

miR-222-3p 在鹅肥肝形成中的作用及靶基因验证

温 康, 刘 龙, 代二朋, 赵敏孟, 郑 云, 耿拓宇, 龚道清*

(扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘 要: 为了检测 miR-222-3p 在填饲鹅不同组织中的表达情况, 并对其靶基因进行预测和验证, 探讨 miR-222-3p 在鹅肥肝形成中的功能。运用实时荧光定量 PCR 技术检测 miR-222-3p 在填饲鹅肝脏、胸肌和腹脂中的表达量; 采用生物信息学方法对鹅 miR-222-3p 的靶基因进行预测, 荧光定量 PCR 技术检测预测靶基因在肝脏中的表达量, 并利用双荧光素酶基因报告系统验证其靶向关系。结果显示: 相比对照组, miR-222-3p 在填饲鹅肝脏和腹脂中的表达量均显著升高; 生物信息学预测结果显示 *MARF1* 和 *B4GALNT3* 基因在 3' UTR 区域存在 miR-222-3p 的潜在结合位点, 且这两个基因在鹅肥肝中均显著下调, 而双荧光素酶基因报告系统显示只有 *MARF1* 基因与鹅 miR-222-3p 存在靶向关系。结果表明, miR-222-3p 在鹅肥肝中表达量显著上调, 且可能通过其靶基因 *MARF1* 对鹅肥肝的形成发挥调控作用。

关键词: miR-222-3p; 鹅肥肝; *MARF1*

中图分类号: S835

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2023)04-0627-05

Role of miR-222-3p in goose fatty liver formation and validation of target genes

WEN Kang, LIU Long, DAI Erpeng, ZHAO Minmeng, ZHENG Yun, GENG Tuoyu, GONG Daoqing

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: In order to detect the expression of microRNA-222-3p in different tissues of feeding geese to predict and validate the target genes of microRNA-222-3p and to explore the function of microRNA-222-3p in the formation of goose fatty liver. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of microRNA-222-3p in the liver, pectoral muscle and abdominal fat of goose, bioinformatics was used to predict the target gene of microRNA-222-3p, quantitative fluorescence PCR was used to detect the predicted target gene expression in liver, and double luciferase gene reporting system was used to verify the target gene. The results showed that the expression of microRNA-222-3p was significantly increased in both liver and abdominal fat of feeding geese compared with the control group, the expression of bioinformatics predictions showed that *MARF1* and *B4GALNT3* had potential binding sites of microRNA-222-3p in the 3'UTR region, and both genes were significantly down-regulated in the fatty liver of geese. However, the dual-luciferase gene reporting system showed that only *MARF1* was the target gene of microRNA-222-3p in geese. The results indicated that microRNA-222-3p expression was significantly up-regulated in goose fatty liver, and may play a regulatory role in the formation of goose fatty liver through its target gene *MARF1*.

Key words: miR-222-3p; goose fat liver; *MARF1*

鹅肥肝质地细嫩, 口味鲜美, 营养丰富, 其中所含的脂肪酸又大多是对人体有益的不饱和脂肪酸, 是世界公认的美食^[1]。主要用于生产鹅肥肝的朗德鹅作为迁徙鸟类的后代, 其肝脏保留了强大的脂肪沉积和体积扩张的能力。研究者发现, 朗德鹅在短期填饲后其肝脏可以增大 10 倍却不发生明显

的病变^[2], 这种现象表明鹅肥肝在形成过程中受到某些特殊因子的调控作用, 但其深入的调控机制仍需要进一步的研究。而 microRNA (miRNA) 作为一种重要的生物调控分子^[3-5], 在细胞分化、增殖、凋亡及肿瘤发生等生物学过程中均发挥着重要作用^[6-8]。本课题组前期通过对朗德鹅肝脏中小 RNA

收稿日期: 2022-08-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31972546, 32172756, 31672405, 32172717) 资助。

