

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.07.012

Let-7a 负性调控人肾上皮细胞 293T 中 UHRF1 基因的表达^①

文利¹, 彭睿², 孙艳¹,
武天慧¹, 彭惠民³, 张政¹

1. 重庆医科大学 细胞生物学及遗传学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学 生物信息学教研室, 重庆 400016;
3. 重庆医科大学 实验教学中心, 重庆 400016

摘要: 目的: 探讨人肾上皮细胞 293T 中 let-7a 对靶基因 UHRF1 的负性调控作用. 方法: 运用生物信息学技术对 let-7a 靶基因进行预测和分析, 构建含有 UHRF1 3'UTR 全长的野生型(pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-wt)和突变型荧光素酶报告质粒(pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-mut), 分别将 pmir-RB-UHRF1-3'UTR-wt, pmir-RB-UHRF1-3'UTR-mut, pmir-RB-REPORT vector 与 let-7a mimics 或 mimics control 共转染 293T 细胞, 双荧光素酶报告系统检测转染后 293T 细胞的荧光素酶表达水平. 293T 细胞分别转染 let-7a mimics 和 inhibitor, western blot 和 real-time RT-PCR 检测 UHRF1 基因的表达. 结果: 生物信息学结果显示 let-7a 有 48 个预测靶基因, 包括 UHRF1, HMGA2, MAPK6 等, 主要涉及 microRNA 在肿瘤、细胞周期、PI3K-AKT、p53 等信号通路. 其中 UHRF1 3'UTR 含有一个 let-7a 的结合位点, 且在多个物种中呈高度保守. 进一步双荧光素酶检测发现, 共转染 let-7a mimics 和 pmir-RB-UHRF1-3'UTR-wt 的 293T 细胞荧光素酶活性显著降低($p < 0.01$). Western blot 和 real-time RT-PCR 结果显示转染 let-7a mimics 的 293T 细胞 UHRF1 表达降低, 而转染 let-7a inhibitor 的 293T 细胞 UHRF1 表达增高. 结论: 人肾上皮细胞 293T 中 let-7a 能通过与 UHRF1 3'UTR 靶向结合, 负性调控 UHRF1 的表达.

关键词: 微 RNA; UHRF1; 基因表达

中图分类号: Q813

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)07-0077-07

微 RNA(MicroRNA, miRNA)let-7 自从被发现后, 其在疾病中的作用引起广泛关注. 在人类基因组中存在 12 个由 let-7 同源基因家族编码的 miRNA 分子, 分别为 let-7a-1, a-2, a-3, 7b, 7c, 7d, 7e, f7-1, f7-2, 7g, 7i, Mir-98, 其序列具有高度的保守性, 在肿瘤、内分泌等疾病中发挥作用. 新近的研究报道, let-7 家族与肾脏疾病关系密切, let-7a 和 let-7c 在肾透明细胞癌患者中呈低表达, let-7g 和 let-7i 在肾透明细胞癌患者中呈高表达, 并与患者的愈后相关^[1-2], Let-7b 和 let-7c 在肾细胞癌患者中呈低表达, 并与 5-氟尿嘧啶

① 收稿日期: 2016-09-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81270912); 重庆市科委一般项目(cstc2013jcyjA10044).

作者简介: 文利(1989-), 女, 重庆忠县人, 硕士, 主要从事细胞生物学及遗传学研究.

通信作者: 张政, 副教授.

治疗的耐药性产生相关性^[3], let-7b 靶向 GALNT2 调控 IgA 肾病^[4], Let-7b 通过靶向作用于 TGFBR1 调控 TGF- β 1 诱导的肾纤维化^[5]. 同时本课题组前期研究通过芯片和 real-time PCR 检测发现在糖尿病肾病患者中循环 let-7a 呈低表达, 参与疾病的发生^[6]. 因此 let-7a 可能是肾脏疾病发生发展的因素之一, 但其确切机制目前仍不清楚.

miRNA 种子序列与靶基因 3'UTR 序列的互补结合是 miRNA 发挥生物学功能的重要方式之一, 参与疾病的病理生理过程. 因此, 我们以人肾上皮细胞 293T 为研究对象, 综合运用生物信息学方法和实验室手段, 分析 let-7a 的一个靶基因 UHRF1.

