

miRNA 与热应激的关系及检测方法进展

郭文晋, 连帅, 李悦, 翟骏飞, 张宇辰, 郭景茹, 计红, 甄莉, 杨焕民^{**}

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163000)

【摘要】 热应激是机体长期暴露在热环境中无法充分将体内的热散出而导致机体温度失衡的一种状态。随着 miRNA 检测技术的进步, 许多学者发现, 热应激会导致 miRNA 的表达量发生变化。miRNA 可以通过结合其靶基因, 抑制 miRNA 靶基因的表达, 从而在调控机体生命活动和抗热应激中发挥重要作用。

【关键词】 热应激; miRNA; 靶基因; 抗热应激

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0666-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.021

Development of detection methods and relationship between miRNA and heat stress

GUO Wen-jin, LIAN Shuai, LI Yue, ZHAI Jun-fei, ZHANG Yu-chen,

GUO Jing-ru, JI Hong, ZHEN Li, YANG Huan-min^{**}

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University,
Daqing Heilongjiang 163000, China)

【Abstract】 Heat stress which leads to a state of temperature imbalance caused by long-term exposure of the body in a thermal environment and the body could not adequately dissipate heat. With the progress of the miRNA measurement technology, many scholars had found that heat stress can lead to a change in the miRNA. expression miRNA can bind its target genes to inhibit the expression of its target genes. That made miRNA to play an important role in the regulation of the body's life activities and anti-heat stress.

【Key words】 Heat Stress; miRNA; Target genes; Anti-heat stress

Corresponding author: YANG Huan-min, E-mail: yanghuanmin@aliyun.com

热应激是机体长期暴露在热环境中无法充分将体内的热散出而导致机体温度失衡的一种状态^[1]。目前全球变暖日益严重,尤其在夏天,动植物很难忍受长时间的高温炙烤,炎热会导致动物中暑、免疫功能下降和生产性能降低,引起植物缺水、干枯甚至死亡,所以热应激的分子水平研究是非常必要的,只有明晰热应激的具体机制才能有针对性的研究相应的抗热应激药物,从而缓解当前热应激对于动植物的不利影响。自1993年Lee等^[2]在秀丽线虫体内发现 miRNA 开始,人们对于 miRNA 功能的探索

就从没有停止过,miRNA 作为一种活跃的小分子非编码 RNA 在许多生命活动中都扮演着重要的角色。众多研究证实 miRNA 与热应激密切相关^[3],在调控机体生长发育中有重要作用。miRNA 这些机制和作用的发现都是依靠着成熟的 miRNA 试验技术,miRNA 的试验技术多是由 RNA 技术发展来的,但是随着人们越来越多的认识到 miRNA 的特殊性,原有的 RNA 试验方法越来越难以满足人们对 miRNA 的探索需求,许多新的研究技术逐渐走进人们的视野。这些新技术为探索 miRNA 在热应激中的分子

【基金项目】 国家自然科学基金项目资助(批准号:31372398);教育部博士点导师基金(编号:20132305110004);黑龙江省自然科学基金面上项目(C2015041);黑龙江省教育厅重点实验室开放课题(AMKL201302)。

【作者简介】 郭文晋(1990-),男,硕士研究生,专业:动物应激生理学。E-mail: guowenjin2008@126.com

【通讯作者】 杨焕民(1956-),男,教授,研究方向:动物应激生理学 E-mail: yanghuanmin@aliyun.com

机制奠定了基础。

1 miRNA 与热应激

近年来对于 miRNA 与热应激之间关系的探索越来越多,许多学者认识到 miRNA 在热应激发生机制、抗热应激和热应激标志物筛选中的巨大潜在意义。2012 年 Chen 等^[4]应用深度测序技术对热应激下的毛白杨进行了全基因组测序,共鉴定出来自 30 个 miRNA 家族的 134 种保守 miRNA 和来自 14 个 miRNA 家族中的 16 种未知 miRNA。在这些 miRNA 中共有 52 种 miRNA 出现了调节异常,其中上调的 miRNA 有 41 种,下调的 miRNA 有 11 种;对比同年在毛白杨冷应激的研究结果发现有些 miRNA 在两种条件下都出现了上调比如 pto-miR-167 和 pto-miR-1450^[5],还有一些出现了相反的调节趋势比如 pto-miR-171,这表明有些 miRNA 在不同温度应激中可能扮演着不同的调控角色,而有些 miRNA 在不同温度应激中所负责调控的生物学功能可能是相同的,其调控作用也是相似的。

