

鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子活性鉴定与分析

王宁^{1,2,3}, 靳艳飞^{1,2,3}, 邢天宇^{1,2,3}, 崔婷婷^{1,2,3}, 黄佳新^{1,2,3}, 闫晓红^{1,2,3}, 李辉^{1,2,3}

(1. 东北农业大学农业农村部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030;

3. 东北农业大学黑龙江省动物细胞与遗传工程重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要: 文章采用基因定点突变和报告基因技术作 A/T 富集区启动子鉴定和转录调控分析, 研究鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区是否具有启动子活性。PromPredict 预测分析提示 miR-17-92 基因簇上游-388~-444 bp 处可能是启动子区域。转录因子结合位点分析发现, A/T 富集区存在 3 个 E2F1 潜在结合位点, 分别位于 miR-17-92 基因簇上游-1 273 bp(结合位点 1)、-1 186 bp(结合位点 2)和-753 bp(结合位点 3)处。报告基因活性分析发现, 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区具有启动子活性, 其中 miR-17-92 基因簇上游-440/-1 区域启动子活性最强。共转染分析显示, 转录因子 E2F1 极显著抑制该 A/T 富集区启动子活性($P < 0.01$); 进一步定点突变分析表明 E2F1 通过 E2F1 结合位点 1 和 2 抑制 A/T 富集区启动子活性。报告基因分析发现, 与对 A/T 富集区启动子作用不同, E2F1 促进 miR-17-92 基因簇宿主基因(MIR17HG)启动子活性。文章首次发现鸡 miR-17-92 基因簇上游存在一个新的转录调控区, 对揭示鸡 miR-17-92 基因簇转录调控具有重要意义。

关键词: 鸡; miR-17-92 基因簇; A/T 富集区; 启动子; E2F1

中图分类号: S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-9369(2019)07-0057-11

王宁, 靳艳飞, 邢天宇, 等. 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子活性鉴定与分析[J]. 东北农业大学学报, 2019, 50(7): 57-67.
DOI: 10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2019.07.007.

Wang Ning, Jin Yanfei, Xing Tianyu, et al. Identification and analysis of promoter activity of A/T-rich region upstream of chicken miR-17-92 cluster[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2019, 50(7): 57-67. (in Chinese with English abstract) DOI: 10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2019.07.007.

Identification and analysis of promoter activity of A/T-rich region upstream of chicken miR-17-92 cluster/WANG Ning^{1,2,3}, JIN Yanfei^{1,2,3}, XING Tianyu^{1,2,3}, CUI Tingting^{1,2,3}, HUANG Jiaxin^{1,2,3}, YAN Xiaohong^{1,2,3}, LI Hui^{1,2,3}(1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. Key Laboratory of Animal Cellular and Genetic Engineering of Heilongjiang Province, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The A/T-rich genomic region upstream of miR-17-92 cluster was analyzed by online bioinformatics software. The promoter of the A/T-rich region and its transcriptional regulation was

收稿日期: 2019-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372299)

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

investigated by reporter gene assay and the site-directed mutagenesis. PromPredict analysis showed that a putative promoter region was located from -388 to -444 bp upstream of chicken miR-17-92 cluster. Transcription factor binding site analysis showed that there were three potential E2F1 binding sites located within the A/T-rich region: -1 273 bp (binding site 1), -1 186 bp (binding site 2) and -753 bp (binding site 3) upstream of the miR-17-92 cluster. The reporter gene assay showed that the A/T-rich region had promoter activity, and the -440 bp region (-440 to -1 bp) upstream of the miR-17-92 cluster had the strongest promoter activity. Cotransfection analysis showed that the transcription factor E2F1 significantly inhibited the promoter activity of the A/T-rich region ($P < 0.01$). Further site-directed mutagenesis showed that E2F1 inhibited the promoter activity via E2F1 binding sites 1 and 2. Reporter gene analysis showed that, unlike its effect on the promoter activity of the A/T-rich region, E2F1 enhanced the promoter activity of miR-17-92 cluster host gene (MIR17HG). The present study first identified a new transcription regulatory region upstream of the chicken miR-17-92 cluster. The outcome of the present study pave the way for elucidating the transcriptional regulation mechanisms of chicken miR-17-92 cluster.

Key words: chicken (*Gallus gallus*); miR-17-92 cluster; A/T-rich region; promoter; E2F1

miR-17-92基因簇非常保守, 基因簇DNA长度约为0.8 kb, 可转录产生6个不同的成熟miRNA: miR-17(miR-17-5p和miR-17-3p)、miR-18a、miR-19a、miR-19b、miR-20a和miR-92^[1]。人类miR-17-92基因簇位于13号染色体, 鸡miR-17-92基因簇则位于1号染色体。miR-17-92基因簇在细胞增殖、分化、凋亡及发育过程中发挥重要调控作用^[2]。此外, 还参与免疫疾病^[3]、心血管疾病^[4]、神经退行性疾病、癌症等疾病发生。目前研究已发现, miR-17-92基因簇在眼癌^[5]、大肠癌^[6]等癌症中起重要作用, 是第一个被公认的非编码癌基因。哺乳动物研究表明, miR-17-92基因簇位于宿主基因(MIR17HG)第三内含子, 其表达受宿主基因启动子调控, 目前发现转录因子c-Myc^[7]、E2F1、E2F2、E2F3^[8]、Spi-1、Fli-3、Fli-1^[9]、STAT3^[10]、cyclin D1^[11]、ETS1、ETS2^[12]等直接结合于MIR17HG基因启动子区, 促进miR-17-92基因簇表达, 而p53^[13]、C/EBP β ^[14]和HIF-1 α ^[15]直接结合于MIR17HG基因启动子区, 抑制miR-17-92基因簇表达。核小体定位分析和染色质特征分析提示, 人类MIR17HG基因转录起始位点下游A/T富集区具有启动子活性。与此结果相一致, 启动子荧光素酶活性分析发现, 人类MIR17HG基因A/T富集区被证实具有启动子活性^[16]。以上研究可见, 人类miR-17-92基因簇不仅受MIR17HG启动子调控, 还受其上游A/T富集区启动子调控。前期研究采

用染色体步移法获得鸡miR-17-92基因簇上游1 704 bp基因组gap区序列, 确定鸡MIR17HG基因启动子区^[17]。生物信息学分析发现, 鸡miR-17-92基因簇上游也存在A/T富集区(chr.1:147 253933-147255083), 全长1150 bp, AT含量为62.48%^[17], 但与人类MIR17HG的A/T富集区相比, 二者序列相似度不高。目前, 鸡miR-17-92基因簇上游A/T富集区是否具有转录调控活性尚不明确。本研究旨在确认鸡miR-17-92基因簇上游A/T富集区是否具有启动子活性, 揭示其转录调控机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

