

# 农药氟虫腈作用下斑马鱼 miR-155 对 UHRF1 的调控作用

张 杰, 张 凯, 李鹿丰, 郭江峰

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 农药氟虫腈对生物体具有慢性神经毒性,对生态环境具潜在的危险性。通过实验分析不同浓度氟虫腈等农药处理后,miRNA 和相关靶基因在核酸和蛋白水平的表达,有助于明确 miR-155 和相关靶基因在外源化学物质毒理学效应中的作用与关系。本研究以 dre-miR-155 为研究对象,通过生物信息学分析,对其靶标进行预测,结合互补“种子”序列、结合的自由能以及各数据库中的排位等因素,选取所预测靶基因 *UHRF1* 进行研究,并利用荧光定量 PCR、Western blot 从基因和蛋白水平研究 miR-155 对基因 *UHRF1* 的调控作用。结果表明,在氟虫腈的作用下 miR-155 表达上调,*UHRF1* 表达下调;*UHRF1* 蛋白表达量随 miR-155 表达的增加而减少,miR-155 可能对 *UHRF1* 的表达有负调控作用。miR-155 对 *UHRF1* 的调控作用的研究对毒理学、生物医学等领域具有重要意义。

**关键词:** 氟虫腈;miR-155;斑马鱼;*UHRF1*;毒理学;生物医学

**中图分类号:** Q89      **文献标志码:** A

## 0 前 言

根据生态毒理学的观点,化学物质的刺激往往会直接或间接引起基因表达发生改变。农药氟虫腈杀虫效果好,使用范围广,它的大面积使用会对人体健康以及水产养殖带来不良影响。研究表明,氟虫腈能提高啮齿目动物肝代谢功能和刺激甲状腺激素的分泌,进而有诱发甲状腺癌的可能,且具有慢性神经毒性,因此被定为 C 类致癌物质<sup>[1]</sup>。

MicroRNA(miRNA)<sup>[2]</sup>是由长的具有发夹结构的 pri-RNA 分子,经过 Dicer 加工形成的一类非编码的小 RNA 分子(约 21~23 nt)。它能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对,引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译,从而对基因进行转录后表达的调控<sup>[3]</sup>。故准确预测和鉴定其靶基因对于研究 miRNA 的功能具有重要的意义。目前国内外主要利用生物信息学方法和生物学实验预测和鉴定

miRNA 的靶基因<sup>[4-10]</sup>。大量研究表明,miRNA 参与了包括细胞分裂增殖、分化与发育以及代谢等许多重要的生物学过程<sup>[11]</sup>,对基因功能研究、人类疾病防治及生物进化探索有重要意义。

本项目组前期研究利用 miRNA 芯片研究了农药三唑磷微乳剂、氟虫腈微乳剂以及其混合物对斑马鱼的 miRNA 表达的影响<sup>[12]</sup>,结果表明,包括 miR-99、miR-155 在内的 21 条 miRNA 的表达发生了改变。miR-155 是一个具有代表性的多功能 miRNA,参与免疫、炎症、血细胞生成及病毒感染等多种生物学过程<sup>[13]</sup>,且在肿瘤的发生过程中起到癌基因的作用。基因 *UHRF1* 是 miR-155 的准靶基因,*hUHRF1* 在食管癌组织中的表达量显著升高,与食管癌分化程度和患者预后相关<sup>[14]</sup>,并且 *hUHRF1* 基因表达提高可促进乳腺癌细胞 BT-549 的生长<sup>[15]</sup>。近期有研究发现 *UHRF1* 蛋白能通过 PHD 结构域结合二甲基和三甲基的 H3K9 多肽,具

收稿日期: 2013-03-01

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY12B07012);浙江省大学生科技创新活动计划项目(2012R406063)

作者简介: 张 杰(1986-),男,浙江湖州人,硕士研究生,研究方向为:miRNA 靶基因的鉴定和功能研究。

通信作者: 郭江峰,E-mail:jfguo@zstu.edu.cn

有对 DNA 和组蛋白甲基化的双重识别功能<sup>[16]</sup>。

为进一步研究氟虫腈对 miR-155 及其潜在靶基因的表达影响,本研究应用荧光定量 PCR 及 Western blot 等技术研究氟虫腈作用前后 miR-155 及其潜在靶基因 *UHRF1* 以及 *UHRF1* 蛋白的表达情况,为进一步研究 miR-155 的功能及 miR-155 的调控途径奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