2012 年 Yu 等^[6]对芜菁热刺激 1 h (46℃) 之后进行深度测序发现,芜菁至少有 35 种保守的 miRNA 家族与拟南芥相似,其中五个 miRNA 家族与热应激有关,对这 5 种 miRNA 进行 RNA 印迹杂交和 RT-PCR 检测发现 bra-miR-398a 和 bra-miR-398b 出现了热抑制,其靶基因为 BracCSD1,而 bra-miR-156h 和 bra-miR-156g 则出现了热诱导情况,其靶基因 BracSPL2 出现了下调的情况,表明 miRNA 可能在热应激时对芜菁起到一定调控作用,扩大了我们对于植物中 miRNA 调控作用的研究视角。2014 年 Li 等^[7]通过对热处理水稻和正常水稻进行深度测序发现了 294 种保守的 miRNA 和 539 种新的 miRNA,其中有 26 种 miRNA 表达下调,21 种 miRNA 表达上调,通过对其中表达差异最为显著的五种 miRNA 进行 qRT-PCR 验证,发现 miR-529 在热应激水稻中出现了极显著 ($P < 0.01$) 下调,这与 Gupta 等^[8]的研究正好互相印证,Gupta 等发现 miR-529 在冷应激中表达量极显著 ($P < 0.01$) 上调,说明 miR-529 是一种温度敏感的 miRNA,且具有一定的保守性,再通过对 miR-529 的靶基因进行生物信息学分析发现,其中一些靶基因集中在细胞生长、发育和凋亡的整个过程中,可以说参与了整个植物体的生长发育过程,对于调控机体的抗热应激作用具有重大意义。这一发现使得人们逐渐认识到 miRNA 在热应激中特异性作用。

miRNA 不仅在植物热应激中发挥作用,在动物

热应激中的研究也有很多,2013 年,Islam 等^[9]应用微流体芯片技术对热耐受小鼠和非热耐受小鼠测序共发现 61 种特异性的 miRNA 和 3081 种 mRNA,将 miRNA 和 mRNA 的测序结果进行合并分析发现 8 种与耐热相关的 miRNA,其中 miR-199a-3p 和 miR-34a-5p 表达最为显著。Zheng 等^[10]在 2014 年发现热应激荷斯坦奶牛血清中保守的 486 个 miRNA 中有 52 个出现差异表达,通过 qRT-PCR 和深度测序法验证的 12 个 miRNA 中有 8 个 miRNA (miR-19a、miR-19b、miR-27b、miR-30a-5p、miR-181a、miR-181b、miR-345-3 和 miR-1246) 表达量显著升高,这些 miRNA 所调控的 mRNA 都集中在与应激和免疫相关的信号通路上,这一研究表明 miRNA 与热应激密切相关,其靶基因信号通路的研究能够很好证明 miRNA 在热应激中重要调节作用,也为未来荷斯坦奶牛热应激的研究指明了方向。2015 年 Morey 等^[11]发现热应激发生时 miR-23a 能够调控 CDK5 的表达,miR-23a 表达量的降低使 CDK5 蛋白的表达量升高以抵抗热应激反应,CDK5 是一种细胞周期素依赖蛋白,主要调控细胞运动功能和起到细胞抗损伤的作用,miRNA 的这种调控功能证实了其在细胞水平抗热应激的重要作用,对于后期抗热应激药物的研发和制备指明了方向。2015 年 Tang 等^[12]从蛋白水平揭示了肉鸡热应激的调控机制,其整个调控网络中绝大部分蛋白的 mRNA 被 miRNA 所调控着,miRNA 在其中扮演着非常重要的调控角色,蛋白水平热应激机制的发现可以说为未来 miRNA 水平的热应激研究奠定了基础。热应激不仅在动植物中有所研究,在微生物中 miRNA 的抗热应激作用也不可忽视,最近就有研究表明热应激益生菌中 IL-10 表达量与 miR-27a 密切相关^[13],这一研究更是将 miRNA、热应激与免疫联系起来,从 miRNA 角度揭示了一部分热应激引起免疫功能异常的机制。

