

## 鸡 mir-17-92 基因簇的结构、功能及其调控

闫晓红, 王志鹏, 王 宁\*

(东北农业大学动物科学技术学院 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030)

**摘要:** mir-17-92 基因簇(mir-17-92 cluster)是脊椎动物的一个保守 miRNA 基因簇, 在哺乳动物细胞增殖、分化、凋亡及发育等多种生物学过程中起重要的调控作用。同时, mir-17-92 基因簇又是一个癌基因, 在多种肿瘤中表达。尽管对 mir-17-92 基因簇的研究非常广泛, 但其作用机制还不完全清楚。鸡 mir-17-92 基因簇的结构组成特点、功能及其作用机制尚未见研究报道。该文根据同一 miRNA 基因簇的 miRNAs 在功能上相关的特点, 以鸡 mir-17-92 基因簇序列为研究对象, 采用生物信息学研究方法和手段, 开展了鸡 mir-17-92 基因簇的基因组结构、miRNAs 序列组成、靶生物学过程和信号通路以及 miRNAs 结合位点分布特点等分析研究。结果发现, 鸡 mir-17-92 基因簇调控 MAPK、Wnt 和 TGF- $\beta$  等多个重要细胞信号通路; miRNA 结合位点分布分析显示, 该 miRNA 基因簇多个成员共同作用于同一个靶基因, 提示该基因簇的 miRNAs 成员以组合和协同的方式调控靶基因。该研究为深入了解 mir-17-92 基因簇如何调控癌症和发育中的关键细胞过程奠定了基础。

**关键词:** 鸡; mir-17-92 基因簇; 细胞信号通路; 功能; 调控

**中图分类号:** Q959.725; Q343      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0254-5853-(2012)05-0455-08

## Characterization of the structure, function and regulation of the chicken mir-17-92 cluster

YAN Xiao-Hong, WANG Zhi-Peng, WANG Ning\*

(Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The miRNA cluster mir-17-92 is conserved in vertebrates and plays crucial roles in cell proliferation, differentiation, apoptosis and animal development. The mir-17-92 cluster also acts as an oncogene that is expressed in variety of cancers. Despite extensive study, the molecular mechanism underlying its functions is not fully understood. The fact that miRNAs in the same cluster are functionally related was used in the present study to investigate the function, and regulation of the chicken mir-17-92 cluster with GO analysis, pathway analysis, and binding site distribution analysis. The investigation found that the chicken mir-17-92 cluster regulated several vital cellular signaling pathways, including the MAPK, Wnt and TGF- $\beta$  signaling pathway. A miRNA binding site distribution analysis found that multiple miRNAs within the mir-17-92 cluster targeted the same genes, suggesting that the miRNA members of the mir-17-92 cluster act synergistically to regulate target genes. This study paves the way for future investigation into how the mir-17-92 cluster may regulate key cellular processes involved in cancer and development.

**Key words:** Chicken; mir-17-92 cluster; Cell signaling pathway; Function; regulation

微 RNA(miRNA)是长度约为 22 nt 的非编码 RNA 分子, 是一类重要的转录后调控因子(Zhang & Su, 2009), 广泛地存在于动物、植物及微生物中。miRNA 生成的阻断研究表明, miRNA 在个体发育、细胞增殖、分化及凋亡等多种生命活动中发挥重要

作用(Inui et al, 2010)。miRNA 的调控异常会导致疾病和癌症的发生(Ventura et al, 2008)。miRNA 基因在染色体上的分布并不是随机的, 许多 miRNA 基因常紧密相邻, 形成 miRNA 基因簇(miRNA cluster)。miRNA cluster 往往由一个共同的启动子调

收稿日期: 2012-04-11; 接受日期: 2012-08-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2009CB941604); 国家自然科学基金项目(30972086)

