

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.20.002

成簇 pri-miRNAs 表达载体的构建及表达验证 *

曲妍佳 李晓宁 张萌萌 范雅婷 肖君华 李凯 周宇荀[△]
(东华大学 化学化工与生物工程学院 上海 201620)

摘要 目的:旨在建立一个多重表达任意 miRNA 的方案,实现多个 pri-miRNA 表达阅读框的串联,用于 miRNA 簇或者 miRNA 家族的功能研究。**方法:**通过改造 CRISPR/Cas9 系统共表达载体 42230,插入 EGFP 编码序列以及单个 pri-miRNA 序列,实现单个 pri-miRNA 表达载体可视化的构建。在单个 pri-miRNA 表达载体的基础上,通过同源重组的方式,插入下一个 pri-miRNA 序列,实现多个 pri-miRNA 表达阅读框的串联表达。**结果:**以 miR29 家族的三个 miRNA 为例,验证了在 pri-miRNA 表达阅读框串联方面的可行性;在多重的 pri-miRNA 表达载体中,miRNA 成熟体验证结果表明,pri-miR29a 和 pri-miR29b 能够在哺乳动物细胞中被加工成熟,其成熟体明显地过表达。在转染的 293A 细胞中,miR29 家族的靶基因 PTEN 的表达水平显著降低。**结论:**所构建的 pri-miRNA 多重表达方案,能够实现多个外源 miRNA 在同一细胞中的共表达,对于探索 miRNA 家族和 miRNA 簇的拮抗或协同调控功能起到重要的推进作用。

关键词:pri-miRNA; miR29 家族; 多重表达载体; PTEN

中图分类号:Q34; Q75; Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)20-3805-07

Construction and Expression Validation of Clustered pri-miRNAs Expression Vectors*

QU Yan-jia, LI Xiao-ning, ZHANG Meng-meng, FAN Ya-ting, XIAO Jun-hua, LI Kai, ZHOU Yu-xun[△]

(School of Chemistry and Bioengineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: In order to create a protocol for multiple expression of arbitrary miRNAs in tandem with multiple pri-miRNA expression reading frames for the functional study of miRNA clusters or miRNA families. **Methods:** By modifying the CRISPR/Cas9 system co-expression vector 42230, the EGFP coding sequence and a single pri-miRNA sequence were inserted to enable visualization of a single pri-miRNA expression. Based on a single pri-miRNA expression vector, the next pri-miRNA sequence was inserted by homologous recombination to achieve tandem expression of multiple pri-miRNA expression reading frames. **Results:** Taking three miRNAs of the miR29 family as an example, the feasibility of pri-miRNA expression in reading frame tandem connection was verified. In multiple pri-miRNA expression vectors, miRNA maturation assay results showed that pri-miR29a and pri-miR29b were able to be processed to mature in mammalian cells and their mature bodies were significantly overexpressed. In transfected 293A cells, target gene PTEN of miR29 family expression level was significantly reduced. **Conclusion:** The pri-miRNA multiple expression protocol that we constructed enables the co-expression of multiple exogenous miRNAs in the same cell. It plays an important role in exploring the antagonistic or cooperative regulation of miRNA family and miRNA cluster.

Key words: Pri-miRNA; miR29 family; Multiple expression vector; PTEN

Chinese Library Classification (CLC): Q34; Q75; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)20-3805-07

前言

miRNA(microRNA)是一类长度约为 22 个核苷酸的内源非编码单链小 RNA,主要通过信使 RNA 的直接剪切或间接抑制翻译在转录后水平调控靶基因的表达^[1-3]。microRNA 在个体发育的不同时期及不同组织中,拥有不同的表达模式,表明其在个体发育和分化过程中起着重要的调控作用^[4-6]。

最近的研究显示,在基因组中大量发现同时表达的 miRNA 簇和具有相同种子序列的 miRNA 家族,这些 miRNA 协同

调节同一生命过程。已知 miR29 家族包括三个 miRNA,分别为 miR29a、miR29b、miR29c。这三种 miRNA 是经过位于两条不同的染色体的两个基因簇分别转录形成的。最近研究表明 miR29 家族通过对靶基因的作用而参与了细胞中一系列的生理过程,比如免疫调控、细胞的凋亡与分化^[7]等等。Fariha 等人对小鼠不同组织的表达谱芯片数据分析显示,在肝脏,肾脏,肺以及心脏中 miR29 家族表达水平随年龄上升,导致小鼠出生后体重的下降^[8]。

在 miRNA 的功能研究中,过表达 miRNA 的载体大多使

* 基金项目:上海市科委实验动物专项基金项目(15140900500/16140901302);中央高校专项基金项目(CUSF-DH-D-2017054)

作者简介:曲妍佳(1990-),硕士研究生,主要研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail:798288225@qq.com

△ 通讯作者:周宇荀(1968-),博士,副教授,主要研究方向:细胞生物学,E-mail:zhouyuxun@dhu.edu.cn,电话:021-67792652

(收稿日期:2018-02-18 接受日期:2018-04-12)

用 Invitrogen 公司构建的以 CMV 为启动子分别表达不同 miRNA 的载体。Xiangning Qiu 等人在 pcDNA3.1 的基础上, 使用同一个启动子在不同酶切位点间串联了 miR34 家族的 3 个 miRNA。他们的实验数据显示, 串联表达三个 miRNA 的载体和单独表达每个 miRNA 的载体, 其 miRNA 表达水平相似; 但是, 串联表达载体对细胞扩增的抑制能力明显高于单独表达的载体^[9]。这提示我们, 在 miR29 家族的功能研究中构建串联表达载体对于其功能研究至关重要。因此, 构建单个和串联 pri-miRNA 表达载体, 探究 miRNA 家族的重要功能。

此外, 目前的 miRNA 共表达质粒大多采用同一启动子启动的方法, 但是根据 Tingting Wang 等人的报道, 利用这种方法构建的共表达载体, 随着 miRNA 数目的增多, miRNA 被加工成熟的能力会受到影响。因此, 尝试使用具有自己启动子各个 miRNA 独立表达的 miRNA 表达框串联的方法, 可能会改善串联个数对 miRNA 的加工成熟带来的影响。