氟虫腈由浙江大学农药与环境毒理研究所提供。主要成分为:1% 氟虫腈微乳剂(Fipronil ME, 1% TC),助剂主要成分:乳化剂;助溶剂(聚乙二醇,无水乙醇,正丁醇,水)。

斑马鱼由浙江大学农药与环境毒理研究所提供。22.0℃ 饲养,自然死亡率小于 1%,试验时选取体长 4~5 cm,体形正常、体色发亮、鱼鳞和鱼鳍无破损,游动灵活,捕食敏捷,无任何病态和异常行为的斑马鱼。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 斑马鱼 miR-155 靶基因筛选

本实验对斑马鱼氟虫腈处理后异常表达的 miR-155 体内靶标的预测筛选主要基于生物信息学分析法。从 miRbase (<http://www.mirbase.org>) 中找出已预测报道的靶基因的相关信息并列表,对上述信息靶基因信息采用 miRanda、microCosm 和

RNAhybrid 软件进行计算;筛选出 3 种计算方法中有 2 种计算方法均预测到的 miRNA 结合位点;结合“种子区”匹配情况,碱基配对情况、自由能、物种间的保守性等其它因素,选取相应的准靶基因进行研究。

#### 1.2.2 样本处理

将斑马鱼分成 8 组,每组 10 尾。一组为空白对照,一组为溶剂对照,即将斑马鱼养在浓度不超过万分之一的 DMSO(二甲基亚砷)水溶液中,其余 6 组斑马鱼分别养在氟虫腈浓度为 0.015,0.030,0.060,0.120,0.240,0.480 mg/L 的溶液中。试验期间禁食处理 96 h。

#### 1.2.3 总 RNA 的定量和完整性检测

用 NanoDrop 仪器测定提取的总 RNA 含量,检测 A260/A280 的比值(纯 RNA 的比值在 2.0 左右),以此来判断总 RNA 的纯度,并计算总 RNA 浓度。用 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳对总 RNA 进行完整性检测。

#### 1.2.4 荧光定量 PCR

从数据库 mirbase (<http://www.mirbase.org/>) 查询斑马鱼 miRNA 序列,并登录数据库 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询斑马鱼 *UHRF1* 序列。用 primer premier 5.0 软件设计引物,设计好后登陆 NCBI 对设计的引物进行 Primer blast。除 miRNA 及内参 miR-16 引物外,还需设计另外三对引物,分别是  $\beta$ -Actin、*UHRF1* 和 *UHRF1*-3' UTR 扩增引物(表 1)。

表 1 荧光定量 RT-PCR 所用的引物

miRNA	引物	序列(Sequence(5'-3'))	长度/nt
	sequence	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGG	22
miR-155	dre-miR-155-SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACCCCCTATC	52
	dre-miR-155 Forward	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATT	21
	dre-miR-155 Reverse	GACCTTAATGCTAATCGTGATAGG	24
	dre-miR-16_SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-TCGCACTGGATACGACCAATAT	53
miR-16	dre-miR-16 Forward	TATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT	24
	dre-miR-16 Reverse	GTCAGTAGCAGCACGTAAATATTGGT	26
	sequence	NCBI 序列号(NM_213077)	
<i>UHRF1</i>	<i>UHRF1</i> Forward	GCTGCCAGGAGGTCGTCTATC	21
	<i>UHRF1</i> Reverse	TTTTGCCCAGGTCGTGTCG	9
$\beta$ -Actin	sequence	ACCCACACCGTGCCCATCTATGAGGGT-TACGCTCTCCCATGCCATCCTGCGTCT-GGATCTAGCTGGTCGTGACCTGACAGAC-TACCTGATGAAGATCCTGACCGAGCGTG-GCTACAGCTTCACCACCACAGCCGAAAGAGAAATTGTCCG	152
	$\beta$ -Actin Forward	GGCTTCTGCTCTGTATGGCG	20
	$\beta$ -Actin Reverse	GGAGGGCAAAGTGGTAAACG	20

对总 RNA 的 DNase I (RNase free) 进行消化处理,以总 RNA 为模板进行反转录合成 cDNA,接着进行荧光定量 PCR 反应。在新的 0.20 mL 光学 PCR 反应管中依次加入试剂,反应体系如下:iQ SYBR GRN SUPERMIX 12.50  $\mu$ L, Forward primer (10  $\mu$ M) 1.00  $\mu$ L, Reverse primer (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L, cDNA 10.51  $\mu$ L。

