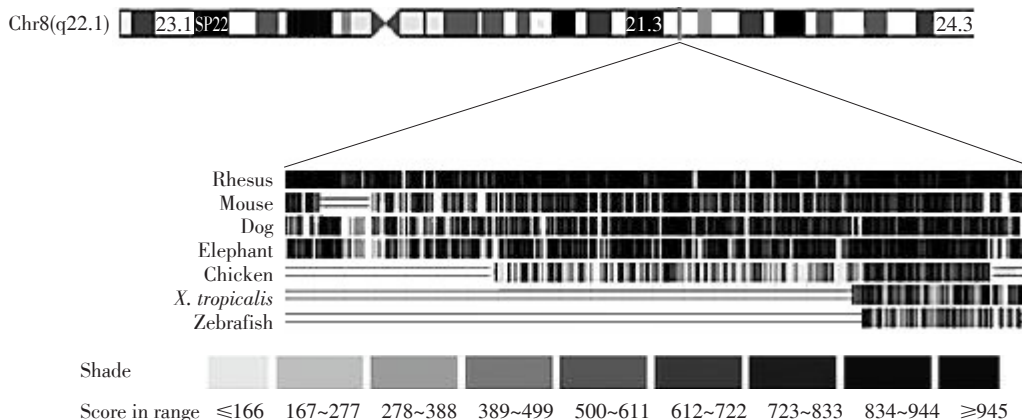


图 1 *TP53INP1* 基因 3' UTR 的同源性分析

Fig. 1 Homology analysis of *TP53INP1* 3' UTR

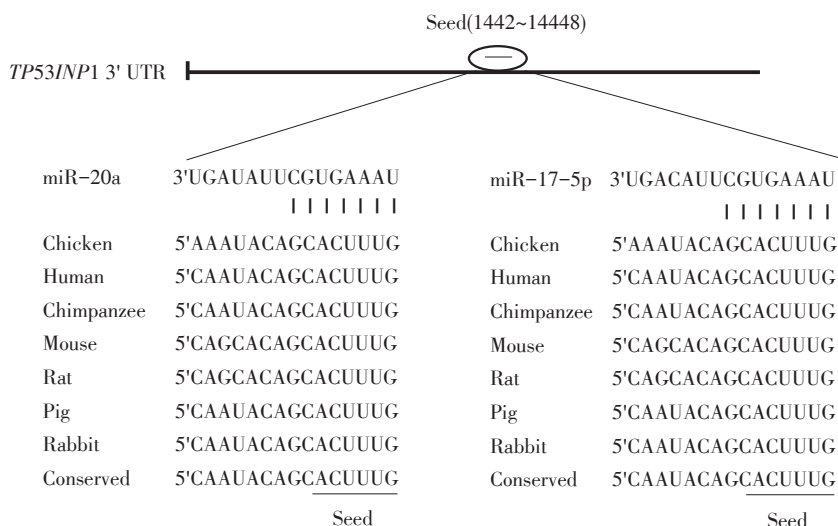
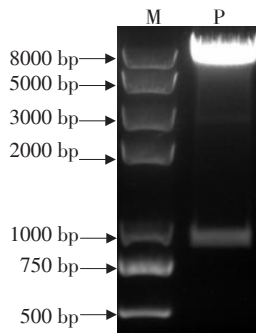


图 2 鸡 *TP53INP1* 3' UTR 的 miR-17-92 基因簇 miRNA 成员结合区分析

Fig. 2 Predicted miRNA binding sites of miR-17-92 cluster in chicken *TP53INP1* 3' UTR

2.2 miR-17-92 基因簇对 TP53INP1 的调节作用分析

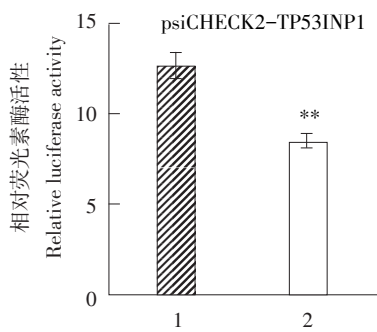
为确定 miR-17-92 基因簇是否靶作用于 TP53INP1 上的 3' UTR, 构建鸡 TP53INP1 的 3' UTR 荧光素酶报告基因载体 (psiCHECK2-TP53INP1) (见图 3), 酶切测序正确无误后, 将 miR-17-92 基因簇 pcDNA3.1-miR-17-92 过表达质粒和 psiCHECK2-TP53INP1 质粒共转染到 DF1 细胞, 48 h 后收细胞, 使用荧光素酶报告基因检测系统测定萤火虫/海参荧光素酶相对活性。结果发现, 与 pcDNA3.1-control 相比, pcDNA3.1-miR-17-92 能极显著抑制 psiCHECK2-TP53INP1 荧光素酶报告基因活性达 5 倍以上 ($P < 0.01$) (见图 4)。这表明 miR-17-92 家族成员可能直接调控 TP53INP1 表达。