2 热应激中 miRNA 分子机制的研究方法

miRNA 与热应激的密切关系驱使着越来越多的人对其进行探索和研究,如何科学的进行 miRNA 的探索成了必须的研究课题,miRNA 的研究主要包括 miRNA 的定量检测、靶基因预测和靶基因验证,通过这三步可以筛选出热应激时 miRNA 的靶基因,从而确定 miRNA 的作用机制和抗热应激意义。

2.1 miRNA 的定量检测

2.1.1 Northern blotting

Ferdinando Fiumara 等在 2015 年应用此种方法

对 miR-22 的表达水平进行了检测。Northern blotting 是一种经典的检验 miRNA 的方法,它能够检测各个组织和器官中 RNA 的量、大小以及估计其丰度,此方法灵敏度高,通过结合 RNA marker 可以检测出 miRNA 片段的大小,能够排除实验中其他小分子 RNA 的干扰,但是此方法对样品的要求量高,步骤繁琐^[14]。

2.1.2 微阵列芯片技术(Microarray)

也叫基因芯片技术,是一种平面的基质载体,上面规则地、特异性地吸附着基因或者基因产物,并且通过与荧光标记过的样本杂交,产生荧光信号,根据荧光信号的强弱即可判断对应基因的表达丰度。此方法的检测样本量大但是信息的稳定性和可重复性差,不能区分高度相似的 miRNA^[15]。

2.1.3 原位杂交

该技术可以更加直观的观测到 miRNA 的表达时间、表达分布范围和具体位置等。但是由于 miRNA 分子太小,需要对传统的原位杂交技术进行改进,以增加其亲和性和结合牢固性,防止洗脱过程中出现分子丢失,造成结果不准确^[16]。

2.1.4 qRT-PCR

Zerlinger 等^[17]应用 qRT-PCR 的方法对血清中的癌症标志物进行筛选。实时荧光定量 PCR 技术的灵敏度和特异性都很强,对于低表达的 miRNA 也能高效的检测出来,适用于高通量筛选,但是经过 PCR 扩增后很容易造成 miRNA 表达量失真,也无法预测未知的 miRNA,国内大多数实验室都在采用这种方法,qRT-PCR 法也是最简单的检测 miRNA 的方法之一。

2.1.5 高通量测序技术(high throughput sequencing, HTS)

又叫下一代测序技术(next-generation sequencing technology, NGS)或者深度测序(deep sequencing),这一技术能够直接对样本中特定大小的 miRNA 进行高通量测序,可以在无需任何 miRNA 序列信息的前提下研究 miRNA 的表达谱,并发现和鉴定新的 miRNA,是目前应用最广泛的 miRNA 筛选技术。这一技术的诞生可以说是基因组学研究领域的一个具有里程碑意义的事件^[18],也促使广大科研工作者们大批量的筛选热应激中表达异常的 miRNA,从而为后续对 miRNA 分子机制的研究奠定了基础。

2.1.6 电化学技术

Tian 等^[19]在 2015 年设计了一种超灵敏电化学技术,这种检测方法通过设计固相 RCA 的方法,将纳米碳管作为固体基质,上面集成一个发夹结构的

探针去识别 miRNA。这是一种新兴的 miRNA 检测技术,非常适合 miRNA 标志物的筛选具有极高的特异性和灵敏度,这种方法能够检测 miRNA 的序列其检测极限是 1.2fM。