1 材料与方法

1.1 主要材料

Escherichia coli DH5 α 和人肾上皮细胞 293T 由本实验室保存. 荧光素酶报告载体 pmiR-RB-REPORT vector 购自广州锐博生物科技有限公司; let-7a mimics, inhibitor 及对照购自上海吉玛制药技术有限公司; 双荧光素酶报告系统检测试剂盒购自 Promega 公司; 各种限制性内切酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、逆转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; Trizol 和 LipofectamineTM 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司; DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司; UHRF1 抗体和 β 体 actin 抗体购自 Santa Cruz 公司. 引物合成和测序由上海生工生物技术有限公司进行.

1.2 let-7a 靶基因生物信息学分析

运用 microRNA 靶基因预测软件 TargetScan(<http://www.targetscan.org/>)、miRTarBase(<http://www.mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)和 RepTar(<http://bioinformatics.ekmd.huji.ac.il/reptar>)预测 let-7a 的靶基因. 在本研究中, 至少来源于 2 个软件的基因才被考虑为 let-7a 的潜在靶基因. 应用 Cytoscape^[7] 的插件 BiNGO^[8], 对预测到的靶基因做 GO(Gene Ontology)过度表达分析. 从 Gene Ontology Consortium^[9] 的网站下载基因本体和人类基因组 GO 注释的数据. 其中, GO 采用最基本的版本(go-basic.obo), 过度表达分析采用超几何测试和 Bonferroni 校正, 以全基因组为参考.

1.3 UHRF13'UTR 野生型与突变型质粒的构建

根据人的 UHRF1 基因 3' UTR 序列(GenBank, NM_001048201)设计上、下游引物: UHRF1-wt-F: 5'-CCGCTCGAGTCTCCAAGCACTTCTCGACA-3'; UHRF1-wt-R: 5'-GAATGCGGCCGCTCTATCTGTGAAAAACATTTATTCTGAGAA-3'. 以 293T 细胞株基因组 DNA 为模板, 按照 TaKaRa 生物有限公司提供的 PCR 试剂盒扩增 UHRF1 基因 3'UTR 序列. 将 PCR 产物和荧光素酶报告载体 pmiR-RB-REPORT vector 分别用 Xho I 和 Not I 双酶切, 回收目的基因和载体片段, 以 T4 连接酶 16 °C 连接过夜 12 h 并将产物转化感受态 DH5 α 细胞, 提取质粒验证获得野生型重组质粒 pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-wt. 根据 let-7a 种子序列与 UHRF1 基因 3' UTR 序列结合位点设计突变引物, UHRF1-3'-UTR-mut 上游: 5'-GGGTTTGTTAATTTTTCTAATTTTAC-CAAAGTTTGCAGCCTAGCTTGTTCATAAAACAGGGATATTTTAAATCACATACCTGCAGACAAACT-3'; 下游: 5'-AGTTTGTCTGCAGGTATGTGATTTAAAATATCCCTGTTTTATGACAAGCTAGGCTGCAAACCTTGGTAAAATTAGAAAAATTAACAAACCC-3'. 测序验证构建质粒.

1.4 细胞培养和瞬时转染

293T 细胞接种于 100 mL 细胞培养瓶, 用含 10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 高糖培养基在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 每 2~3 d 换液. 293T 细胞分为下列 4 个组: let-7a 组(细胞转染

let-7a mimics)、对照组(细胞转染 mimics control)、无处理组及 let-7a 抑制组(细胞转染 let-7a inhibitor). 待细胞生长到 80%左右, 按照脂质体 LipofectamineTM 2000 试剂盒说明书将 let-7a mimics, mimics control 和 let-7a inhibitor 转染至 293T 细胞, 4~6 h 后更换新鲜的 DMEM 培养基, 24~48 h 后收集各组细胞.