U6 启动子是脊椎动物小细胞核 RNA (small nuclear RNA, snRNA)U6 的启动子, 属于 RNA 聚合酶 III 子类。由上游启动子元件和非基因控制区组成, 可以划分成两个部分:(1)距转录起始位点上游约 70 bp 范围内有 snRNA 近端序列元件 (proximal sequence element, PSE) 和 TATA 元件;(2)距转录起始位点上游约 200 bp 远端区域的八聚体基序^[10]。U6 启动子所转录基因的下游存在一段 5'-TTTTTTT-3' 六聚体胸腺嘧啶序列, 它为 RNA 聚合酶 III 提供转录终止信号。除此之外, U6 启动子还有一个重要的特点, 即 +1 位的 G 对转录效率影响较大^[11]。在 RNA 干扰技术的 shRNA 表达载体的构建过程中, U6 启动子就被广泛应用^[12]。2013 年以来, 研究最为广泛的 CRISPR/Cas9 系统, 其单链指导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 大都采用 U6 启动子^[13]。另外该启动子大小约为 250 bp, 长度适宜, 因此, 以 U6 启动子作为串联 pri-miRNA 表达框的启动子具有可行性。

正如之前 miRNA 研究进展中所述, 已经有研究报告, miRNA 簇和 miRNA 家族共同参与调控同一代谢通路^[14,15]。然而, 这些 miRNAs 之间的协同调节机制仍然有待被进一步解析。构建多个 miRNA 的共表达载体, 对研究 miRNAs 间相互作用重要重大。目前, 大多采用在不同质粒上表达所需 miRNA 的方法来研究 miRNA 的功能。但是, 受到转染效率的影响, 这样的方法并不利于多个 miRNA 同时在一个细胞中表达^[16]。虽然, Xiangning Qiu 等人在 pcDNA3.1 上实现了 3 个 miRNA 的同时表达, 但是他们的方法仍然具有局限性, 如载体上有限的多克隆位点数限制插入 miRNA 的数量。因此建立一个多重表达任意 miRNA 的方案, 构建一种能够在哺乳动物细胞中更加灵活的同时表达多种 miRNA 的载体对于研究 miRNA 簇以及 miRNA 家族在生命过程中的功能至关重要。

1 材料与方法

1.1 材料

42230(pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9)质粒; DH5 α 感受态细胞(TIANGEN); 293A 细胞(本实验室冻存); NovoRec PCR® 一步定向克隆试剂盒; 限制性内切酶; RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit。

1.2 方法

1.2.1 目的片段的扩增 根据 PCR 试剂盒使用说明, 以 miR29 家族设计的不同引物, PCR 扩增不同目的片段。PCR 反应体系: 2 \times Taq MasterMix 10 μ L, 上游引物 1 μ L(200 nM), 下游引物 1 μ L(200 nM), 模板 3 μ L, H₂O 5 μ L。反应条件: 95 °C 变性 2 min 后, 95 °C 30 s, 60.5 °C 1 min, 72 °C 1 min, 40 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 切胶回收。

1.2.2 重组质粒的构建和鉴定 用 BamH I 和 EcoR I 分别对单个 pri-miRNA 表达载体和两个(或三个)pri-miRNA 表达载体的 PX330-U6-CBh-EGFP 进行酶切, 纯化后的线性化酶切产物与目的片段的重组后, 转化大肠杆菌感受态 DH5 α (普通转化过程, 未经蓝白斑筛选), 于 37 °C 振荡培养至少 1 h, 涂板后 37 °C 恒温培养 12~14 h, 挑取单克隆经菌落 PCR 验证后送上海生工生物工程公司测序, 并抽提正确质粒。

1.2.3 pri-miRNAs 多重表达载体在细胞中的表达 用完全培养基 DMEM (10% 胎牛血清, 100 mg/mL 链霉素, 100 U/mL 青霉素) 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 293A 细胞。在重组质粒转染 2 h 前, 将含血清培养基换为不含血清的 opti-MEM 培养基, 按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂的说明书进行转染。转染 6 h 后吸去上清, 继续加入完全培养基培养 48 h 后, 用显微镜观察细胞的生长状态及荧光状态。

1.2.4 总 RNA 提取、反转录、实时定量 PCR 扩增 依照说明书使用 TRIzol Reagent(Invitrogen, 美国) 提取总 RNA。RNA 的质量和浓度通过 NanoDrop 2000c (Thermo NanoDrop, 美国) 超微量分光光度计确定。采用 DNaseI 以去除基因组 DNA 污染。采用 SuperScript II Reverse Transcriptase(Fermentas, 美国) 试剂盒进行逆转录。PCR 过程使用 ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, 美国), 结果利用 7500 Software v2.0.4 软件采用 $2^{\Delta\Delta CT}$ 法比较实验组和对照组的表达量。

1.3 引物设计

miRNA 序列信息来自 miRBase, 利用 primer3, Primer Premier 5.0 和 Oligo7 设计 stem-loop 茎环反转录特异性引物。如表 1 所示。

表 1 Stem-loop 茎环反转录特异性引物

Table 1 Stem-loop reverse-transcription-specific primer

Target	sequence (5' to 3')
miR-29a-3p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACTAACCG
miR-29b-3p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACAACACT
miR-29c-3p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACTAACCG
miR-16-5p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACCGCCAA

2 结果

2.1 pri-miRNAs 多重表达载体的构建

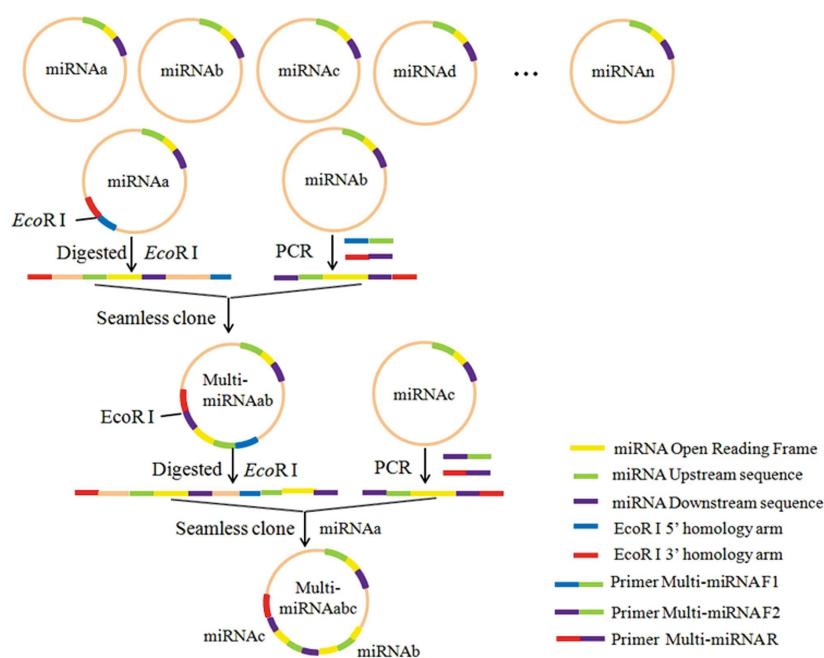


图 1 多重表达 pri-miRNAs 载体构建过程

Fig. 1 Multiple expression of pri-miRNAs vector construction process

2.1.1 单个 pri-miRNA 表达载体的构建 使用限制性内切酶 *Bam*H I 线性化载体 PX330-U6-*Bam*H I-CBh-EGFP(图 2A、B)。以 GT1-7 基因组为模板，分别以 pri-miR29a/b/c 为引物进行 PCR 扩增目的片段(图 2C、D、E)。以 pre-miRNA-seq 为引物进

行菌落 PCR 验证，筛选阳性克隆，PCR 产物大小为 410 bp、426 bp、426 bp(图 2F、G、H)。经测序验证后，与理论结果相同，载体构建成功。

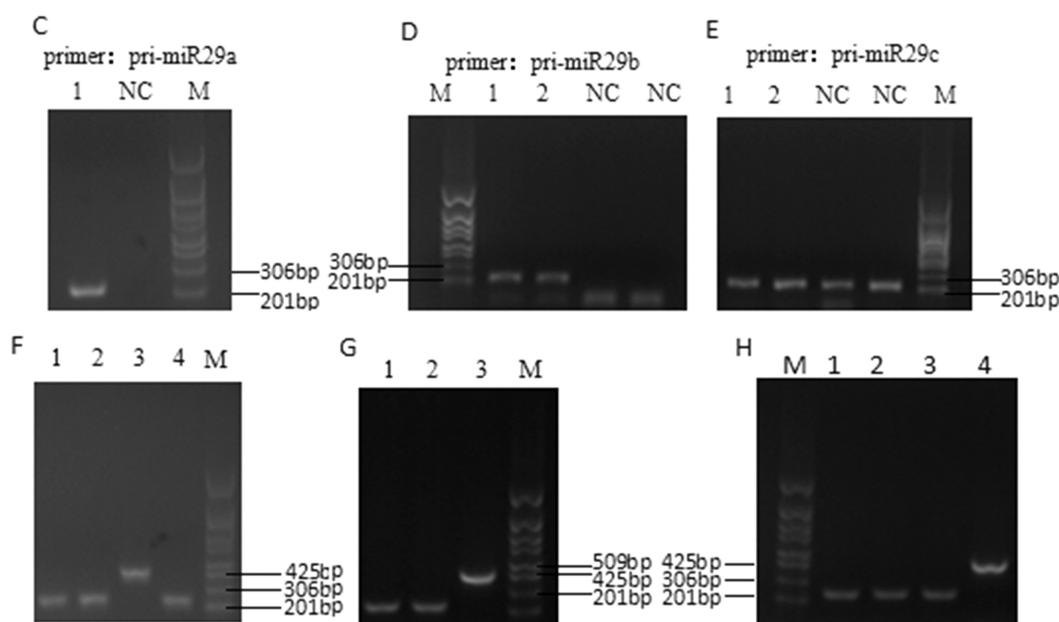


图 2 单个 pri-miRNA 表达载体的构建与验证 A、B 经过限制性内切酶 *Bam*H I 酶切后的的 PX330-U6-*Bam*H I-CBh-EGFP 载体电泳图；C、D、E 以 GT1-7 基因组为模板分别以 pri-miR29a/b/c 上下游为引物经 PCR 扩增得到 pri-miR29a、pri-miR29b、pri-miR29c 片段；F、G、H 菌落 PCR 分别验证重组质粒；

Fig. 2 Construction and Verification of Single Pri-miRNA Expression Vector

A, B After restriction enzyme *Bam*H I digested PX330-U6-*Bam*H I-CBh-EGFP vector electrophoresis;

C, D, E Prim-miR29a, pri-miR29b and pri-miR29c fragments were amplified by PCR using prim-miR29a/b/c upstream and downstream primers from GT1-7 genome as template; F, G, H colony PCR were used to verify the recombinant plasmid;

2.1.2 两个 pri-miRNAs 多重表达载体的构建 使用限制性内切酶 *EcoR I* 对单个 pri-miRNA 表达载体进行酶切(图 3A)。以构建成功的单个 pri-miRNA 表达载体为模板, 分别以 Multi-miRNA-F1、Multi-miRNA-R1 为上下游引物进行 PCR 扩增长

度为 630 bp 目的片段(图 3B)。以 42230-*EcoR I-L*、42230-*EcoR I-R* 为上下游引物对重组质粒进行菌落 PCR 验证, PCR 产物 825 bp(图 3C)。经测序验证后,与理论结果相同,载体构建成功。

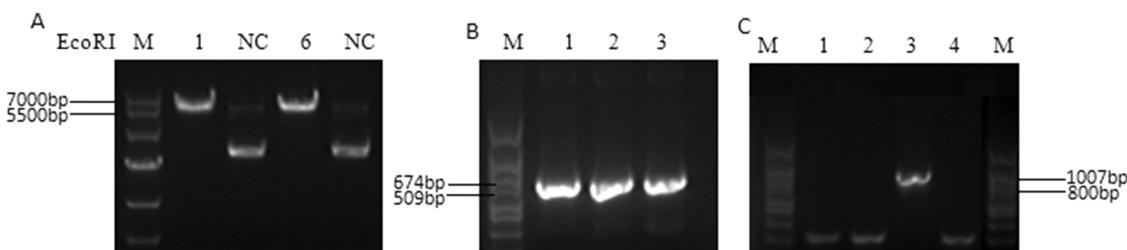


图 3 两个 pri-miRNAs 多重表达载体的构建与验证

Fig. 3 Construction and validation of two pri-miRNAs multiple expression vectors

A 经过限制性内切酶 *EcoR I* 处理的单个 pri-miRNA 载体;B 以 PX330-U6-pri-miR29b-CBh-EGFP、PX330-U6-pri-miR29c-CBh-EGFP 为模板, 分别以 Multi-miRNA-F1、Multi-miRNA-R 为上下游引物进行 PCR 扩增, 得到的 U6-pri-miR29b、U6-pri-miR29c 片段;C 菌落 PCR 验证重组质粒;

