

# osa-miR168a-5p 靶向调节人源 ADD1 及 E2F2 基因表达的研究

陈真真, 蔡 军

(中国医学科学院阜外医院/国家心血管病中心/心血管疾病国家重点实验室  
/高血压中心, 北京 100037)

**摘要:**目的 探究植物 osa-miR168a-5p 靶向调节人源相关基因表达的影响。方法 采用 TargetScan 预测 osa-miR168a-5p 的靶基因,并筛选相关靶基因进行后续验证。构建靶基因 mRNA 3'-UTR 荧光素报告基因及相应的突变体,采用双荧光素酶报告基因活性分析系统验证 osa-miR168a-5p 与靶基因的关系。结果 利用 Targetscan 预测的 osa-miR168a-5p 靶基因结果显示,ADD1 与 E2F2mRNA 3'-UTR 区域均存在 osa-miR168a-5p 结合位点。双荧光素酶报告基因实验结果显示,使用 osa-miR168a-5p mimics 内源性增加 osa-miR168a-5p 能够抑制 ADD1 及 E2F2 报告基因的表达,将 ADD1 及 E2F2 mRNA 3'-UTR 区与 osa-miR-168a-5p 的结合位点突变后,内源性 osa-miR-168a-5p 增加所引起的报告基因表达下调的作用消失。结论 osa-miR168a-5p 能够直接调节人源 ADD1 及 E2F2 基因表达,因此食物中的 osa-miR168a 进入人体很可能直接靶向人源 ADD1 及 E2F2 基因发挥相应的生物学效应。

**关键词:**osa-miR168a;ADD1;E2F2;靶基因

中图分类号:R3

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2020.11.020

文章编号:1006-1959(2020)11-0064-03

## Study on osa-miR168a-5p Targeted Regulation of Human ADD1 and E2F2 Gene Expression

CHEN Zhen-zhen, CAI Jun

(Fuwai Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences/National Cardiovascular Disease Center/  
State Key Laboratory of Cardiovascular Diseases/Hypertension Center, Beijing 100037, China)

**Abstract:**Objective To explore the effect of plant osa-miR168a-5p on targeted regulation of human-related gene expression. Methods TargetScan was used to predict osa-miR168a-5p target genes, and related target genes were screened for subsequent verification. The target gene mRNA 3'-UTR luciferin reporter gene and corresponding mutants were constructed, and the dual luciferase reporter gene activity analysis system was used to verify the relationship between osa-miR168a-5p and the target gene. Results The results of osa-miR168a-5p target genes predicted by Targetscan showed that both ADD1 and E2F2mRNA 3'-UTR regions had osa-miR168a-5p binding sites. The results of the dual luciferase reporter gene experiment showed that the endogenous increase of osa-miR168a-5p mimics using osa-miR168a-5p can inhibit the expression of ADD1 and E2F2 reporter genes. After mutating the binding site of ADD1 and E2F2 mRNA 3'-UTR region to osa-miR-168a-5p, the effect of the endogenous increase of osa-miR-168a-5p on reporter gene expression disappeared. Conclusion osa-miR168a-5p can directly regulate the expression of human ADD1 and E2F2 genes. Therefore, the entry of osa-miR168a in food into the human body is likely to directly target the human ADD1 and E2F2 genes to exert the corresponding biological effects.

**Key words:**osa-miR168a;ADD1;E2F2;Target gene

MicroRNA(miRNA)是一类长度约为 22~24 个核苷酸的非编码 RNA,能够在转录后层面上调控基因表达。miRNA 基因在细胞核内转录成原始 miRNA,随后在 RNase III-DROSHA 的作用下形成具有发卡结构的前体 miRNA,再在 DICER 酶的作用下切割为成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 的种子区域(一般为第 2~8 位核苷酸序列)和靶基因的 3'UTR 区域结合,进而抑制靶基因转录<sup>[1]</sup>。miRNA 作为重要的转录后调节因子,广泛参与心血管疾病、代谢性疾病、癌症等疾病的发生发展<sup>[2-4]</sup>。microRNA 也可以跨物种进行调节,研究发现<sup>[5]</sup>,人和动物血清中始终存在外源性的植物 miRNA,其中植物 miR168a 和 miR156a 表达水平最高,给予小鼠富含 osa-

miR168a 的大米喂养后,血清及肝脏中的 MIR168a 水平显著升高;进一步研究发现 miR168a 可以直接靶向结合低密度脂蛋白受体衔接蛋白 1(LDLRAP1)外显子,降低 LDLRAP1 的蛋白表达。一条 microRNA 可以调节多个基因的转录,一个基因也可以被多条 microRNA 调控。因此,除 LDLRAP1 以外,是否植物 MIR168a 还可以靶向其他哺乳动物的相关基因尚未可知。基于此,本研究利用生物信息学软件预测 osa-miR168a-5p 的靶基因,并用双荧光素报告基因系统分析确认,现报道如下。