1.5 双荧光素酶报告系统检测

将 293T 细胞按照每孔 4×10^3 个细胞种植于 96 孔板, 然后按照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书将 pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-wt (200 ng/mL), pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-mut (200 ng/mL), pmiR-RB-REPORT vector (200 ng/mL) 及 let-7a mimics (50 nmol/L) 转染至 293T 细胞. 转染 48 h 后, 裂解各组细胞, 按 Dual Glo Luciferase Assay System 说明书操作, 以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值表示各组细胞的荧光强度.

1.6 Real-time PCR

采用 Trizol 法提取细胞和血液总 RNA. 采用 PrimerScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行逆转录反应. UHRF1 引物, 上游: 5'-ATCTCGGGTGGGGTTTTTCC-3'; 下游: 5'-ATGCTCTAAG-GAGTCGGGGT-3'. 逆转录反应总体系 20 μ L, 其中 5x gDNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L, RNA 1 μ g, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L, RT Primer Mix 1 μ L, 5x PrimeScript Buffer 4 μ L, 加 RNase Free dH₂O 至 20 μ L. 逆转录反应条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min; 85 $^{\circ}$ C 5 s; 4 $^{\circ}$ C 放置. 实时定量反应总体系 20 μ L, 其中 SYBR[®] Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) 10 μ L, Primer (10 μ mol/L) 0.8 μ L, RT products 1.6 μ L, dH₂O 6.8 μ L. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环. 每个检验指标做 3 个复孔. 以 β -actin 作为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法相对定量 UHRF1 的表达水平.

1.7 Western blot 检测

按试剂盒说明书操作提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白质总含量. 根据目的蛋白相对分子质量用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 200V 转膜 2 h, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 按照一抗说明书稀释抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜 12 h 孵育; TBST 漂洗 3 次, 二抗孵育 90 min, TBST 洗涤 3 次, ECL 化学发光法曝光条带, Quantity One 软件采集图像并分析.

1.8 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计学软件分析, 实验数据以 $\pm s$ 表示, 多组数据使用单因素方差分析, 组内比较用 Dunnett-*t* 检验.

2 结 果

2.1 let-7a 靶基因生物信息学分析结果

运用 microRNA 靶基因预测软件, 得到在 3 个软件中至少 2 个软件有交集的 let-7a 的 48 个预测靶基因. GO 分析结果显示这些靶基因在细胞成分、分子功能、生物过程中参与了诸多生理过程. GO 注释有不同的分类, 在 34 条 GO 注释中生物过程占据 30 条, 表明参与生物过程的 let-7a 靶基因占绝对优势. KEGG 分析结果显示有 21 条信号通路包含 3 个或以上的 let-7a 预测靶基因, 这些信号通路主要涉及 microRNA 在细胞周期、PI3K-AKT、p53 等信号通路(图 1).

2.2 UHRF1 是 let-7a 的靶基因

在这 48 个 let-7a 预测靶基因中, UHRF1 基因的 3' UTR 含有一个 let-7a 的结合位点(图 2A), 其与 let-7a 的 5' 端第 2~8 位碱基序列, 即“种子序列”完全互补, 而且该 UHRF1 基因 3' UTR 结合位点在多个物种(包括人类、黑猩猩、恒河猴、兔、猪等)的基因组中高度保守(图 2B). 提示 UHRF1 基

因 3' UTR 与 let-7a 结合位点结合性强, 保守度高, 可能是 let-7a 一个较好的靶基因, 因此选择 UHRF1 基因进一步研究.

在 293T 细胞中分别上、下调 let-7a 的表达, real-time RT PCR 和 Western blot 检测高、低表达 let-7a 的细胞中靶基因 UHRF1 的 mRNA 和蛋白表达. 结果显示转染 let-7a mimics 组 UHRF1 mRNA 表达水平较对照组及未转染组低, 转染 let-7a inhibitor 组较未转染组高(图 3A), 同时转染 let-7a mimics 组 UHRF1 蛋白表达水平较对照组及未转染组低, 转染 let-7a inhibitor 组较未转染组高(图 3B), 与 real-time RT PCR 结果相一致. 表明 let-7a 可以负性调节 UHRF1 基因的表达.