作者简介: 温 康, 博士研究生。E-mail: DX120190116@yzu.edu.cn

* 通信作者: 龚道清, 教授, 博士生导师。E-mail: yzong@163.com

高通量测序发现, 鹅 miR-222-3p 在填饲不同阶段的鹅肝中均显著上调, 提示其可能参与鹅肥肝形成的调控作用。在其他物种的研究中发现, miR-222-3p 可促进肿瘤细胞迁移和侵袭, 抑制细胞凋亡, 并与肾细胞癌患者的不良预后相关, 有研究发现 miR-222-3p 表达降低可影响细胞周期, 促进细胞凋亡, 进而发挥抗癌作用^[9-10], 这与填饲过程中脂肪在鹅肝细胞中大量堆积, 使肝细胞肥大并且增殖相对应。因此, 本试验采用荧光定量 PCR 技术和双荧光素酶报告基因系统对鹅肥肝中 miRNA 的表达及其靶基因的调控关系进行了研究, 以探讨 miR-222-3p 在鹅肥肝形成中可能的作用, 为进一步阐述鹅肥肝形成机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物试验和样品采集

供试动物为 70 日龄体重相近的健康朗德鹅公鹅共 12 只, 填饲组和对照组各 6 只, 均购自淮安笠城养殖场。填饲用的饲料主要为玉米, 先将玉米煮沸 3~5 min, 取出沥干, 趁热加入 1% 植物油、0.8%~1% 食盐, 充分搅拌后填饲, 对照组自由采食。试验鹅均笼养, 填饲方法及饲养管理按常规方法进行, 填饲 19 d 后采集肝脏右叶样品、胸肌和腹脂样品迅速置于液氮中, 并转移到 -80 °C 冰箱备用。

1.2 总 RNA 提取及 miRNA 和 mRNA 反转录

采用 Trizol 法 (Invitro gen 公司, 15596026) 按照说明书提取肝脏、胸肌和腹脂组织的总 RNA。使用 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 反转录试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司, MR101-01/02) 进行 miRNA 反转录, 反应条件如下: 16 °C 30 min; 42 °C 30 min; 85 °C 5 min; 5 °C 5 min。使用 PrimeScript RT Reagent Kit 试剂盒

(TaKaRa, RR037A) 进行 mRNA 反转录, 将 RNA 浓度统一稀释为 200 ng·μL⁻¹ 后建立 10 μL 反转录体系进行反转录 (模板量为 400 ng)。

1.3 鹅 miR-222-3p 及其预测靶基因的表达量检测

采用 stem-loop 实时荧光定量 PCR 的方法检测鹅 miR-222-3p 在试验鹅不同组织中的表达。以 miRNA 第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应: 2× miRcute miRNA premix 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL, 模板 1.33 μL, 加 ddH₂O 补足至 20 μL。反应条件为: 95 °C 10 min; 然后 95 °C 15 s、60 °C 60 s, 40 个循环。PCR 反应在 Applied Biosystems 7 500 荧光定量 PCR 仪中进行, 以 U6 作为内参。

采用实时荧光定量 PCR 检测预测靶基因的 mRNA 表达水平。PCR 反应体系: 2× SYBR Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL, 50× ROX Reference Dye II 0.4 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 7.8 μL。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s、60 °C 34 s, 40 个循环。PCR 扩增后进行熔解曲线分析, GAPDH 作为内参^[11]。相关引物信息见表 1。

1.4 鹅 miR-222-3p 靶基因预测

由于鹅基因组尚未完全公布, 因此参考与其同源性较高的鸡的基因 3'UTR 序列, 使用 miRDB、TargetScan 和 miRcosm 这 3 种在线软件对 miR-222-3p 进行靶基因的预测, 取两两交集作为进一步分析的靶基因集。此外, 参考本实验室前期鹅转录组测序结果, 并参考已有文献进行靶基因预测。3 个靶基因预测软件在线网址分别为:

<http://mirdb.org/miRDB/>

<http://www.targetsca.org/>

<http://www.ebiac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/tar gets/v5 />^[12]。