### 1 材料和方法

**1.1 材料与试剂** 实验细胞 HEK-293 细胞购自北京裕恒丰公司;DMEM 培养基(GIBCO)、胎牛血清(GIBCO)、青霉素链霉素混合液(南京凯基)、PBS(Hyclone)、胰蛋白酶(GIBCO)、opti-MEM(Invitrogen)、osa-miR168a mimics(广州锐博)、Lipofectamine 2000(Invitrogen)、pmirGLO 载体(优宝生物)、双荧光素报告基因检测试剂盒(Promega)。

基金项目:国家自然科学基金(编号:81800367)

作者简介:陈真真(1988.1-),女,山东泰安人,博士,助理研究员,主要从事糖尿病及高血压相关研究

通讯作者:蔡军(1975.10-),男,湖北荆州人,博士,主任医师,教授,主要从事高血压相关研究

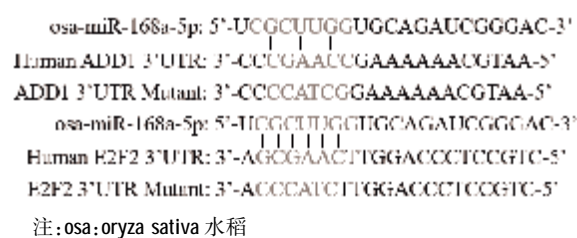
**1.2 HEK-293 细胞培养及转染** 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 恒温培养箱中孵育。转染前 1 d, 胰酶消化后铺 6 孔板, 使其在转染日密度为 70%。转染前首先弃掉完全培养基, 加入无血清培养基, 每孔细胞使用 100  $\mu$ l opti-MEM 稀释 2  $\mu$ g 报告基因质粒以及 100nm olosa-miR168amimics, 混匀; 100  $\mu$ l opti-MEM 稀释 2 $\mu$ l Lipofectamine2000 转染试剂, 混匀。将上述两种稀释液混合后室温放置, 20 min 后将其加入 6 孔板中, 轻轻摇动混匀。转染后的细胞在 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 恒温培养箱中孵育 6 h 后更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。转染 48 h 后, 检测报告基因活性。

**1.3 双荧光素酶报告基因活性检测** 首先裂解细胞, 配制相应的裂解液, 将 5X 的 PLB 溶液用蒸馏水稀释成 1XPLB 的工作液。6 孔板中每孔加入 500  $\mu$ l 1X PLB 溶液后置于水平摇床, 室温孵育 15 min 以便充分裂解。裂解后 12000 rpm 离心 5 min, 取上清备用。将荧光素酶检测底物溶解于荧光素酶检测缓冲液配置成荧光素酶检测工作液, 置于室温。将化学发光仪设置成间隔时间 2 s, 测定时间 10 s。取 20  $\mu$ l 细胞裂解液上清, 并加入 100  $\mu$ l 荧光素酶检测工作液, 轻柔混匀后用化学发光仪读数。制备停止反应液体, 将试剂盒中的 Stop&Glo 底物溶解于 Stop&Glo 缓冲液, 加入 100  $\mu$ l 停止反应液后混匀并读数。

**1.4 统计学方法** 采用 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 行 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

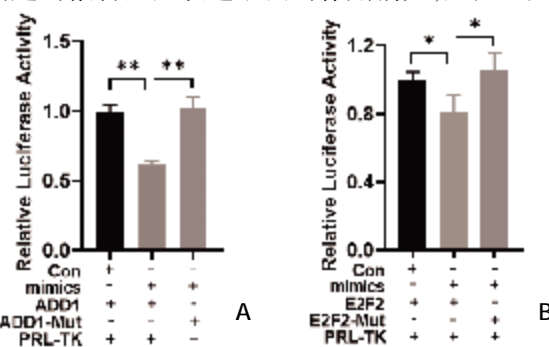
**2.1 预测 osa-miR168a-5p 靶基因及载体构建** 利用 TargetScan 预测 osa-miR168a-5p 的靶基因, 结果发现 ADD1 与 E2F2mRNA3'-UTR 区域均存在 osa-miR168a-5p 结合位点。osa-miR168a-5p 种子区域中有连续 6 个核苷酸序列与人源 ADD1mRNA 3'-UTR 区域形成互补序列, 另有连续 6 个核苷酸序列与人源 E2F2 mRNA 3'-UTR 区域形成互补序列。将 ADD1, E2F2mRNA 的 3'-UTR 与 osa-miR168a-5p 的种子序列的结合度进行预测, 并分别以人源 ADD1 mRNA 和 E2F2 mRNA 为模板, 扩增含有 osa-miR168a-5p 结合位点的 ADD1 3'-UTR 序列及含有 osa-miR168a-5p 结合位点的 E2F2 3'-UTR 序列, 随后将 PCR 产物通过酶切位点 Nhe1 和 Xba1 构建到 pmirGLO 载体上, 得到 pmirGLO-ADD1, pmirGLO-E2F2。对 ADD1 3'-UTR 及 E2F2 3'-UTR 的 osa-miR168a-5p 结合位点进行突变后构建 pmirGLO-ADD1 突变质粒和 pmirGLO-E2F2 突变质粒, 突变序列见图 1。



