

论著 · 实验研究

miRNA-126/miRNA-126* 在大鼠
正常胎肺发育过程中的作用

杨洋¹ 阚清¹ 邱洁¹ 浦晓丹¹ 张盼² 张晓群² 周晓玉¹

(1. 南京医科大学附属南京儿童医院新生儿科, 江苏 南京 210008; 2. 南京医科大学儿科研究所, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的** 探讨 miRNA-126/miRNA-126* 在大鼠胎肺发育中的表达水平及其作用。**方法** 12 只孕鼠随机分为 3 组, 每组 4 只, 3 组仔鼠分别于胎龄 16 d、19 d 组和 21 d 时取出, 运用苏木精-伊红染色在仔鼠胎肺发育的这 3 个关键时期对胎肺进行形态学观察, 随后通过建立 microRNA (miRNA) 芯片, 了解 miRNA-126/miRNA-126* 在 3 组仔鼠胎肺中的基本表达趋势, 进而挑选出 miRNA-126* 并应用 real-time PCR 对其表达水平进一步研究。**结果** miRNA-126 在 3 组芯片间表达无明显差异, 而 miRNA-126* 随着肺发育进程表达量逐渐上升; 采用 real-time PCR 对 miRNA-126* 表达进行进一步检测, 结果亦显示 miRNA-126* 随着肺发育进程表达量逐渐上升, 组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** miRNA-126* 可能在大鼠胎肺发育中起着重要作用。

[中国当代儿科杂志, 2012, 14(9): 708-712]

[关键词] 肺发育; miRNA-126*; miRNA-126; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)09-0708-05

Role of miRNA-126/miRNA-126* in the fetal lung development of rats

YANG Yang, KAN Qing, QIU Jie, PU Xiao-Dan, ZHANG Pan, ZHANG Xiao-Qun, ZHOU Xiao-Yu. Department of Neonatology, Nanjing Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China (Zhou X-Y, Email: xyzhou161@163.com)

Abstract: Objective To investigate the expression and role of miRNA-126/miRNA-126* in the fetal lung development of rats. **Methods** Twelve pregnant Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups and the fetal rats were removed at 16, 19 and 21 days of gestation respectively. Hematoxylin and eosin staining was performed to observe lung morphology of fetal rats. Then microRNA (miRNA) microarray was used to study the expression patterns of miRNA-126/miRNA-126* in fetal lungs at the three time points. And miRNA-126* was selected for further study by real-time PCR. **Results** There was no evident difference in the expression of miRNA-126 among the three groups, however the expression level of miRNA-126* increased gradually as the fetal lung developed. The real-time PCR result further showed that expression of miRNA-126* increased gradually with lung development, displaying significant differences among the three groups ($P < 0.05$). **Conclusions** miRNA-126* may play an important role in development of the fetal lung in rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(9): 708-712]

Key words: Lung development; miRNA-126*; miRNA-126; Rats

作为一类新近发现的调控分子, microRNAs (miRNAs) 在细胞增殖、分化及凋亡等众多生理过程中都扮演着重要角色^[1-3]。而至于它们的作用机制现已得到基本认同, 即 miRNA 可以同其特定的靶向 mRNA 结合, 形成紧密的互补结构, 最终导致 mRNA 的降解及翻译、表达受阻^[4]。

近年来有研究显示这些小 RNA 调控分子可以调节组织器官的发育^[5], 却很少有研究涉及胎肺发

育时 miRNA 的表达情况, 即使有少数报道, 其热点也主要局限于为数不多的几个 miRNAs, 如 Let-7 家族、miRNA-17-92 簇等。如今随着芯片技术的发展及对肺发育机制理解的加深, 更多有意义的 miRNA 尚待发现和研究, 如 miRNA-126/miRNA-126*, 有研究发现在由小鼠胚胎干细胞演化而来的上皮细胞内 miRNA-126 和 miRNA-126* 均有高表达表现^[6]。因此, 我们推断 miRNA-126/miRNA-126* 在胚胎肺发