采集AA肉鸡血液和腹部脂肪组织, 酚/氯仿抽提法提取基因组DNA; Trizol法提取AA肉鸡组织和细胞中总RNA。

1.2 生物试剂

DNA Marker、EasyTaq DNA Polymerase、Trans-Start FastPfu Fly DNA Polymerase、dNTPs、pEASY-T1 Simple Cloning Kit、pEASY-Blunt M2 Expression vector、Trans1-T1 Phage Resistant Chemical Competent Cell购自北京全式金公司。PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、限制性内切酶Kpn I、Sma I、Sal I和T₄ DNA连接酶均购自宝生物工程有限公司(TaKaRa, 中国大连)。质粒小量制备试剂盒、DNA纯化回收试剂盒

购自 Axygen 杭州有限公司。荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司。转染试剂 Lipofectamine™2000 购自美国 Invitrogen 公司。细胞裂解液、ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术研究所(上海)。HA 标签抗体、 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 Abmart 公司(上海)。DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、0.25%胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。胎牛血清购自美国 BI 公司。FastStart Universal SYBR Green Master(ROX) 购自 Roche 公司(德国)。pGL3-basic vector、pRL-TK vector、pCMV-HA vector、DF1 细胞(鸡胚成纤维细胞)和 ICPA-II 细胞(永生鸡前脂肪细胞系)均由东北农业大学农业农村部鸡遗传育种重点实验室保存。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析

从 UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) 获得鸡 chr.1:147253933-147255083 的 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区序列, 利用 GPMiner (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/>) 和 PromPredict: (<http://nucleix.mbu.iisc.ernet.in/prompredict/prompredict.html>) 预测所获 A/T 富集区启动子区, 利用在线软件 mulan (<https://mulan.dcode.org/>) 和 JASPAR (<http://jaspar.binf.ku.dk/>) 预测鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区转录因子结合位点。

1.3.2 报告基因载体构建

根据鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物。以 AA 肉鸡血液基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 扩增鸡 miR-17-92 基因簇上游的全长 A/T 富集区序列、A/T 富集区 5' 端截短突变和 3' 端截短突变, 引物信息见表 1。将产物与克隆载体 pEASY-T1 Simple Cloning Vector 连接。双酶切、测序鉴定无误后, 利用 pGL3-basic vector 构建全长 A/T 富集区和截短突变体的报告基因载体。PCR 反应体系 10 μ L: 0.1 μ L Easy Taq DNA Polymerase, 1 μ L 10 \times EasyTaq DNAPolymerase Buffer, 0.8 μ L dNTPs, 1 μ L 基因组 DNA 模板, 上下游引物各 0.2 μ L, 6.7 μ L ddH₂O。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 经 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。同时采用基因合成方法, 将野生型 A/T 富集区报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-

577) 的 3 个 E2F1 潜在结合位点 CCGGAAA (结合位点 1)、CGGCAGAAAATGCGGA (结合位点 2) 和 ACGCCAAA (结合位点 3) 分别突变成 *Eco* R I 酶切位点 GGAATTCC, GGAATTCAGGAATTCC 及 GGAATTCC, 构建包含 E2F1 结合位点突变的报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92-MUT1 (结合位点 1), pGL3-AT-MIR17-92-MUT2 (结合位点 2) 和 pGL3-AT-MIR17-92-MUT3 (结合位点 3)。采用双酶切、测序鉴定无误后用于后续分析。

1.3.3 细胞培养

ICPA-II 细胞用含有 10% 胎牛血清, 终浓度为 100 U \cdot mL⁻¹ 青霉素、100 mg \cdot L⁻¹ 链霉素 DMEM/F12 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO₂ 和 90% 相对湿度细胞培养箱中培养。DF1 细胞用含有 10% 胎牛血清, 终浓度为 100 U \cdot mL⁻¹ 青霉素、100 mg \cdot L⁻¹ 链霉素的 DMEM/High glucose 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO₂ 和 90% 相对湿度细胞培养箱中培养。

1.3.4 表达载体构建

根据 GenBank 中鸡 *LEF1* 基因 (NM_205013.2)、*ETS1* 基因 (NM_205298.2) 和 *E2F1* 基因 (NM_205219.1) 序列, 设计引物, 分别扩增 3 个基因全长编码区。PCR 引物详情见表 1。

采用 Trizol 方法提取鸡脂肪组织总 RNA, 利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒反转录为 cDNA, 以其为模板, 利用高保真 TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase 酶, 对鸡 *LEF1*, *ETS1*, *E2F1* 基因全长编码区作 PCR 扩增, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 20 s, 58 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。将 *LEF1* 和 *ETS1* 扩增产物克隆至 pEASY-Blunt M2 Expression vector, 将 *E2F1* 扩增产物克隆至 pCMV-HA vector, 获得 3 个基因真核表达载体。

1.3.5 Western blot 分析

将 ICPA-II 细胞接种至 6 孔板中, 待细胞汇合度达 70% 时, 采用 Lipofectamine™2000 转染试剂, 分别用 pCMV-HA-E2F1、pEASY-MYC-LEF1 和 pEASY-MYC-ETS1 真核表达载体 (2.0 μ g) 转染细胞, 转染 6 h 后换为添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 48 h 后, PBS 洗涤 3 遍, 每孔加入含 2 μ L PMSF (100 mmol \cdot L⁻¹) 裂解液 200 μ L, 冰上裂解 40 min。采用 10% SDS-PAGE, 100 V 电泳 1.5 h 分离蛋白, 将分离蛋白质样品转至 0.45 μ m 孔径 NC

膜上, 封闭液室温下封闭2 h后, PBST 洗去膜上封闭液(10 min·次⁻¹×4次), 将膜孵育在含有一抗体稀释液(碧云天)中, 4℃过夜。抗体稀释比例分别为 β -actin 抗体(Abmart, 1:5 000), myc 和 HA 标签抗体(Abmart, 1:1 000)。一抗孵育结束后, PBST

洗膜4次, 每次10 min, 然后将膜在辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠抗体中(Abmart, 1:5 000)室温孵育1 h。再用PBST洗膜4次, 每次10 min, 最后ECL显色, 利用SmartChemTM Image Analysis System分析图像。