A single pri-miRNA vector treated with the restriction enzyme *EcoR I*;

B PX330-U6-pri-miR29b-CBh-EGFP, PX330-U6-pri-miR29c-CBh-EGFP as a template, Multi-miRNA-F1, Multi-miRNA-R for the upstream and downstream primers PCR amplified U6-pri-miR29b, U6-pri-miR29c fragment; C colony PCR validation of the recombinant plasmid.

2.1.3 三个 pri-miRNAs 多重表达载体的构建 使用限制性内切酶 *EcoR I* 线性化处理 PX330-U6-pri-miR29a-29b-CBh-EGFP(图 4A)。以 GT1-7 基因组为模板, 分别以 Multi-miRNA-F2、Multi-miRNA-R2 为上下游引物进行 PCR 扩增长度为 631 bp

目的片段(图 4B)。以 42230-*EcoR I-L*、42230-*EcoR I-R* 为上下游引物进行菌落 PCR 验证, 筛选出扩增片段位于 1007-1522 bp 之间的阳性克隆(图 4C)。经测序验证后,与理论结果相同,载体构建成功。

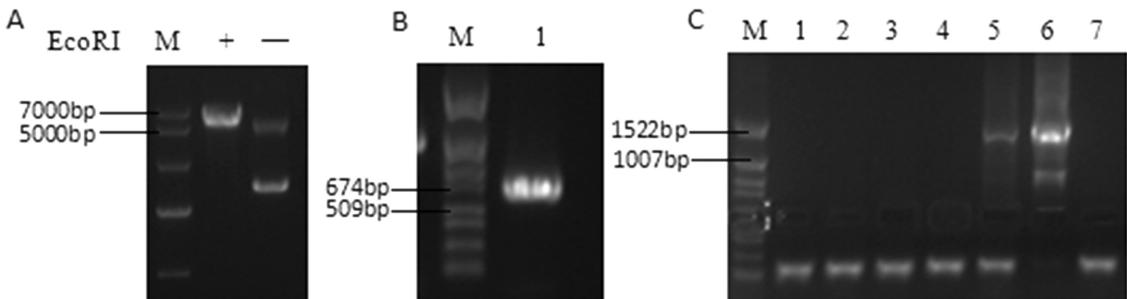


图 4 三个 pri-miRNAs 多重表达载体的构建与验证

Fig. 4 Construction and validation of three pri-miRNAs multiple expression vectors

A 经过限制性内切酶 *EcoR I* 处理的线性化的载体 PX330-U6-pri-miR29a-29b-CBh-EGFP; B PX330-U6-pri-miR29c-CBh-EGFP 为模板, Multi-miRNA-F2 与 Multi-miRNA-R 为上下游引物经 PCR 扩增的 U6-pri-miR29c 片段; C 菌落 PCR 对重组质粒进行验证;

A linearized vector PX330-U6-pri-miR29a-29b-CBh-EGFP treated with the restriction enzyme EcoRI; B PX330-U6-pri-miR29c-CBh-EGFP as a template, Multi-miRNA-F2 and Multi-miRNA-R for the upstream and downstream primers PCR amplified U6-pri-miR29c fragment; C colony PCR to verify the recombinant plasmid

2.2 pri-miRNAs 多重表达载体在细胞中的表达

2.2.1 脂质体法转染 293A 细胞 细胞铺板 24 h 后用显微镜对细胞进行观察,并利用脂质体进行转染。如图 5 所示,实验组细胞中转染 PX330-U6-pri-miR29abc-CBh-EGFP 可观察到绿色荧光。

2.2.2 Real-time PCR 检测 RNA 水平基因表达量 与野生型 293A 细胞相比,PX330-U6-pri-miR29a-CBh-EGFP 质粒转染组 miR29a 是前者表达量的 7.183 倍,过表达水平显著;PX330-U6-pri-miR29b-CBh-EGFP 质粒转染组 miR29b 是前者表达量的 4.397 倍,过表达水平显著;PX330-U6-pri-miR29c-CBh-EGFP 质粒转染组 miR29c 是前者表达量的 0.6913 倍,可

以认为没有过表达。如图 6 所示。

与野生型 293A 细胞相比,PX330-U6-pri-miR29a-29b-CBh-EGFP 质粒转染组 miR29a 是前者表达量的 7.251 倍,过表达水平显著,miR29b 是前者表达量的 9.223 倍,过表达极为显著;PX330-U6-pri-miR29a-29c-CBh-EGFP 质粒转染组 miR29a 是野生型 293A 细胞中表达量的 6.224 倍,过表达极为显著;PX330-U6-pri-miR29b-29c-CBh-EGFP 质粒转染组 miR29b 是野生型 293A 细胞表达量的 3.243 倍,过表达极为显著,miR29c 是野生型表达量的 1.412 倍,未过表达。如图 7 所示。