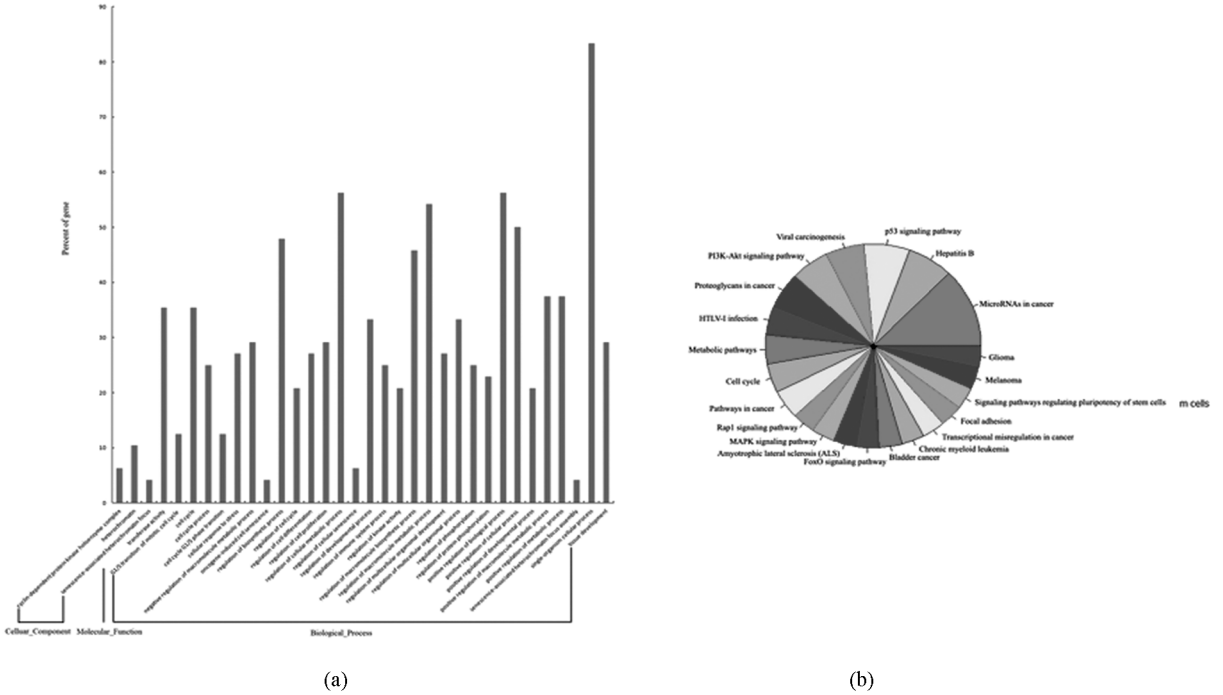


图 1 预测靶基因的 GO 和 KEGG 分析

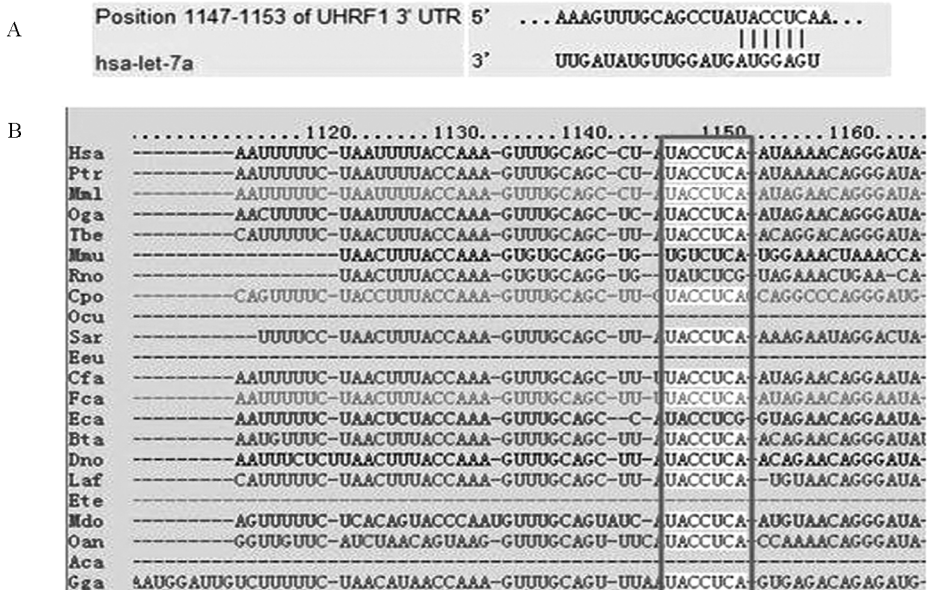


图 2 let-7a 靶基因 UHRF1 的生物信息学分析

选用包含萤火虫素酶和海肾荧光素酶作为报告基因体系, 分别构建了 UHRF1-3'UTR-wt 和 UHRF1-3'UTR-mut 的荧光素酶报告载体质粒, 测序证实构建成功. 荧光素酶活性检测结果显示, 过表达 let-7a 可显著抑制 UHRF1 荧光酶活性 ($p < 0.01$, 图 4), 提示 let-7a 可通过与 UHRF1 3'UTR 结合, 负性调控 UHRF1 的表达, UHRF1 是 let-7a 的靶基因.

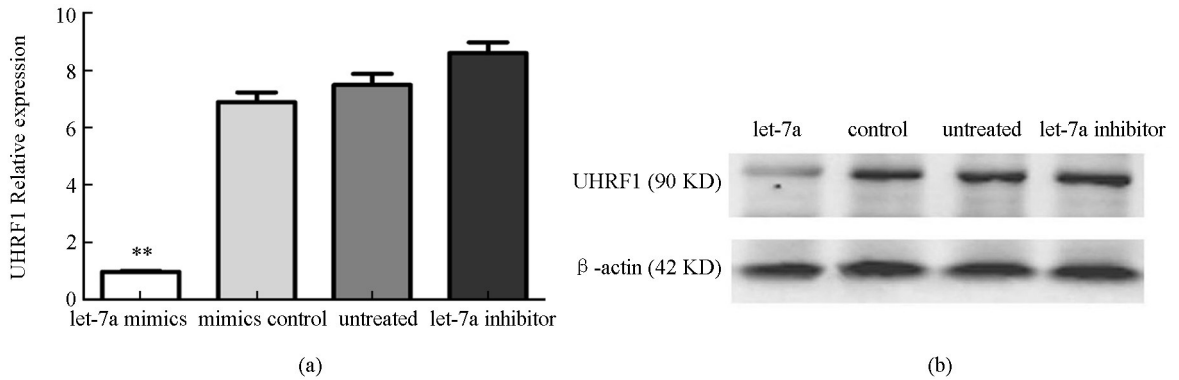


图 3 高低表达 let-7a 对 UHRF1 基因表达的影响

3 讨论

近年来, 随着 microRNAs 数据的不断增加, 这一类小 RNA 分子为我们提供了一个全新的角度来认识基因和基因表达调控的本质. 文献报道 miRNA 在多种疾病包括肾脏疾病中表达异常, 比如 Mir-21 和 Mir-210 在肾透明细胞癌表达上调, Mir-141, Mir-200c 和 Mir-429 表达下调^[10], MiR-21, miR-192 和 miR-433 在 TGF- β 1 诱导的肾纤维化中具有协同促进作用, 而 miR-29 和 miR-200 家族则具有抑制效应^[11]. 