

动物及兽医生物技术

过表达 miR-155 抑制 C2C12 成肌分化

熊燕, 王禹, 卫宁, 许儒祥, 杨公社, 庞卫军

西北农林科技大学 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 陕西 杨凌 712100

熊燕, 王禹, 卫宁, 等. 过表达 miR-155 抑制 C2C12 成肌分化. 生物工程学报, 2014, 30(2): 182–193.

Xiong Y, Wang Y, Wei N, et al. Effect of over-expressed miR-155 on inhibiting C2C12 myogenic differentiation. Chin J Biotech, 2014, 30(2): 182–193.

摘要: 为明确 miR-155 在 C2C12 成肌分化中的作用及分子机制, 本研究构建了 miR-155 过表达腺病毒载体, 运用过表达 miR-155 的腺病毒感染 C2C12, 并诱导其成肌分化。通过形态学观察, 成肌标志基因 mRNA 和蛋白表达水平的检测, 以及双荧光素酶报告基因系统对预测的 miR-155 靶基因 (*TCF4*) 的验证, 结果表明, C2C12 细胞分化中, 过表达 miR-155 明显降低了肌管的形成, 成肌标志基因 *MyoG* 和 *MyHC* 的 mRNA 表达量极显著地下降 ($P < 0.01$), 而 *MyoD* 差异不显著 ($P > 0.05$), 成肌标志基因蛋白检测结果与 mRNA 检测结果一致; 进一步研究显示 miR-155 与预测的 *TCF4* 基因的 3' UTR 3 个靶点 (1487-1493, 1516-1522, 4532-4583) 中的 1 个 (4532-4538) 结合, 并发现过表达 miR-155 显著降低了 *TCF4* 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$)。表明 miR-155 可能通过靶向 *TCF4* 抑制 C2C12 成肌分化。

关键词: miR-155, C2C12, 成肌分化, TCF4, 腺病毒

Received: May 3, 2013; **Accepted:** October 9, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30600437), NWAUFU Basic Science Research Program (No. QN2009021), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB124705), the Reproduction Technology of National Pork Industry Technology Systems (No. CARS-36-04).

Corresponding author: Weijun Pang. Tel: +86-29-87091893; E-mail: pwj1226@nwsuaf.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30600437), 西北农林科技大学基本科研业务项目 (No. QN2009021), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB124705), 国家生猪产业技术体系 (No. CARS-36-04) 资助。

网络出版时间: 2013-11-05

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131105.1012.002.html>

Effect of over-expressed miR-155 on inhibiting C2C12 myogenic differentiation

Yan Xiong, Yu Wang, Ning Wei, Ruxiang Xu, Gongshe Yang, and Weijun Pang

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: To clarify the function and molecular mechanism of miR-155 in myogenic differentiation of C2C12, we constructed adenovirus over-expression vector of miR-155, then C2C12 cells were infected by adenovirus and induced myogenic differentiation. First, we observed the morphology of C2C12 after differentiation. Then the mRNA and protein expressions of myogenic markers (*MyoD*, *MyoG* and *MyHC*) were detected by qPCR and western blotting. Subsequently, the dual luciferase reporter gene assay was carried out to validate putative target gene (*TCF4*) of miR-155. Meanwhile, mRNA level of *TCF4* was analyzed after over-expressing miR-155. The results show that over-expressed miR-155 reduced myotubes formation. Moreover, the mRNA and protein expression of *MyoG* and *MyHC* decreased significantly ($P < 0.01$). Further research demonstrated miR-155 bound the one (4532-4538) of three putative sites (1487-1493, 1516-1522, 4532-4583) of *TCF4* by luciferase reporter gene assay and the mRNA level of *TCF4* decreased notably ($P < 0.05$). The data suggest that miR-155 inhibited myogenic differentiation of C2C12 through targeted *TCF4*.

Keywords: miR-155, C2C12, myogenic differentiation, *TCF4*, adenovirus

miRNA 是一类长度约 18–22 nt 的短链非编码 RNA, 通过结合基因的 3' UTR 调控靶基因 mRNA 的翻译^[1]。研究表明, 许多 miRNA 是骨骼肌形成的关键调节子^[2], 其中 miR-1、miR-133 和 miR-206 是肌肉组织特异性 miRs^[3]。Dey 等发现 miR-206 和 miR-486 通过直接与 *Pax7* 的 3' UTR 结合, 下调 *Pax7* 的表达来促进成肌细胞分化^[4]。miR-1 和 miR-133 位于同一基因簇, 能同时被转录, 但二者功能相反, miR-1 促进成肌细胞分化, 抑制其增殖; 而 miR-133 促进成肌细胞增殖, 对分化起抑制作用^[5]。此外, miR-214^[6]、miR-148a^[7] 和 miR-378^[8] 也能促进成肌细胞分化, 其中 miR-378 在成肌分化中形成了反馈环调节, 其与成肌分化抗原 (Myogenic differentiation antigen, *MyoD*) 的内源性抑制物 (*MyoR*) 的 3' UTR 结合抑制其翻译, 同时 *MyoD* 与 miR-378 基因启动子近端结合, 引起 miR-378

染色质重组和反式激活^[8]。同时成肌分化也受到 miRNA 的负向调控, 如 miR-23a 直接靶向肌球蛋白重链亚型 1 (*Myosin heavy chain 1*, *MyHC1*)、*MyHC2* 和 *MyHC4* 的 3' UTR^[9]; miR-146a 能与 Notch 信号通路的关键成员 *Numb* 的 3' UTR 结合抑制其翻译, 进而抑制该信号通路促肌管形成的作用^[10]。由此可见, 成肌分化受到多种 miRNA 的共同调节, 发掘新的 miRNA 调控成肌细胞分化机制, 是从 miRNA 层面全面揭示肌形成机理的研究热点。

miR-155 是机体中重要的 miRNA, 参与多种生理功能, 包括造血细胞的生成、炎症反应、免疫应答、前体脂肪细胞分化、血管平滑肌的收缩^[11]。近年来, 研究发现 miR-155 在肌肉组织发育中起调控作用^[12], 但是具体的作用及机制还需进一步研究。基于前人的研究基础, 利用 TargetScan、PicTar、PITASites 及 MIRDDB 等