表1 引物列表

Table 1 Primers used in this study

名称 Name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	T值(℃) Tm value	产物长度(bp) Product length
AT(-1291/-1)-F	<u>GGGTACCCGGGGAACGTGGAGGGGAGGATA</u>	55	1 291
AT(-1291/-1)-R	<u>CCCCGGGGGCAACCAGCTTTTTAGTAATTCAA</u>		
AT(-724/-1)-F	<u>GGGTACCCGCTTTCAATTTTGAATATAGCACT</u>	55	724
AT(-724/-1)-R	<u>CCCCGGGGGCAACCAGCTTTTTAGTAATTCAA</u>		
AT(-440/-1)-F	<u>GGGTACCCATTCTTAATTATCCAAACTGAGCAT</u>	55	440
AT(-440/-1)-R	<u>CCCCGGGGGCAACCAGCTTTTTAGTAATTCAA</u>		
AT(-1/-724)-F	<u>CCCCGGGGCGCTTTCAATTTTGAATATAGCACT</u>	55	724
AT(-1/-724)-R	<u>GGGTACCCGCAACCAGCTTTTTAGTAATTCAA</u>		
AT(-1291/-577)-F	<u>GGGTACCCGGGGAACGTGGAGGGGAGGATA</u>	55	715
AT(-1291/-577)-R	<u>CCCCGGGGGTTCTCTCATTTGGGTTTAGATGGG</u>		
AT(-1291/-626)-F	<u>GGGTACCCGGGGAACGTGGAGGGGAGGATA</u>	55	666
AT(-1291/-626)-R	<u>CCCCGGGGCCAGTAATGGCTGTAAGTTACCCAAGC</u>		
AT(-1291/-980)-F	<u>GGGTACCCGGGGAACGTGGAGGGGAGGATA</u>	55	312
AT(-1291/-980)-R	<u>CCCCGGGGGCTGCTAAACATGCCTGCAATCCT</u>		
E2F1-F	<u>GCGTCGACCACCTGAGCCATGGCTACGG</u>	56	1 288
E2F1-R	<u>GCGGTACCAGCCTCAGAAGTCCAAGTGCCT</u>		
LEF1-F	(G/A)NNATGNCGCAGCTGCCGGGGCCGGGG	56	1 107
LEF1-R	GATGTAGGCAGCTGTCAATTCCTGGGG		
ETS1-F	(G/A)NNATGNTGGACCTGAAGCCCACCTG	56	1 311
ETS1-R	CTCATCAGCATCTGGCTTGACGTC		
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA	60	
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT		
miR-17-3p-F	ACACTCCAGCTGGGACTGCAGTGAAGGC	60	64
miR-17-3p-R	CTCAACTGCTGCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAAGTGC		
miR-20a-F	ACACTCCAGCTGGGTAAGTGCTTATAGTGC	60	67
miR-20a-R	CTCAACTGCTGCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACCTGC		
pri-miR-17-92-F	CATCTACTGCCCTAAGTGCTCCTT	60	68
pri-miR-17-92-R	GCTTGGCTTGAATTATTGGATGA		
URP	TGGTGTCTGGAGTCCG	60	

注: 斜体表示保护碱基, 下划线序列分别为 *Sma* I、*Kpn* I 和 *Sal* I 酶切位点。*Sma* I 酶切位点为 CCCGGG; *Kpn* I 酶切位点为 GGTACC; *Sal* I 酶切位点为 GTCGAC。

Note: The italics are protective bases; the underlined bases are restriction sites for *Sma* I, *Kpn* I and *Sal* I, respectively. The restriction site for *Sma* I is CCCGGG. The restriction site for *Kpn* I is GGTACC. The restriction site for *Sal* I is GTCGAC.

1.3.6 报告基因活性检测

1.3.6.1 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子报告基因活性分析

将 DF1 细胞或 ICPA- II 细胞接种至 24 孔板中, 待细胞汇合度约 70% 时, 采用 Lipofectamine™-2000 转染试剂, 将所有 A/T 富集区突变体 (0.8 μg) 及反向插入的报告基因 (0.8 μg) 与内参质粒 pRL-TK (80 ng) 共转染细胞。转染 6 h 后, 换为含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 48 h 后, 使用 Promega 公司 Dual Luciferase Reporter Assay System 作双荧光素酶检测。报告基因活性为萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性比值, 每个试验 3 次独立重复。

1.3.6.2 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区及 MIR17HG 基因启动子转录调控分析

将 ICPA- II 细胞接种至 24 孔板中, 培养至细胞汇合度约为 70% 时, 采用 Lipofectamine™2000 转染试剂, 将特定 A/T 富集区报告基因载体或 MIR17HG 基因启动子报告基因载体 (0.4 μg) 分别与特定转录因子真核表达载体 (0.4 μg) 及内参质粒 pRL-TK (80 ng) 共转染细胞, 48 h 后检测报告基因活性, 报告基因活性分析方法同上。

1.3.7 E2F1 基因对内源性 miR-17-92 基因簇表达的影响

将鸡 DF1 细胞和 ICPA- II 细胞接种至 6 孔板中培养, 待细胞汇合度达 70% 时, 采用 Lipofectamine™-2000 转染试剂, 将 pCMV-HA-E2F1 真核表达载体 (2.0 μg) 和空载 pCMV-HA vector (2.0 μg) 转染细胞, 48 h 后, 收集细胞, 利用 Trizol 法提取细胞总 RNA。利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒反转录后, Real-time stem-loop RT-PCR 和 Real-time RT-PCR 检测鸡 miR-17-92 基因簇前体 (pri-miR-17-92) 和 miRNA 成员表达, 引物信息见表 1, Real-time RT-PCR 和 Real-time stem-loop RT-PCR 采用 10 μL 反应体系, 反应体系如下: 上、下游引物各 0.3 μL, 模板 1 μL, FastStartUniversal SYBR Green Master (ROX) 5 μL, ddH₂O 3.4 μL。反应条件: 预变性 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共 40 个循环。每个样品设 3 孔重复, 利用 2^{-ΔΔCt} 方法计算相对表达量。

1.4 数据分析

运用 GraphPad Prism5 软件分析试验数据, 平均

数 ± 标准差表示, t-test 作差异显著性分析, **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 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区的生物信息学分析