将以上试剂混匀后稍离心,在 ABI 7300 中进行 PCR 反应,反应条件如下:50.0 $^{\circ}$ C 下预热 3 min;95.0 $^{\circ}$ C 下预变性 3 min;95.0 $^{\circ}$ C 下变性 10 s,59.0 $^{\circ}$ C 下退火 20 s,72.0 $^{\circ}$ C 下延伸 20 s,在延伸阶段检测荧光强度收取信号,变性、退火、延伸 3 个步骤共循环 40 余次;在 PCR 反应后,采用以下的程序进行熔解曲线分析:从 70.0 $^{\circ}$ C 到 95.0 $^{\circ}$ C 条件下,每隔 0.5 $^{\circ}$ C 停留 10 s,检测一次荧光强度变化。

### 1.2.5 Western blot

实验以 GAPDH 为内参,分两次进行,分别取得 GAPDH 和 *UHRF1* 蛋白的 Western blot 化学发光显影结果,实验所用抗体如表 2 所示。实验步骤大致如下:用 Western 及 IP 细胞裂解液提取全鱼总蛋白,并用 BCA 法测定蛋白浓度。然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(以 10% 分离胶为例)。先制胶,接着将样品加入 5 $\times$  上样缓冲液混匀,将混合液放在沸水中煮沸 5 min 后迅速冰浴冷却,然后上样,每泳道上样量为 30.0~50.0  $\mu$ g,再进行电泳。电泳后,经过转膜,封闭,孵育一抗,洗膜,孵育二抗,洗膜等步骤,最后将 PVDF 膜放于保鲜膜上,取适量 ECL 试剂盒中等体积的 A 液和 B 液混合,混匀后加在膜的表面,反应 5 min 后,吸去多余液体,移入凝胶成像分析仪中,在化学光敏模式下曝光显影,并用 Image J 对图像进行分析。

表 2 Western blot 所用抗体

抗体	名称	作用蛋白	来源
一抗	UHRF-1 Antibody	UHRF1 蛋白	Abnova
一抗	GAPDH Antibody	GAPDH	Bioworld
二抗	Goat anti-Rabbit IgG-HRP	UHRF1 蛋白	Bioworld
二抗	Goat anti-Mouse IgG-HRP	GAPDH	Bioworld

## 2 结果与分析

### 2.1 靶基因的筛选

从 miRbase (<http://www.miRbase.org/>) 中找出已预测报道的靶基因的相关信息并列表,对上述信息靶基因信息采用 miRanda、microCosm 和 RNAhybrid 软件进行计算;找出 3 种计算方法中有 2 种计算方法均预测到的 miRNA 结合位点;其中

miRanda、microCosm 和 RNAhybrid 都能预测到的 dre-miR-155 靶基因共 233 条。

从中筛选出种子区完全匹配的靶基因,其中结合较好的靶基因有 *UHRF1*、*fzd8b*、*zgc:73210* 等,结合碱基配对情况、自由能、物种间的保守性等其它因素,选取 *UHRF1* 进行实验。

### 2.2 不同浓度氟虫腈处理后 miR-155 及 *UHRF1* 的表达变化

对 miRNA 和 mRNA 进行荧光定量 PCR 测定,并对不同处理斑马鱼 miR-155、*UHRF1* 的差异性表达进行分析。

本研究通过统计多个样本(生物学重复)的多次实验(技术性重复)得出各实验组 miR-155 和基因 *UHRF1* 的平均表达量,并分别除以溶剂对照组(DMSO 组)miR-155 和基因 *UHRF1* 的平均表达量,得出各实验组 miR-155 和基因 *UHRF1* 的相对表达量。如 0.240 mg/L 氟虫腈处理组,miR-155 的相对表达量为  $3.3801 \pm 0.4004$  大于 DMSO 组 miR-155 的相对表达量  $1.0000 \pm 0.1117$ ,而 0.240 mg/L 氟虫腈处理组基因 *UHRF1* 的相对表达量为  $0.2192 \pm 0.0763$  远小于 DMSO 组的相对表达量  $1.0000 \pm 0.2172$ ,*UHRF1* 的相对表达量随 miR-155 相对表达量的增加而减少。但与此同时 0.48 mg/L 氟虫腈处理组的 miR-155 和基因 *UHRF1* 的相对表达量变化却并不是十分明显。主要是由于基因表达受复杂网络调控,即便 *UHRF1* 是 miR-155 的直接靶标,它也不能随 miR-155 直接相应地变化,因为还受到其他因素的影响;所以虽然 miR-155 调控 *UHRF1*,但是 *UHRF1* 的变化幅度与 miR-155 的变化幅度可能存在差异。

