

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.002

人 MicroRNA335 的预测靶基因 CCL11 CCL26 及 SOX4 的鉴定*

温志红¹,代 艳¹,何 爽²

(广西壮族自治区人民医院:1. 儿科;2. 康复科,南宁 530021)

[摘要] **目的** 验证人 MicroRNA335(hsa-miR-335)与嗜酸细胞趋化因子 1(CCL11)、嗜酸细胞趋化因子 3(CCL26)、SOX4 的靶向调控关系。**方法** 选择网络在线的生物信息学软件 miRanda 和 TargetScan 共同预测为 hsa-miR-335 靶基因的 CCL11、CCL26、SOX4 作为研究对象。构建 CCL11、CCL26、SOX4 基因 3'端非翻译区(3'UTR)双荧光素酶报告基因载体 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR、pMIR-REPORT-SOX4 3'UTR;采用 Lipofectamine 2000 将真核表达质粒 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR、pMIR-REPORT-SOX4 3'UTR、阳性对照质粒分别与 Pre-miRTM miRNA335 Precursor 或阴性对照质粒共转染到 293 T7/17 细胞;双荧光素酶报告基因检测系统检测 CCL11、CCL26、SOX4 基因 3'UTR 与 Hsa-miR-335 共转染萤火虫(Firefly)和海洋腔肠(Renilla)荧光素酶活性,并与阴性对照对比。**结果** hsa-miR-335 对 SOX4 的荧光表达有显著的抑制作用($P<0.01$),但并不影响 CCL11、CCL26 荧光素酶活性($P>0.05$)。**结论** hsa-miR-335 可靶向调控 SOX4,而对 CCL11、CCL26 的表达无影响。

[关键词] 微 RNAs;hsa-miR-335;靶基因;基因调控;CCL11;CCL26;SOX4;双荧光素酶报告基因检测系统

[中图分类号] Q782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)24-3316-03

The identification of human microRNA335's predicated target gene CCL11,CCL26 and SOX4*

Wen Zhihong¹,Dai Yan¹,He Shuang²

(1. Department of Pediatrics;2. Department of Rehabilitation,the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region,Nanning,Guangxi 530021,China)

[Abstract] **Objective** To identify the targeted-regulating relationship between human MicroRNA335 (hsa-miR-335) and CCL11,CCL26 and SOX4. **Methods** The potential fragments of hsa-miR-335 target genes CCL11,CCL26 and SOX4 were predicted by the bioinformatics analyzing tools online. The 3' untranslated regions(3'UTR) of the CCL11,CCL26 and SOX4 were connected to the eukaryotic expression vectors pMIR REPORT. The constructs of pMIR-REPORT-CCL113'UTR,pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR,pMIR-REPORT-SOX4 3'UTR and positive control were co-transfected with Pre-miRTM miRNA335 Precursor or negative control into 293 T7/17 cell line by lipofectamine 2000,respectively. Both Firefly and Renilla luciferase activity were detected by dual luciferase reporter assay system. **Results** Compared with the negative control group,luciferase assay revealed that has-miR-335 could significantly diminish luciferase activity from SOX4 reporter vector ($P<0.01$),while the suppression of luciferase activity was not found in CCL11 or CCL26 reporter vector ($P>0.05$). **Conclusion** The results suggested that hsa-miR-335 targeted regulated SOX4,but not targeted CCL11 and CCL26.

[Key words] MicroRNAs;hsa-miR-335;target gene;gene regulation;CCL11;CCL26;SOX4;dual luciferase reporter gene system

微小 RNA(MicroRNA)是在真核生物中发现的长度为 18~25 个碱基的非编码单链 RNA,其在进化过程中高度保守并具有广泛的生物学功能。MicroRNA 与靶基因 3'端非翻译区(3'UTR)的碱基完全或不完全互补配对,通过降解信息 RNA 或抑制翻译过程从而调节靶基因的表达^[1]。因此,寻找 MicroRNA 调控的靶基因,是研究 MicroRNA 功能的一个关键切入点。经生物信息学软件预测嗜酸细胞趋化因子 1(CCL11)、嗜酸细胞趋化因子 3(CCL26)、SOX4 是人 MicroRNA335(hsa-miR-335)的靶基因,本研究将用分子生物学方法对 3 个基因进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 PCR 引物(美国 Integrated DNA Technologies 公司);Pre-miRTM miRNA335 Precursor、pMIR-REPORT 真核表达质粒(美国 Ambion 公司);PCR 试剂盒、T4DNA 连