野生型 293A 细胞相比,PX330-U6-pri-miR29abc-CBh-EGFP 质粒转染组 miR29a 是前者表达量的 5.303 倍,过表达水

平显著,miR29b 是前者表达量的 4.374 倍,过表达显著。如图 8 所示。

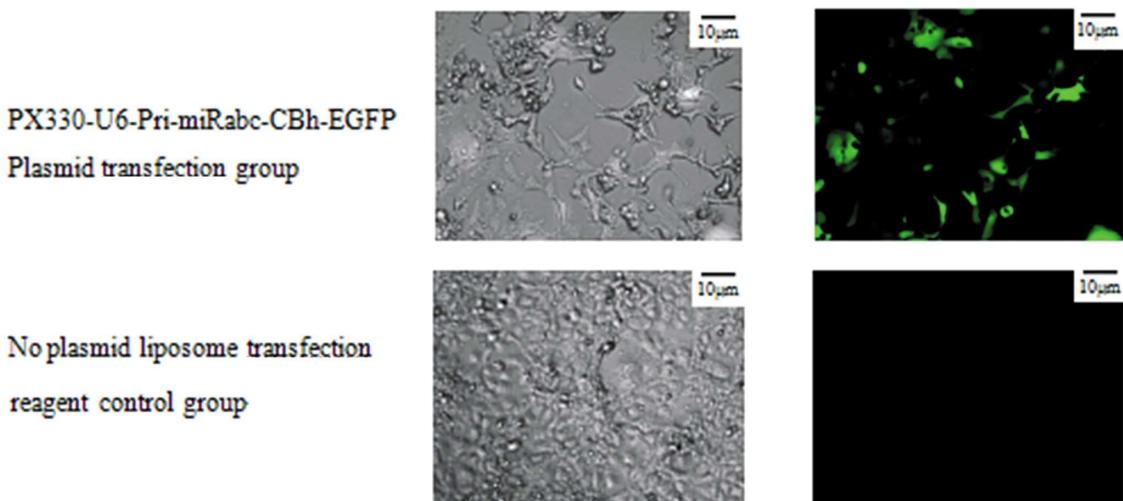


图 5 转染 48 h 后在 293A 细胞中绿色荧光表达情况

Fig. 5 The expression of green fluorescence in 293A cells after 48 h transfection

分别为用荧光显微镜观察到的转染 293A 细胞 48 h 后:PX330-U6-pri-miR29abc-CBh-EGFP 质粒转染组和无质粒脂质体转染试剂对照组中细胞的荧光状况

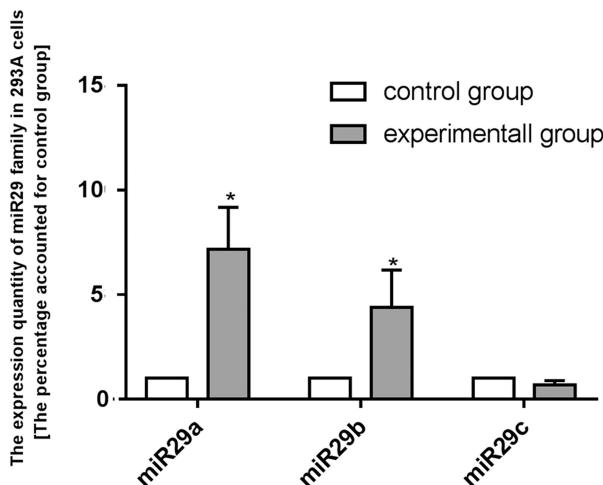


图 6 pri-miRNAs 单个表达载体对 293A 细胞 miR29a、29b、29c 表达的影响

Fig. 6 Effects of single pri-miRNAs expression vector on miR29a, 29b, 29c expression in 293A cells

2.2.3 Real-time PCR 检测靶基因 PTEN 相对表达量 已有报道显示,PTEN 基因是 miR29 家族的靶基因。如图 9 所示,单个、两个、三个 pri-miRNAs 表达载体在 293A 细胞中 PTEN 基因相对表达量。由此可见单个质粒转染组与对照组差异极为显著;两个多重质粒转染组与对照组差异显著;三个多重质粒转染组与对照组差异显著。可得出结论:所构建三种pri-miRNAs 表达载体在 293A 细胞中对 PTEN 基因的表达产生了显著影响。

3 讨论

在 miRNA 的功能研究中,过表达 miRNA 的载体大多使用 Invitrogen 公司构建的以 CMV 为启动子分别表达不同 miR-

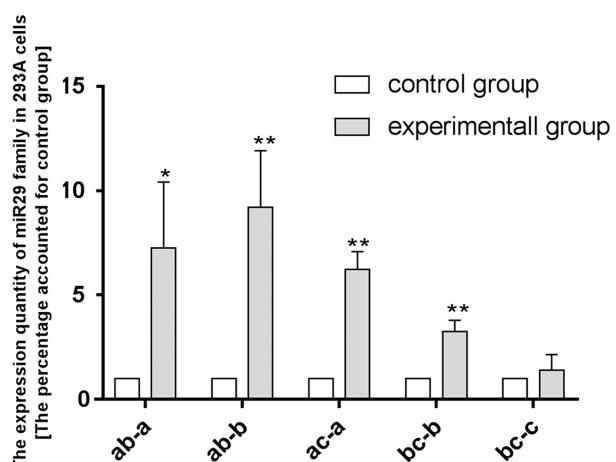


图 7 pri-miRNAs 两个多重表达载体对 293A 细胞 miR29a、29b、29c 表达的影响

Fig. 7 Effects of two pri-miRNAs multi expression vectors on miR29a, 29b, 29c expression in 293A cells

NA 的载体。2011 年, Xiangning Qiu 等人使用同一个启动子在不同酶切位点间串联了 miR34 家族的 3 个 miRNA。他们的实验数据显示,串联表达三个 miRNA 的载体和单独表达每个 miRNA 的载体,其 miRNA 过表达水平相似;但是,多重表达载体对细胞扩增的抑制能力明显高于单独表达的载体^[17,18]。这提示我们,在 miR29 家族的功能研究中构建多重表达载体对于其功能研究至关重要。为了解决随着 miRNA 数目的增多,miRNA 被加工成熟的能力会受到影响的问题,尝试使用具有自己启动子各个 miRNA 独立表达的 miRNA 表达框串联的方法,可能会改善串联个数对 miRNA 的加工成熟带来的影响。因此,尝试使用长度适宜的 U6 启动子作为可行性串联 pri-miRNA 表达框的启动子。

