

使用 poly(A)-tailed RT-PCR 对猪部分 microRNAs 在胚胎期的表达进行验证

周焱¹, 宋齐¹, 王欢^{1,2}, 王海军¹, 朱建国¹, 逢大新¹, 欧阳红生¹, 唐小春¹

(¹吉林大学畜牧兽医学院吉林省动物胚胎工程重点实验室, 长春 130062;

²吉林农业科技学院生物工程分院, 吉林 132101)

摘要: MicroRNAs(miRNAs)是一系列小的非编码的 RNA,长度大约为 21~22 nt。主要通过抑制翻译或者进行 mRNA 的降解而在多种生理以及发育过程中发挥很重要的作用。miRBase16.0(2010)数据库中显示,注释的线虫、小鼠、大鼠以及人的 miRNAs 分别有 175 种、673 种、408 种和 1048 种。而哺乳动物猪的 miRNAs 仅仅为 211 种,特别是在胚胎生长发育过程中调节基因表达的 miRNAs 的研究十分欠缺。因此使用 poly(A)-tailed RT-PCR 对猪的 10 种 miRNAs 的表达在猪胚胎期第 33 天(E33)进行验证。对于鉴定的这 10 种 miRNAs,通过实时定量 PCR 对其表达水平进行相对分析,并使用 PicTar 和 TargetScan 软件对其靶基因进行预测。结果表明:在头部组织中 ssc-miR-9 的表达量最高的,而在内脏组织中 ssc-miR-1 的表达量最高。功能分析表明这些 miRNAs 可以参与神经、大脑、肌肉、器官的发育。此研究为以后进一步的研究猪以及相关动物胚胎发育的 miRNAs 的功能提供有用的信息。

关键词: microRNA;猪;胚胎发育;poly(A)-tailed PCR;靶标预测

中图分类号:S828

文献标志码:A

论文编号:2011-0272

Identification Pig Partial microRNAs at Embryo by Poly(A)-tailed RT-PCR

Zhou Yan¹, Song Qi¹, Wang Huan^{1,2}, Wang Haijun¹, Zhu Jianguo¹, Pang Daxin¹,

Ouyang Hongsheng¹, Tang Xiaochun¹

(¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062;

²Department of Biology Engineering, Jilin Agriculture Science and Technology College, Jilin 132101)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small noncoding RNAs of 21~22 nucleotides in length that play important roles in multiple biological and developmental processes by degrading targeted mRNAs or repressing mRNA translation. The database of miRBase16.0 (2010) show that there are 175, 673, 408, and 1048 annotated miRNAs for *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, and *Homo sapiens*, respectively. However, there are only 211 miRNAs described for *Sus scrofa*. In particular, the miRNAs which regulate gene expression in embryonic growth and development were still poorly understood. Therefore, in this study we carried out poly(A)-tailed RT-PCR to verify the expression of ten miRNAs at porcine embryonic day 33 (E33). Of these distinct miRNAs identified, the author determined the relative amount of miRNAs by quantitative real-time PCR and performed investigation into identification of the potential target mRNAs using PicTar and TargetScan. Results showed that: ssc-miR-9 was the most abundantly expressed miRNA in the head region, ssc-miR-1 was the most abundantly expressed miRNA in the organ region. Function analysis suggested that

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2009CB941001)。

第一作者简介:周焱,男,1987年出生,硕士研究生,研究方向为干细胞与转基因动物。通信地址:130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院, Tel: 0431-87835175, E-mail: yanzhou_2006@126.com。

通讯作者:唐小春,女,1982年出生,讲师,博士,研究方向为基因表达与调控。通信地址:130062 吉林省长春市西安大路5333号吉林大学畜牧兽医学院, Tel: 0431-87835175, E-mail: xiaochuntang@jlu.edu.cn。

收稿日期:2011-01-27,修回日期:2011-03-14。

these miRNAs were mostly involved in the development of nerves, the cerebrum, muscle, and organs. The results provide useful information for the investigation of embryonic miRNAs in the pig and other animals.