前期研究发现, 鸡 miR-17-92 基因簇上游 1150 bp (chr.1 147253924-147255116) 存在一个 A/T 富集区, A/T 含量为 62.48%^[17]。为确定该 A/T 富集区是否调控 miR-17-92 基因簇表达, 利用 GPMiner (<http://gpmminer.mbc.nctu.edu.tw/>) 分析该 A/T 富集区序列, 结果表明, A/T 富集区序列中存在一个 TATA box 和一个 CCAAT box, 分别位于基因簇上游 488 bp 处和 591 bp 处。利用 PromPredict 预测该 A/T 富集区启动子区, 结果提示在该基因簇上游 444 bp 到 388 bp 处存在一个启动子区。目前已知鸡 MIR17HG 启动子位于该基因簇上游 3 kb 处^[17], 鸡 MIR17HG 启动子与所预测 A/T 富集区启动子区相距较远, 提示 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子为独立启动子。利用 mulan (<https://mulan.dcode.org/>) 和 JASPAR (<http://jaspar.binf.ku.dk/>) 预测鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区中转录因子结合位点发现, 该 A/T 富集区存在转录因子 LEF1、ETS1 和 E2F1 潜在结合位点, 其中 E2F1 潜在结合位点 3 个, 分别位于 miR-17-92 基因簇上游 -1 273 bp (结合位点 1)、-1 186 bp (结合位点 2) 和 -753 bp (结合位点 3) 处 (见图 1)。

2.2 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子报告基因活性分析

为验证鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区是否具有启动子活性, 采用 PCR 扩增构建 miR-17-92 基因簇上游全长 A/T 富集区报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92 (-1291/-1)、5' 端截短报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92 (-724/-1) 和 pGL3-AT-MIR17-92 (-440/-1)、3' 端截短报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92 (-1291/-577)、pGL3-AT-MIR17-92 (-1291/-626) 和 pGL3-AT-MIR17-92 (-1291/-980) 以及其反向插入报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92 (-1/-724) (见表 1, 图 2)。

将全长 A/T 富集区报告基因载体及 5' 端和 3' 端截短突变体的报告基因载体分别转染 DF1 细胞和 ICPA- II 细胞。报告基因活性分析显示, 全长 A/T

富集区启动子报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92 (-1291/-1) 荧光素酶活性极显著高于 pGL3-basic 空载体 ($P < 0.01$)。截短突变报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-577)、pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-626)、pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-980)、pGL3-AT-MIR17-92(-724/-1) 和 pGL3-AT-MIR17-92(-440/-1) 荧光素酶活性同样极显著高于 pGL3-basic 空载体 ($P < 0.01$)。3'端截短突变体报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-577)、pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-626)、pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-980) 与全长 A/T 富集区报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-

92(-1291/-1) 荧光素酶报告基因活性差异不明显, 但 5'端截短突变体报告基因载体 pGL3-AT-MIR(-724/-1) 和 pGL3-AT-MIR17-92(-440/-1) 荧光素酶报告基因活性显著高于全长 A/T 富集区报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-1) 活性 ($P < 0.05$)。与预期一致, 反向插入报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92(-1/-724) 与 pGL3-basic 空载体相比, 二者活性无显著差异 ($P > 0.05$)。以上结果表明, 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区具有启动子活性, 且 miR-17-92 基因簇上游-440 bp 序列启动子活性最强(见图3)。

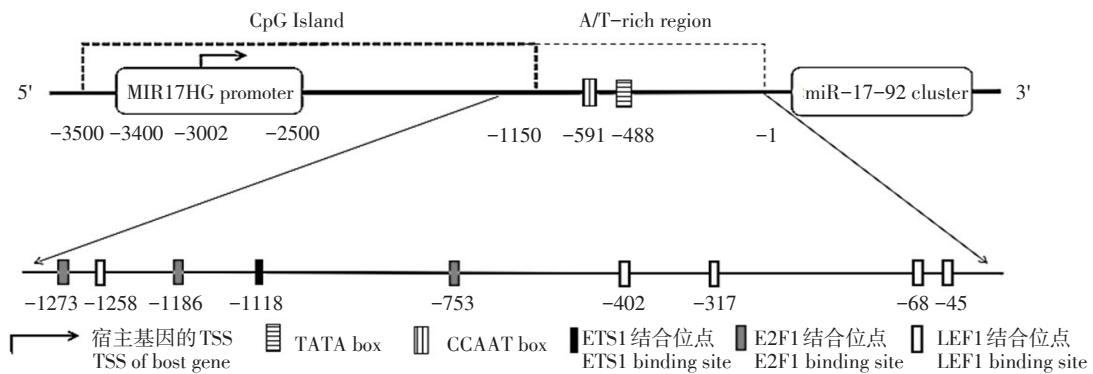
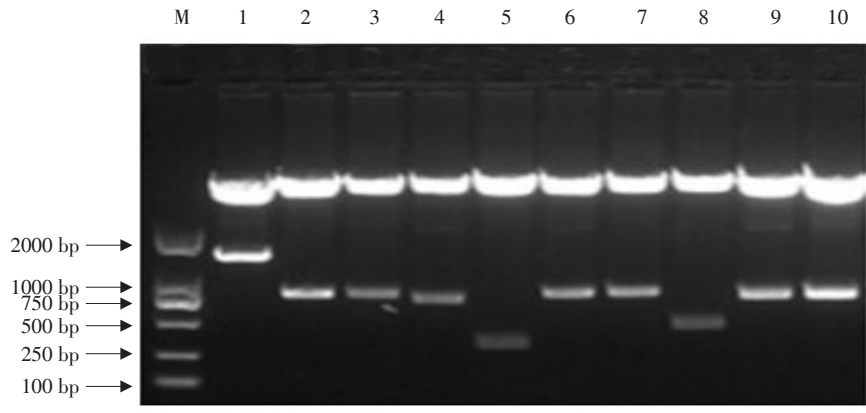