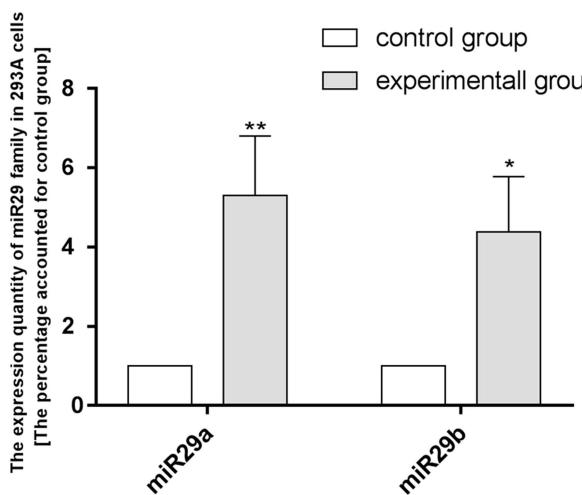


图 8 pri-miRNAs 三个多重表达载体对 293A 细胞中 miR29a、miR29b 表达的影响

Fig. 8 Effects of three pri-miRNAs multi expression vectors on miR29a, 29b, 29c expression in 293A cells

本方案使用的载体是对现有的 CRISPR/Cas9 系统共表达载体42230 进行改造而成^[19], 将载体中的 Cas9 编码序列替换为 EGFP 编码序列, 实现载体转染细胞后的可视化, 另外将 sgRNA 骨架序列替换为限制性内切酶 *Bam*H I 识别序列, 提供 pri-miRNA 的插入位点。对于 pri-miRNA 串联表达载体的构建, 首先构建单个 pri-miRNA 表达载体并在此基础上, 通过设计带有同源臂和下一个 pri-miRNA 插入位点的引物对 pri-miRNA 表达阅读框进行扩增, 同时利用一步克隆试剂盒实现多个 pri-miRNA 表达阅读框的串联。

将构建成功的载体转染进入鼠源的下丘脑 GT1-7 细胞进行表达, 转染质粒组观察到了 EGFP 的表达, 但绿色荧光强度比 293A 细胞中强度较弱。已有研究发现 GT1-7 细胞本身细胞周期长、分裂慢用脂质体法转染效率不高^[20-22]。但是通过荧光强度的识别表明构建的单个和多个 miRNA 载体在 GT1-7 细胞中是可以工作的。虽然没有在 mRNA 水平进行载体 miRNA 相对表达量的测定, 但根据 GT1-7 细胞中 EGFP 的表达水平可以认为除了 293A 细胞外, 所构建成功的可视化 pri-miRNA 簇表达载体在其它哺乳动物细胞中也是可以工作和表达的。表明本方案所提供的基本质粒构件具有很宽的应用范围, 可以实现使用同一载体在不同物种间解析 miRNA 功能。

实验研究以 miR29 家族为例, 成功构建了可视化成簇 pri-miRNAs 表达载体, 并在哺乳动物细胞中成功表达。无论是 RNA 水平上 miRNA 成熟体的过表达还是基因水平上的相对表达量的差异都表明了所探究的使用具有自己启动子各个 miRNA 独立表达的多种 pri-miRNAs 多重表达载体的构建方案是可行的, 这一方案能够实现多个外源 miRNAs 在同一细胞中的共表达与功能执行, 构建成功的 pri-miRNAs 多重表达载体可以用于 miRNA 簇或者 miRNA 家族的功能研究^[23,24]。

从基因组中直接扩增待插入的 pri-miRNA, 用于构建的单个和多重 pri-miRNA 表达载体。但是在不同 pri-miRNA 表达载体中, 由于 pre-miRNA 两侧的序列长度差异, 导致转染进入 293A 细胞后, miR29a、miR29b 成熟体的相对表达量显著增加,

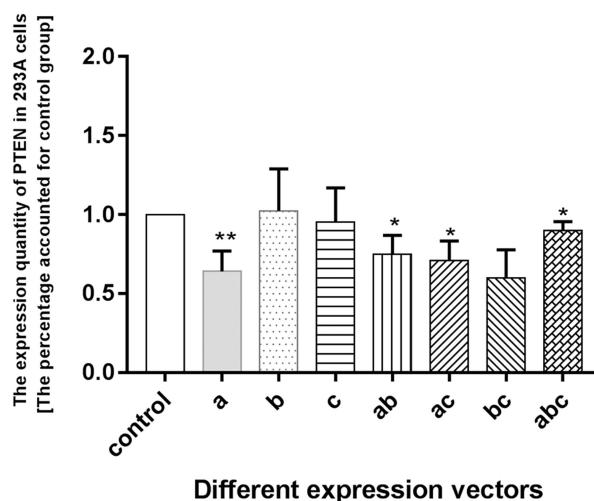


图 9 构建的各个载体对 293A 细胞中 PTEN 基因表达的影响

Fig. 9 Effect of each vector constructed on PTEN gene expression in 293A cells

但 miR29c 成熟体的相对表达量没有明显变化。参考 Sven Diederichs 等人对侧翼序列影响 miRNA 加工成熟的结果, 认为本方案所表达 pri-miRNA 序列自身形成的二级结构, 可能会影响 Dicer 酶的结合, 从而影响 miRNA 成熟体的形成^[25,26]。从 pri-miR29a、29b、29c 序列预测的结构中可以得知, 与 miR29a、29b 相比, miR29c 的初级体结构明显不对称, 侧翼序列的不对称有可能影响 miR29c 的结构的正确形成与成熟, 从而影响成熟 miR29c 的表达^[27,28]。除此之外, 检测不到成熟 miR29c 的过表达还有可能是因为所扩增初级体中两侧序列较短。有研究表明最小的 pri-miRNA 中包含前体序列和大约 20 个核苷酸碱基的侧翼序列, 尽管我们扩增的 pri-miR29c 包含长度为 30nt 核苷酸碱基的侧翼序列, 但有可能仍然没有达到能够使 pre-miR29c 正确剪切的长度, 从而影响 miR29c 的成熟^[29,30]。接下来我们会解决 miR29c 成熟体表达的问题, 利用构建成功的 pri-miRNAs 多重表达载体继续探究 miR29 家族在细胞内的信号通路及功能。

目前已分别成功构建多个表达载体。构建成功的多重 miR29 家族表达载体在 293A 细胞中成功表达 miR29a、29b, 同时将多重表达载体在细胞中的相对表达量与单个表达载体的相对表达量进行比较, 未发现有显著差异, 这说明将 miRNA 家族中各 miRNA 多重表达并未影响 miRNA 的表达水平。这些数据都表明所探讨和研究的成簇 pri-miRNA 表达载体的构建方法是可行的。