以上均提示在肾脏疾病的发生发展中, miRNA 扮演了重要角色. 因此, 我们选择进一步研究 let-7a 在肾病中的生物学功能.

尽管目前有很多 microRNA 靶基因预测软件, 但由于这些软件所采用的计算方式在某些细节上存在差异, 导致各个软件的预测结果并不完全一致^[12]. 而且, 经生物信息学预测所得的靶基因必须经过实验室研究验证. 在本研究中, 我们运用 microRNA 靶基因预测软件 TargetScan, miRTarBase 和 RepTar^[13] 预测 let-7a 的靶基因, 共有 48 个至少在 2 个软件有交集的基因作为 let-7a 的预测靶基因. 进一步运用生物信息学技术对 let-7a 的预测靶基因进行功能富集性分析. GO 分析结果显示这些靶基因在细胞成分、分子功能、生物过程中参与了诸多生理过程. KEGG 分析结果显示有 21 条信号通路包含 3 个或以上的 let-7a 预测靶基因, 主要涉及 microRNA 在细胞周期、PI3K-AKT、p53 等信号通路. 在这些预测靶基因中, UHRF1 引起了我们的注意. 最近的研究发现, UHRF1 通过一种独特的半甲基化 CpG 结合活性, 将 DNMT1 召集到 DNA 复制叉周围, 维持 DNA 的甲基化^[14], UHRF1 通过结合 K9 甲基化或甲基化 DNA, 能有效定位到异质染色体上, 并在异质染色体的形成与维持中起重要作用^[15].