接酶试剂盒、大肠杆菌 DH5a 感受态细胞、Lipofectamine 2000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司);限制性核酸内切酶(美国 NEB 公司);质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒(美国 QIAGEN 公司);DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);双荧光素酶报告基因检测系统试剂(美国 Promega 公司)。

1.1.2 实验设备 PCR 仪(美国 Eppendorf 公司),二氧化碳恒温培养箱(美国 Thermo 公司),synergyTM 2 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 靶基因预测 应用网络在线生物信息学分析软件 miRanda 和 TargetScan,选择 2 个软件共同预测为 has-miR-335 靶基因且与免疫相关的 CCL11、CCL26、SOX4 作为研究对象。

1.2.2 CCL11、CCL26、SOX4 基因 3'UTR 真核表达载体的构建 CCL11、CCL26 基因 3'UTR 真核表达载体 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR 已成功

* 基金项目:广西自然科学基金项目(2011GXNSFC018019);广西卫生和计划生育委员会计划课题项目(Z2015309)。 作者简介:温志红(1967—),主任医师,硕士,主要从事儿科免疫性疾病和呼吸性疾病研究。

构建^[2]。真核表达载体 pMIR-REPORT-SOX4-3'UTR 构建方法见参考文献^[2];扩增 SOX4 基因 3'UTR 全长的上游引物 5'-GGC CAC TAG TGA AAC GAA AAG GAC A-3',下游引物 5'-GGC CGC CGG CAC ACT GGT GGC AGG T-3',扩增产物序列长度 1 845 bp。

1.2.3 质粒提取及纯化 Pre-miRTMmiRNA335 Precursor、pMIR-REPORT 真核表达质粒提取和纯化方法见参考文献^[2]。质粒经美国辛辛那提儿童医学中心测序室测定,序列正确。

1.2.4 细胞培养 复苏人 293 T7/17 细胞,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养,接种适当数量细胞于 24 孔板,37℃二氧化碳恒温培养箱培养 48~72 h,待细胞融合 70%后进行转染。

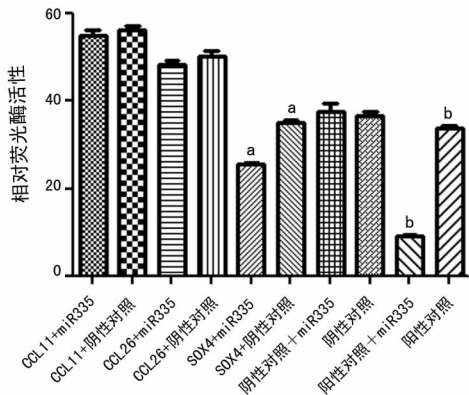
1.2.5 细胞转染 阴性对照为空白 pMIR-REPORT 真核表达载体,阳性对照质粒自行合成^[3]。将真核表达质粒 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR、pMIR-REPORT-SOX4 3'UTR、阳性对照质粒分别与合成的 Pre-miRTMmiRNA335 Precursor 或阴性对照共转染到 293 T7/17 细胞系,每组设置 3 个复孔,严格按照说明书进行操作。

1.2.6 荧光素酶检测 共转染 48 h 后同时检测 CCL11、CCL26、SOX4 基因 3'UTR 萤火虫 (firefly) 和海洋腔肠 (renilla) 荧光素酶活性,并与阴性对照对比,实验重复 3 次,操作参照说明书。

1.3 统计学处理 用 GraphPad Prism5.0 软件进行统计分析、制图,组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

由图所见,hsa-miR-335 可显著降低克隆 SOX4 3'UTR 的报告基因活性($P<0.01$),表达下调 30%左右,但并不影响 CCL11 3'UTR、CCL26 3'UTR 荧光素酶活性。初步认为 hsa-miR-335 对 SOX4 有靶向调控作用,而对 CCL11、CCL26 并无此作用,见图 1。



a: $P<0.01$, SOX4 + miR335 与 SOX4 + 阴性对照比较; b: $P<0.01$, 阳性对照 + miR335 与阳性对照比较。

图 1 CCL11、CCL26、SOX4 基因相对荧光素酶活性值

3 讨 论

人类 1/3 的基因由 MicroRNA 调控^[4],由此认为其在高级真核生物内对基因表达的调控作用可能和转录因子一样重要。MicroRNA 通过降解靶基因 mRNA 或者转录后抑制靶基因表达而发挥作用,目前已证实 MicroRNA 参与细胞增殖、分化、凋亡,生物发育、脂肪代谢等生命过程中的一系列重要进程,并与免疫系统疾病、心血管疾病、糖尿病、肿瘤等多种疾病的发生、发展密切相关^[5-9]。因此,预测及验证 MicroRNA 靶