另外根据实验数据我们可以看到, 我们构建的 pri-miRNAs 串联表达载体在 293A 细胞中通过 miR29 家族的过表达, 而使其靶基因 PTEN 的相对表达量与野生型 293A 细胞相比产生了显著差异。这表明我们构建的可视化 pri-miRNAs 簇表达载体可以用来进行 miRNA 家族的功能研究, 也从基因功能角度验证了本课题探讨的此种成簇 pri-miRNAs 表达载体构建方法是可行的。其中, pri-miR29b、pri-miR29c 单个 pri-miRNA 表达载体与 pri-miR29b+29c 两个 pri-miRNAs 表达载体转染进入 293A 细胞后, 虽然检测到了 miR29b、miR29c 成熟体的过表

达,但并没有影响 PTEN 基因的相对表达量,这可能是因为缺少 miR29a 表达的原因。总而言之,本研究通过以 miR29 家族为例,成功构建了可视化成簇 pri-miRNAs 表达载体,并在哺乳动物细胞中成功表达。无论是 RNA 水平上 miRNA 成熟体的过表达还是基因水平上的相对表达量的差异都表明了本课题所探究的使用具有自己启动子各个 miRNA 独立表达的多种 pri-miRNAs 串联表达载体的构建方案是可行的,这一方案能够实现多个外源 miRNAs 在同一细胞中的共表达与功能执行,构建成功的 pri-miRNAs 串联表达载体可以用于 miRNA 簇或者 miRNA 家族的功能研究。接下来我们会解决 miR29c 成熟体表达的问题,利用构建成功的 pri-miRNAs 串联表达载体继续探究 miR29 家族在细胞内的信号通路及功能。

总之,以 miR29 家族为例,我们成功建立了多重表达 miRNA 的方案。这一成果对于未来我们探索 miRNA 家族和 miRNA 簇的拮抗或协同调控功能起到重要的推进作用。未来我们将对本方案进行改进和优化,在此基础上继续多重其他 pri-miRNA 表达框,探索载体的容纳能力。

参 考 文 献(References)

- [1] Ouellet D L, Perron M P, Gobeil L A, et al. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all [J]. *Biotechnology*, 2014, 2006(2006): 69616-69636
- [2] Park J H, Shin S Y, Shin C. Non-canonical targets destabilize microRNAs in human Argonautes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(4): 1569-1583
- [3] Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function[J]. *Genomics*, 2015, 13(1): 17-24
- [4] Fan X, Chen W, Fu Z, et al. MicroRNAs, a subpopulation of regulators, are involved in breast cancer progression through regulating breast cancer stem cells[J]. *Oncology Letters*, 2017, 14(5): 5069-5076
- [5] Friedländer M R, Lizano E, Houben A J, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(4): 57-74
- [6] Bourassa M W, Ratan R R. The interplay between microRNAs and histone deacetylases in neurological diseases [J]. *Neurochemistry International*, 2014, 77: 33-39
- [7] Jackson B L, Grabowska A, Ratan H L. MicroRNA in prostate cancer: functional importance and potential as circulating biomarkers [J]. *BMC Cancer*, 2014, 10(14): 930-941
- [8] Kundu S T, Byers L A, Peng D H, et al. The miR-200 family and the miR-183~96~182 cluster target Foxf2 to inhibit invasion and metastasis in lung cancers[J]. *Oncogene*, 2016, 35(2): 173-186
- [9] Verdura E, Herve D, Bergametti F, et al. Disruption of a miR-29 binding site leading to COL4A1 upregulation causes pontine autosomal dominant microangiopathy with leukoencephalopathy [J]. *Annals of neurology*, 2016, 80(5): 741-753
- [10] Yang T, Liang Y, Lin Q, et al. MiR-29 mediates TGF β 1-induced extracellular matrix synthesis through activation of PI3K-AKT pathway in human lung fibroblasts [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2013, 114(6): 1336-1342
- [11] Lourdusamy A, Rahman R, Smith S, et al. microRNA network analysis identifies miR-29 cluster as key regulator of LAMA2 in ependymoma [J]. *Acta Neuropathologica Communications*, 2015, 3(1): 26-34
- [12] Kamran F, Andrade A C, Nella A A, et al. Evidence That Up-Regulation of MicroRNA-29 Contributes to Postnatal Body Growth Deceleration[J]. *Molecular Endocrinology*, 2015, 29(6): 21-32
- [13] Powers J T, Tsanov K M, Pearson D S, et al. Multiple mechanisms disrupt the let-7 microRNA family in neuroblastoma[J]. *Nature*, 2016, 535(7611): 246-255
- [14] Lin X, Yang H, Zhang H, et al. A novel transcription mechanism activated by ethanol: induction of Slc7a11 gene expression via inhibition of the DNA-binding activity of transcriptional repressor octamer-binding transcription factor 1 (OCT-1) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(21): 14815-14823
- [15] Heckl D, Kowalczyk M S, Yudovich D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(9): 941-946
- [16] Zhang X, Liu Q, Luo C, et al. Identification and Characterization of Buffalo 7SK and U6 pol III Promoters and Application for Expression of Short Hairpin RNAs [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(2): 2596-2607
- [17] Li C, Ren L, Wang Y, et al. 0345 Construction and functional analysis of expression vector and miRNA interference vectors of Gsdma of Tibetan sheep [J]. *Journal of Animal Science*, 2016, 94(5): 165-177
- [18] Hacke K, Treger J A, Bogen B T, et al. Genetic Modification of Mouse Bone Marrow by Lentiviral Vector-Mediated Delivery of Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Short Hairpin RNA Confers Chemoprotection Against 6-Thioguanine Cytotoxicity [J]. *Transplantation Proceedings*, 2013, 45(5): 2040-2052
- [19] Oliver D, Yuan S, Mcswiggin H, et al. Pervasive Genotypic Mosaicism in Founder Mice Derived from Genome Editing through Pronuclear Injection[J]. *Plos One*, 2015, 10(6): 57-69
- [20] Lin X, Zhou X, Liu D, et al. MicroRNA-29 regulates high- glucose-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells through PTEN[J]. *In Vitro Cellular*, 2016, 52(4): 419-426
- [21] Ma Y N, Chen M T, Wu Z K, et al. Emodin can induce K562 cells to erythroid differentiation and improve the expression of globin genes [J]. *Cellular Biochemistry*, 2013, 382(1-2): 127-136
- [22] Abuhatzira L, Xu H, Tahhan G, et al. Multiple microRNAs within the 14q32 cluster target the mRNAs of major type 1 diabetes autoantigens IA-2, IA-2 β , and GAD65 [J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2015, 29(10): 4374-4384
- [23] Pal A S, Kasinski A L. Animal Models to Study MicroRNA Function [J]. *Advances in Cancer Research*, 2017, 135: 53-118
- [24] Sun K, Lai E C. Adult-specific functions of animal microRNAs [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(8): 535-548
- [25] Zhang X, Liu Q, Luo C, et al. Identification and Characterization of Buffalo 7SK and U6 pol III Promoters and Application for Expression of Short Hairpin RNAs [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(2): 2596-2607