\*通信作者(Corresponding author), 博士, 教授, 博导, E-mail: ningwang2001@yahoo.com

第一作者简介: 闫晓红, 硕士, 讲师, E-mail: yanxiaohong@neau.edu.cn

控, 转录产生一个多顺反子的前体转录本, 前体转录本经过 Drosha 酶和 Dicer 酶加工, 产生多个成熟的 miRNAs。mir-17-92 cluster 是人、鼠等脊椎动物中一个保守的 miRNA cluster(Tanzer & Stadler, 2004), 具有 6 个串联排列的 miRNAs 前体, 可产生 miR-17-5p、miR-17-3p、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b 和 miR-92 等至少 7 个成熟 miRNA 分子(Wang et al, 2008)。mir-17-92 cluster 敲除小鼠的研究表明, 它是哺乳动物生长发育所必需的, mir-17-92 cluster 敲除鼠出生后很快死亡, 并伴有心脏、肺等发育缺陷(de Pontual et al, 2011; Ventura et al, 2008); 肺脏过表达 mir-17-92 cluster 会导致转基因鼠死亡, 转基因鼠肝脏出现细胞增殖增强, 而肺上皮细胞分化下降(Lu et al, 2007)。mir-17-92 cluster 的功能多种多样, 可调控细胞增殖、分化、凋亡及血管再生等生物学过程(Zhang et al, 2009), 其具体生物学功能取决于细胞类型和发育阶段等。目前已知 mir-17-92 cluster 在 B 细胞发育、肺祖细胞增殖和分化、脂肪细胞分化及血管发生等中发挥重要作用(Wang et al, 2008; Lu et al, 2007)。mir-17-92 cluster 是目前公认的第一个非编码癌基因(oncomir-1), 现已发现 mir-17-92 cluster 在肺癌、B 细胞淋巴瘤、淋巴瘤、肝癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌及胰腺癌等多种肿瘤细胞中高表达(Lu et al, 2007; Olive et al, 2010), 而且, 在淋巴瘤、肺癌等多种癌细胞中均存在 mir-17-92 cluster 基因扩增现象(Ota et al, 2004)。mir-17-92 cluster 和原癌基因 *c-Myc* 在癌症发生中具有协同作用, 过表达 mir-17-92 cluster 能促进原癌基因 *c-Myc* 诱导的淋巴瘤发生(O'Donnell et al, 2005; Tagawa et al, 2007), 而敲除该基因簇能够在体外降低肿瘤细胞的生长, 在体内能降低 Myc 的致癌作用, 但这种作用可被重新导入 mir-17-92 cluster 所恢复(Mu et al, 2009)。

生物信息学分析和实验都已证实, 同一 miRNA 基因簇的 miRNAs 在功能上是相关的(Yuan et al, 2009; Kim et al, 2009)。miRNA 通过其靶基因发挥作用, 但是, 通过鉴定靶基因揭示 miRNA 在细胞和机体内生长发育过程中的作用及作用机制非常困难。原因一是 miRNA 多以家族形式存在, 成员之间功能冗余, 遗传分析非常困难; 二是单个 miRNA 靶基因众多, 靶基因数量可从几百到上千, 每一个靶基因又受多个 miRNAs 的调控; 三是从基因表达量的变化看, miRNA 对靶基因表达的抑制作

用并不大, 即使过表达 miRNA, 一般它们对内源性靶基因的蛋白表达水平的抑制作用也不超过 50%(Baek et al, 2008), 而在这种情况下, 大多蛋白是具有活性的, 仍然能正常发挥作用。这说明, 虽然每个 miRNA 有许多靶基因, 但是, 仅一部分靶基因具有明显的生物学作用。相对于单个 miRNA, miRNA cluster 的功能研究难度更大, 因为 miRNA cluster 的靶基因数量更多, 其作用和作用机制更为复杂。针对 miRNA 功能研究的困境, 人们提出了研究 miRNA 的靶生物学过程和信号通路, 而不是靶基因的研究策略, 认为这可能是一个更好的选择(Inui et al, 2010)。原因是信号分子复合物是一个高度动态、短暂而又非化学配比的复合物, 其形成是一个剂量依赖性的反应, 而这正是 miRNA 调控的理想靶分子。现在, 研究已证实, 在动物细胞中, 信号通路是 miRNA 调控的首要靶通路(Inui et al, 2010; Avraham & Yarden, 2012)。