2.1.7 微流控芯片技术

是一种新型的 miRNA 检测技术,与传统方法相比其所需时间大大减少,能够准确快速的在 20 min 内对未标记的 miRNA 进行检测,适用于 POC 诊断^[20],这一技术的发展对于寻找热应激标志物和快速确定动植物热应激状态有重要意义。

2.2 miRNA 靶基因的筛选

通过上述试验方法对 miRNA 进行定量检测以后就可以把表达量有差异的 miRNA 进行生物信息学分析,通过预测软件和 miRNA 数据库,对所得 miRNA 进行分析和预测,预测的主要内容是靶基因的结合性和热稳定性等,比较常见的 miRNA 预测软件是 miRanda、TargetScan、miRNA.org、Pictar 和 miR-Walk 等等。由于预测软件的敏感度和特异性都有待改善,很多时候给出的靶基因非常多而且很难筛选,我们可以通过试验的方法对 miRNA 的靶基因进行进一步验证,利用 miRNA 与其靶基因呈负相关的特性,通过过表达或者抑制 miRNA 以观察其靶基因的表达情况,将呈负相关的靶基因进行筛选和统计,再根据其生物学功能选出目标靶基因^[21]。

2.3 miRNA 靶基因的验证

靶基因的验证是 miRNA 机制研究中最困难的一个阶段,根据所预测靶基因的自由能结合能力以及生物学功能,选出符合标准的目标靶基因进行靶基因验证。

2.3.1 双荧光素酶报告基因

目前,最常用且有效的方法就是双荧光素酶报告基因(dual luciferase reporter, DLR)^[22],通过构建含有荧光素酶的载体将 miRNA 与靶基因结合,根据 miRNA 与靶基因的结合效率来判断两者是否能够结合。

2.3.2 miRNA 交联和免疫沉淀反应(miR-CLIP)

一种可以捕捉 miRNA 瞬时表达量的方法,这种方法已经在希拉细胞(HeLa cells)上建立,为了寻找 miR-106a 的靶基因,这种方法不仅证实了许多在 TargetScan 上预测到的 miR-106a 的靶基因,还发现了许多新的靶基因^[23]。这一技术的发明与发现为大规模研究 miRNA 的抗热应激机制提供了有效的途径。