Key words: microRNA; *Sus scrofa*; embryonic development; poly(A)-tailed PCR; target prediction

0 引言

microRNAs(miRNAs)是一类短的非编码的,长约22个核苷酸的RNA分子,广泛存在于动植物中^[1-2]。miRNAs主要是通过与其靶标mRNA的3'-UTR区配对而降解靶标mRNA或抑制mRNA的正常翻译,进而对基因转录后表达进行调控^[3-4]。第一个被发现的miRNA是*lin-4*,它可以控制秀丽线虫的后期胚胎发育,但是不编码蛋白^[5],所以未能引起足够的重视。然而自从另一个类似功能的miRNA*let-7*基因的发现^[6],数千条miRNAs在植物、鱼、小鼠以及人类中得到鉴定。

目前在小鼠和人类中研究发现,miR-1以及miR-133在骨骼肌以及心肌中特异性表达,miR-1通过结合*HDAC4*来促进肌肉分化,相反miR-133通过靶标于*SRF*来抑制肌肉分化,促进成肌细胞增值^[7]。另外研究发现,在miR-14基因敲除的动物体内,三酰基甘油和甘油二酯的含量增加,过量表达miR-14则减少^[8]。Esau C等^[9]发现在分化的脂肪细胞中miR-143表达明显升高,而抑制miR-143会导致脂肪细胞分化受阻,此外该试验还证明,miR-143的作用靶点是细胞外调节激酶5(*ERK5*),这些结果表明miRNAs与脂肪代谢之间也有直接的关系。同时在Smad3蛋白存在的条件下miR-24受TGF- β 1的调节并促进肌肉的分化^[10]。

到目前为止,大部分miRNAs的发现和功能的验证都是在小鼠中实现的,这些发现并不能完全与miRNAs在人类中的作用相吻合,国际上逐渐用猪作为研究模型来模拟miRNAs在人类生长发育和生理病理中的作用。但关于猪的miRNAs的报道很少,特别是关于猪胚胎发育的miRNAs就更少,而miRNAs对于哺乳动物的胚胎发育是至关重要的。因此,该试验使用poly(A)-tailed RT(Reverse Transcription)PCR的方法对猪的10种miRNAs(ssc-miR-9、ssc-miR-103、ssc-miR-140*、ssc-miR-184、ssc-miR-30a、ssc-miR-1、ssc-miR-24、ssc-miR-183、ssc-miR-26a、ssc-miR-101a)在发育33天的胚胎的头部组织以及内脏组织进行验证,确定其在胚胎期的表达,并进行实时定量的分析,确定其在胚胎发育33天这一特定阶段的相对表达量。同时对这10种miRNAs的发育相关的靶基因进行预测以及进行功能分析,来进一步探讨猪的miRNAs对胚胎发育调节的机理。因此笔者为下一步

继续进行生长发育相关的miRNAs的靶基因验证试验以及功能分析奠定了基础,同时也为进行胚胎发育机制研究的人员提供了有价值的资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要工具酶与试剂 Trizol与Superscript III型逆转录酶购自Invitrogen公司;poly(A)聚合酶购自NEB公司;rATP购自Promega公司;Ex Taq DNA聚合酶与dNTP mix购自Takara公司;miRNAs特异引物、下游通用反向引物以及3' poly(T)接头引物由南京金斯特公司合成;实时定量试剂盒(BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit)购自博日公司;DEPC购自Sigma公司;50 bp DNA Ladder、pGM-T载体以及感受态细胞购自北京天根公司。

1.1.2 试验材料与设备 怀孕33天的大白母猪由吉林大学原种猪场提供,实时定量PCR仪器Mx3000P购自Stratagene公司。

1.1.3 引物设计 根据miRNAs数据库miRBase16.0(2010)中公布的猪的miRNAs的序列,使用primer 5软件设计的miRNAs的扩增引物见表1。

1.1.4 靶基因的预测 用PicTar算法以及TargetScan算法对miRNAs进行靶基因的预测。并对2种算法获得的靶基因进行比较,增加预测的特异性,同时选出与胚胎发育有关的靶基因。

1.2 方法

1.2.1 动物以及总RNA样品的准备 使用外科手术将怀孕33天的大白母猪的胎儿取出(胎儿个数,n=3)。去除羊膜后,将胎儿在PBS中迅速清洗数次。用剪刀将胎儿的头部组织与内脏组织进行分离。按照Trizol试剂的说明书进行头部组织与内脏组织的总RNA的提取。获得RNA之后用核酸测定仪测定总RNA在260 nm的吸光度以及 A_{260}/A_{280} 的比值,确定总RNA纯度与浓度,选取OD值在1.8~2.0的总RNA做后续研究。将剩余样品立即分别冻存于液氮直到需要进一步的分析。