M-Trans 2 k plus II Marker(8000);
P-psiCHECK2-TP53INP1 双酶切鉴定 (*Xho* I 和 *Not* I)
P-psiCHECK2-TP53INP1 digested with *Xho* I 和 *Not* I

图 3 psiCHECK2-TP53INP1 载体双酶切验证

Fig. 3 Identification of psiCHECK2-TP53INP1 plasmid by double enzyme digestion with *Xho* I and *Not* I



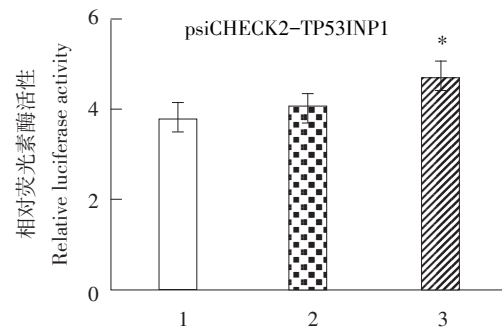
1-pcDNA3.1-control; 2-pcDNA3.1-miR-17-92

图 4 miR-17-92 基因簇对 psiCHECK2-TP53INP1 报告基因活性影响

Fig. 4 Effect of miR-17-92 cluster overexpression on relative luciferase activity of psiCHECK2-TP53INP1

2.3 miR-20a 对 TP53INP1 的调节作用

生物信息学分析显示, miR-17-92 基因簇中 miR-17-5p, miR-20a 均靶作用于 TP53INP1, 为确定这两个 miRNA 成员是否作用于 TP53INP1, 利用 miR-17-5p 和 miR-20a 的 inhibitor 与 psiCHECK2-TP53INP1 共转染到 DF1 细胞中, 测定相对荧光活性。结果发现, 与 inhibitor NC 相比, miR-17-5p inhibitor 和 miR-20a inhibitor 均能提高报告基因活性, 其中 miR-20a 达到显著水平 ($P < 0.05$) (见图 5), 结果表明 miR-20a 可能靶作用于 TP53INP1。



1-NC; 2-miR-17-5p inhibitor; 3-miR-20a inhibitor

图 5 转染 miR-17-5p inhibitor 和 miR-20a inhibitor 对 psiCHECK2-TP53INP1 报告基因活性影响

Fig. 5 Effect of miR-17-5p inhibitor and miR-20a inhibitors on reporter activity of psiCHECK2-TP53INP1

为进一步验证 miR-17-5p 和 miR-20a 是否靶作用于 TP53INP1, 使用 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 和 miR-19b 的 inhibitor, 转染到 DF1 细胞中, 以 miRNA inhibitor NC 作为阴性对照, 24 和 48 h 后使用 real-time RT-PCR 检测 TP53INP1 在 DF1 细胞中的表达水平。结果发现, 与 miRNA inhibitor NC 相比, 转染 miR-20a inhibitor 显著提高 TP53INP1 表达水平, 而转染 miR-17-5p、miR-19a 和 miR-19b 的 inhibitor 对 TP53INP1 的 mRNA 表达水平未发生显著变化 ($P > 0.05$) (见图 6)。此结果与报告基因分析结果一致, 说明在 DF1 细胞中鸡 miR-20a 靶作用于 TP53INP1。