再结合各实验组 miR-155 和基因 *UHRF1* 的相对表达量的方差,得到的实验结果如图 1 所示。

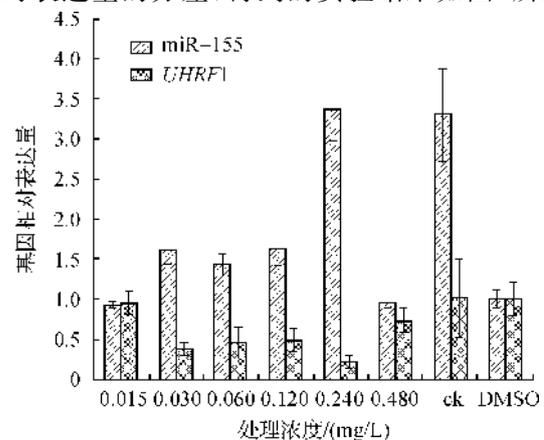


图 1 miR-155 与 *UHRF1* 的相对表达量

总体来说, miR-155 表达上调, *UHRF1* 表达下调, 反之则上调, miR-155 的表达对所预测靶基因 *UHRF1* 极可能有抑制作用。

### 2.3 UHRF1 蛋白水平实验分析

根据 1.2.5 步骤进行操作, 以 GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)为内参, 结果如下:



图2 Western blot 化学发光显影结果

注:①为 CK 组,②为 DMSO 组,③为 0.015 mg/L 氟虫腈处理组,④为 0.030 mg/L 氟虫腈处理组,⑤为 0.060 mg/L 氟虫腈处理组,⑥为 0.120 mg/L 氟虫腈处理组,⑦为 0.240 mg/L 氟虫腈处理组,⑧为 0.480 mg/L 氟虫腈处理组

本实验采用 Image J 对 Western blot 结果图像(图 2)进行处理, 得出各处理组条带的累积光密度值, 接着得出内参 GAPDH 的累积光密度值, 用各组条带的累积光密度值除以内参的累积光密度值, 得到各种处理条件下 UHRF1 蛋白的相对表达量, 对数据进行处理, 建立柱状图, 结果如图 3 所示。溶剂对照组和各种浓度的氟虫腈处理组中, UHRF1 蛋白的表达相对于 CK 组都有显著差异, 且与 miR-155 相对表达量存在一定关联。如 0.240 mg/L 氟虫腈处理组 UHRF1 蛋白相对表达量平均值为  $0.2136 \pm 0.0157$  (与 CK 组比较  $P < 0.01$ , 具有极显著差异), 低于 DMSO 组的  $0.3716 \pm 0.0115$  (与 CK 组比较  $P < 0.01$ , 具有极显著差异), 而 miR-155 相对表达量却为  $3.3801 \pm 0.4004$ , 高于 DMSO 组的 miR-155 相对表达量数值  $1.0000 \pm 0.1117$ 。

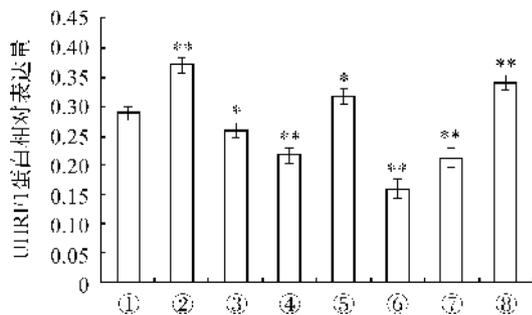


图3 各处理组 UHRF1 蛋白的相对表达量

注:①为 CK 组,②为 DMSO 组,③为 0.015 mg/L 氟虫腈处理组,④为 0.030 mg/L 氟虫腈处理组,⑤为 0.060 mg/L 氟虫腈处理组,⑥为 0.120 mg/L 氟虫腈处理组,⑦为 0.240 mg/L 氟虫腈处理组,⑧为 0.480 mg/L 氟虫腈处理组

结合荧光定量实验结果, 总体上 UHRF1 蛋白表达量随 miR-155 表达的增加而减少, miR-155 抑

制 UHRF1 蛋白表达, miR-155 对 UHRF1 蛋白表达有负向调控作用。

### 3 结论

本实验通过生物信息学分析 miR-155 和准靶基因的信息以及相互作用位点, 以基因 *UHRF1* 作为研究对象, 并通过荧光定量, Western blot 对靶基因进行实验验证。基因表达的改变可以作为一种用于预测氟虫腈等环境化学物质对人及生物体毒性的生物标志物。农药氟虫腈处理斑马鱼后, miR-155 和 *UHRF1* 的表达发生明显变化, 且蛋白的表达量也随之发生变化。miR-155 表达上调, *UHRF1* 表达下调, 反之则上调, miR-155 的表达对准靶基因 *UHRF1* 有抑制作用。UHRF1 蛋白表达量随 miR-155 表达的增加而减少, miR-155 抑制 UHRF1 蛋白表达, miR-155 对 UHRF1 蛋白表达有负向调控作用。miR-155 对基因 *UHRF1* 的调控作用还需进一步通过荧光素报告酶法验证。