表 1 引物信息

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'→3')	产物长度
MARF1	F: ACCTGCTTGTTGTCTGCCTGTA R: CCTCCTTGGTCACGGATTGC	300
B4GALNT3	F: GGGAGGAGAAGACTGGGA R: TTTGTGCGCTTGGCTGTG	321
GAPDH	F: GCCATCAATGATCCCTTCAT R: CTGGGGTTCACGCTCCTG	155
MARF1-Spe I	F: cgactagt CCTTAAGCCTCATTGGTGGT	313
MARF1-Mlu I	R: cgacgcgt TCACTTCAGGTCAGCACGTT	
B4GALNT3-Spe I	F: cgactagt CAGGCTGGGCTGGAAGT	330
B4GALNT3-Mlu I	R: cgacgcgt AGACGGTGGACGGTGCT	
222-3P-Spe I	F: cgactagt GAACTTGCTCTGCACCTA	326
222-3P-Mlu I	R: cgacgcgt ATGTTGGACTAACGCTGT	

1.5 双荧光素酶报告系统验证靶基因

根据预测靶基因 3'UTR 与 miR-222-3p 结合的靶位点设计引物, 在其两端各保留约 100 bp, 从鹅基因组中 PCR 扩增获得约 300 bp 片段, 通过酶切位点 Spe I 和 Mlu I 将其连入靶基因报告载体 pMIR-REPORT (Ambion, AM57795), 构建靶基因报告载体。根据鹅 miR-222-3p 的序列从公司 (上海吉玛生物科技有限公司) 定制其模拟物 (mimics), 使用双荧光素酶报告系统在 CHO 细胞中验证靶基因。具体操作参照文献[13]。引物信息见表 1。

1.6 统计分析

实时荧光定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行分析。图中数据以“平均值+标准差”表示, 两组间比较采用 SPSS 的 t 检验进行、ANOVA 方差分析或相关性分析。

2 结果与分析

2.1 鹅肥肝模型的建立

70 日龄朗德鹅经过 19 d 的填饲, 对照组平均体重从 3.71 kg 增加到 4.42 kg, 填饲组的平均体重从 3.72 kg 增加到 6.87 kg。相应地, 填饲组的平均肝重为 830.2 g, 对照组的平均肝重为 103.0 g。相对于对照组, 填饲组的肝脏重量显著增加, 表明填饲成功诱导了鹅肥肝的形成。

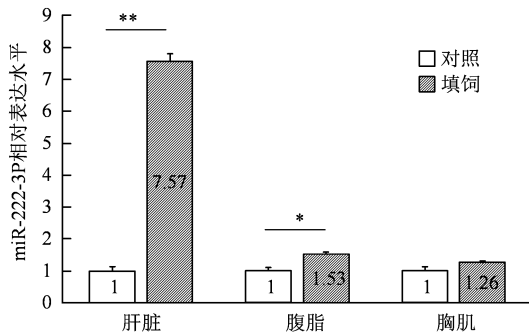


图 1 miR-222-3p 在填饲 19 d 朗德鹅肝脏、胸肌和腹脂中的表达情况

Figure 1 Expression of microRNA-222-3p in liver, pectoral muscle and abdominal fat of 19-day-old Landis geese

2.2 miR-222-3p 在填饲朗德鹅不同组织中的表达情况

本试验采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-222-3p 在朗德鹅填饲 19 d 后肝脏、胸肌和腹脂中的表达情况。由图 1 可知, miR-222-3p 在所检测的填饲鹅各组织中的表达量均高于对照组。其中, miR-222-3p 在填饲朗德鹅的肝脏中极显著上调 ($P<0.01$), 在填饲朗德鹅的腹脂中显著上调

($P<0.05$), 而在胸肌中 miR-222-3p 相对于对照组表达量增加但不显著 ($P>0.05$)。

2.3 miR-222-3p 靶基因的预测

本课题组在前期在鹅肝脏的小 RNA 测序中发现了序列为 5'-AGCUACAUCUGGCUACUGG G U CUCU-3' 的 miRNA, 注释之后发现其与 cgr-miR-222-3p 完全一致, 故将其命名为鹅 miR-222-3p。鹅 miR-222-3p 与 miRBase 数据库中鸡 miR-222a (gga-miR-222a) 在前 24 个碱基完全一致 (种子序列相同)。使用 gga-miR-222a 在鸡的数据库中进行靶基因预测后, 结合前期转录组测序数据筛选出在填饲鹅肝脏中显著下调的基因 (miR-222-3p 为上调), 并在鹅的对应基因的 3'UTR 序列中确认结合位点。最后共筛选出 *MARF1* 和 *B4GALNT3* 两个预测靶基因。其中 *MARF1* 含有两个结合位点, *B4GALNT3* 含有一个结合位点 (见图 2)。