在线软件预测 miR-155 的靶基因,发现 T 细胞因子 4 (T cell factor 4,TCF4) 存在 3 个 miR-155 的潜在靶位点。TCF4 作为经典 wnt 信号通路的下游元件,正向调节成肌细胞分化,并且促进肌球蛋白重链的表达^[13-14],推测 miR-155 可能靶向结合 TCF4,抑制其翻译,从而抑制 C2C12 成肌分化。

本研究通过制备 miR-155 过表达腺病毒,感染 C2C12 细胞并诱导分化,运用 qPCR 和 Western blotting 技术检测肌细胞分化标志基因,如 MyoD、肌细胞生成素 (Myogenin,MyoG) 及 MyHC 的表达水平,明确了 miR-155 在成肌分化中的作用。为探索 miR-155 调控成肌细胞分化的分子机制,构建 TCF4 的 3' UTR 双荧光素酶报告载体,与 miR-155 过表达载体共转染 HEK293T 细胞,检测荧光素酶活性,并进一步检测过表达 miR-155 对 C2C12 中 TCF4 的 mRNA 水平影响,揭示了 miR-155 调控 C2C12 成肌分化的分子机制,将为 miRNA 调控成肌分化提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

腺病毒载体系统由本实验室保存;HEK293T、HEK293A、C2C12 细胞系均购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所。限制性内切酶 (*Xho* I 和 *Kpn* I)、*Taq* 酶和 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa),*Pme* I、*Pac* I (NEB),反转录和 qPCR 试剂盒 (TaKaRa),BCA 蛋白定量试剂盒 (Beyotime);质粒小量抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒 (Omega);双荧光素酶检测试剂盒 (Promega);胎牛血清、马血清 (HyClone);DMEM 培养基

和胰蛋白酶 (Gibco);青霉素、链霉素(四季青公司);TurboFect Transfection Reagent (Thermo Scientific);MyoD 抗体 (Santa Cruz, 1 : 500),MyoG 抗体 (Millipore, 1 : 500),MyHC 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA, 1 : 500)。其他试剂均为进口或国产化学分析纯。引物合成以及测序由北京三博远志有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 miR-155 成熟序列的保守性分析

在 miRbase 数据库中,搜索小鼠、人、猪、牛、大猩猩、鲤鱼、非洲爪蟾、斑马鱼、鸡、狗、黑猩猩、猕猴的 miR-155 成熟序列,利用 Clustal W 软件对序列进行保守性分析。

1.2.2 鼠 miR-155 腺病毒的载体构建、包装与扩繁

用带有限制性内切酶 *Xho* I 与 *Kpn* I 序列的引物扩增 miR-155 前体,并连接到腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 中,经 *Pme* I 线性化后,与 pAd-Easy 骨架载体共转化 BJ5183 感受态细胞,并涂于卡那霉素抗性的平板,使 pAdTrack-CMV-miR-155 与 pAd-Easy 骨架载体重组,次日挑选菌落 (选择最小的菌落),碱裂解法提取质粒,最后进行 *Pac* I 酶切与测序鉴定。构建好的重组载体用 *Pac* I 酶切线性化后,乙醇沉淀纯化。将 293A 细胞以 2×10^4 细胞/cm² 的密度接种于 60 mm 培养皿,待细胞融合至 70%–80%时,参考 TurboFect 说明书,用纯化的腺病毒线性化质粒转染 HEK293A 细胞进行包装。待 7–14 d,整皿细胞都出现荧光,细胞部分脱落,分别收集上清和细胞。细胞放于冻存管中,加入 1 mL 培养基于–80 ℃和 37 ℃反复冻融 3–4 次,收集细胞毒,–80 ℃保存。将

HEK293A 细胞以 5×10^6 细胞接种于 100 mm 培养皿中,待细胞融合至 90% 加入上清毒进行扩繁,36–48 h 后收集细胞,以同样的方法收集病毒,用于后续实验使用。

1.2.3 C2C12 细胞体外成肌分化模型的建立

未分化的 C2C12 细胞以含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基 (生长培养基, growth medium, GM) 在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。当细胞长至 80%–90% 的汇合度时,换以含 2% 马血清的 DMEM 培养基 (分化培养基, differentiation medium, DM) 诱导其成肌分化。每隔 2 天换液,持续诱导 5 d,以倒置显微镜观察肌管的形成。

1.2.4 过表达 miR-155 的腺病毒感染 C2C12 细胞

以 5×10^4 细胞/cm² 的密度接种于 60 mm

培养皿,待细胞汇合到 60%–70%,弃去培养基,加入 miR-155 腺病毒上清 500 μL 和 miR-155 细胞毒 100 μL,同时用仅表达 GFP 的腺病毒作为对照,并且与处理组的病毒量一致。病毒感染细胞 4 h 后,换成 GM,待细胞汇合至 80%–90%,按实验室优化的方案进行诱导分化。

1.2.5 荧光定量 PCR (q-PCR)

收集细胞,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,并用 RNA-free 水溶解,分别用 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪检测总 RNA 的质量及浓度,–80 °C 保存。用 U6 与 microRNA 或 oligdT 与随机引物反转录合成 cDNA。参照 TaKaRa 公司的 qPCR 说明书,采用 20 μL 体系对 miR-155 及成肌标志基因进行定量分析,以 U6 和 GADPH 作为内参,引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 相关基因的引物序列及参数