mir-17-92 cluster 是一个被广泛研究的 miRNA 基因簇, 该 miRNA 基因簇的多个成员的靶基因已得到实验证, 目前, 已知的靶基因有 E2F1、E2F2、E2F3、CDKN1A、RB2/P130、TGF- $\beta$ 1、Pten、BIM(Bcl2 interacting mediator of cell death)、cyclin D1、CTGF、Tsp1、MAPK9、MAPK14 及 STAT3 等(Aguda et al, 2008; Carraro et al, 2009; Mu et al, 2009; O'Donnell et al, 2005; Olive et al, 2010; Peter, 2010; Sylvestre et al, 2007; Trompeter et al, 2011; Yu et al, 2008)。尽管 mir-17-92 cluster 的一些靶基因已得到验证, 但是, 该 miRNA 基因簇参与的生物学过程和通路还远未弄清楚(de Pontual et al, 2011)。我们在鸡前脂肪细胞小 RNA 文库重测序中发现, mir-17-92 cluster 也在鸡前脂肪细胞中表达(Yao et al, 2011), 但目前尚未见鸡 mir-17-92 cluster 的报道。为此, 我们开展了鸡 mir-17-92 cluster 的基因组结构、miRNAs 序列组成、miRNAs 作用位点分布及其靶生物学过程和信号通路等研究, 为下一步实验分析鸡 mir-17-92 cluster 的作用及其作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 mir-17-92 基因簇序列

从 miRBase 数据库(<http://microrna.sanger.ac.uk/>) 查询到鸡、人、黑猩猩、大鼠、小鼠、猪、牛、狗、珍珠鸡、非洲蟾蜍、家蝇及斑马鱼等 12 种动物的

mir-17-92 cluster, 下载这些物种 mir-17-92 cluster 各 miRNA 的前体序列和成熟序列。

## 1.2 mir-17-92 基因簇 DNA 序列

通过 UCSC Genome Browser(<http://genome.ucsc.edu/>) 获取这 12 种动物 mir-17-92 cluster 的 DNA 序列和基因组定位信息。

## 1.3 mir-17-92 基因簇序列的比对分析

利用 ClustalW2.0(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 对 12 种动物 mir-17-92 cluster 的 DNA 序列及该基因簇各 miRNA 的前体序列和成熟序列做比对分析。

## 1.4 鸡 mir-17-92 基因簇的功能分析

以鸡 mir-17-92 cluster(gga-mir-17-92 cluster)为研究对象, 通过 TargetScan(<http://www.targetscan.org/>)、PicTar(<http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/>) 和 miRDB(<http://mirdb.org/miRDB/>) 软件, 分析 gga-mir-17-92 cluster 各 miRNA 的靶基因。选取至少两款软件都预测到的靶基因作为该 miRNA 基因簇的靶基因, 根据同一 miRNA 基因簇的 miRNAs 在功能上相关的特点(Yuan et al, 2009; Kim et al, 2009), 利用 David 数据库(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), 分析 gga-mir-17-92 cluster 调控的生物学过程和信号通路。选取三款软件都预测到的靶基因作为 gga-mir-17-92 cluster 的靶基因, 进行靶基因的 miRNA 作用位点分布分析。

## 2 结果

### 2.1 鸡 mir-17-92 基因簇的结构分析

查询 miRBase 数据库可知, gga-mir-17-92 cluster 位于鸡 1 号染色体上, 其 DNA 序列全长 795 bp。利用 UCSC Genome Browser 确定 gga-mir-17-92 cluster 的各个 miRNA 在染色体上的排列顺序, 结果发现, 鸡、人和鼠 mir-17-92 cluster 的排列顺序相同(图 1)。目前, 已知人等哺乳动物的 mir-17-92 cluster 有两个旁系同源体 mir-106a-363 cluster 和 mir-106b-25 cluster(Ventura et al, 2008)。人 mir-106a-363 cluster 位于 X 染色体, 该基因簇的初级转录本称为 Kis2, 包含 mir-106a、mir-18b、mir-20b、mir-19b-2、mir-92-2 和 mir-363 等 6 个 miRNA。人 mir-106b-25 cluster 位于 7 号染色体上一个蛋白质编码基因 MCM7 的第 13 个内含子内, 包含 mir-106b、mir-93 和 mir-25 等 3 个 miRNA。利用 UCSC 数据库的 BLAT, 发现鸡基因组序列上仅有一个

gga-mir-17-92 cluster 的旁系同源体 gga-mir-106-20b cluster, 它位于鸡 4 号染色体上, 包含 mir-106、mir-18b 和 mir-20b 等 3 个 miRNA。鸡 mir-17-92 cluster 的旁系同源体与人等哺乳动物该基因簇的旁系同源体的构成不同, 说明人、鼠和鸡的 mir-17-92 cluster 的旁系同源体的产生机制不同, gga-mir-106-20b cluster 可能是鸡特异性的。