图 2 miR-222-3p 与预测靶基因 3'UTR 区域结合位点
Figure 2 microRNA-222-3p binding sites with 3'UTR regions of predicted target genes

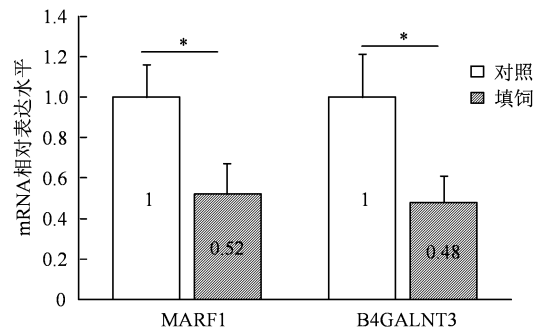


图 3 MARF1 和 B4GALNT3 在填饲朗德鹅肝脏中 mRNA 的表达

Figure 3 mRNA Expression of MARF1 and B4GALNT3 in Liver of Landis geese

2.4 miR-222-3p 预测靶基因在填饲鹅肝脏中表达

通常情况下, miRNA 与其靶基因具有相反的表达趋势, 因此, 本研究通过荧光定量 PCR 检测了候选靶基因 *MARF1* 和 *B4GALNT3* 在对照组肝脏和填饲 19 d 朗德鹅肝脏中的表达情况。由图 3 可见, *MARF1* 和 *B4GALNT3* 基因在填饲组中的表达量均显著低于对照组 ($P<0.05$), 表明这 2 个基因在鹅肥肝形成过程中受到了调控。

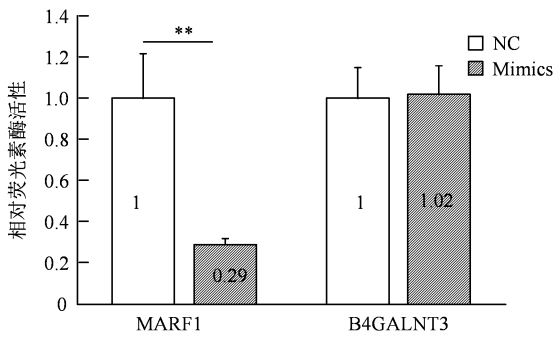


图4 miR-222-3p 候选靶基因相对荧光素酶活性

Figure 4 Relative luciferase activity of candidate target genes of microRNA-222-3p

2.5 双荧光报告系统验证 miR-222-3p 靶基因

本研究采用双荧光素酶基因检测技术进一步对 miR-222-3p 的靶基因进行验证。由于 CHO 细胞本身 miR-222-3p 表达量极低,且易于培养,因此是研究 miR-222-3p 靶基因的理想细胞系^[14]。本试验设置 miR-222-3p 过表达组(miR-222-3p mimics)和对照组(miR-222-3p mimics NC)分别与连入 MARF1 和 B4GALNT3 基因 3'UTR 序列的靶基因报告载体 pMIR-REPORT 共转染 CHO 细胞,并检测荧光信号,结果如图 4。由图 4 可见,转染 MARF1 基因报告载体的 miR-222-3p 过表达组荧光素酶活性极显著下调 ($P < 0.01$),而转染 B4GALNT3 基因报告载体的 miR-222-3p 过表达组则与对照组无显著差异,结果说明 MARF1 基因与鹅 miR-222-3p 存在靶向调控关系。