Table 1 Primer sequences and parameters for real-time PCR of related gene

Primer	Oligonucleotides (5'–3')	Product (bp)	Temperature (°C)
miR-155-RT	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCG	65	56
miR-155-F	GCAATTCAGTTGAGTACCCCTA		
miR-155-R	GGAGGTAAATGCTAATTGTGATAG		
v-miR-155-F	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC	231	65
v-miR-155-R	CGGGGTACCGGGGAAATCTGTGGTTTACGT		
U6-F	CCGCTCGAGCTGAGTTTATCCAGCAGGGTG		
U6-R	AAAATATGGAACGCTTCACGAA	108	60
MyoD-F	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATAT		
MyoD-R	CTACCCAAGGTGGAGATCCTG		
MyoG-F	CACTGTAGTAGGCGGTGTCGT	265	60
MyoG-R	ATCCAGTACATTGAGCGCCTAC		
MyHC-F	GACGTAAGGGAGTGCAGATTGT		
MyHC-R	CGCAAGAATGTTCTCAGGCT	110	60
TCF4-F	GCCAGGTTGACATTGGATTG		
TCF4-R	GGAGGAGAAGAAGCTCGGAAAA		
GADPH-F	AGGTAGGGGCTCGTCAGGT	266	60
GADPH-R	TGCTGAGTATGTCGTGGAGTCT		
	ATGCATTGCTGACAATCTTGAG		

1.2.6 Western blotting

培养皿中的细胞用 PBS 清洗 3 次,并用胰酶消化,收集细胞, -80°C 保存。使用时,加入 200 μL 含 1% PMSF (蛋白酶抑制剂) 的细胞裂解液,冰上裂解 30 min, 然后 4°C 、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清,用 BCA 法将蛋白定量后,用细胞裂解液调整蛋白浓度,使样品浓度均一化。按与上清 1:4 的比例加入 $5\times$ 上样缓冲液, 100°C 煮沸 10 min, 分装后保存。配制蛋白质电泳胶,吸取 20 μL 蛋白样品上样,电泳分离,然后转移到 PVDF 膜 (硝酸纤维素膜) 上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 用 MyoD、MyoG、MyHC 与 GAPDH 的一抗孵育过夜,次日再用二抗孵育 2 h, Bio-Rad GS-800 曝光系统显示结果,使用 Quantity One Manuel 软件进行灰度分析,绘制柱形图。

1.2.7 双荧光素酶报告基因分析

HEK293T 以 8×10^4 细胞/ cm^2 的密度接种于 24 孔板。培养 24 h 后,按照 TurboFect Transfection Reagent 操作手册进行转染,每孔加入 100 ng 的 psiCHECK-2-3' UTR 和 900 ng pAdTrack-CMV-miR-155 或者 pAdTrack-CMV 载体,并设置 4 个重复。转染 36 h 后,每孔加入 500 μL 的被动裂解液,根据双荧光素酶试剂盒说明书,利用 PerkinElmer VicTOR $\times 5$ 系统分别检测萤火虫荧光素酶和海参荧光素酶活性。结果显示为海参荧光素酶/萤火虫荧光素酶活性的比值,处理组再与对照组进行比较。

1.2.8 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件 One-way ANOVA 进行方差分析与显著性检验。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $*P < 0.05$, 差异显著; $**P < 0.01$, 差异极显著。

2 结果与分析

2.1 miR-155 在不同物种的保守性分析

在 miRbase 数据库中分别搜索小鼠、人、猪、牛、大猩猩、鲤鱼、非洲爪蟾、斑马鱼、鸡、狗、黑猩猩、猕猴的 miR-155 成熟序列进行 Clustal W 比对。结果显示其成熟序列在物种间存在差异,其中猪和小鼠第 12 位碱基为 U, 其余为 C (图 1)。通常 miR 成熟序列 5'端的 2-8 个碱基为种子序列,其与 mRNA 的结合很重要。但是最新的研究发现,种子序列附近的核苷酸变异会改变 miRNA 与靶位点形成二级结构的稳定程度 (即最低自由能大小),从而影响其靶向作用^[15-16]。因此 miR-155 在小鼠和猪中的靶基因可能与其他物种存在差异。此外,其他物种 miR-155 的成熟序列仅在 3'端最后一个碱基存在缺失变异 (图 1),其不会影响 miRNA 与靶基因结合物的稳定性^[16],所以 miR-155 在这些物种中功能具有一定的保守性。

Gorilla	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG-
Carp	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG-
Xenopus	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG-
Zebrafish	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG-
Chicken	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG-
Dog	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Chimpanzee	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Macaca	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Bovine	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Human	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Pongo	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Mouse	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU
Pig	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGG-

— Seed sequence

图1 miR-155成熟序列在不同物种中的保守性分析
Fig. 1 Conservative analysis of miR-155's mature sequence among 13 species. "*" represent base consistent perfectly.

2.2 miR-155 腺病毒载体构建

用带有 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切位点的引物, 以小鼠 DNA 为模板克隆长为 321 bp、含酶切位点序列的 pre-miR-155, 并胶回收目的片段 (图 2A, 泳道 13), 随后插入到 pAdTrack-CMV 载体中, 转化大肠杆菌 DH5 α 后经 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切 (图 2A, 泳道 1–12)、测序鉴定以及 pre-miR-155 的穿梭载体与 pAd-Easy 骨架载体重组。经 *Pac* I 酶切后, 出现一条 4.5 kb 的小片段和一条 23 kb 的大片段 (图 2B), 获得了阳性重组质粒, 测序鉴定与 miRbase 中序列完全一致, 表明成功构建了 miR-155 腺病毒重组载体。