- in cancer metabolism and chemotherapy [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2014, 7: 837-846
- [9] Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos JC, et al. Lipoic acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications [J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15: 458-483
- [10] Dorsam B, Fahrer J. The disulfide compound α-lipoic acid and its derivatives: a novel class of anticancer agents targeting mitochondria [J]. Cancer Lett, 2016, 37: 12-19
- [11] Xu Y, Zhang H, Lit LC, et al. The kinase LMTK3 promotes invasion in breast cancer through GRB2-mediated induction of integrin beta(1) [J]. Sci Signal, 2014, 7: ra58
- [12] Zhang Y, Xu G, Liu G, et al. miR-411-5p inhibits proliferation and metastasis of breast cancer cell via targeting GRB2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476: 607-613
- [13] Liang N, Zhong R, Hou X, et al. Ataxiatelangiectasia mutated (ATM) participates in the regulation of ionizing radiation-induced cell death via MAPK14 in lung cancer H1299 cells [J]. Cell Prolif, 2015, 48: 561-572
- [14] Wang Z, Luo Z, Zhou L, et al. DDX5 promotes proliferation and tumorigenesis of non-small-cell lung cancer cells by activating beta-catenin signaling pathway [J]. Cancer Sci, 2015, 106: 1303-1312
- [15] Li D, Li Z, Xiong J, et al. MicroRNA-212 functions as an epigenetic-silenced tumor suppressor involving in tumor metastasis and invasion of gastric cancer through down-regulating PNX expression [J]. Am J Cancer Res, 2015, 5: 2980-2997
- [16] Ketscher A, Jilg CA, Willmann D, et al. LSD1 controls metastasis of androgen-independent prostate cancer cells through PNX and LPAR6 [J]. Oncogenesis, 2014, 3: e120
- [17] Murphy CG, Dickler MN. The Role of CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer [J]. Oncologist, 2015, 20: 483-490
- [18] Gopal SK, Greening DW, Zhu HJ, et al. Transformed MDCK cells secrete elevated MMP1 that generates LAMA5 fragments promoting endothelial cell angiogenesis [J]. Sci Rep, 2016, 6: 28321
- [19] Bartolini A, Cardaci S, Lamba S, et al. BCAM and LAMA5 Mediate the Recognition between Tumor Cells and the Endothelium in the Metastatic Spreading of KRAS-Mutant Colorectal Cancer [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22: 4923-4933
- [20] Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. Oncogenic Ras isoforms signaling specificity at the membrane [J]. Cancer Res, 2018, 78: 593-602
- [21] Farhan M, Wang H, Gaur U, et al. FoxO signaling pathway as therapeutic targets in cancer [J]. Int J Biol Sci, 2017, 13: 815-827
- [22] Link W, Fernandez-Marcos PJ. FoxO transcription factors at the interface of metabolism and cancer [J]. Int J Cancer, 2017, 114: 2379-2391
- [23] Narla G, Sangodkar J, Ryder CB. The impact of phosphatases on proliferative and survival signaling in cancer [J]. Cell Mol Life Sci, 2018 [Epub ahead of print]
- [24] Ouyang ZH, Wang WJ, Yan YG, et al. The PI3K/Akt pathway: critical player in intervertebral disc degeneration [J]. Oncotarget, 2017, 34: 57870-57881
- [25] Giubellino A, Burke TR, Bottaro DP. Grb2 signaling in cell motility and cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12: 1021-1033
- [26] Timsah Z, Ahmed Z, Ivan C, et al. Grb2 depletion under non-stimulated conditions inhibits PTEN, promotes Akt-induced tumor formation and contributes to poor prognosis in ovarian cancer [J]. Oncogene, 2016, 35: 2186-2196
- [27] Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135: 1331-1339
- [28] Li LY, Li EM, Wu ZY, et al. Overexpression of GRB2 is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7: 3132-3140
- [29] Yang L, Wang X, Xu J, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis reveal α-lipoic acid regulated cell proliferation via Grb2-mediates signaling in hepatoma cancer cells [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22: 2981-2992
- [30] Belter A, Gudanis D, Rolle K, et al. Mature MiRNAs Form Secondary Structure, which Suggests Their Function beyond RISC [J]. Plos One, 2014, 9(11): 48-57
- [31] Ouyang F, Luo Q J, Zhang Y, et al. Transposable element-associated microRNA hairpins produce 21-nt sRNAs integrated into typical microRNA pathways in rice [J]. Integrative Genomics, 2013, 13(2): 207-216

(上接第3811页)

- [26] Hudcova K, Trmkova L, Kejnovska I, et al. Novel biophysical determination of miRNAs related to prostate and head and neck cancers [J]. Eur Biophys J, 2015, 44(3): 131-138
- [27] Wang Y, Zhang X, Li H, et al. The role of miRNA-29 family in cancer [J]. European Journal of Cell Biology, 2013, 92(3): 123-138
- [28] Adams L. Non-coding RNA: Pri-miRNA processing: structure is key [J]. Nature Reviews Genetics, 2017, 18(3): 145-152

- [29] Belter A, Gudanis D, Rolle K, et al. Mature MiRNAs Form Secondary Structure, which Suggests Their Function beyond RISC [J]. Plos One, 2014, 9(11): 48-57
- [30] Ouyang F, Luo Q J, Zhang Y, et al. Transposable element-associated microRNA hairpins produce 21-nt sRNAs integrated into typical microRNA pathways in rice [J]. Integrative Genomics, 2013, 13(2): 207-216