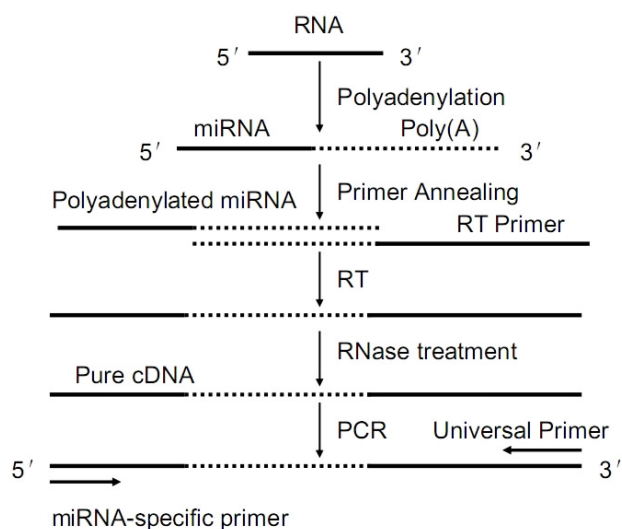
1.2.2 poly(A)-tailed RT-PCR 提取胚胎头部组织与内脏组织的总RNA,用poly(A)聚合酶对miRNAs进行多聚腺苷酸化,然后使用特异的poly(T)接头引物和SuperScript III进行反转录获得cDNA,最后使用所要研究的miRNAs的特异上游引物以及一个通用下游引

表1 miRNAs poly(A)-tailed RT-PCR 实验使用的引物序列

名称	特异引物序列
ssc-miR-9_F	5' -TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA-3'
ssc-miR-103_F	5' -AGCAGCATGTACAGGGCTATGA-3'
ssc-miR-140*_F	5' -TACCACAGGGTAGAACCACGGAC-3'
ssc-miR-184_F	5' -TGGACGGAGAAGTATAAGGGT-3'
ssc-miR-30a_F	5' -TGTAACATCCTCGACTGGAAG-3'
ssc-miR-1_F	5' -TGGAATGTAAA GAAGTATGTA-3'
ssc-miR-24_F	5' -TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG-3'
ssc-miR-183_F	5' -TATGGCACTGGTAGAATTCAGT-3'
ssc-miR-26a_F	5' -TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT-3'
ssc-miR-101_F	5' -TACAGTACTGTGATAACTGAA -3'
3' Poly(T) adapter	5' -ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATGd(T)30(A,G,orC)(A,G,C,orT)-3'
Universal reverse primer	5' -ATTCTAGAGGCCGAGG CGGCCGACATGT-3'

物进行普通的PCR扩增,参考于Fu HJ^[11],原理如图1。简单的说,对于多聚腺苷酸化加尾反应(50 μL体系):4 μg 总RNA,0.5 μL ATP(100 mmol/L),5 U poly(A)聚合酶,37°C反应30 min。将多聚腺苷酸化加尾的RNA作为模板进行反转录(20 μL体系):4 μg poly(A)-tailed RNA,1 μL poly(T)接头引物:5'-ATTCTAGAGGCCGA GCGGCCGACATGd(T)30(A,G,orC)(A,G,C,or T)-3',1 μL dNTP mix(10 mmol/L),200 U SuperScript III,4 μL 5×RT缓冲液。50°C反应60 min后75°C处理15 min以灭活反转录酶。制备的cDNA即可作为PCR的模板。PCR反应过程为(20 μL

体系):1 μL cDNA模板,1 μL dNTP mix(10 mmol/L)0.2 μL Ex Taq,2 μL的10×PCR缓冲液,0.5 μL的上游miRNA特异引物,0.5 μL的下游的通用反向引物:5' - ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATGT-3'。PCR反应程序:95°C预变性5 min,94°C变性30 s,特异温度退火复性30 s,72°C延伸30 s,25个循环,4°C保存。由于聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨率高于琼脂糖凝胶电泳,所以获得的80 bp左右的PCR产物进行12%的多聚丙烯酰胺凝胶电泳,并进行EB染色。取一定量剩余的PCR扩增产物连接到pGEM-T载体,然后转化到大肠杆菌感受态细胞中培养,挑选阳性菌液送公司测序。



使用poly(A)聚合酶对小RNA进行多聚腺苷酸化。poly(A)-tailed的RNA用含有oligo-dTs侧翼为接头序列的引物进行反转录合成cDNAs。使用RNase H对样品进行处理移除cDNAs中的小RNA。使用小RNA特异引物以及下游通用引物进行普通的PCR