基因,对研究 MicroRNA 的功能及其参与的生物学过程具有非常重要意义。

既往研究发现白细胞介素 13 (IL-13) 刺激人气道上皮细胞,部分 MicroRNA 表达上调,部分 MicroRNA 表达下降,而 MicroRNA335 是表达下调最明显的一个。众所周知,IL-13 是参与哮喘等变态反应性疾病的重要炎症介质^[10],气道上皮细胞参与哮喘气道炎症的形成,由此推测 MicroRNA335 可能与哮喘等免疫性疾病有关。动物实验及人体试验均发现 MicroRNA 确实参与哮喘气道炎症和气道高反应的形成^[11-13]。CCL11、CCL26 是嗜酸性粒细胞 (EOS) 选择性趋化剂,通过与 CC 家族趋化因子受体 3 (CCR3) 相结合,吸引 EOS 向炎症部位聚集并活化^[14],会致哮喘患者气道炎症加重及气道高反应。研究发现 SOX4 影响前 B 细胞的生存,提示 SOX4 与免疫相关^[15]。这就是虽然生物信息学软件预测 MicroRNA335 的靶基因很多,本研究选择 CCL11、CCL26、SOX4 作为研究对象的原因。

由于一个 MicroRNA 可以调节多个靶基因,一个靶基因也可以有数个 MicroRNA 与其配对,给靶基因的预测和证实带来了困难^[16]。MicroRNA 靶基因芯片筛选技术的应用,为疾病的发病机制和诊断治疗的研究提供了新的思路,但该技术存在信息质量的稳定性差、费用较高等缺陷限制了它的广泛应用^[17]。通过生物信息学预测 MicroRNA 靶基因,然后通过分子生物学方法和技术加以验证仍然是目前 MicroRNA 靶基因寻找的最常用的实验方法^[18-19]。当前,利用荧光素酶报告基因系统体外检测实验寻找或验证 MicroRNA 靶基因已成为不可或缺的一种快速实验技术。

本研究通过靶基因预测软件 miRanda 和 TargetScan 进行生物信息学分析发现 CCL11、CCL26、SOX4 可能是 hsa-miR-335 的靶基因。通过构建报告基因重组质粒 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR、pMIR-REPORT-SOX4 3'UTR,并分别与 Pre-miRTMhsa-miR-335 共转染到 293 T7/17 细胞系;同时共转染 Pre-miRTMmiRNA335 Precursor,并设阴性对照质粒、阳性对照质粒以保证实验的可靠性。运用双荧光素酶报告基因检测系统测定 Has-miR-335 对 pMIR-REPORT-CCL11 3'UTR、pMIR-REPORT-CCL26 3'UTR、pMIR-REPORT-SOX4 3'UTR 的直接作用,通过观察荧光素酶的表达强度初步证实 hsa-miR-335 靶向调控 SOX4,但对 CCL11、CCL26 并无影响,提示生物信息学软件对 MicroRNA 靶基因的预测具有假阳性,需通过分子生物学实验加以验证。

体外实验证实了 hsa-miR-335 对靶基因 SOX4 有良好的可调控性,为后续 hsa-miR-335 与哮喘等免疫性疾病的功能研究提供实验基础。

参考文献

[1] Okamura K. Diversity of animal small RNA pathways and their biological utility[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012,3(3):351-368.
[2] 温志红,代艳,何爽. CCL11 和 CCL26 基因 3'UTR 真核表达载体的构建和意义[J]. 中国临床新医学, 2014,7 (1):5-7.
[3] 温志红,代艳,何爽. 人 MicroRNA-335 阳性对照质粒真核表达载体的构建及意义[J]. 中国临床新医学, 2015,8 (1):1-3.
[4] Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of