2.3 miR-155 腺病毒的载体的包装与扩繁

将构建好的重组腺病毒载体 pAd-miR-155 用 *Pac* I 酶切后, 乙醇沉淀纯化, 用 TurboFect 转染融合率为 60%–70% 的 HEK293A 细胞。荧光显微镜下观察, 第 3 天有大量荧光, 第 6 天出现“彗星尾”现象 (图 3A), 待大部分细胞脱落, 表明病毒成熟, 收集病毒, 进行病毒扩繁, 加毒 36 h 后几乎所有细胞被病毒感染 (图 3B), 48 h 观察超过 50% 的细胞脱落 (图 3B), 此时是收毒的最佳时间。

2.4 miR-155 腺病毒感染 C2C12 细胞及其过表达效率检测

miR-155 腺病毒感染汇合率为 60%–70% 的 C2C12 细胞, 并用 GFP 处理为对照。24 h 后观察, 感染效率大约为 50% (图 4A), 48 h 收集细胞, 提取总 RNA, 用特异性反转录引物反转成 cDNA, qPCR 分析 miR-155 成熟序列的表达量, 以 U6 作为内参。结果显示, 过表达 miR-155 后其表达量升高了 8.8 倍 ($P < 0.01$)。表明构建的载体能在 C2C12 中高效表达。

2.5 过表达 miR-155 抑制 C2C12 细胞成肌分化

对腺病毒处理的 C2C12 细胞进行分化诱导, 观察分化第 5 天细胞的形态学变化。结果发现, 对照 GFP 腺病毒处理 5 d 后, 细胞正常分化, 并有大量肌管形成 (图 5A)。然而, 过表达 miR-155 细胞分化受到抑制, 肌管明显减少 (图 5A)。同时, 提取细胞总 RNA, qPCR 检测成肌分化转录因子 *MyoD*、*MyoG* 及 *MyHC* 的表达水平, 结果显示 *MyoG* 和 *MyHC* 的 mRNA 水平极显著下降 ($P < 0.01$), 而 *MyoD* 的 mRNA 略有下降, 但差异不显著 (图 5B、C 和 D)。Western

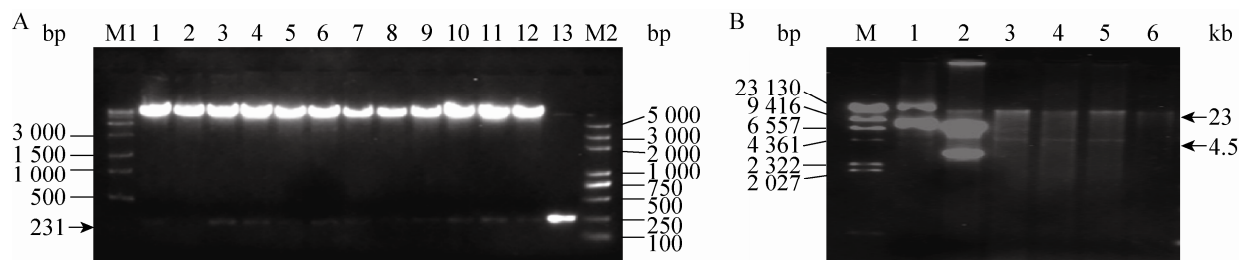


图 2 pre-miR-155 腺病毒过表达载体的构建

Fig. 2 Construction of miR-155 adenovirus over-expression vector. (A) pAdTrack-CMV-miR-155 was identified by restriction enzyme digestion (*Kpn* I and *Xho* I). M1, M2: DNA marker; 1–12: the digested production of pAd-CMV recombinant plasmids; 13: the pre-miR-155 fragment purified by DNA gel extraction. (B) The easy vector contains pre-miR-155 digested with *Pac* I. M: DNA marker; 1: easy vector and pAdTrack-CMV-miR-155 recombinant plasmid; 2: pAdTrack-CMV-miR-155; 3–6: the digested production of easy vector and pAdTrack-CMV-miR-155 recombinant plasmid.

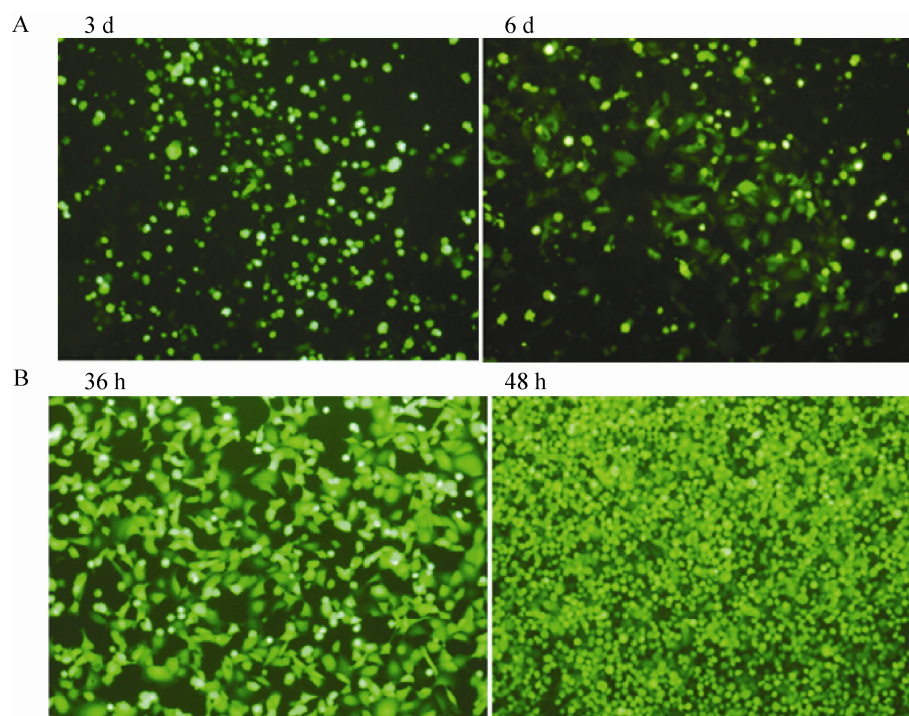


图3 重组腺病毒载体 pAd-miR-155 的包装与扩增

Fig. 3 Package and amplification of recombinant adenovirus vector pAd-miR-155. (A) The third day after HEK 293A cells transfected with pAd-pre-miR-155, 30%–40% cells expressed GFP. In the sixth day, the GFP expression increased rapidly, and the shape of GFP was like a comet tail (100×). (B) The GFP expression when pAd-miR-155 proliferated in HEK 293A cells (100×).