采用同样方法, 分析 miR-17-5p, miR-19a, miR-19b, miR-20a 的 inhibitor, 对鸡前脂肪细胞内源性 TP53INP1 表达影响, 结果与 DF1 细胞结果一致, 转染 miR-20a 的 inhibitor 显著提高细胞 TP53INP1 表达水平 ($P < 0.05$)。但转染 miR-17-5p、

miR-19a 和 miR-19b 的 inhibitor 后, 未发现 *TP53INP1* 表达水平发生显著变化 ($P>0.05$) (见图

7)。同样也说明在前脂肪细胞中只有 miR-20a 对 *TP53INP1* 表达有调控作用。

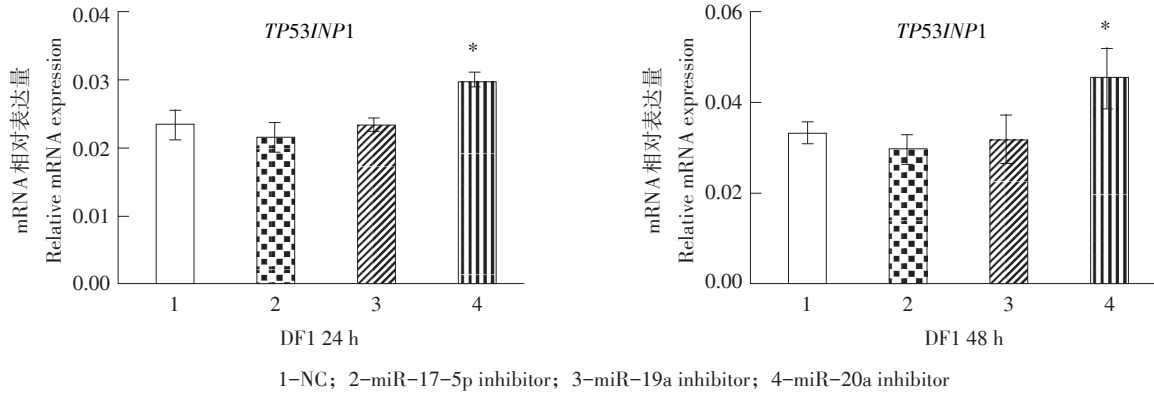


图6 转染 miR-17-5p、miR-17-9a 和 miR-20a 的 inhibitor 对 DF1 细胞中内源性 *TP53INP1* 表达影响

Fig. 6 Effect of miR-17-5p, miR-17-9a and miR-20a inhibitors on relative *TP53INP1* mRNA expression in DF1 cells

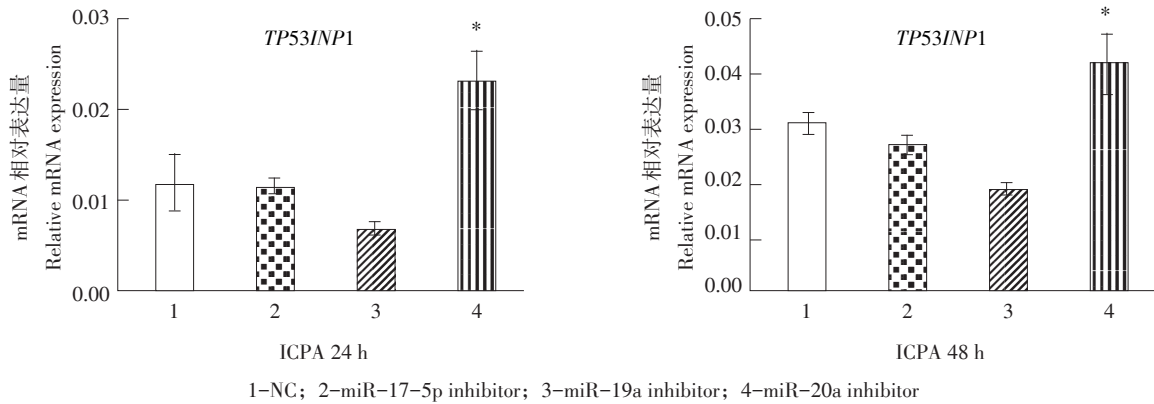


图7 转染 miR-17-5p 和 miR-20a 的 inhibitor 对鸡前脂肪细胞中内源性 *TP53INP1* 表达的影响

Fig. 7 Effect of miR-17-5p and miR-20a inhibitors on relative *TP53INP1* mRNA expression in ICFA cells

3 讨论与结论

本研究采用生物信息学、报告基因技术证实 *TP53INP1* 是 miR-17-92 基因簇 miR-20a 的一个靶基因。miR-20a 结合位点在人、鼠、鸡等动物 *TP53INP1* 基因 3' UTR 高度保守, 推测 *TP53INP1* 是 miR-17-92 基因簇的重要保守靶基因。多个研究支持这一推测^[6-14]。