图 A 人 chr.13, 鼠 chr.14

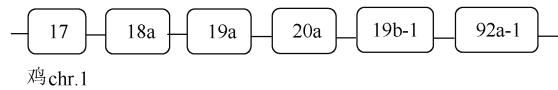


图 B 人 chr.X, 鼠 chr.X

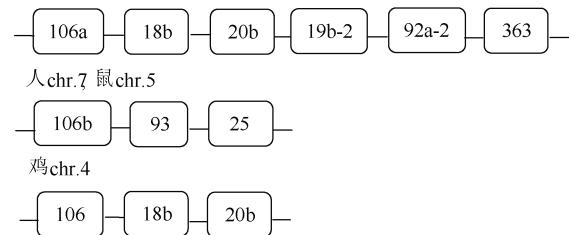


图 1 人、鼠和鸡 mir-17-92 基因簇(图 A)及其旁系同源体(图 B)的结构组成

Fig. 1 Schematic representation of the mir-17-92 cluster (A)

and their paralogs (B) in human, mouse and chicken

方框内数字或数字与字母的组合代表 mir-17-92 基因簇及其旁系同源体中的相应 microRNA (The numbers or numbers with letter inside the boxes stand for the corresponding microRNAs of the mir-17-92 cluster and their paralogs)。

mir-17-92 cluster 产生的 miRNAs 可以分为 3 个家族, 分别为 mir-17 家族、mir-19 家族及 mir-92 家族, 其中 mir-17 家族包括 mir-17、mir-18 和 mir-20 (Olive et al, 2010)。对 gga-mir-17-92 cluster 及其旁系同源体 gga-mir-106-20b cluster 的所有前体 miRNAs 做同源性分析, 结果发现, mir-17、mir-18a/18b、mir-20a/20b 及 mir-106 是同源序列, 均属于 mir-17 家族(RF00051), mir-19a/19b 是同源序列, 属于 mir-19 家族(RF00245), 而 mir-92 属于 mir-92 家族(RF00464)。

### 2.2 mir-17-92 基因簇的 DNA 序列比较分析

查询 UCSC 数据库, 共获上述 12 种动物中 9 种动物(珍珠鸡、狗、家蝇除外)的 mir-17-92 cluster 基因组序列, 比较分析发现, 不同物种 mir-17-92 cluster 在其染色体上位置不同, 但其基因组序列长度相近, 约 781~883 bp。9 种动物 mir-17-92 cluster

的 DNA 序列比对结果显示, mir-17-92 cluster 的 DNA 序列组成在各物种间保守性较高, 且呈现物种间进化关系越近, 其 DNA 序列的相似度越高。例如, 人与猪、狗、牛及鼠 mir-17-92 cluster 的 DNA 序列的相似度为 89%~97%; 鸡和热带爪蟾间的相似度为 79%, 而鸡和热带爪蟾与人等哺乳动物间的相似度则都在 50% 左右。

### 2.3 mir-17-92 基因簇的 miRNAs 前体序列和成熟序列分析

已获取的 12 种动物 mir-17-92 基因簇的各 miRNA 前体序列(pre-miRNA)的比对分析显示, 鸡与珍珠鸡除了 mir-19a 的同源性为 92%, mir-92a 同源性为 95% 外, 其他相对应 pre-miRNA 序列的同源性均为 100%。同时还发现, mir-17、mir-18a、mir-19a、mir-20a 及 mir-92a 的 pre-miRNA 序列在这 12 种动物中的保守性均高于 mir-19b 的保守性(表 1); 而 mir-19b pre-miRNA 序列的保守性相对较低, 主要是由于斑马鱼与其他物种间的差异略大, 12 种动物的 mir-19b pre-miRNA 序列间的相似度在 70%~86%。但进一步分析发现, mir-19b pre-miRNA 序列的差异主要发生在前体序列中成熟序列以外的区域, 而 12 种动物 mir-19b 的成熟序列仍高度保守。