图1 poly(A)-tailed RT-PCR的原理图

1.2.3 miRNAs的实时定量 按照 Real-Time PCR Kit的说明书进行实时定量PCR。使用 poly(A)-tailed RT-PCR的方法进行10种miRNAs的第一链cDNA的合成,并用Mx3000P检测系统的2步法进行扩增。所有的反应需进行3次重复。miRNAs的表达水平根据ct值进行测量,ct值代表每一个样品的荧光值超过荧光阈值的部分循环数,miRNAs的变化使用方程: $2^{-\Delta\Delta ct}$ 进行计算。使用的上游引物为10种miRNAs特异的序列,下游反向引物为通用引物。U6基因的表达作为内参,内参的引物序列为:U6_F:5' - GCTTCGGCAG CACATATACTAAAAT-3'; U6_R: 5'-CGCTTCACGAA TTTGCGTGTTCAT-3'。

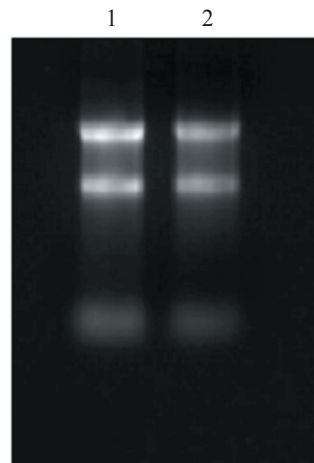
1.2.4 miRNAs靶基因的预测 在动物基因组中,由于miRNAs与靶基因的3' -UTR区域只是部分的互补,所以比较难进行靶标预测^[12],现在常用的的预测程序有TargetScan、TargetScanS、miRanda、DIANA-microT、RNAhybrid、PicTar等等。虽然现有的几种预测程序在

技术细节上有所不同,但它们都建立在相同的原理上,即 miRNAs 的 5' 末端的 2~8 个碱基的“种子序列”与靶标 mRNA 的互补性、miRNAs 靶位点的保守性、miRNA:mRNA 双链之间的热稳定性及附近序列的二级结构的原则。此试验中使用 PicTar 算法^[13]以及 TargetScan 算法^[14]进行靶基因的预测,并且试图去揭示 miRNAs 在猪的胚胎发育中的功能,并且由于猪的基因不包括在这 2 种算法中,所以使用人的 miRNA:mRNA 进行靶标的预测。

2 结果与分析

2.1 用 poly(A)-tailed RT-PCR 的方法对猪 miRNAs 在胚胎期进行部分验证的结果

由于 miRNAs 的序列短,并且无 3'末端的 poly(A) 序列,故使用加尾的方式进行验证。提取大白猪 33 天胚胎的头部组织与内脏组织的总 RNA(图 2),并选取 OD 值在 1.8~2.0 的总 RNA 进行实验。将 poly(A)-tailed RT-PCR 获得的 80 bp 左右长度的产物进行多聚丙烯酰胺凝胶电泳,对 10 种 miRNAs 在胎儿的头部组织(图 3a, b)与内脏组织(图 3c, d)进行验证。结果显示,选定的 10 种 miRNAs 在猪的 33 天胚胎的头部组织与内脏组织均表达,并且扩增的目的片段条带单一、无杂带、大小与预期的一致,同时也表明此方法可以特异扩增成熟的 miRNA。之后将聚丙烯酰胺凝胶电泳获得的特异条带连接 T 载体进行测序。与其他的鉴定 miRNAs 的方法相比, poly(A)-tailed RT-PCR 的方法相对简单、方便并且精确。