[收稿日期] 2012-04-01; [修回日期] 2012-05-02

[基金项目] 江苏省卫生厅面上项目 (No. H200642)。

[作者简介] 杨洋, 硕士, 住院医师。

[通信作者] 周晓玉, 教授, 主任医师。

育过程中也有同样的高表达表现,且可能是通过促进内皮细胞功能来发挥作用的。

在本实验中,我们首先采用最新的 miRCURY™ 核酸锁芯片(v. 16.0)(包含有超过 1891 个探针),以期在胎肺发育后期探明 miRNA-126/miRNA-126* 的具体表达方式,后挑选出我们感兴趣的 miRNA 进一步研究以尝试阐明其可能涉及的发育机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年 Sprague-Dawley 大鼠 24 只,购自南京医科大学动物实验中心,其中雌雄各 12 只,饲养在南京医科大学动物中心 SPF 环境中。将雌雄鼠按 1:1 合笼,次日雌鼠见阴栓计为孕 1 d。将 12 只孕鼠随机分为 3 组,分别是 S1、S2、S3 组,每组 4 只。3 组分别在仔鼠胎龄为 16 d、19 d 和 21 d 时应用水合氯醛处死妊娠母鼠,立即取出所有胎肺组织,并尽可能去除多余杂质组织。随后,应用 PBS 漂洗胎肺组织,每组保留一份胎肺用于形态学观察。剩余组织应用 Trizol (Invitrogen 公司)和 miRNeasy mini kit (Qiagen 公司)抽提总 RNA。RNA 质量采用分光光度计(ND-1000, Nanodrop Technologies 公司)进行检测。

1.2 形态学观察

3 组胎肺组织均应用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,行 4 μm 连续切片。随后切片行苏木精-伊红(HE)染色,每个肺组织随机选取 6 张切片,每张切片随机选取 6 个视野置于光学显微镜下(×40 倍),观察 3 组间胎肺组织形态学结构变化。

1.3 miRNA 芯片

各组胎肺组织进行 RNA 提取后,采用 miRCU-

RY™ Hy3™/Hy5™ 标记 (Exiqon, Vedbaek, Denmark)以进行探针筛查。随后在杂交体系中(Nimblegen Systems, Inc., Madison, WI, USA)置于 56℃ 下 16~20 h,进而促使激活反应,并且保持恒定的孵育温度以提升杂交的一致性和信号的灵敏度。最后在离心机上采用 400 rpm 离心 5 min。随后将这些切片通过芯片扫描系统(Axon Instruments, Foster City, CA)进行扫描观察。扫描图随后输入 GenePix Pro 6.0 软件进行数据分析。

1.4 Real-time PCR

各组胎肺中总 RNA 采用 Trizol 进行提取。单链 cDNA 的合成步骤如下:反转录混合物包含有 1 μg 总 RNA, 1 μM rno-miRNA 反转录引物 0.3 μL (表 1), 200 U/μL MMLV 逆转录酶 0.1 μL (Epicentre 公司), 2 μL 10 × RT 缓冲液, 2 μL dNTP 混合物, 40 U/μL 核糖核酸酶抑制剂 0.3 μL (Epicentre 公司), 补充 ddH₂O 至 20 μL;反应条件为 16℃ 下 30 min, 42℃ 下 40 min, 85℃ 下 5 min。在 real-time PCR 过程中,反应混合物包括 1 μL cDNA, 2.5 μL 10 × PCR 缓冲液(Promega 公司), 1 单位 Taq 酶(Promega 公司), 终浓度为 0.25 × Sybergreen1 (Invitrogen)12.5 μL 及 2 μL 引物(表 2), 补充 ddH₂O 至 25 μL;采用 U6 snRNA 作为内参照,通过 Rotor-Gene 3000 (Corbett Research 公司)real-time PCR 系统进行反应,反应条件为 95℃ 10 min; 95℃ 10 s, 60℃ 60 s(收集荧光),循环 40 次;扩增反应结束后,按 95℃ 10 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s 反应 1 次;最后从 60℃ 缓慢加热到 99℃。PCR 的结果采用 threshold cycle (Ct)进行计算,而每个 miRNA 的相对表达量则采用 2^{-(CtmiRNA-CtU6)} 进行比较。

表 1 反转录引物序列

miRNA 名称	反转录引物序列
U6	5'-CGCTTCACGAATTTCGCTGCAT-3'
rno-miR-126*	5'-GTCGTATCCAGTGGCTGTCTGTGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACCGCGTA-3'

表 2 Real-time PCR 引物序列

miRNA 名称	引物序列	退火温度
U6	上游引物:5'-GCTTCGCGCAGCATATACTAAAT-3'	60℃
	下游引物:5'-CGCTTCACGAATTTCGCTGCAT-3'	
rno-miR-126*	上游引物:5'-GGGCATTATTACTTTTGG-3'	60℃
	下游引物:5'-TCCGTGTCGTGGAGTC-3'	