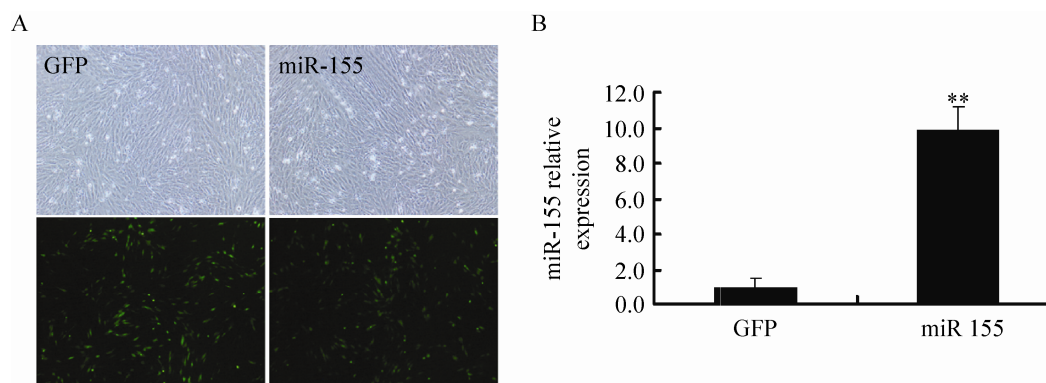


图4 miR-155 腺病毒感染 C2C12 及过表达效率检测

Fig. 4 miR-155 adenovirus infected C2C12 and the efficiency of overexpression was detected. (A) C2C12 cells before being infected by adenovirus and the GFP expression in C2C12 cells infected with adenovirus containing miR-155 (40×). (B) Real-time PCR analysis mRNA expression of mature miR-155. ** $P < 0.01$ compared with GFP group.