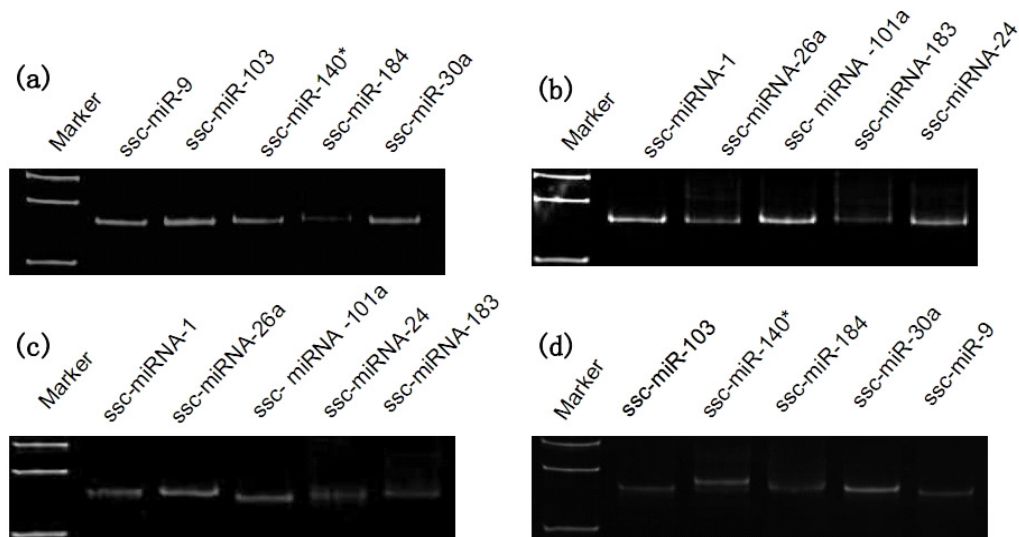


1: 头部组织总 RNA; 2: 内脏组织总 RNA

图 2 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取的头部组织与内脏组织的总 RNA

2.2 对 10 种 miRNAs 在头部组织和内脏组织相对表达量进行比较

对于头部组织与内脏组织的 10 种 miRNAs 进行初步验证后,此试验使用实时定量 PCR 比较这 10 种 miRNAs 在头部组织与内脏组织的相对的表达量(图 4)。结果表明,头部 ssc-miR-9 的表达量最高, ssc-miR-1 的表达量相对较低(图 4a)。在内脏中 ssc-miR-1 的表达量最高, ssc-miR-184 的表达量相对较低(图 4b)。这说明 ssc-miR-9 在猪头部组织早期形成过程中可能起到重要的调节作用,而 ssc-miR-1 在猪内脏组织早期发育过程中则起主要



10 种 miRNAs 分别为 ssc-miR-9、ssc-miR-103、ssc-miR-140*、ssc-miR-184、ssc-miR-30a、ssc-miR-1、ssc-miR-24、ssc-miR-183、ssc-miR-26a、ssc-miR-101a。PCR 产物的长度为 80 bp。使用 12% 多聚丙烯酰胺凝胶电泳进行 PCR 产物分析。Marker: 50 bp;