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学分

析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组胎肺组织形态学观察

在 S1 组中,肺上皮细胞开始分化成原始的气泡腔体样结构,间质部分非常致密(图 1A);在 S2 组中,

肺腺泡腔迅速扩大,间质组织较前变薄,并排列成条索状(图1B);在S3组中,更多成熟的肺泡出现,围绕在支气管周围,而间质比前两组更为稀疏(图1C)。

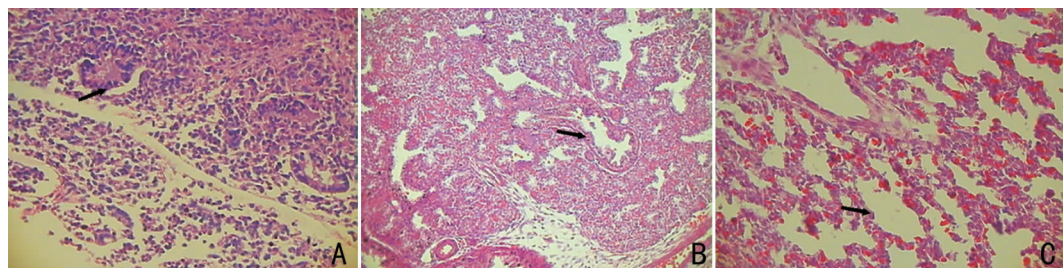


图1 3组胎肺组织光镜下形态学变化(苏木精-伊红染色,×40) A为孕16 d组,可见原始气泡腔体样结构(箭头所示); B为孕19 d组,可见腺泡腔扩大,成条索样排列,间质变薄(箭头所示);C为孕21 d组,可见肺泡明显扩大而间质更为菲薄(箭头所示)。

2.2 miRNA 芯片检测 3 组间 miRNA-126/miRNA-126* 表达水平

miRNA 芯片检测结果显示 miRNA-126 在 3 组间相对表达较为稳定;而 miRNA-126* 在 3 组间则表现出了明显的表达差异,并依胎龄的增加其表达量呈逐渐上升。见图 2。

2.3 Real-time PCR 检测 3 组间 miRNA-126* 表达水平

Real-time PCR 检测结果显示 miRNA-126* 表达水平在 3 组间随胎龄增加呈上升趋势($P < 0.05$),与芯片结果所示趋势相一致。见图 3。

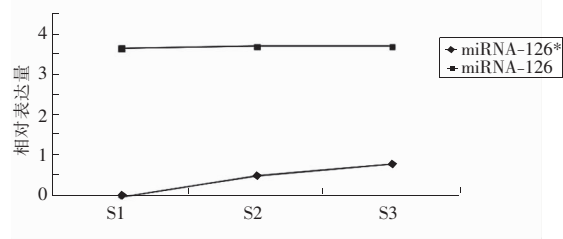


图2 芯片中 miRNA-126 及 miRNA-126* 在 3 组间的差异表达情况 S1 组为胎龄 16 d 组,S2 组为胎龄 19 d 组,S3 组为胎龄 21 d 组。miRNA-126* 随着肺发育进程表达量逐渐上升,而 miRNA-126 的相对表达量在 3 组间未表现出明显差异。

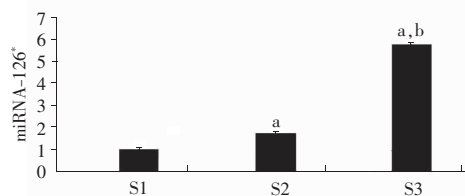


图3 Real-time PCR 检测 3 组间 miRNA-126* 表达水平 S1 组为胎龄 16 d 组($n = 60$),S2 组为胎龄 19 d 组($n = 56$),S3 组为胎龄 21 d 组($n = 58$)。miRNA-126* 表达水平在 3 组间随胎龄增加呈上升趋势($P < 0.05$),与芯片结果一致。a: 与 S1 组比较, $P < 0.05$;b: 与 S2 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

大鼠胎肺发育包含 5 个阶段^[7-8],分别为胚芽期(胎龄第 1~13 天),假腺管期(第 13~18 天),小管期(第 18~20 天),囊泡期(第 20 天~足月)及肺泡期(足月至生后 5 d)。其中第 19 天是 II 型肺上皮细胞开始分化出现的时期,而 II 型肺上皮细胞的产生又与表面活性物质的分泌等紧密相关,是胎肺发育的一个关键点。因而本实验挑选了胎龄 19 d 前后共 3 个时间点(胎龄 16 d、胎龄 19 d、胎龄 21 d),以期反映正常大鼠胚胎肺发育的后期阶段。