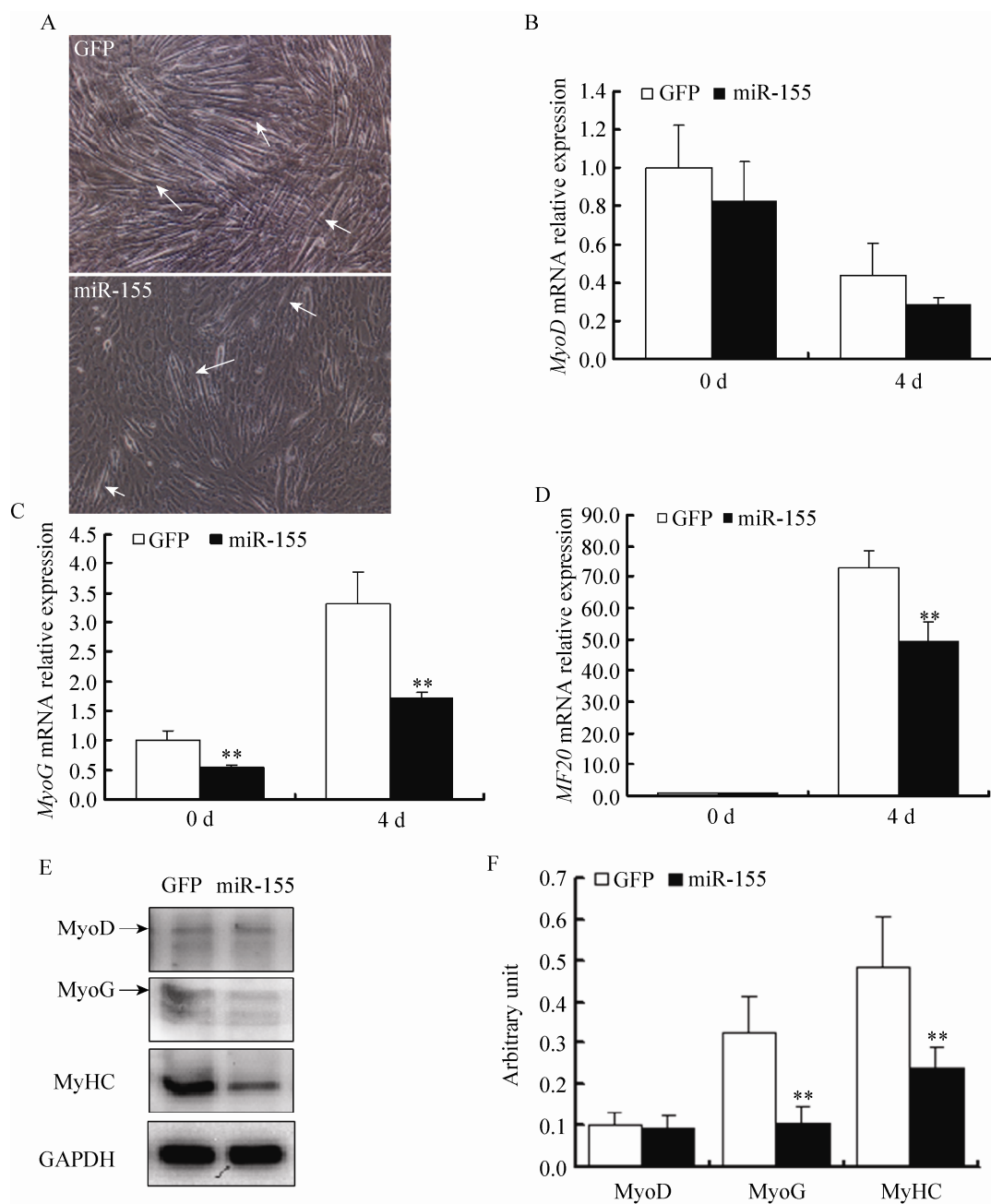


图 5 miR-155 抑制 C2C12 成肌分化

Fig. 5 miR-155 inhibits the C2C12 myogenic differentiation. (A) Morphometric observation of C2C12 myoblast differentiation at day 5 (100 \times), white arrows indicate myotubes. (B–D) Q-PCR showed the relative mRNA expression of *MyoD*, *MyoG*, and *MyHC* between over-expression miR-155 and GFP group. (E) The protein expressions of *MyoD*, *MyoG* and *MyHC* were analyzed by Western blotting at day 5 after differentiation. (F) Densitometric analysis of *MyoD*, *MyoG* and *MyHC*, normalized against GAPDH. ** $P < 0.01$ compared with GFP group at the same time point.

blotting 分析蛋白表达, 结果与 qPCR 结果一致, MyoD 和 MyHC 蛋白表达明显下降 (图 5E 和 F)。以上结果从形态学及分子水平表明过表达 miR-155 抑制 C2C12 成肌分化。

2.6 miR-155 靶基因 *TCF4* 的验证

利用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>

vert_50/) 和 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 等在线预测软件发现 *TCF4* 的 3'UTR 有 3 个保守的靶向位点 (图 6A), 该转录因子在调控肌肉发育方面有重要作用^[14,17]。进一步分析 miR-155 成熟序列与预测的靶向位点结合的二级结构 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)

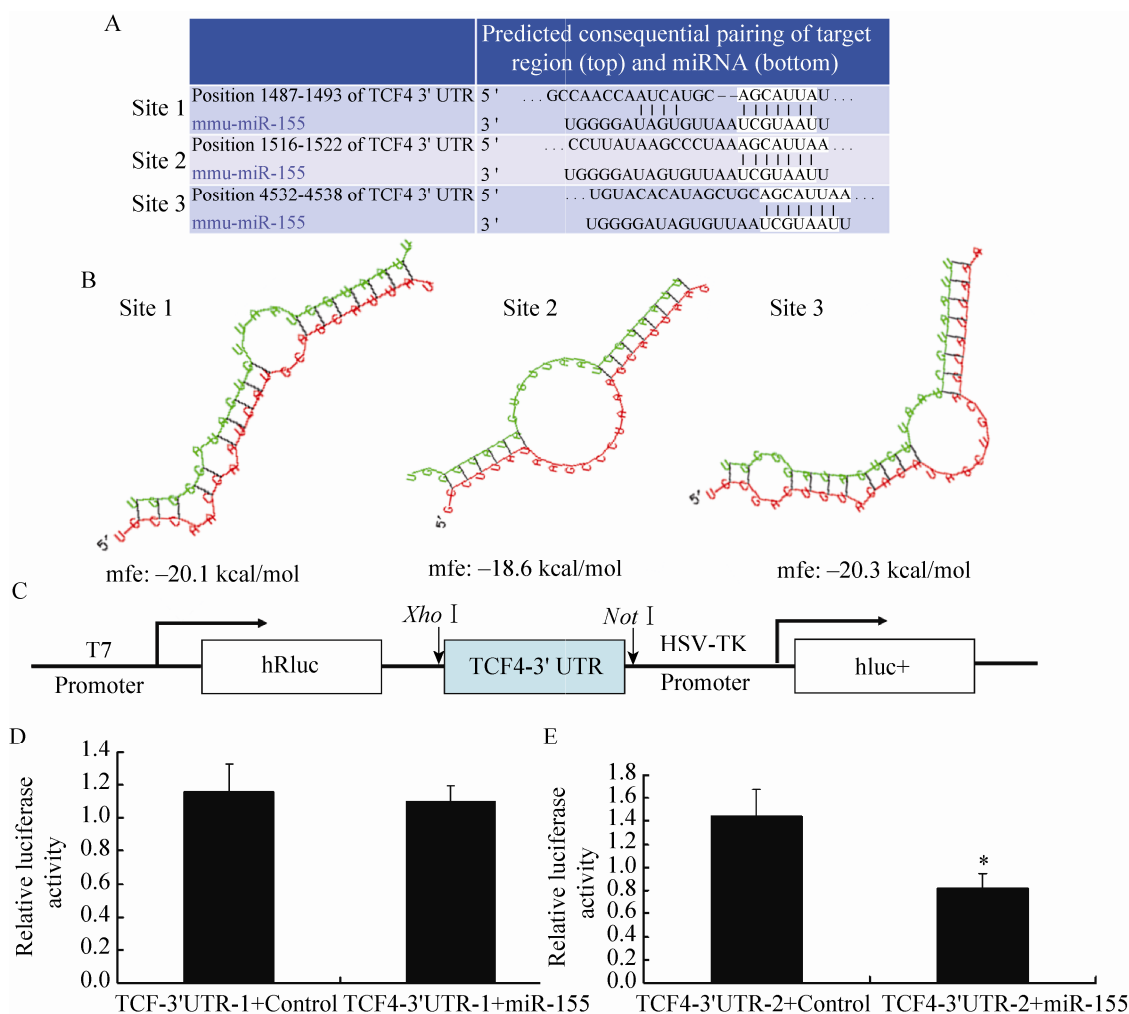


图 6 *TCF4* 是 miR-155 的靶基因

Fig. 6 *TCF4* is a target gene of miR-155. (A) Three putative target sites of *TCF4* were predicted by TargetScan and PicTar. (B) miR-155: *TCF4* 3' UTR duplex among different putative target sites. The sequence marked in red is *TCF4* 3' UTR, and the sequence marked in green is the mature sequence of miR-155 in mouse. mfe: minimum free energy. (C) Schematic representation of the construct used in the luciferase assay. (D and E) miR-155 directly binds to 3' UTR (4532-4538) of *TCF4*. HEK293T cells in 24-well plates were transfected with 3'UTR reporters (psiCHECK-1-3'UTR contains site1 and site2, psiCHECK-2-3'UTR contains site3, 100 ng) and pAdTrack-CMV-miR-155 (900 ng). Lysates were harvested 36 h after transfection, and reporter activity was measured with the dual luciferase assay. * $P < 0.05$ compared with control.