3 讨论和结论

鹅肝,具有大量沉积脂肪而不发生明显病理症状的特点,是研究动物脂肪肝保护机制的一种独特的动物模型^[15-16]。在本研究中,通过小 RNA 测序分析其靶基因的调控研究,对鹅脂肪肝形成机理进行了进一步研究。miRNA 在免疫系统的调控中发挥了重要作用^[17-18]。这是因为,当肝细胞中长期沉积过量脂肪的时候,肝细胞会受到脂毒性的影响,而脂毒性与氧化应激、内质网应激、炎症反应、细胞死亡等一系列生理过程均息息相关^[19-20]。

前期通过对填饲朗德鹅肝脏小 RNA 测序中发现的鹅脂肪肝差异表达 miR-222-3p 进行了组织表达验证、靶基因预测、验证和分析。结果证实鹅 miR-222-3p 在填饲鹅脂肪代谢相关组织中显著上调,表明其与鹅脂肪肝形成的调控相关,且可能通过其靶基因 MARF1 发挥作用。前人研究发现,miRNA-222-3P 在人肝癌组织中的表达量显著高于

正常组织,与肿瘤的增殖、侵袭和转移紧密相关^[21]。

MARF1 基因是一种卵母细胞 RNA 结合蛋白相关的基因,与维持 mRNA 稳态和基因稳定性有关^[22],在发育中的中维持基因稳定性同时通过调控 B 细胞和 T 细胞的生成控制炎症反应的发生^[23]。在试验中发现,在肥肝中的 MARF1 的 mRNA 的表达量显著降低,其他动物发生脂肪肝的过程中,往往会伴随着炎症的发生,而朗德鹅经过填饲肝脏部位不仅不会发生炎症反应而且在停止填饲肝脏恢复到正常状态后不会产生病理变化,本试验也验证了上述研究, MARF1 基因在调控炎症发生的过程中起到重要的作用。也在一定程度上表明 MARF1 基因是鹅肥肝在形成过程中抑制炎症反应的一个重要的候选基因。

本研究结果显示,miR-222-3p 的表达量在填饲组显著提高,而 MARF1 填饲组的表达量显著减少,提示 miRNA-222-3P 可能对鹅肥肝形成过程中肝脏等组织的细胞增殖发挥重要作用(填饲鹅体重为对照组的两倍,肝重可达对照组的 8 倍)。此外,本研究证实了 MARF1 为 miRNA-222-3P 的靶基因,且该基因在鹅肥肝中的表达量受到显著抑制,表明 MARF1 可能受 miRNA-222-3P 的调控从而参与鹅肥肝的形成。

结果表明,miR-222-3p 在鹅肥肝形成中发挥重要作用,且通过其靶基因 MARF1 对鹅肥肝的形成发挥调控作用。

参考文献:

- [1] 柳序,刘耀文,匡佑华,等.鹅脂肪肝的形成及主要影响因素的研究进展[J].经济动物学报,2019,23(4):234-239.
- [2] 郑云,刘龙,孙晓先,等.朗德鹅填肥期 SCD1 基因的表达及其相关 miRNA 的筛选[J].中国家禽,2017,39(2):16-21.
- [3] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] 张琦悦,何春,孙浩玮,等.动物脂肪组织相关 miRNAs 的研究进展[J].中国畜牧杂志,2020,56(7):46-51.
- [5] 张亭亭,刘长洲,赵娟,等.植物 microRNA 及其在植物生长发育中作用的研究进展[J].安徽农业科学,2013,41(13):5667-5669,5673.
- [6] 郑永霞,焦炳华. miRNA 的生物形成及调控基因表达机制[J].生命的化学,2010,30(6):821-826.
- [7] 黄瑞贤,段晓燕,刘晓琳,等.miRNA-181a 在非酒精性脂肪性肝病中的作用及其机制[J].中华肝脏病杂志,2021,29(12):1177-1181.
- [8] 郭梦玲,李燕伶,王思毓,等.circRNA-miRNA 轴在肿瘤中的最新研究进展[J].国际遗传学杂志,2021,44(6):409-416.