在肺发育领域,既往研究较多的是一些有着重要地位的经典的 miRNAs,如 Let-7 家族等。在本实验中,我们采用最新的芯片技术筛查了 miRNA-126/miRNA-126*,这两者之前几乎从未在肺发育中被提及。miRNA-126/miRNA-126* 来自于同一基因区带(均定位于 *Egfl7* 基因的 9 号内含子上),首先被发现的是较为常见的 miRNA-126(即 miRNA-126-3p)^[9],随后人们探明了另一类 miRNA-126,其是由具有同一前体形式 miRNA 的 5'端处理而来,因此被命名为 miRNA-126* (即 miRNA-126-5p)。

由于二者均由同一初级 miRNA 转化而来,同时研究发现在小鼠胚胎干细胞演化而来的上皮细胞内 miRNA-126 和 miRNA-126* 也均有高表达^[6]。因此,它们在调控胚胎血管生成及维持血管完整性方面可能起着重要作用^[6,10]。但是既往研究中二者的相关性主要局限于癌症发病机制中。其中由于 miRNA-126 可以作用于癌症组织中血管内皮生长因子(VEGFA),Spred-1 以及磷酸肌醇-3-激酶(PI3K),其表达水平在人类乳腺癌中呈下降趋势。与之相对的是,在体外肺癌组织中,miRNA-126 则表现出上

调,并可减缓某些肺癌细胞系细胞的生长速率^[11]。另外,Liu等^[12]则集中研究了由LV-mir-126转染的肺癌细胞系及其他3种细胞系,结果发现miRNA-126可以有效地减少VEGF的表达,并且可作为潜在的肿瘤抑制剂阻滞细胞增殖。与此同时,其他两位研究者则证明了miRNA-126作为肿瘤抑制剂主要是基于其对禽类肉瘤病毒-10调控激酶(Crk)的调控,而Crk在肺癌中往往被认为同肿瘤侵蚀性有关^[13-14]。以上这些均提示了miRNA-126/miRNA-126*不仅在胚胎发育血管生成方面,而且在癌症方面也有重要的作用。Musiyenko等^[15]曾报道Egfl7的天然缺陷可致其内含子miRNA(miRNA-126*)的缺失,致使前列腺素高表达,进而间接促进了LNCaP前列腺癌细胞的侵蚀性。这是有关miRNA-126*为数不多的报道之一。

已知内含子占有真核生物基因组的绝大多数部分,并且既往一直被认为是没有功能的^[16-17],但随着近来内含子miRNA的发现,研究者渐渐意识到原先被剔除的“无功能”内含子可能确有一定的作用,正如编码miRNA-126/miRNA-126*的Egfl7基因中9号内含子一样,现已不止一次被证明其在血管相关的组织细胞增殖中呈高水平表达,且在包括肺脏在内的特定器官里含量十分丰富^[18-20]。另外,即使在几年前,人们尚认为在miRNA发生机制中,RNA的一条链优先与沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC)结合,而另一条链(miRNA*)常被认为无功能而被降解^[21]。但是近些年来,随着大规模RNA测序研究增多,miRNA*的发现也越来越多。就miRNA-126和miRNA-126*而言,两者都曾被测得在同一组织中有高表达,并发挥着同样重要的作用^[22]。实际上,miRNA的两条链存在高度的组织特异性,且两条链均能各自有效地抑制其自身靶基因^[23-24]。所以同miRNA-126相比,miRNA-126*在某些方面可能也有其自身的特定功能^[25]。除此之外,由于miRNA-126/miRNA-126*均来源于Egfl7基因,且共有一条mRNA,故在之前报道中,两者的表达水平似乎一直是呈平行相关的^[13,26]。然而,现今有少数研究报道miRNA-126的表达调控部分是独立于EGFL7蛋白之外的^[27],因而表明可能存在独立的启动子分别调控miRNA-126和miRNA-126*,这也进一步说明两者可能拥有不同的信号通路和生理机制,并发挥着各自不同的作用。