submission.html), 结果显示第 3 个位点与 miR-155 形成的自由能最小, 结构最稳定 (图 6B), 其可能是 miR-155 发挥作用的靶位点。为了验证预测结果, 构建了 *TCF4* 的双荧光素酶报告基因载体 (图 6C): psiCHECK-1-3' UTR (包含 Site1 与 Site2) 和 psiCHECK-2-3' UTR (包含 Site 3), 分别与 miR-155 过表达质粒共转染 HEK 293T 细胞, 检测萤火虫荧光素酶和海参荧光素酶活性, 并以萤火虫荧光素酶活性为内参。结果显示转染包含 Site3 载体的荧光素酶活性明显降低 ($P<0.05$) (图 6E), 而包含 Site1 与 Site2 的转染组差异不显著 (图 6D), 表明 miR-155 通过靶向结合 *TCF4* 的 Site3 发挥作用。

2.7 过表达 miR-155 下调 *TCF4* 的 mRNA 水平

以上验证 *TCF4* 是 miR-155 的靶基因, C2C12 细胞过表达 miR-155 能否影响内源 *TCF4* 的 mRNA 水平需进一步研究。腺病毒感染 C2C12, 分别在诱导分化 0 d、4 d 收集细胞提取 RNA, 利用 qPCR 检测 *TCF4* 的 mRNA 水平, 结果显示过表达 miR-155 使得 *TCF4* 的 mRNA 水平显著下降 (图 7), 表明在成肌分化过程中, *TCF4* 受到 miR-155 的调节。

3 讨论

骨骼肌是肌肉的主要组成部分, 肌细胞的分化是其生长发育的前提, 该生理过程非常复杂, 涉及到大量基因的表达调控、信号通路的“对话”及非编码 RNA 的调节。研究表明, miRNAs 作为一种短链非编码 RNA, 广泛地参与了骨骼肌细胞的分化以及相关疾病的形成^[2]。因此, 以 C2C12 为细胞模型, 寻找新的调控肌

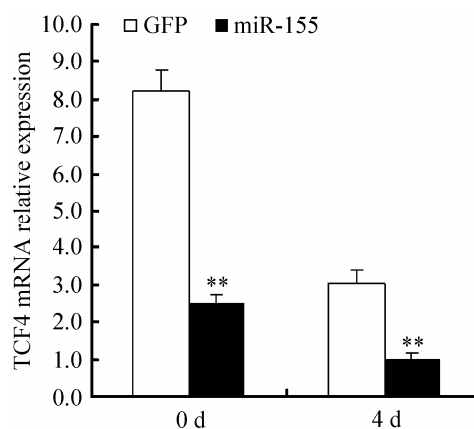


图 7 miR-155 调节 *TCF4* 的 mRNA 水平

Fig. 7 miR-155 regulates *TCF4* at the mRNA level. Over-expressed miR-155 in C2C12 cells shows a significant decrease in the endogenous *TCF4* mRNA level. ** $P<0.01$ compared with GFP group at the same time point.

细胞分化的 miRNA 并揭示其作用的分子机理, 是该研究领域的热点, 并将为肌相关疾病的治疗及家畜的分子育种提供理论基础。

在本研究的预实验中采用 pcDNA3.1 过表达 miR-155 质粒转染 C2C12 细胞, 其过表达效率仅为对照组的 2 倍, 不能满足后期实验的要求, 故使用 miR-155 的过表达腺病毒作为载体, 其与逆转录病毒和慢病毒相比, 具有安全性高、易扩繁、滴度高、靶细胞种类多、过表达效率高、不整合到宿主基因组中等优点, 是基因治疗研究的首选载体^[18-19]。在感染实验中, 添加了 10 $\mu\text{g/mL}$ 的聚凝胺, 其是一种多聚阳离子聚合物, 可通过中和细胞表面唾液酸与病毒颗粒之间的静电排斥, 促进病毒的吸附作用, 从而提高感染效率^[20]。此外, 双荧光素酶报告分析中, 将靶基因的 3' UTR 连接到 psiCHECK-2 载体上, 该质粒能同时表达萤火虫荧光素酶和海参荧光素酶, 避免了两个质粒转染效率低, 同

一批次和不同批次间转染差异大的弊端,提高了实验的准确性。

MyoD 是生肌调节因子 (Myogenic regulation factors, MRFs) 家族的重要成员,抑制肌细胞增殖,调节肌肉特异基因表达,在成肌细胞形成肌管早期起关键作用^[21-22]。在本实验中,C2C12 细胞过表达 miR-155 后,MyoD 的 mRNA 和蛋白的表达略有下降,但是差异不显著。然而,成肌分化晚期标志基因 MyoG 和 MyHC 的 mRNA 和蛋白的表达差异极显著。表明 miR-155 在调控成肌细胞分化中发挥重要作用,并提示 miR-155 可能通过抑制早期标志基因 MyoD 推迟成肌细胞的分化,并进一步通过抑制肌肉形成的晚期标志分子 MyoG 和 MyHC 阻遏肌肉的分化。