3 结论与展望

近五年来,大量高通量测序技术在 miRNA 与热应激研究中的应用,使得人们对 miRNA 在不同物种间表达情况以及它们的特异性调节功能有了一个全新的认识。综合众多热应激相关的研究成果不难发现,miRNA 与热应激密切相关,机体内外环境温度升高会影响自身 miRNA 的表达量,从而实现其对靶基因和靶蛋白的调控,进而影响机体热应激时的状态,可以说环境温度的升高决定着 miRNA 表达的特异性、时序性和集中性^[24]。虽然目前 miRNA 与热应激的研究越来越多,但是对于 miRNA 是如何在热应激中发挥作用的人们还是知之甚少。相信随着分子生物学技术的日益发展,热应激与 miRNA 之间的作用关系终将被揭开,而这些基础研究也为明晰热应激机制和筛选热应激标志物奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Bernabucci U, Biffani S, Buggiotti L, et al. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle[J]. J Dairy Sci, 2014, 97(1): 471–486.
- [2] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. Lee, RC, et al. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-4 [J]. Cell, 1995, 75: 843–854.
- [3] Zhang R, Zhang Q, Niu J, et al. Screening of microRNAs associated with Alzheimer's disease using oxidative stress cell model and different strains of senescence accelerated mice[J]. J Neurol Sci, 2014, 338(1–2): 57–64.
- [4] Chen L, Ren Y, Zhang Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of heat-responsive and novel microRNAs in Populus tomentosa [J]. Gene, 2012, 504(2): 160–165.
- [5] Chen L, Zhang Y, Ren Y, et al. Genome-wide identification of cold-responsive and new microRNAs in Populus tomentosa by high-throughput sequencing [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(2): 892–896.
- [6] Yu X, Wang H, Lu Y, et al. Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in Brassica rapa [J]. J Exp Botany, 2012, 63(2): 1025–1038.
- [7] Li J, Wu L Q, Zheng W Y, et al. Genome-wide identification of microRNAs responsive to high temperature in rice (Oryza sativa) by high-throughput deep sequencing [J]. J Agronomy Crop Sci, 2014, 201(5): 379–388.
- [8] Gupta OP, Meena NL, Sharma I, et al. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat [J]. Mol Biol Reports, 2014, 41(7): 4623–4629.
- [9] Islam A, Deuster PA, Devaney JM, et al. An exploration of heat tolerance in mice utilizing mRNA and microRNA expression analysis [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72258.
- [10] Zheng Y, Chen K, Zheng X, et al. Identification and bioinformatics analysis of microRNAs associated with stress and immune response in serum of heat-stressed and normal Holstein cows[J]. Cell Stress Chaperones, 2014, 19(6): 973–981.
- [11] Morey TM, Roufayel R, Johnston DS, et al. Heat shock inhibition of CDK5 increases NOXA levels through miR-23a repression [J]. J Biol Chem, 2015, 290(18): 11443–11454.
- [12] Tang XF, Meng QS, Gao J, et al. Label-free quantitative analysis of changes in broiler liver proteins under heat stress using SWATH-MS technology [J]. Sci Reports, 2015, Article number 15119.
- [13] Demont A, Hacini-Rachinel F, Doucet-Ladevèze R, et al. Live and heat-treated probiotics differently modulate IL10 mRNA stabilization and microRNA expression [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(4): 1264–1267.
- [14] Fiumara F, Rajasethupathy P, Antonov I, et al. MicroRNA-22 gates long-term heterosynaptic plasticity in Aplysia through presynaptic regulation of CPEB and downstream targets [J]. Cell reports, 2015, 11(12): 1866–1875.
- [15] Woolley AT. ABC Spotlight on emerging microRNA analysis methods [J]. Analyt Bioanal Chem, 2015, 407(22): 6579–6581.
- [16] Li J, Li X, Li Y, et al. Cell-specific detection of miR-375 down-regulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53582.
- [17] Zeringer EM, Rai AJ, DeCastro J, et al. A complete workflow for high throughput isolation of serum microRNAs and downstream analysis by qRT-PCR: application to cancer biomarker discovery [J]. Cancer Res, 2015, 75(15 Suppl): 3387–3387.
- [18] Itesako T, Seki N, Yoshino H, et al. The microRNA expression signature of bladder cancer by deep sequencing: the functional significance of the miR-195/497 cluster [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e84311.
- [19] Tian Q, Wang Y, Deng R, et al. Carbon nanotube enhanced label-free detection of microRNAs based on hairpin probe triggered solid-phase rolling-circle amplification [J]. Nanoscale, 2015, 7(3): 987–993.
- [20] Ishihara R, Hasegawa K, Hosokawa K, et al. Multiplex microRNA detection on a power-free microfluidic chip with laminar flow-assisted dendritic amplification [J]. Analyt Sci, 2015, 31(7): 573–576.
- [21] Doecke JD, Chekouo TT, Stingo F, et al. miRNA target gene identification: Sourcing miRNA target gene relationships for the analyses of TCGA Illumina MiSeq and RNA-Seq Hiseq platform data [J]. Int J Human Genet, 2014, 14: 17–22.
- [22] Wolter JM, Kotagama K, Babb CS, et al. Detection of miRNA targets in high-throughput using the 3' LIFE assay [J]. J Vis Exp, 2015 (99): e52647.
- [23] Grimson A. Noncoding RNA: Linking microRNAs to their targets [J]. Nat Chem Biol, 2015, 11(2): 100–101.
- [24] Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. [J]. Essays Biochem, 2013, 54: 29–38.

[收稿日期] 2016–05–24