在本实验中,经过芯片筛查,我们发现在3组间miRNA-126并没有表现出如同miRNA-126*一样的差异表达及上调趋势,而是在3个时间点间呈现稳

定表达,这进一步证实了上述的猜测。而且随后real-time PCR的结果也表明miRNA-126*的表达在3组间差异均具有统计学意义。事实上,这是第一次在胎肺发育中报道miRNA-126*随着肺发育过程存在差异表达及上调趋势。根据这些结果,我们推测miRNA-126*可能在胎肺发育过程中扮演着重要的角色。既往对miRNA-126和miRNA-126*的研究主要局限于癌症领域,但是在胚胎期的细胞同癌症细胞在某些方面往往具有共性,如高度快速的分裂增殖能力等。miRNA-126/126*在癌症组织中的高表达水平已被证实同其在血管发生方面的作用密不可分,因此当在论及胚胎发育时,这两类miRNAs可能通过同样的机制来促进胎肺的发育成熟。

当今临床上随着机械通气的广泛应用,发生呼吸窘迫综合征的早产儿、极低出生体重儿抢救成活率大大提高,但相关肺发育疾病的发生率也随之升高^[28]。本实验的推论或许有助于阐明miRNA-126*在大鼠胎肺发育中所起的重要作用,并且对于以后进一步研究新生儿肺发育相关疾病(如支气管肺发育不良等)提供一定的理论基础。

[参 考 文 献]

[1] Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division [J]. Cell, 2005, 122(1): 6-7.

[2] Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer; small molecules with a huge impact[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(34): 5848-5856.

[3] Lee RC, Feinbaum RL, 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.

[4] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. Mol Cell, 2007, 27(1): 91-105.

[5] Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(3): 219-230.

[6] Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity [J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 272-284.

[7] Burri PH. Fetal and postnatal development of the lung[J]. Annu Rev Physiol, 1984, 46: 617-628.

[8] Zoetis T, Hurtt ME. Species comparison of lung development[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2003, 68(2): 121-124.

[9] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue specific microRNAs from mouse [J]. Curr Biol, 2002, 12(9): 735-739.

[10] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 261-271. 14

[11] Liu B, Peng XC, Zheng XL, Wang J, Qin YW. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo[J]. Lung Cancer, 2009, 66(2): 169-

175.

[12] Liu B, Peng XC, Zheng XL, Wang J, Qin YW. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo[J]. Lung Cancer, 2009, 66(2): 169-175.

[13] Crawford M, Brawner E, Batte K, Yu L, Hunter MG, Otterson GA, et al. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373(4): 607-612.

[14] Yang Y, Li X, Yang Q, Wang X, Zhou Y, Jiang T, et al. The role of microRNA in human lung squamous cell carcinoma[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 200(2): 127-133.

[15] Musiyenko A, Bitko V, Barik S. Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates prostein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells[J]. J Mol Med (Berl), 2008, 86(3): 313-322.

[16] Naora H, Deacon NJ. Relationship between the total size of exons and introns in protein-coding genes of higher eukaryotes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79(20): 6196-6200.

[17] Clement JQ, Qian L, Kaplinsky N, Wilkinson MF. The stability and fate of a spliced intron from vertebrate cells[J]. RNA, 1999, 5(2): 206-220.

[18] Parker LH, Schmidt M, Jin SW, Gray AM, Beis D, Pham T, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation[J]. Nature, 2004, 428(6984): 754-758.

[19] Fitch MJ, Campagnolo L, Kuhnert F, Stuhlmann H. EGFL7, a novel epidermal growth factordomain gene expressed in endothelial cells[J]. Dev Dyn, 2004, 230(2): 316-324.

[20] Campagnolo L, Leahy A, Chitnis S, Koschnick S, Fitch MJ, Fallon JT, et al. EGFL7 is a chemoattractant for endothelial cells and is up-regulated in angiogenesis and arterial injury[J]. Am J Pathol, 2005, 167(1): 275-284.

[21] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[22] Saito Y, Friedman JM, Chihara Y, Egger G, Chuang JC, Liang G. Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(3): 726-731.

[23] Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(17): 5944-5953.

[24] Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3'UTR evolution[J]. Nat Struct Mol Biol, 2008, 15(4): 354-363.

[25] Meister J, Schmidt MH. miR-126 and miR-126*: new players in cancer[J]. Scientific World Journal, 2010, 10: 2090-2100.

[26] Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity[J]. Dev Cell, 2008, 15(2): 272-284.

[27] Li X, Shen Y, Ichikawa H, Antes T, Goldberg GS. Regulation of miRNA expression by Src and contact normalization: effects on nonanchored cell growth and migration[J]. Oncogene, 2009, 28(48): 4272-4283.

[28] 陈幽, 韩玉昆, 叶贞治, 卢光进. 呼吸窘迫综合征并发支气管肺发育不良危险因素分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(1): 15-18.

(本文编辑:万静)