图1 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区生物信息学分析

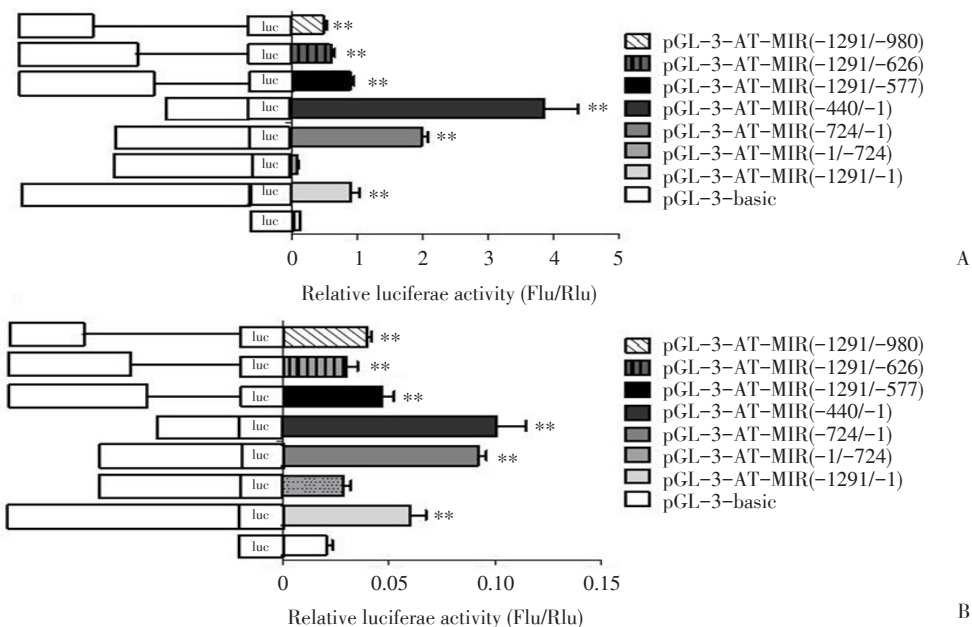
Fig. 1 Bioinformatics analysis of A/T-rich region upstream of chicken miR-17-92 cluster



M-DNA 分子质量标准(DL2000 Marker), 从上到下依次为: 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp
 1-pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-1); 2-pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-577); 3-pGL3-AT-MIR17-92-MUT1; 4-pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-626); 5-pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-980); 6-pGL3-AT-MIR17-92(-724/-1); 7-pGL3-AT-MIR17-92(-1/-724); 8-pGL3-AT-MIR17-92(-440/-1); 9-pGL3-AT-MIR17-92-MUT2; 10-pGL3-AT-MIR17-92-MUT3
 M-DL 2 000 DNA marker from top to bottom: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, and 100 bp
 1-pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-1); 2-pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-577); 3-pGL3-AT-MIR17-92-MUT1; 4-pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-626); 5-pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-980); 6-pGL3-AT-MIR17-92(-724/-1); 7-pGL3-AT-MIR17-92(-1/-724); 8-pGL3-AT-MIR17-92(-440/-1); 9-pGL3-AT-MIR17-92-MUT2; 10-pGL3-AT-MIR17-92-MUT3

图2 鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区报告基因载体双酶切鉴定

Fig. 2 Double digestion identification of the promoter reporters of the A/T rich-region and its mutants upstream of chicken miR-17-92 cluster



A-转染 DF1 细胞分析结果; B-转染 ICPA-II 细胞分析结果。

左侧为 A/T 富集区截短突变体的结构模式图, 右侧图为报告基因活性分析结果。各组结果均于与 pGL3-basic 结果相比, 星号表示差异显著 $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

A-Analysis of the promoter activity in DF1 cells transfected with the promoter reporters of the A/T-rich region with different length. B-Analysis of the promoter activity in ICPA-II cells transfected with the promoter reporters of the A/T-rich region with different length. Figure on the left is the schematic diagram of truncation mutants of the A/T-rich region; figure on the right is the histogram of the promoter activity of the truncation mutants of the A/T-rich region. The results of the A/T-rich region with different length were compared with pGL3-basic vector, and the asterisk indicates a significant difference $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**).

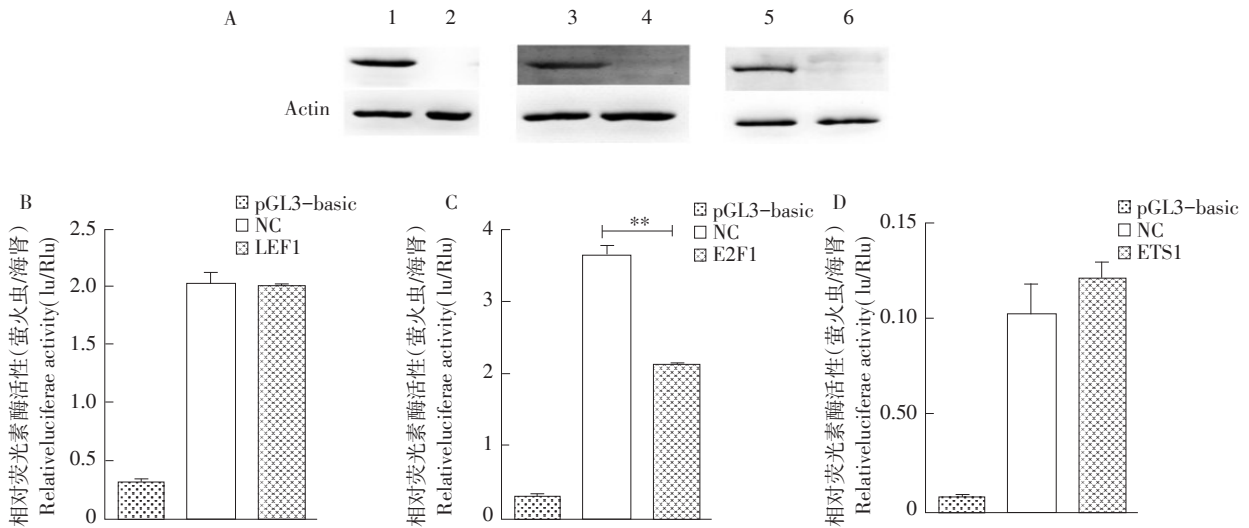
图3 不同长度 A/T 富集区报告基因活性分析

Fig. 3 Promoter activity analysis of the A/T-rich region with different length

2.3 LEF1、ETS1、E2F1 对鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子活性的影响

哺乳动物研究发现, ETS1^[12]与 E2F1^[8]直接作用于 MIR17HG 启动子, 调控 miR-17-92 基因簇表达。通过鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区作生物信息学分析发现, 该区存在转录因子 LEF1、ETS1 和 E2F1 潜在结合位点, 但 LEF1、ETS1 和 E2F1 是否调控该 A/T 富集区启动子尚不清楚。为此, 开展 LEF1、ETS1 和 E2F1 对鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区调控分析。将 pEASY-MYC-LEF1、pEASY-MYC-ETS1、pCMV-HA-E2F1 3 个真核表达载体分别与鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区报告基因载体 pGL3-AT-MIR(-1291/-1) 共转染细胞, 报告基因活性分析结果表明, LEF1 和 ETS1 对 A/T 富集区报告基因活性无显著影响 ($P > 0.05$), 而 E2F1 则明显抑制 A/T 富集区报告基因活性 ($P < 0.01$) (见图 4)。进一步将 pCMV-HA-E2F1 分别与截短突变报告基因载体 pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-