鸡 mir-17-92 基因簇能产生 7 种成熟 miRNAs, 即 gga-miR-17-3p(MIMAT0001115)、gga-miR-17-5p

(MIMAT0001114)、gga-miR-18a(MIMAT0001113)、gga-miR-19a(MIMAT0001112)、gga-miR-19b(MIMAT0001110)、gga-miR-20a(MIMAT0001111) 和 gga-miR-92(MIMAT0001109)。这些成熟 miRNA 序列的比对分析显示, mir-19 家族的 miR-19a 和 miR-19b 的序列相似度很高, 达 95%。mir-17 家族中, miR-17-5p 与 miR-20a 的序列相似度最高, 为 91%, 其次是 miR-20a 与 miR-18a, 为 81%; 而 miR-17-3p 与 miR-17-5p 的序列相似度较低, 仅有 55%。mir-17 家族、mir-19 家族及 mir-92 家族间各 miRNA 成熟序列间的相似度都不高, 在 47%~63% 之间(表 2)。

miRNA 成熟序列 5' 端的第 2~8 位碱基序列组成被誉为“种子序列(seed sequence)”, 种子序列是 miRNA 与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合所必需的。比较鸡 mir-17-92 cluster 及其旁系同源体 gga-mir-106-20b cluster 的各个成熟 miRNA 的种子序列组成可见, 同属于 mir-17 家族, miR-17-3p 独自具有种子序列 CUGCAGU; 而 miR-18a/18b 的种子序列完全相同, 为 AAGGUGC; miR-17-5p、miR-20a/20b 和 miR-106 的种子序列完全相同, 为 AAAGUGC。mir-19 家族的 miR-19a/19b 的种子序列也完全相同, 是 GUGCAAA; 属于 miR-92 家族的 miR-92 的种子序列是 AUUGCAC(图 2)。

表 1 12 种动物 mir-17-92 基因簇的 6 种前体 miRNA 序列比对结果

Tab. 1 Multiple sequence alignments of 6 pre-miRNAs of the mir-17-92 cluster from 12 different animals (%)

鸡 <i>Gallus gallus</i>	珍珠鸡 <i>Taeniopygia guttata</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	牛 <i>Bos taurus</i>	猪 <i>Sus scrofa</i>	狗 <i>Canis familiaris</i>	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	家蝇 <i>Monodelphis domestica</i>	非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
mir-17	100	94	94	94	92	94	88	91	94	96	85
mir-18a	100	98	98	100	98	100	97	97	98	84	86
mir-19a	92	97	97	97	97	98	95	96	97	95	90
mir-19b	100	95	95	95	96	96	93	93	95	86	77
mir-20a	100	94	94	94	94	91	88	89	91	83	84
mir-92a	95	94	94	94	94	94	91	91	93	84	85

表 2 鸡 mir-17-92 基因簇各 miRNA 成员成熟序列的比对结果

Tab. 2 Multiple sequence alignments of miRNA members of the chicken mir-17-92 cluster (%)

鸡 miRNA Chicken miRNA	gga-miR-19b	gga-miR-19a	gga-miR-20a	gga-miR-17-3p	gga-miR-18a	gga-miR-17-5p
gga-miR-92	57	19	28	40	47	42
gga-miR-19b		95	47	45	59	47
gga-miR-19a			47	45	63	43
gga-miR-20a				60	81	91
gga-miR-17-3p					45	55
gga-miR-18a						72

gga-miR-106	<b>AAAAGUGCUUACAGUGCAGGU</b> 22
gga-miR-17-5p	<b>CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU</b> 24
gga-miR-20a	<b>UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG</b> 23
gga-miR-20b	<b>CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG</b> 23
gga-miR-18b	<b>UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUA</b> 22
gga-miR-18a	<b>UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUUA</b> 22
gga-miR-17-3p	<b>ACUGCAGUGAAGGCA-CUUGU</b> 20
gga-miR-19b	<b>UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA</b> 23
gga-miR-19a	<b>UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA</b> 23
gga-miR-92	<b>UAUUGCACUUGUCCCCGGCCUG</b> 21

图 2 鸡 mir-17-92 基因簇及其旁系同源体 mir-106-20b 基因簇中各 miRNA 种子序列比较

Fig. 2 Comparison of miRNA seed sequences of chicken mir-17-92 cluster and its paralog mir-106-20b  
阴影粗体部分表示种子序列(Seed sequences are in bold).