注: osa: oryza sativa 水稻

图 1 核苷酸序列

**2.2 双荧光素报告基因系统分析确证靶基因** 使用转染试剂将 osa-miR-168a-5pmimics 与 ADD13'UTR luciferase 质粒或 E2F23'UTR luciferase 质粒以及 PRL-TK 荧光较准质粒共转染 HEK-293 细胞后, 结果显示与对照组相比, 内源性 osa-miR168a-5p 增加能够降低 ADD1 及 E2F2 报告基因的表达, 但当 ADD1 及 E2F2mRNA3'UTR 区 osa-miR-168a-5p 的结合位点突变以后, 内源性 osa-miR-168a-5p 增加所引起的报告基因表达下调的作用消失, 见图 2。



注: A: ADD13'-UTR 及其突变体的双荧光素报告基因检测结果; B: E2F23'-UTR 及其突变体的双荧光素报告基因检测结果。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 2 双荧光素报告基因系统检测结果

## 3 讨论

研究发现<sup>[9]</sup>, 哺乳动物血清及器官中存在植物 miRNA, 其可通过小鼠胃肠道进入机体内, 提示不同种属的 miRNA 可以同时存在于机体内共存。此外, miRNA 可以跨物种进行调节, LaMonte G 等<sup>[10]</sup>研究发现, 疟原虫自身无法编码合成 miRNA, 但在镰型红细胞中, 人 miR-451、miR-223 及 miR-19b 均在疟原虫中富集, 提示 miRNA 可由宿主向寄生虫迁移。使用 miRNA-451、miR223 和 let-7i 转染红细胞后, 显著抑制疟原虫的生长, 从而抵抗疟疾的发生。Shahid S 等<sup>[11]</sup>发现寄生植物菟丝子也可以通过植物 miRNA 影响宿主 mRNA 的表达。Zhou Z 等<sup>[12]</sup>研究发现, 在常用的抗病毒药物金银花煎煮后的汁液中存在大量植物 microRNA2911, 给予小鼠金银花煎煮后的汁液喂养后, 小鼠外周血和肺组织中的植物 mi-croRNA2911 含量显著上调, 进一步研究发现 mi-croRNA2911 可直接靶向甲型流感病毒 H1N1, H5N1 及 H7N9 发挥抗病毒作用。以上研究均证实 miRNA 可以跨越物种发挥转录后调节作用。miR168a 是植物

中常见的 microRNA, 番茄中的 sly-miR168a 能够调节番茄的生长发育和果实成熟; 拟南芥中的 miR168a 能够介导对干旱、盐碱等生物胁迫的响应<sup>[9]</sup>; 水稻中的 miR168a (osa-miR168a) 可以通过调节其靶基因 AGO1 的表达增加水稻种子的活力<sup>[10]</sup>。值得注意的是, miR168a 是第一个被证实可以跨物种调节的植物 miRNA。在哺乳动物体内, osa-miR168a 可以靶向调节小鼠肝脏中的 LDLRAP1, 介导 LDLRAP1 蛋白表达沉默。目前关于 osa-miR168a 靶向调节其他哺乳动物基因表达的研究较少, 因此对该领域的进行研究具有重要意义。