1)、pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-980) 和 pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-577) 共转染细胞, 报告基因检测结果发现, E2F1 过表达可极显著降低各截短突变体报告基因载体荧光素酶活性 ($P < 0.01$) (见图 5A)。为验证 E2F1 是否直接靶向鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区, 将 pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-577) 和突变型报告基因载体 (pGL3-AT-MIR17-92-MUT1、pGL3-AT-MIR17-92-MUT2、pGL3-AT-MIR17-92-MUT3) 分别与 E2F1 真核表达载体共转, 发现与前述结果一致, E2F1 过表达可显著降低 pGL3-AT-MIR17-92(-1291/-577) 报告基因活性 ($P < 0.01$)。E2F1 结合位点突变后, E2F1 仍显著降低 pGL3-AT-MIR17-92-MUT3 载体荧光素酶活性 ($P < 0.01$), 但 E2F1 难以抑制 pGL3-AT-MIR17-92-MUT1 和 pGL3-AT-MIR17-92-MUT2 荧光素酶报告基因活性 ($P > 0.05$) (见图 5B)。综上所述, E2F1 通过作用于 E2F1 结合位点 1 和 2 抑制 A/T 富集区启动子活性。

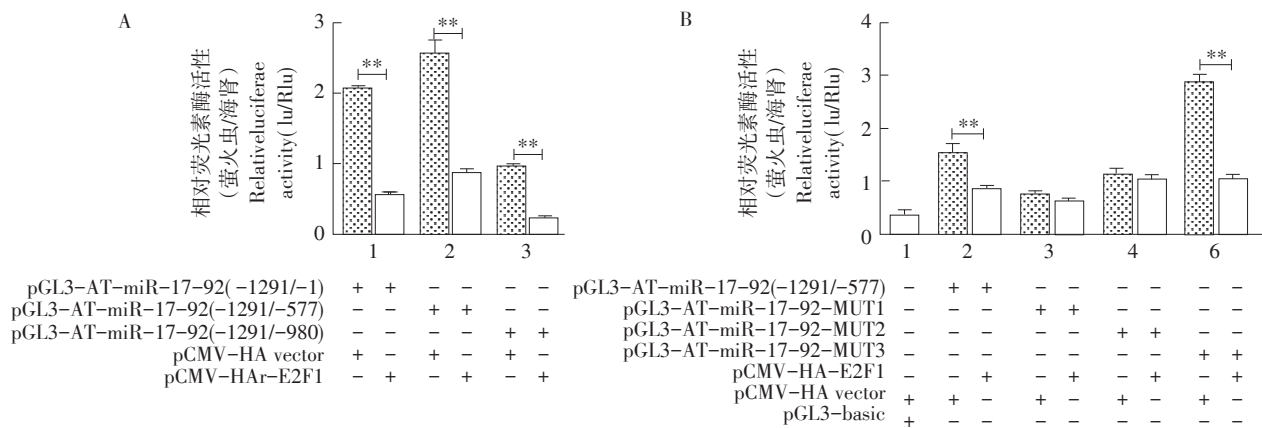


A-LEF1、ETS1 和 E2F1 真核表达载体 Western blot 验证。1-LEF1 转染细胞的裂解物；2-阴性对照(pEASY-Blunt M2 Expression vector 转染细胞裂解物)；3-E2F1 转染细胞裂解物；4-阴性对照(pCMV-HA vector 转染细胞裂解物)；5-ETS1 转染细胞裂解物；6-阴性对照(pEASY-Blunt M2 Expression vector 转染细胞裂解物)；B-过表达 LEF1 对 A/T 富集区启动子报告基因载体 pGL3-AT-MIR(-1291/-1) 活性的影响；C-过表达 E2F1 对 A/T 富集区启动子报告基因载体 pGL3-AT-MIR(-1291/-1) 活性的影响；D-过表达 ETS1 对 A/T 富集区启动子报告基因载体 pGL3-AT-MIR(-1291/-1) 活性的影响；B、C 和 D 中 NC 分别代表空载体 pEASY-Blunt M2 Expression vector、pCMV-HA vector 和 pEASY-Blunt M2 Expression vector。*表示差异显著， $P<0.05$ (*)， $P<0.01$ (**)

A-Western blot identification of the eukaryotic expression vectors of LEF1, ETS1 and E2F1. 1-The lysate of cells transfected with LEF1 (pEASY-MYC-LEF1); 2-Negative control (the lysate of cells transfected with pEASY-Blunt M2 Expression vector); 3-The lysate of cells transfected with E2F1 (pCMV-HA-E2F1); 4-Negative control (the lysate of cells transfected with pCMV-HA vector); 5-The lysate of cells transfected with ETS1 (pEASY-MYC-ETS1); 6-Negative control (the lysate of cells transfected with pEASY-Blunt M2 Expression vector). B-Effect of LEF1 overexpression on the promoter activity of the A/T-rich region reporter pGL3-AT-MIR(-1291/-1). C-Effect of E2F1 overexpression on the promoter activity of the A/T-rich region reporter pGL3-AT-MIR(-1291/-1). D-Effect of ETS1 overexpression on the promoter activity of A/T-rich region reporter pGL3-AT-MIR(-1291/-1). NC in Figures B, C and D represents the pEASY-Blunt M2 Expression vector, pCMV-HA vector and pEASY-Blunt M2 Expression vector, respectively. The asterisk indicates a significant difference, $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**)

图4 LEF1、ETS1 和 E2F1 对鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子活性的影响

Fig. 4 Effect of transcription factors (LEF1, ETS1 and E2F1) on the promoter activity of A/T-rich region upstream of chicken miR-17-92 cluster



加号(+)表示转染质粒；减号(-)表示为转染质粒；*表示差异显著， $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

Plus sign (+) indicates that the plasmid was transfected; minus sign (-) indicates that the plasmid was not transfected. The asterisk indicates a significant difference. $*P<0.05$, $**P<0.01$