(a, b) 总 RNA 来源于头部; (c, d) 总 RNA 来源于内脏

图 3 用 poly(A)-tailed RT-PCR 的方法验证 10 种 miRNAs 在猪 33 天胚胎头部组织(a, b)与内脏组织(c, d)的表达

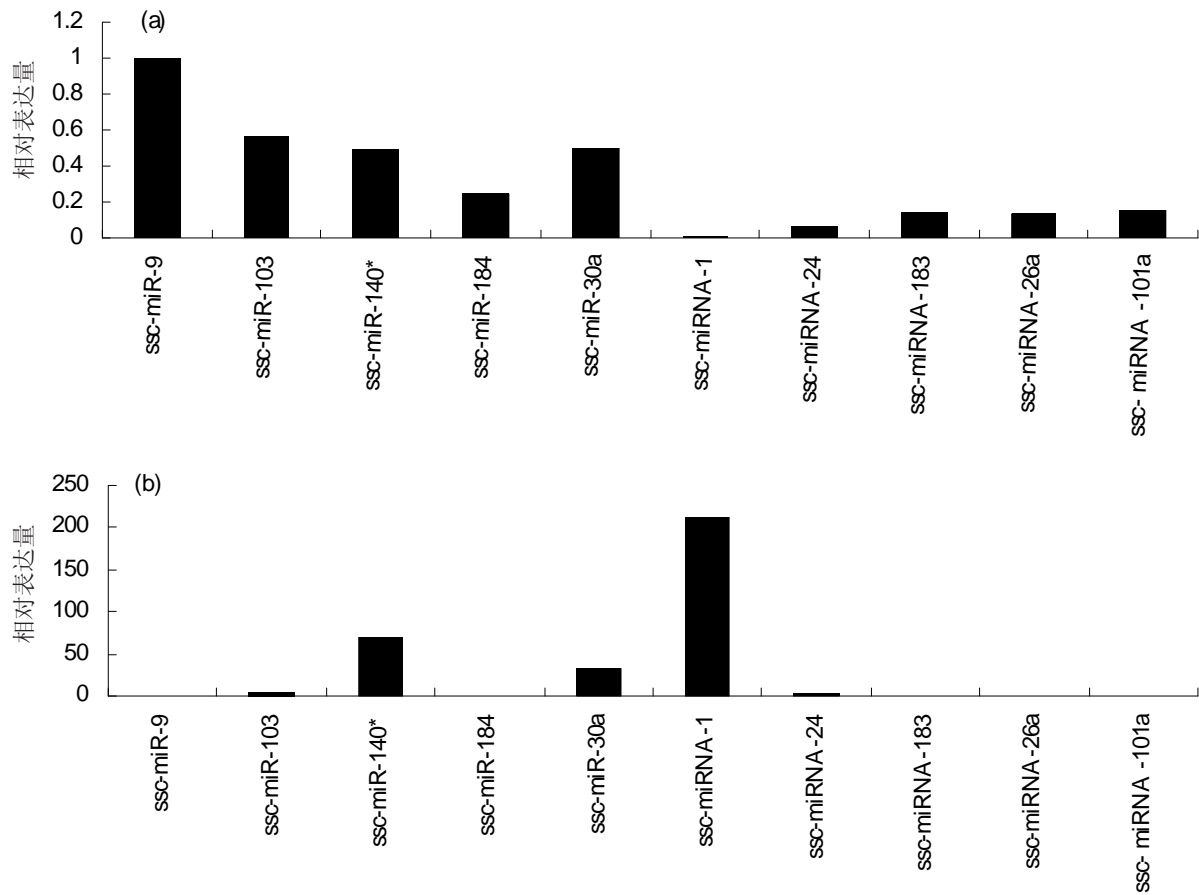


图4 10种miRNAs在头部组织(a)与在内脏组织(b)中的相对表达量

作用。

2.3 对验证过的 miRNA 的靶基因进行预测以及功能分析

为了进一步的阐明这 10 种 miRNAs 在胚胎发育中所发挥的分子功能,试验需要对其胚胎发育相关的靶基因进行预测。用 PicTar 算法以及 TargetScan 算法对这 10 种 miRNAs 的靶基因的预测,并比较后分别选出 5 种与胚胎发育相关的靶基因,共产生 50 个参与胚胎发育的靶基因(表 2)。其中,在头部组织相对高

表达的 miRNAs 的靶基因可以参与胚胎期的神经发育,例如 miR-9 可以调节人神经祖细胞(hNPCs)的增殖与迁移^[15-16]。在内脏组织中相对高表达的 miRNAs 可以调节内脏发育相关的基因,研究表明 miR-1 通过抑制 Delta 蛋白的翻译来促进心肌细胞的分化^[17],并在小鼠的胚胎干细胞分化期间调节 *sirt1* 的表达^[18]。而 miR-140 调节软骨的发育并维持稳态,它的缺失会导致骨关节炎的形成^[19]。另外功能分析表明这些胚胎发育相关的靶基因大多参与心脏、骨骼肌、大脑、神经系

表2 10种miRNAs与猪胚胎发育相关的靶标的预测以及功能分析

miRNA	Target gene related to embryonic development	Functions
ssc-miR-9	Fibrillin-1 precursor(<i>FBNI</i>), Homeobox protein engrailed-1 (<i>Hu-En-1</i>), Protein patched homolog 1(<i>PTCI</i>), Homeobox protein Hox-A11(<i>HOXA11</i>), platelet - derived growth factor C precursor (<i>PDGFC</i>)	heart development, skeletal development, hindbrain development
ssc-miR-103	SNF-related serine/threonine-protein kinase(<i>SNRK</i>), Axis inhibition protein 2(<i>Axin-2</i>), Delta-like protein 1 precursor(<i>DLL1</i>), Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1(<i>MAP2K1</i>), Cyclin-dependent kinase 5 activator 1 precursor(<i>CDK5R1</i>)	neuron differentiation, brain development, osteoblast differentiation