本实验通过生物信息学技术发现 UHRF1 基因的 3'UTR 含有一个 let-7a 的结合位点, 其与 let-7a 的 5' 端第 2~8 位碱基序列, 即“种子序列”完全互补, 而且该 UHRF1 基因 3'UTR 结合位点在多个物种

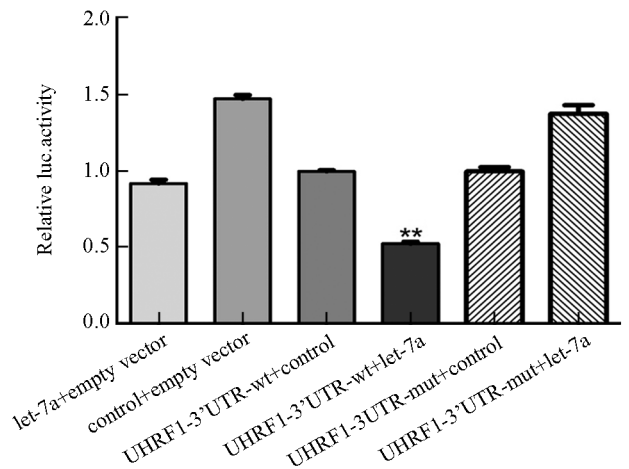


图 4 双荧光素酶报告检测荧光活性

(包括人类、黑猩猩、恒河猴、兔、猪等)的基因组中高度保守. 因此, UHRF1 基因是较好的 Let-7a 预测靶基因. 为证实 let-7a 与 UHRF1 是否存在直接靶向作用, 我们构建了 UHRF1-3'UTR-wt 和 UHRF1-3'UTR-mut 的荧光素报告载体质粒进行荧光素酶活性检测. 结果显示, 过表达 let-7a 可抑制 UHRF1-3'UTR-wt 荧光素酶活性, 提示 let-7a 可与 UHRF1 3'UTR 上的互补位点结合, 从而抑制目的基因的表达. 接下来, 我们在 293T 细胞中转染 let-7a mimics 和 inhibitor 使之高表达和低表达 let-7a, 通过 Western blot 和 real-time RT PCR 检测结果显示, 在 293T 细胞中 let-7a 组 UHRF1 蛋白和 mRNA 表达量明显降低, 而 let-7a inhibitor 组, UHRF1 蛋白和 mRNA 表达水平上调, 表明 let-7a 可负性调控 UHRF1 基因的表达, 是 let-7a 的一个靶基因.

本研究从生物信息学手段和实验室证据两方面来探讨 let-7a 对 UHRF1 的靶向调控作用, 后者建立在前者的基础之上. 该研究可为我们提供更丰富的关于 let-7a 参与转录或转录后调控机制的有关信息, 而后续对其靶基因 UHRF1 的下游效应研究, 将为深入认识 let-7a 的生物学功能提供重要启示.

参考文献:

- [1] GOWRISHANKAR B, IBRAGIMOVA I, ZHOU Y, et al. MicroRNA Expression Signatures of Stage, Grade, and Progression in Clear Cell RCC [J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(3): 329–341.
- [2] HEINZELMANN J, HENNING B, SANJMYATAV J, et al. Specific miRNA Signatures Are Associated with Metastasis and Poor Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma [J]. *World J Urol*, 2011, 29(3): 367–373.
- [3] PENG J, MO R, MA J, et al. let-7b and let-7c are Determinants of Intrinsic Chemoresistance in Renal Cell Carcinoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2015, 13(1): 1–8.
- [4] SERINO G, SALLUSTIO F, CURCI C, et al. Role of let-7b in the Regulation of N-Acetylgalactosaminyltransferase 2 in IgA Nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(7): 1132–1139.
- [5] WANG B, JHA J C, HAGIWARA S, et al. Transforming Growth Factor- β 1-Mediated Renal Fibrosis is Dependent on the Regulation of Transforming Growth Factor Receptor 1 Expression by let-7b [J]. *Kidney Int*, 2014, 85(2): 352–361.
- [6] ZHOU J, PENG R, LI T, et al. A Potentially Functional Polymorphism in the Regulatory Region of let-7a-2 is Associated with an Increased Risk for Diabetic Nephropathy [J]. *Gene*, 2013, 527(2): 456–461.
- [7] MAERE S, HEYMANS K, KUIPER M. BiNGO: a Cytoscape Plugin to Assess Overrepresentation of Gene Ontology Categories in Biological Networks [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(16): 3448–3459.
- [8] EPPIG J T, HARRIS M A, HILL D P, et al. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25–29.
- [9] 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.
- [10] TANG K, XU H. Prognostic Value of Meta-Signature miRNAs in Renal Cell Carcinoma: an Integrated miRNA Expression Profiling Analysis [J]. *Sci Rep*, 2015(5): 10272–10284.
- [11] CHUNG A C, LAN H Y. MicroRNAs in Renal Fibrosis [J]. *Frontiers in Physiology*, 2015(6): 50.
- [12] AMBROS V. The Functions of Animal MicroRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350–355.
- [13] EKIMLER S, SAHIN K. Computational Methods for MicroRNA Target Prediction [J]. *Genes (Basel)*, 2014, 5(3): 671–683.
- [14] SHARIF J, MUTO M, TAKEBAYASHI S, et al. The SRA Protein Np95 Mediates Epigenetic Inheritance by Recruiting Dnmt1 to Methylated DNA [J]. *Nature*, 2007, 450(7171): 908–912.
- [15] LIU X, GAO Q, LI P, et al. UHRF1 Targets DNMT1 for DNA Methylation Through Cooperative Binding of Hemimethylated DNA and Methylated H3K9 [J]. *Nature Communications*, 2013, 4(3): 1563.

MicroRNA Let-7a Negatively Regulates the Expression of UHRF1 in Human Renal Epithelial Cells 293T

WEN Li¹, PENG Rui², SUN Yan¹,
WU Tian-hui¹, PENG Hui-min³, ZHANG Zheng¹

1. Department of Cell Biology and Genetics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Bioinformatics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

3. Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To explore the negative regulatory effect of let-7a on the expression of UHRF1 in human renal epithelial cells 293T. Methods Bioinformatics methods were used for let-7a target prediction and analysis. The full length wild type of UHRF1-3' (pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-wt) and the mutant type (pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-mut plasmid) were constructed, and the 293T cells were co-transfected with pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-wt or pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-mut plasmid or pmiR-RB-REPORT vector with let-7a mimics or mimics control intervention. Luciferase expression level of the 293T cells was detected by the dual luciferase reporter assay system. Western blot and real-time RT PCR were used to detect the expression of UHRF1 gene in the 293T cells which had been transfected with let-7a mimics or inhibitor. Results Bioinformatics analysis indicated that let-7a contained 48 potential target genes including UHRF1, HMGA2 and MAPK6, which were mainly involved in the signaling pathways of cancer, cell cycle, PI3K-AKT and p53. Among these targets, UHRF1 was found to contain a phylogenetically conserved binding site with let-7a. Furthermore, dual luciferase reporter displayed that luciferase activity in 293T transfected with let-7a mimics and pmiR-RB-UHRF1-3'UTR-wt intervention was significant decreased ($p < 0.01$). Moreover, western blot and real-time RT PCR demonstrated that the expression of UHRF1 declined in let-7a over-expressed 293T cells, while the expression of UHRF1 was enhanced in let-7a down-expressed 293T cells. Conclusion Let-7a negatively regulates the expression of UHRF1 in human renal epithelial cells 293T through binding UHRF1 3'UTR.

Key words: microRNA (miRNA); UHRF1; gene expression

责任编辑 夏 娟