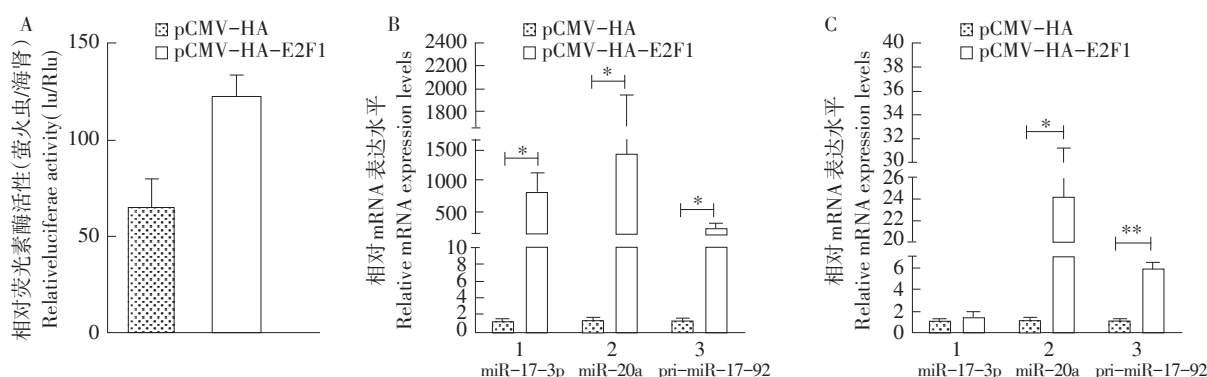
图5 转录因子E2F1对鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子活性的影响

Fig. 5 Effect of E2F1 overexpression on the promoter activity of the A/T-rich region and its mutants upstream of miR-17-92 cluster

2.4 E2F1 对鸡 miR-17-92 基因簇的影响

哺乳动物研究发现, MIR17HG 基因启动子受 E2F1 调控^[18]。前期研究发现, 鸡 MIR17HG 基因启动子区也存在一个保守转录因子 E2F1 结合位点^[17]。为了解 E2F1 对 miR-17-92 基因簇宿主基因启动子活性的影响, 将鸡 miR-17-92 基因簇宿主基因的启动子报告基因载体 pGL3-cMIR17HG (-3780/-2506) 与 pCMV-HA-E2F1 真核表达载体共转染 ICPA-II 细胞, 结果发现, E2F1 可显著增强

宿主基因启动子报告基因活性 (见图 6A) ($P < 0.05$); 将 E2F1 真核表达载体转染 ICPA-II 细胞和 DF1 细胞, 检测鸡 miR-17-92 基因簇前体 (pri-miR-17-92)、miR-17-3p 和 miR-20a。结果发现, 在 ICPA-II 细胞中, E2F1 可显著促进 miR-17-92 基因簇前体、miR-17-3p 和 miR-20a 表达 ($P < 0.05$); DF1 细胞中, E2F1 极显著促进 miR-17-92 基因簇前体表达 ($P < 0.01$), 显著促进 miR-20a 表达 ($P < 0.05$) (见图 6B, 6C)。



A-E2F1 过表达对 MIR17HG 启动子活性的影响; B、C: E2F1 过表达对鸡细胞内源性 miR-17-92 基因簇表达的影响。其中图 B 为转染 ICPA-II 细胞结果, 图 C 为转染 DF1 细胞结果。*表示差异显著, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A-The effect of E2F1 overexpression on the promoter activity of MIR17HG; Figures B and C: Effect of E2F1 overexpression on the endogenous expression of miR-17-92 cluster in ICPA-II (B) and DF1 cells (C). The asterisk indicates a significant difference.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图 6 E2F1 过表达对 MIR17HG 启动子和内源性 miR-17-92 基因簇表达的影响

Fig. 6 Effect of E2F1 overexpression on the promoter activity of MIR17HG and the endogenous expression of chicken miR-17-92 cluster

3 讨论与结论

目前已证实, 人类 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区具有启动子活性, 对该基因簇起调控作用^[19]。鸡 miR-17-92 基因簇上游同样存在 A/T 富集区, 但与人类相似度仅 34%^[17]。人类 miR-17-92 基因簇上游 CpG 岛与 A/T 富集区之间存在一个重要的 c-Myc 结合位点 E-box (E3), 位于该基因簇上游 1 500 bp 处, 此 c-Myc 结合位点与 miR-17-5p 上游 700 bp 序列对人类 miR-17-92 基因簇转录起调控作用^[20]。但鸡 miR-17-92 基因簇 A/T 富集区上游无相应 c-Myc 结合位点。以上结果提示, 鸡与人类 miR-17-92 基因簇 A/T 富集区转录调控可能不完全相同。本研究证实鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区具有启动子活性, 其中 miR-17-92 簇上游约 440 bp 序列为高活性启动子区。以上结果与

PromPredict 启动子分析结果一致, PromPredict 分析显示, miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区启动子区位于该基因簇上游-444 bp 到-388 bp 处。

研究发现 E2F1 可显著促进 miR-17-92 簇表达^[8]。本研究发现 E2F1 促进鸡 MIR17HG 基因启动子的报告基因活性及细胞内源性 miR-17-92 基因簇表达。本研究中, E2F1 对鸡 MIR17HG 启动子和 A/T 富集区启动子调控作用不同 (见图 4C, 6A), 推测鸡 miR-17-92 基因簇可能在不同细胞、组织及生理和病理状态下采用不同启动子转录调控。研究显示, 约三分之一内含子 miRNA 具有独立于其宿主基因启动子, 独立于宿主基因转录^[21]。miRNA 基因由多个启动子调控, 其表达调控机制复杂多样, 在不同组织和细胞类型中 miRNA 转录调控可能不同^[22]。例如, let-7c 转录调控十分复杂, 宿主基因启动子可控制急性骨髓性白血病亚

型急性早幼粒细胞白血病中 let-7c 表达, 但非白血病肿瘤中 let-7c 转录优先受内含子启动子调节; 宿主基因启动子在急性骨髓性白血病更为活跃, 但内含子启动子可在其他组织类型例如前列腺细胞中起作用^[23]。研究表明, miR-128-2 表达不仅受其宿主基因启动子调控, 还可能由内含子启动子转录。ChIP 分析发现, 在急性淋巴细胞白血病患者中, miR-128-2 表达与其宿主基因表达不一致可能由 p53 失活引起, p53 失活可能丧失抑制内含子启动子的作用, 导致 miR-128-2 水平升高^[22]。miR-17-92 基因簇受宿主基因启动子和基因簇上游 A/T 富集区启动子转录调控。研究发现, 原癌基因 Pim-1 与 c-Myc 通过 A/T 富集区上游 200 bp 处的 c-Myc 结合位点协同激活 A/T 富集区转录^[19]。