续表 2

miRNA	Target gene related to embryonic development	Functions
ssc-miR-140*	Jagged-1 precursor(<i>JAG1</i>), Pituitary homeobox 2(<i>PITX2</i>), Early growth response protein 2(<i>EGR2</i>), Ubiquitin-protein ligase E3A(<i>UBE3A</i>), Histone deacetylase 4(<i>HDAC4</i>)	organ morphogenesis peripheral, nervous system development, striated muscle development
ssc-miR-184	Frizzled-1 precursor(<i>FZD1</i>), Band 4.1-like protein 5(<i>EPB41L5</i>), Immunoglobulin superfamily member 8 precursor(<i>IGSF8</i>), DNA topoisomerase 2-beta(<i>TOP2β</i>), RNA-binding protein Musashi homolog 1(<i>MSH1</i>)	paraxial mesoderm development, forebrain development, nervous system development
ssc-miR-30a	Serine/threonine-protein kinase receptor R3 precursor(<i>ACVRL1</i>), Adenomatous polyposis coli protein(<i>APC</i>), Pituitary homeobox 2(<i>PITX2</i>), Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 1(<i>APBA1</i>), Homeobox protein DLX-6(<i>DLX6</i>)	anterior/posterior pattern formation, embryonic limb morphogenesis, cell proliferation
ssc-miR-1	Homeobox protein Hox-B4(<i>HOXB4</i>), Neurogenic locus notch homolog protein 3 precursor(<i>NOTCH3</i>), Endothelin-1 precursor(<i>EDN1</i>), Mab-21-like protein 1(<i>MAB21L1</i>), Ras GTPase-activating protein 1(<i>RASA1</i>)	forebrain development, dorsal/ ventral pattern formation, neuron apoptosis
ssc-miR-24	Sphingosine 1-phosphate receptor Edg-1(<i>EDG1</i>), Hepatocyte nuclear factor 1-beta(<i>HNF-1β</i>), Myogenin, Neurogenic differentiation factor 1(<i>NEUROD1</i>), Delta-like protein 1 precursor(<i>DLL1</i>)	anterior/posterior pattern formation, cell differentiation/ striated muscle development, somite specification
ssc-miR-183	Low-density lipoprotein receptor related protein 6 precursor(<i>LRP6</i>), Insulin receptor substrate 1(<i>IRS1</i>), Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform(<i>PPP2CA</i>), Protein kinase C alpha type(<i>PRKCA</i>), Muscleblind-like protein(<i>MBNL1</i>)	gastrulation, anterior/posterior pattern formation, mesoderm development
ssc-miR-26a	Jagged-1 precursor(<i>JAG1</i>), Inhibin beta B chain precursor(<i>INHBB</i>) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual- specificity protein phosphatase(<i>PTEN</i>), E1A-associated protein p300(<i>EP300</i>), Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma(<i>PIK3R3</i>)	organ morphogenesis, central nervous system development, myoblast/ endothelial cell differentiation
ssc-miR-101	Cyclin-dependent kinase 5 activator 1 precursor(<i>CDK5R1</i>), Protein patched homolog 1(<i>PTCH</i>), Neurogenic differentiation factor 1(<i>NEUROD1</i>), Zinc finger homeobox protein 1b(<i>ZFHX1B</i>), Transcription factor SOX-9(<i>SOX9</i>)	neuron differentiation, dorsal/ ventral pattern formation, heart development

统的发育以及胚胎前后模式、背腹模式的形成。这些结果均表明这些 miRNAs 在猪的胚胎发育中可能扮演着很重要的角色。具体的靶标的确定还需要进一步试验来验证。

3 讨论

miRNAs 代表了一种新的能调节基因表达的因子。到目前为止已经有数百种 miRNAs 在小鼠以及人中得到鉴定。与小鼠相比,猪不仅基因组序列与人的同源性高度相近,并且在解剖学、生理学、生物化学、病

理学和药理学等方面与人类相似性极高。同时由于猪相关 miRNAs 已有的报道不多,特别是在猪胚胎发育阶段 miRNAs 的表达模式以及作用仍然不是很清楚,所以对各种动物的胚胎发育相关的 miRNAs 的研究,将使作者更好的理解胚胎发育的机制,同时为在人类中进行相似的研究提供参考。

此实验在猪的胚胎发育的第 33 天(此时期母猪度过第 1 个怀孕危险期,胚胎的器官发生已经完成)对胚胎发育相关的 10 种 miRNAs (ssc-miR-9、ssc-miR-103、

ssc-miR-140*、ssc-miR-184、ssc-miR-30a、ssc-miR-1、ssc-miR-24、ssc-miR-183、ssc-miR-26a、ssc-miR-101a)进行了 poly(A)-tailed RT-PCR 验证,确定了其在猪胚胎头部组织和内脏组织中确实存在,这种验证方法与其他 miRNA 的检测方法比较,需时较短、初始 RNA 量较少,并且由于同时对所有 miRNAs 进行多聚腺苷酸加尾,所以可以制作一个模板,检测多个 miRNAs 表达。