- [9] LIN X, XING Y, ZHANG Y H, et al. Glucose participates in the formation of goose fatty liver by regulating the expression of miRNA-33/CROT[J]. *Animal Sci J*, 2021, 92(1): e13674.
- [10] LEWIS B P, SHIH I H, JONES-RHOADES M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. *Cell*, 2003, 115(7): 787-798.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- [13] WANG X G, SHAO F, WANG H J, et al. MicroRNA-126 expression is decreased in cultured primary chicken hepatocytes and targets the sprouty-related EVH1 domain containing 1 mRNA[J]. *Poult Sci*, 2013, 92(7): 1888-1896.
- [14] BARRON N, KUMAR N, SANCHEZ N, et al. MicroRNAs as potential engineering targets for improvement of CHO cell production phenotypes[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(1): 11-21.
- [15] ZHAO M M, LIU T J, WANG Q, et al. Fatty acids modulate the expression of pyruvate kinase and arachidonate-lipoxygenase through PPAR γ /CYP2C45 pathway: a link to goose fatty liver[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(10): 4346-4358.
- [16] 王银银, 李鹏. 非酒精性脂肪性肝病发病机制的研究进展[J]. *贵州医药*, 2022, 46(2): 182-184.
- [17] 李娜, 肖斌, 邹全明, 等. MiRNA 在细胞因子表达调控中的作用[J]. *生命的化学*, 2010, 30(4): 514-517.
- [18] 黄正洋, 黄华云, 穆春宇, 等. MiR-18a-5p 在鸡不同生长时期的表达及其生物信息学分析与靶基因预测[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(12): 4361-4371.
- [19] LI Y X, HAN T T, LIU Y, et al. Insulin resistance caused by lipotoxicity is related to oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in LPL gene knockout heterozygous mice[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 239(1): 276-282.
- [20] 刘晓琳, 范建高. 非酒精性脂肪性肝病中脂毒性肝细胞来源的外泌体 miR-192-5p 通过 Rictor/Akt/FoxO1 信号通路激活巨噬细胞[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(10): 2218.
- [21] 任超, 刘蕊. 尿液中 miRNA-24-3p 联合 miRNA-222-3p 检测在前列腺癌中的诊断及临床意义[J]. *天津医科大学学报*, 2022, 28(2): 181-185.
- [22] BLOCH D B, LI P C, BLOCH E G, et al. LMKB/MARF1 localizes to mRNA processing bodies, interacts with Ge-1, and regulates IFI44L gene expression[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94784.
- [23] YAO Q Q, CAO G Y, LI M Z, et al. Ribonuclease activity of MARF1 controls oocyte RNA homeostasis and genome integrity in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(44): 11250-11255.

安徽农业大学林学学科团队揭示森林叶片氮磷养分回流的全球分布特征

近日,《总体环境科学》在线发表了我校林学与园林学院的最新研究成果《森林生态系统中叶片氮和磷再吸收的全球分布》(Global distributions of foliar nitrogen and phosphorus resorption in forest ecosystems)。该研究分析了影响叶片氮养分回流率(NRE)和磷养分回流率(PRE)的生物和非生物因素,预测了全球森林NRE和PRE的空间分布特征。研究结果表明,NRE和PRE在气候带、植物功能群和叶片氮磷比之间有相反的趋势,全球NRE的范围为21%-55%(平均值为38%),PRE的范围为16%-55%(平均值为36%)。NRE和PRE的空间变化分别与N-限制和P-限制相耦合。

养分回流是指叶片凋落之前,养分从衰老叶片转移到贮藏器官或生长组织的过程。养分回流是养分保存的一个重要机制,对维持生态系统养分稳定、促进养分循环以及提升资源利用效率发挥重要作用。因此,研究养分回流的驱动因子和空间分布特征将有助于了解树木对养分的留存、利用能力和对气候变化的响应。

林学与园林学院黄兴召副教授为第一作者,中国科学院地理科学与资源研究所汪金松副研究员为通讯作者,林学与园林学院徐小牛教授、万芳芳老师和陆舟颖硕士生以及中国科学院地理科学与资源研究所廖家强硕士生参与了此项工作。安徽农业大学为第一作者单位。研究获得了安徽省重点研发计划和国家重点研发计划项目的资助。