TP53INP1 具有抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡作用。在人体宫颈癌细胞研究中发现, miR-20a/miR-17-5p 靶作用于 *TP53INP1* 基因, 促进宫颈癌细胞增殖^[13-15]; 在人体胃癌研究中发现, miR-20a/miR-17-5p 靶作用于 *p21* 和 *TP53INP1*, 从而促进胃癌细胞增殖^[6]。农业部鸡遗传育种重点实验室之前研究发现, 过表达 miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪细胞增殖, 但机制仍不清楚。本研究证实,

miR-17-92 基因簇成员 miR-20a 靶作用于 *TP53INP1*。考虑到 miR-17-92 基因簇靶基因众多, 推测 miR-17-92 基因簇可能至少部分通过抑制 *TP53INP1* 基因表达, 从而促进鸡前脂肪细胞增殖。后续将以拯救试验确认 miR-20a 是否作用于 *TP53INP1* 而促进细胞增殖。

与人 *TP53INP1* 研究结果不同, 发现鸡 miR-20a 能靶向作用于 *TP53INP1*, 但 miR-17-5p 对 *TP53INP1* 并无明显作用。鸡 miR-17-5p 和 miR-20a 种子区相同, 但 miR-17-5p 对鸡 *TP53INP1* 无明显作用, 推测 miRNA 作为一个反式作用因子, 在发挥调控时还需其他蛋白、非编码 RNA 等参与, 在不同细胞中其靶基因并不完全相同^[16-17]。

TP53INP1 基因是 miR-20a 的靶基因; 抑制其表达, miR-17-92 基因簇可能是通过靶向抑制 *TP53INP1* 表达, 促进鸡脂肪细胞增殖。

[参 考 文 献]

- [1] Ambros V. MicroRNA: Tiny regulators with great potential[J]. Cell, 2001(7): 823-826.
- [2] Wienholds E, Plasterk R H A. MicroRNA function in animal development[J]. Febs Letters, 2005, 26: 5911-5922.
- [3] Alvarez-Garcia I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. Development, 2005, 21: 4653-4662.
- [4] Lai E C, Tomancak P, Williams R W, et al. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes[J]. Genome Biol, 2003(7): 42.
- [5] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human[J]. Rna—a Publication of the Rna Society, 2003(2): 175-179.
- [6] Wang M, Gu H B, Qian H, et al. miR-17-5p/20a are important markers for gastric cancer and murine double minute 2 participates in their functional regulation[J]. European Journal of Cancer, 2013(8): 2010-2021.
- [7] Ventura A, Young A G, Winslow M M, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 similar to 92 family of miRNA clusters[J]. Cell, 2008(5): 875-886.
- [8] Diosdado B, van de Wiel M, Droste J S T S, et al. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression[J]. British Journal of Cancer, 2009(4): 707-714.
- [9] Zhang C G, Zhu Q L, Zhou Y, et al. N-Succinyl-chitosan nanoparticles coupled with low-density lipoprotein for targeted osteo-
- loaded delivery to low-density lipoprotein receptor-rich tumors [J]. International Journal of Nanomedicine, 2014, 9(1): 2919-2932.
- [10] Hilton C, Neville M J, Karpe F. MicroRNAs in adipose tissue: Their role in adipogenesis and obesity[J]. International Journal of Obesity, 2013(3): 325-332.
- [11] Yao J, Wang Y, Wang W, et al. Solexa sequencing analysis of chicken pre-adipocyte microRNAs[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011(1): 54-61.
- [12] Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, et al. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis[J]. Mol Cell, 2001(1): 85-94.
- [13] Tomasini R, Samir A A, Carrier A, et al. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 39: 37722-37729.
- [14] Yan X H, Wang Z P, Wang N. Characterization of the structure, function and regulation of the chicken mir-17-92 cluster[J]. Zoological Research, 2012, 33(5): 455-462.
- [15] Tomasini R, Seux M, Nowak J, et al. TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity[J]. Oncogene, 2005, 55: 8093-8104.
- [16] Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1[J]. Nat Med, 2014(4): 368-376.
- [17] Tan W Q, Li Y, Lim S G, et al. miR-106b-25/miR-17-92 clusters: Polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20: 5962-5972.