本研究中, 单独突变 miR-17-92 基因簇上游 1 273 和 1 186 bp 处 E2F1 结合位点 1 和 2 后, E2F1 丧失对启动子报告基因载体活性抑制作用(见图 5B), 可能两个 E2F1 结合位点位置较近, 存在协同作用。转录调控研究发现, 对于包含多个转录因子结合位点的启动子, 转录因子之间存在协同作用, 一个转录因子结合启动子促进其结合位点附近其他结合位点与转录因子结合^[24-25]。鸡 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区具有启动子活性; E2F1 抑制 A/T 富集区启动子活性。

[参 考 文 献]

- [1] Fujiwara C S, Kimura E T. Insights into regulation of the miR-17-92 cluster of miRNAs in cancer[J]. *Frontiers in Medicine*, 2015, 2: 64.
- [2] Gao X, Zhang R, Qu X, et al. MiR-15a, miR-16-1 and miR-17-92 cluster expression are linked to poor prognosis in multiple myeloma[J]. *Leukemia Research*, 2012, 36(12): 1505-1509.
- [3] Tsitsiou E, Lindsay M A. microRNAs and the immune response[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2009, 29(7): 343-351.
- [4] Small E M, Frost R J A, Olson E N. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2010, 121(8): 1022-1032.
- [5] Konkrite K, Sundby M, Mukai S, et al. miR-17-92 cooperates with RB pathway mutations to promote retinoblastoma[J]. *Genes & Development*, 2011, 25(16): 1734-1745.
- [6] Tsuchida A, Ohno S, Wu W, et al. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer[J]. *Cancer Science*, 2011, 102(12): 2264-2271.
- [7] O'donnell K A, Wentzel E A, Zeller K I, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 839-843.
- [8] Tan W, 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.
- [9] Kayali S, Giraud G, Morlé F, et al. Spi-1, Fli-1 and Fli-3 (miR-17-92) oncogenes contribute to a single oncogenic network controlling cell proliferation in friend erythroleukemia[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): 46799.
- [10] Brock M, Trenkmann M, Gay Renate E, et al. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a Novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway[J]. *Circulation Research*, 2009, 104(10): 1184-1191.
- [11] Yu Z, Wang C, Wang M, et al. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2008, 182(3): 509-517.
- [12] Kabbout M, Dakhllallah D, Sharma S, et al. MicroRNA 17-92 cluster mediates ETS1 and ETS2-dependent RAS-oncogenic transformation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): 100693.
- [13] Yan H-L, Xue G, Mei Q, et al. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis[J]. *Embo Journal*, 2014, 28(18): 2719-2732.
- [14] Yan Y, Hanse E A, Stedman K, et al. Transcription factor C/EBP- β induces tumor-suppressor phosphatase PHLPP2 through repression of the miR-17-92 cluster in differentiating AML cells [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2016, 23(7): 1232-1242.
- [15] He M, Wang Q Y, Yin Q Q, et al. HIF-1 α downregulates miR-17/20a directly targeting p21 and STAT3: A role in myeloid leukemic cell differentiation[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2013, 20(3): 408-418.
- [16] Oszolak F, Poling L L, Wang Z, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters[J]. *Genes & Development*, 2008, 22: 3172-3183.
- [17] 程敏, 张文建, 邢天宇, 等. 鸡 miR-17-92 基因簇上游调控区功能分析[J]. *遗传*, 2016, 38(8): 724-735.
- [18] He S, Yang S, Deng G, et al. Aurora kinase A induces miR-17-92 cluster through regulation of E2F1 transcription factor[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(12): 2069-2076.
- [19] Thomas M, Lange-Grünweller K, Hartmann D, et al. Analysis of

- transcriptional regulation of the human miR-17-92 cluster; evidence for involvement of Pim-1[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(6): 12273-12296.
- [20] Thomas M, Langegrünweller K, Hartmann D, et al. Analysis of transcriptional regulation of the human miR-17-92 cluster; evidence for involvement of Pim-1[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(6): 12273-12296.
- [21] Isik M, Korswagen H C, Berezikov E. Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Silence*, 2010, 1: 1-9.
- [22] Monteys A M, Spengler R M, Wan J, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters[J]. *RNA—a Publication of the Rna Society*, 2010, 16(3): 495-505.
- [23] Pelosi A, Careccia S, Sagrestani G, et al. Dual promoter usage as regulatory mechanism of let-7c expression in leukemic and solid tumors[J]. *Molecular Cancer Research*, 2014, 12(6): 878.
- [24] Pettersson M, Schaffner W. Synergistic activation of transcription by multiple binding sites for NF- κ B even in absence of co-operative factor binding to DNA[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 214(2): 373-380.
- [25] Hobert O. Common logic of transcription factor and microRNA action[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, 29(9): 462-468.

(上接第 56 页)

- [13] Groenen M A M, Archibald A L, Uenishi H, et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution [J]. *Nature*, 2012, 491: 393-398.
- [14] Nakamura M, Houghtling R A, Macarthur L, et al. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2003, 184(1): 313-325.
- [15] Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, et al. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2003, 14(3): 191-198.
- [16] 刘福云, 刘文英, 师红, 等. 大鼠胚胎神经干细胞的纯化、诱导分化及鉴定[J]. *生物医学工程学杂志*, 2004(4): 591-596.
- [17] 张乐莉, 杨卓. 神经干细胞中 Notch 和生长因子/细胞因子信号通路间的相互作用[J]. *天津医药*, 2007, 35(12): 905-905.
- [18] 朱晓峰, 张晓梅, 刘玉芳, 等. EGF、bFGF、BDNF 对大鼠海马神经干细胞增殖和分化的作用[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2002, 2(6): 389.
- [19] Chadashvili T, Peterson D A. Cytoarchitecture of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR-2) immunoreactivity in astrocytes of neurogenic and non-neurogenic regions of the young adult and aged rat brain[J]. *J Comp Neurol*, 2006, 498(1): 1-15.
- [20] Raff M C, Miller R H, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium[J]. *Nature*, 1983, 303: 390-396.
- [21] 刘伟, 王立生, 吴曙霞. 全球干细胞研究发展趋势与格局分析 [J]. *中国医药生物技术*, 2016, 12(1): 77-81.
- [22] 左萍萍, 李学坤. 神经干细胞治疗神经系统疾病的应用研究 [J]. *中国康复理论与实践*, 2003, 9(7): 385-387.
- [23] Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 743-745.
- [24] Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M, et al. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders[J]. *Brain Research Reviews*, 2005, 48(2): 211-219.