### 参考文献:

- [1] 徐广春, 顾中言, 杨玉清, 等. 氟虫腈的应用和风险研究进展[J]. 现代农药, 2008, 7(2): 1-5.
- [2] Aprelikova O, Yu X, Palla J, et al. The role of miR-31 and its target gene SATB2 in cancer-associated fibroblasts[J]. Cell Cycle, 2010, 9(21): 4387-4398.
- [3] 俞焙秦, 刘炳亚. miRNA 的生物学特性和功能[J]. 上海交通大学学报, 2007, 27(5): 136-141.
- [4] 颜春荣, 刘贤进, 余向阳, 等. 氟虫腈单克隆抗体制备及其性能分析[J]. 江苏农业学报, 2003, 19(3): 166-169.
- [5] Brennecke J, Stark A, Russell R B, et al. Principles of microRNA-target recognition[J]. PLoS Biology, 2005, 3(3): e85.
- [6] John B, Enright A J, Aravin A, et al. Human microRNA targets[J]. PLoS Biology, 2004, 2(11): e363.
- [7] Kiriakidou M, Nelson P T, Kouranov A, et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets [J]. Genes & Development, 2004, 18(10): 1165-1178.
- [8] 夏伟, 曹国军, 邵宁生. MicroRNA 靶基因的寻找及鉴定方法研究进展[J]. 中国科学: C 辑, 2009(1): 121-128.
- [9] Sethupathy P, Corda B, Hatzigeorgiou A G. TarBase: a comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets[J]. Rna, 2006, 12(2): 192-197.

- [10] Karginov F V, Conaco C, Xuan Z, et al. A biochemical approach to identifying microRNA targets[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(49): 19291-19296.
- [11] Stefani G, Slack F J. Small non-coding RNAs in animal development[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(3): 219-230.
- [12] Wang X, Zhou S, Ding X, et al. Effect of triazophos, fipronil and their mixture on miRNA expression in adult zebrafish[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2010, 45(7): 648-657.
- [13] Weber M J. New human and mouse microRNA genes found by homology search[J]. FEBS Journal, 2004, 272(1): 59-73.
- [14] 吴清泉, 黄建峰. *UHRF1* 基因在食管癌中的表达和意义[J]. 同济大学学报: 医学版, 2012, 32(6): 39-43.
- [15] 李新莉, 朱 然, 朱 巍 等. 人 *UHRF1* 基因对乳腺癌肿瘤细胞 BT-549 生长的影响[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2008, 28(3): 345-348.
- [16] Rajakumara E, Wang Z, Ma H, et al. PHD finger recognition of unmodified histone H3R2 links *UHRF1* to regulation of euchromatic gene expression[J]. Molecular Cell, 2011, 43(2): 275-284.

## Regulating Effect of Zebrafish miR-155 on *UHRF1* under Action of Pesticide Fipronil

ZHANG Jie, ZHANG Kai, LI Lu-feng, GUO Jiang-feng

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Pesticide fipronil has chronic neurotoxicity to living body and potential risk to ecological environment. The experimental analysis on expression of nucleic acid and protein level in miRNA and related target gene treated by pesticides such as fipronil of different concentrations is helpful for determining the effect and relation of miR-155 and related target gene in toxicological effect of exogenous chemicals. With dre-miR-155 as the research object, this research predicts its drone through bioinformatics analysis, selects the predicted target gene *UHRF1* for research in combination with complementary seed sequence, binding free energy and ranking in each database etc. and studies the regulating effect of miR-155 on gene *UHRF1* from gene and protein level using fluorescent quantitation PCR and Western blot. The result shows miR-155 expression up-regulation and *UHRF1* expression down-regulation under the action of fipronil; *UHRF1* protein expression quantity reduces with the increase of miR-155 expression and miR-155 might have negative regulation effect on *UHRF1* expression. The research on regulating effect of miR-155 on *UHRF1* has important meanings for such fields as toxicology and biomedicine.

**Key words:** fipronil; miR-155; zebrafish; *UHRF1*; toxicology; biomedicine

(责任编辑: 许惠儿)