TCF4 是经典 Wnt 信号通路在核内的目标,并作为该通路的分子开关,通过 β -catenin 在核内与其结合后激活下游靶基因的转录。Wnt 信号在胚胎发生中对肌肉的形成发挥重要作用,是肌细胞终末分化和卫星细胞定向的关键调控因子^[17]。研究显示 C2C12 细胞系阻断 β -catenin 活性或通过表达显性负向 TCF4,抑制了成肌分化^[14],表明 TCF4 是经典 wnt 通路调控成肌分化的关键因子。进一步的生物信息学分析 TCF4 的 3'UTR 序列上存在 3 个 miR-155 的潜在靶点,经过双荧光素酶报告基因分析验证,Site3 是与 miR-155 结合的有效位点。我们分析了 miRNA 与靶位点及附近序列形成的二级结构,其与 Site3 形成的二级结构自由能最小,结构最稳定,这可能是 Site3 成为有效位点的一个原因,另外,miRNA 结合位点在 3'UTR 区的位置和相应位置的碱基分布,位点的可结合性等也与靶基因的结合存在密切相关性^[16,23]。进一步的实验证明了 miR-155 能下调内源 TCF4 的 mRNA 水平,

这似乎与传统观念相矛盾:动物细胞中 miRNA 仅调控靶 mRNA 的翻译。但是最新研究表明富含 AU 的 miRNA 能影响 mRNA 的稳定性,缩短半衰期^[24-25]。经分析,miR-155 的 AU 含量超过 50%,另外,有研究者在 HeLa 细胞中证明了外源 miR-1 和 miR-155 能同时降低靶基因的 mRNA 和蛋白水平,对于 miR-233,也观察到相似的结果^[26]。所以,miR-155 可能通过影响 TCF4 mRNA 的稳定性来发挥靶向作用。

总之,本实验成功制备了 miR-155 的过表达腺病毒,感染 C2C12 细胞,过表达效率提高了 8.8 倍,诱导分化后,形态学观察肌管明显减少,检测成肌分化相关基因 MyoG 和 MyHC 的表达显著下降,进一步验证了 TCF4 为 miR-155 的靶基因。以上结果明确了 miR-155 抑制 C2C12 成肌分化的作用,并暗示其可能通过靶向 TCF4 抑制肌管的形成。

REFERENCES

- [1] Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. Genom Proteom Bioinform, 2009, 7(4): 147-154.
- [2] Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Munsterberg AE. microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. Clin Sci (Lond), 2012, 123(11): 611-625.
- [3] Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, et al. Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. Dev Biol, 2008, 321(2): 491-499.
- [4] Dey BK, Gagan J, Dutta A. miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. Mol Cell Biol, 2011, 31(1): 203-214.
- [5] Luo X, Lin H, Pan Z, et al. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in

- hypertrophic heart. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20045–20052.
- [6] Liu J, Luo XJ, Xiong AW, et al. MicroRNA-214 promotes myogenic differentiation by facilitating exit from mitosis via down-regulation of proto-oncogene N-ras. *J Biol Chem*, 2010, 285(34): 26599–26607.
- [7] Zhang J, Ying ZZ, Tang ZL, et al. MicroRNA-148a promotes myogenic differentiation by targeting the ROCK1 gene. *J Biol Chem*, 2012, 287(25): 21093–21101.
- [8] Gagan J, Dey BK, Layer R, et al. MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation. *J Biol Chem*, 2011, 286(22): 19431–19438.
- [9] Wang L, Chen X, Zheng Y, et al. miR-23a inhibits myogenic differentiation through down regulation of fast myosin heavy chain isoforms. *Exp Cell Res*, 2012, 318(18): 2324–2334.
- [10] Kuang W, Tan J, Duan Y, et al. Cyclic stretch induced miR-146a upregulation delays C2C12 myogenic differentiation through inhibition of Numb. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(2): 259–263.
- [11] Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, et al. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(6): 497–505.
- [12] Zhao S, Zhang J, Hou X, et al. OLFML3 expression is decreased during prenatal muscle development and regulated by microRNA-155 in pigs. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(4): 459–469.
- [13] Schnorrer F, Dickson BJ. Muscle building; mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev Cell*, 2004, 7(1): 9–20.
- [14] Mathew SJ, Hansen JM, Merrell AJ, et al. Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development*, 2011, 138(2): 371–384.
- [15] Cong F, Ku L. Computational analysis of miRNA and target mRNA interactions: combined effects of the quantity and quality of their binding site. *Progr Biochem Biophys*, 2009, 35(5): 608–615.
- [16] Didiano D, Hobert O. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *RNA*, 2008, 14(7): 1297–1317.
- [17] von Maltzahn J, Chang NC, Bentzinger CF, et al. Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol*, 2012, 22(11): 602–609.
- [18] Danthinne X, Imperiale MJ. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Therapy*, 2000, 7(20): 1707–1714.
- [19] Ross PJ, Parks RJ. Construction and characterization of adenovirus vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2009, doi: 10.1101/pdb.prot5011.
- [20] Jacobsen F, Hirsch T, Mittler D, et al. Polybrene improves transfection efficacy of recombinant replication-deficient adenovirus in cutaneous cells and burned skin. *J Gene Med*, 2006, 8(2): 138–146.
- [21] Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*, 2000, 57(1): 16–25.
- [22] Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(2): a008342.
- [23] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233.
- [24] Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 2005, 122(4): 553–563.
- [25] Vohradsky J, Panek J, Vomastek T. Numerical modelling of microRNA-mediated mRNA decay identifies novel mechanism of microRNA controlled mRNA downregulation. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(14): 4579–4585.
- [26] Hu W, Collier J. What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function. *Cell Res*, 2012, 22(9): 1322–1324.

(本文责编 郝丽芳)