此外,作者对猪的这 10 种 miRNAs 进行了实时定量,初步了解了这 10 种 miRNAs 在头部与内脏的相对的表达量的高低。从相对定量结果看出,在头部组织中,ssc-miR-9 表达量最高,有研究也表明 miR-9 参与调节脑神经的发育,在人类中 miR-9 参与调节神经细胞的增值与迁移^[15-16],由此看出 ssc-miR-9 在脑组织的分化发育过程中尤为重要;在内脏组织中,ssc-miR-1 表达量最高,在小鼠组织的 miRNA 调节研究中发现,miR-1 通过抑制 Delta 蛋白(Notch 蛋白的一个配体)的翻译来影响 Notch 信号通路,从而促进心肌细胞的分化^[17]。而在头部组织中 ssc-miR-1 以及内脏组织中 ssc-miR-184 低表达,可能是在胚胎发育第 33 天这一发育的特定阶段,细胞的类型以及微环境的限制导致这些 miRNAs 表达量较低。

试验中,miRNAs 可能的靶基因的预测以及功能分析表明,这 10 种 miRNAs 可以参与胚胎发育的调节。例如,作者预测 miR-103 的一个潜在的靶标为 *AXIN2*(Axis inhibition protein 2),而 *Axin2* 可以结合 APC(Adenomatous polyposis coli)蛋白来稳定 beta-catenin,进而调节下游基因 *c-myc*、*MMP7*、*ID2*、*CD44*、*EphB2* 以及 *FGF20* 的转录活性。另外 miR-1 靶标于 *Notch3*(Neurogenic locus notch homolog protein 3 precursor),从而可以反向的调节神经分化、前脑发育以及其他的发育过程。miR-30a 被预测可以结合 *EP300*(E1A-associated protein p300),进而可以调节肺的发育。这给研究人员将来研究头部和内脏发育过程中的基因调节提供了重要线索。

现阶段关于猪的 miRNAs 研究主要集中在通过 miRNAs 测序和通过与人类 miRNAs 序列比对来寻找新的 miRNAs 上,功能鉴定方面在国际上还是空白,此实验为猪 miRNAs 功能鉴定提供了很好的线索,使笔者能更好的理解在胚胎发育过程中 miRNAs 的作用,相信不久的将来,猪的 miRNAs 功能研究会给研究胚胎发育的机制提供更多的信息。

参考文献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism,and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297.
- [2] Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets[J]. FEBS Letters,2005,579(26):5904-5910.
- [3] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature,2004,431(7006):350-355.
- [4] Kim V N, Nam J W. Genomics of microRNA[J]. Trends Genet, 2006,22(3):165-173.
- [5] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell,1993,75(5):843-854.
- [6] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *C.aenorhabditis elegans*[J]. Nature,2000,403(6772):901-906.
- [7] Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nat Genet,2006,38(2):228-33.
- [8] Xu P, Vermooy S Y, Guo M, et al. The drosophila microRNA miR-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism[J]. Curr Biol,2003,13(9):790-5.
- [9] Esau C, Kang X, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem,2004,279(50): 52361-52365.
- [10] Sun Q, Zhang Y, Yang G, et al. Transforming growth factor- β -regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation [J]. Nucleic Acid Res,2008,36(8):2690-2699.
- [11] Fu H J, Zhu J, Yang M, et al. A novel method to monitor the expression of microRNAs[J]. Mol Biotechnol,2006,32(3):197-204.
- [12] Carthew R W. Gene regulation by microRNAs[J]. Curr Opin Genet Dev,2006,16(2):203-208.
- [13] Krek A, Grün D, Poy M N, et al. Combinatorial microRNA target predictions[J]. Nat Genet,2005,37(5):495-500.
- [14] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. Cell,2003,115(7):787-798.
- [15] Uchia N. microRNA-9 control a migratory mechanism in human neural progenitor cells[J]. Cell Stem Cell,2010,6(4):294-296.
- [16] Delaloy C, Liu L, Lee J A, et al. MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors[J]. Cell Stem Cell,2010,6(4):323-335.
- [17] Kwon C, Han Z, Olson E N, et al. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2005,102(52):18986-18991.
- [18] Saunders L R, Sharma A D, Tawney J, et al. miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues[J]. Aging (Albany NY),2010,2(7): 415-431.
- [19] Miyaki S, Sato T, Inoue A, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis[J]. Genes Dev,2010,24(11):1173-1185.