- protein synthesis by miRNAs; how many mechanisms[J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(3): 118-126.
- [5] Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(11): 2309-2315.
 - [6] 胡晓娟, 聂红. MicroRNA 在免疫系统中的作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(8): 930-932.
 - [7] Takyar S, Vasavada H, Zhang JG, et al. VEGF controls lung Th2 inflammation via the miR-1-Mpl (myeloproliferative leukemia virus oncogene)-P-selectin axis[J]. J Exp Med, 2013, 210(10): 1993-2010.
 - [8] 刘煜, 李华, 李东, 等. MicroRNA-1 对肝癌细胞 BAG4 表达的影响[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(6): 479-482, 487.
 - [9] 滕尧树, 曹晓林, 李勇. microRNA 在气道变应性疾病中的研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36(1): 114-118.
 - [10] 温志红, 周薇雅, 胡琼燕, 等. 哮喘患儿免疫球蛋白 E、白细胞介素-13 检测的意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(21): 1621-1622.
 - [11] Feng MJ, Shi F, Qiu C, et al. MicroRNA-181a, -146a and -146b in spleen CD4⁺ T lymphocytes play proinflammatory roles in a murine model of asthma[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13(3): 347-353.
 - [12] Chiba Y, Tanabe M, Goto K, et al. Down-regulation of miR-133a contributes to up-regulation of RhoA in bronchial smooth muscle cells[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(8): 713-719.
 - [13] Chiba Y, Misawa M. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: MiR-133a and bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in asthma[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 114(3): 264-268.
 - [14] 刘新彦. 白细胞介素-17 和嗜酸性粒细胞趋化因子与上呼吸道变应性疾病相关性的研究进展[J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2013, 29(1): 100-104.
 - [15] Sun B, Mallampati S, Gong Y, et al. Sox4 is required for the survival of pro-B cells[J]. J Immunol, 2013, 190(5): 2080-2089.
 - [16] Mathelier A, Carbone A. Large scale chromosomal mapping of human microRNA structural clusters[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(8): 4392-4408.
 - [17] Gao Z, Shi T, Luo X, et al. High-throughput sequencing of small RNAs and analysis of differentially expressed microRNAs associated with pistil development in Japanese apricot[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 371.
 - [18] Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, et al. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(10): 1726-1733.
 - [19] Qin A, Wen Z, Zhou Y, et al. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(2): 252-264.
- (收稿日期: 2015-02-22 修回日期: 2015-08-10)
-
- (上接第 3315 页)
- topoietic stem cells[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(2): 348-356.
- [7] Li D, Wang Y, Wu H, et al. The effects of p38 MAPK inhibition combined with G-CSF administration on the hematopoietic system in mice with irradiation injury[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62921.
 - [8] Shao L, Li H, Pazhanisamy SK, et al. Reactive Oxygen species and hematopoietic stem cell senescence[J]. Int J Hematol, 2011, 94(1): 24-32.
 - [9] Zhou Y, Duan S, Zhou Y, et al. Sulfiredoxin-1 attenuates oxidative stress via Nrf2/ARE pathway and 2-Cys prdxs after oxygen-glucose deprivation in astrocytes[J]. J Mol Neurosci, 2015, 55(4): 941-950.
 - [10] Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(1/2): 76-87.
 - [11] Takabayashi S, Yamauchi Y, Tsume M, et al. A spontaneous smc1b mutation causes cohesin protein dysfunction and sterility in mice[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234(8): 994-1001.
 - [12] Wu H, Xue D, Chen G, et al. The BCL2L1 and PGAM5 axis defines hypoxia-induced receptor-mediated mitophagy[J]. Autophagy, 2014, 10(10): 1712-1725.
 - [13] Telliez JB, Bean KM, Lin LL. LRDD, a novel leucine rich repeat and death domain containing protein[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1478(2): 280-288.
 - [14] Mine Y, Young D, Yang C. Antioxidative stress effect of phosphoserine dimers is mediated via activation of the Nrf2 signaling pathway[J]. Mol Nutr Food Res, 2015, 59(2): 303-314.
 - [15] Li Y, Liu X, Zhou T, et al. Inhibition of APE1/Ref-1 redox activity rescues human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress and reduces choroidal neovascularization[J]. Redox Biol, 2014, 2: 485-494.
 - [16] Sankunni M, Parikh RA, Lewis DW, et al. Targeted inhibition of ATR or CHEK1 reverses radioresistance in oral squamous cell carcinoma cells with distal chromosome arm 11q loss[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2014, 53(2): 129-143.
 - [17] Bierbaum M, Bastiaens PI. Cell cycle-dependent binding modes of the ran exchange factor RCC1 to chromatin[J]. Biophys J, 2013, 104(8): 1642-1651.
 - [18] Yang Z, Wang WE, Zhang Q. CIAPIN1 siRNA inhibits proliferation, migration and promotes apoptosis of VSMCs by regulating Bcl-2 and Bax[J]. Curr Neurovasc Res, 2013, 10(1): 4-10.
- (收稿日期: 2015-02-22 修回日期: 2015-08-07)