ADD1 是内收蛋白基因  $\alpha$  亚基编码的蛋白, 参与细胞膜钠离子转运和信号转导<sup>[11]</sup>。研究表明<sup>[12]</sup>, ADD1 基因 Gly460Trp 位点的多态性与原发性高血压密切相关。ADD1 基因启动子区 DNA 甲基化降低增加原发性高血压的患病风险<sup>[13]</sup>。此外, ADD1 还参与其他心血管疾病(动脉粥样硬化和心肌梗死)、肾脏疾病及肿瘤的发生发展过程<sup>[14]</sup>。E2F2 是 E2F 转录因子家族中的成员之一, 主要参与细胞增殖的调控过程<sup>[15]</sup>。除此之外, E2F 还参与细胞分化、凋亡、自噬等过程<sup>[16]</sup>。值得注意的是, E2F 不仅参与肿瘤的发生发展过程, 在血压调节中也发挥重要作用, Zhou 等<sup>[16]</sup>研究表明, E2F2 全身敲除小鼠呈现高血压; LiH 等<sup>[17]</sup>研究表明, 在氧化应激状态下, 靶向 E2F 增加二氢叶酸还原酶的含量以及恢复 eNOS 的功能能够成功降低血压。本研究使用生物信息学手段预测 osa-miR168a-5p 的靶基因, 挑选 ADD1 及 E2F2 进行下游的验证实验, 双荧光素酶报告基因实验分析显示, 使用 osa-miR168a-5p mimics 内源性增加 osa-miR168a-5p 能够显著抑制 ADD1 及 E2F2 报告基因的表达。然而将 ADD1 及 E2F2 mRNA 3'UTR 区与 osa-miR-168a-5p 的结合位点突变后, 内源性 osa-miR-168a-5p 增加所引起的报告基因表达下调的作用完全丧失。表明人源 ADD1 及 E2F2 基因是 osa-miR168a-5p 的直接靶基因, 证实了 osa-miR168a 可以调节除 LDLRAP1 之外的新的人源靶基因 ADD1 和 E2F2 的表达, 丰富了 osa-miR168a 可以跨界调节的证据。

综上所述, osa-miR168a-5p 能够直接调节人源 ADD1 及 E2F2 基因表达, 食物中的 osa-miR168a 进入人体很可能直接靶向人源 ADD1 及 E2F2 发挥相应的生物学效应。

#### 参考文献:

- [1] 林宇鑫. MicroRNA 生物标志物识别的模型构建[D]. 苏州大学, 2016.
- [2] Thum T, Mayr M. Review focus on the role of microRNA in cardiovascular biology and disease[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(4):

543-544.

- [3] Sethupathy P. The Promise and Challenge of Therapeutic MicroRNA Silencing in Diabetes and Metabolic Diseases[J]. Curr Diab Rep, 2016, 16(6):52.
- [4] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(6):852.
- [5] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA[J]. Cell Res, 2012, 22(1):107-126.
- [6] LaMonte G, Philip N, Reardon J, et al. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into Plasmodium falciparum inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance[J]. Cell Host Microbe, 2012, 12(2):187-199.
- [7] Shahid S, Kim G, Johnson NR, et al. MicroRNAs from the parasitic plant Cuscuta campestris target host messenger RNAs[J]. Nature, 2018, 553(7686):82-85.
- [8] Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses[J]. Cell Res, 2015, 25(1):39-49.
- [9] Li W, Cui X, Meng Z, et al. Transcriptional regulation of Arabidopsis MIR168a and argonaute1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses[J]. Plant Physiol, 2012, 58(3):1279-1292.
- [10] Zhou Y, Zhou S, Wang L, et al. miR164c and miR168a regulate seed vigor in rice[J]. J Integr Plant Biol, 2020, 62(4):470-486.
- [11] Kiang KM, Leung GK. A Review on Adducin from Functional to Pathological Mechanisms: Future Direction in Cancer[J]. Biomed Res Int, 2018(2018):3465929.
- [12] Zhang JR, Hu WN, Li CY. A Review of the Epidemiological Evidence for Adducin Family Gene Polymorphisms and Hypertension[J]. Cardiol Res Pract, 2019(2019):7135604.
- [13] Zhang LN, Liu PP, Wang L, et al. Lower ADD1 gene promoter DNA methylation increases the risk of essential hypertension[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e63455.
- [14] Infante A, Laresgoiti U, Fernandez-Rueda J, et al. E2F2 represses cell cycle regulators to maintain quiescence[J]. Cell Cycle, 2008, 7(24):3915-3927.
- [15] Muller H, Bracken AP, Vernell R, et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis[J]. Genes Dev, 2001, 15(3):267-285.
- [16] Zhou J, Zhu Y, Cheng M, et al. Regulation of vascular contractility and blood pressure by the E2F2 transcription factor[J]. Circulation, 2009, 120(13):1213-1221.
- [17] Li H, Li Q, Zhang Y, et al. Novel Treatment of Hypertension by Specifically Targeting E2F for Restoration of Endothelial Dihydrofolate Reductase and eNOS Function Under Oxidative Stress[J]. Hypertension, 2019, 73(1):179-189.

收稿日期: 2020-05-12; 修回日期: 2020-05-22

编辑/杜帆