## 2.4 鸡 mir-17-92 基因簇的靶生物学过程和信号通路分析

为揭示鸡 mir-17-92 cluster 的作用及其作用机制, 我们首先预测了该基因簇中各 miRNA 的靶基因, 基于同一 miRNA 基因簇的 miRNAs 在功能上相关的特性(Yuan et al, 2009; Kim et al, 2009), 合并整个 mir-17-92 cluster 的靶基因, 进而分析该 miRNA 基因簇所调控的生物学过程和信号通路。我们利用 TargetScan、PicTar 和 miRDB 软件, 分别获得 gga-mir-17-92 cluster 7 个 miRNAs 的靶基因, 共计 4421 个。为降低靶基因的假阳性率, 选取至少两款软件能预测到的靶基因作为 gga-mir-17-92 cluster 的靶基因, 共获 522 个基因。将这 522 个基因递交 DAVID 数据库, 过滤后得到 476 个基因, 进而利用

DAVID(Background: Gallus)对这 476 个靶基因做 GO(Gene Ontology)分析、功能聚类分析(Functional annotation clustering)、KEGG Pathway 和 Panther Pathway 分析。

2.4.1 鸡 mir-17-92 基因簇靶基因的 GO 分析和功能聚类分析 GO 分析显示, 476 个基因中, 与生物过程有关的基因(GOTERM\_BP\_FAT)222 个, 占 46.6%; 与分子功能有关的基因(GOTERM\_MF\_FAT)281 个, 占 59.0%; 与细胞组件有关的基因(GOTERM\_CC\_FAT)126 个, 占 26.5%。对参与生物过程的 222 个基因作进一步分析(Thresholds: Count=5, EASE=0.05), 结果发现, 参与生物过程的基因主要富集于 RNA 代谢、转录调控、信号转导、蛋白磷酸化及修饰等, 其中 RNA 代谢、转录调控是许多 miRNA 常见的靶生物学过程(Glazov et al, 2008), 鸡 mir-17-92 cluster 作用的独特之处是调控信号传导和蛋白修饰。

DAVID 功能聚类分析结果显示(Classification Stringency: Highest), 476 个基因存在 60 个富集簇, 其中, 分值不低于 1(enrichment score $\geq 1$ )的簇有 16 个。分值最高的是细胞黏附蛋白 Cadherin 家族富集簇(InterPro 蛋白结构域富集), 其次是依赖于修饰的大分子降解过程(GO 生物学过程富集)、核糖核苷酸结合功能(GO 分子功能富集)、脂类分子结合区(uniprot database, 蛋白序列特征富集)、金属离子结合功能(GO 分子功能富集)、转录负调控(GO 生物学过程富集)以及大分子合成的负调控(GO 生物学过程富集)等富集簇(表 3)。

表 3 基因功能聚类分析  
Tab. 3 Gene functional annotation clustering analysis

Annotation cluster 富集簇	Enrichment score 富集簇分值	Count 基因数	P Value P 值
Annotation Cluster 1 INTERPRO	Enrichment Score: 4.8 Cadherin, N-terminal	10	2.9E-8
Annotation Cluster 2 GOTERM_BP_FAT	Enrichment Score: 3.41 modification-dependent macromolecule catabolic process	15	1.5E-4
Annotation Cluster 3 GOTERM_MF_FAT	Enrichment Score: 3.38 ribonucleotide binding	68	2.7E-4
Annotation Cluster 4 UP_SEQ_FEATURE	Enrichment Score: 3.11 lipid moiety-binding region:S-geranylgeranyl cysteine	6	9.2E-5
Annotation Cluster 5 GOTERM_MF_FAT	Enrichment Score: 2.5 metal ion binding	95	2.3E-3
Annotation Cluster 6 GOTERM_BP_FAT	Enrichment Score: 2.45 negative regulation of transcription	13	1.6E-3
Annotation Cluster 7 GOTERM_MF_FAT	Enrichment Score: 2.43 GTP binding	19	3.3E-3
Annotation Cluster 8 GOTERM_BP_FAT	Enrichment Score: 2.39 negative regulation of macromolecule biosynthetic process	14	3.2E-3

**2.4.2 鸡 mir-17-92 基因簇靶基因的 KEGG Pathway 和 Panther Pathway 分析** KEGG 通路富集分析显示(Thresholds:count=5, EASE=0.05), 476 个靶基因中, 121 个基因参与 KEGG 代谢通路, 占 25.4%。7 个具有显著性的 KEGG 代谢通路( $P<0.05$ )分别是 MAPK 信号通路(19 个基因)、Wnt 信号通路(11 个基因)、TGF- $\beta$  信号通路(8 个基因)、泛素介导的蛋白降解通路(12 个基因)、内吞作用通路(13 个基因)、黏着斑通路(12 个基因)和卵母细胞减数分裂通路(8 个基因)(表 4)。

Panther pathway 分析显示(Thresholds:count=2, EASE=0.1), 476 个靶基因中, 33 个基因参与 2 个显著的富集通路( $P<0.05$ ), 分别是 Wnt 信号通路(20 个基因)和 cadherin 信号通路(13 个基因)。另外, 还有 8 个基因参与 TGF- $\beta$  信号通路( $P<0.1$ )(表 4)。

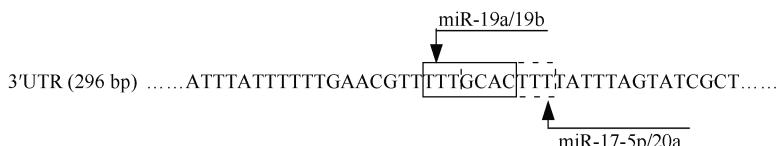
**表 4 鸡 mir-17-92 基因簇靶基因的通路分析**  
**Tab. 4 Pathways analysis of target genes of the chicken mir-17-92 cluster**

信号通路 Pathway term	靶基因数 Count <sup>1</sup>	百分率 % <sup>2</sup>	P 值 P Value
<b>KEGG 通路 KEGG pathway</b>			
MAPK 信号通路	19	4.0	4.8E-4
MAPK signaling pathway			
泛素介导的蛋白降解通路	12	2.5	2.9E-3
Ubiquitin mediated proteolysis			
内吞作用通路	13	2.7	1.4E-2
Endocytosis			
Wnt 信号通路	11	2.3	1.6E-2
Wnt signaling pathway			
TGF- $\beta$ 信号通路	8	1.7	1.7E-2
TGF- $\beta$ signaling pathway			
黏着斑通路	12	2.5	4.6E-2
Focal adhesion			
卵母细胞减数分离通路	8	1.7	4.8E-2
Oocyte meiosis			
<b>Panther 通路 Panther pathway</b>			
Wnt 信号通路	20	4.2	3.7E-4
Wnt signaling pathway			
Cadherin 信号通路	13	2.7	4.0E-3
Cadherin signaling pathway			
TGF- $\beta$ 信号通路	8	1.7	9.1E-2
TGF- $\beta$ signaling pathway			

<sup>1</sup> 参与该代谢途径的靶基因数(Numbers of involved genes); <sup>2</sup> 参与该代谢途径的靶基因数除以基因总数(Numbers of involved genes/Numbers of total genes)。

## 2.5 鸡 mir-17-92 cluster 的 miRNAs 结合位点分布分析

miRNA 通过其种子序列与靶基因 mRNA 3'UTR 区碱基互补来调控靶基因的表达。靶基因 mRNA 3'UTR 区具有多个 miRNA 的结合位点, 同时受多个 miRNA 的调控, 这些 miRNA 存在组合和协同作用(Yan & Wang, 2010)。靶基因 3'UTR 的 miRNA 结合位点分布能揭示 miRNA 之间的组合和协同作用。为此, 我们选取三款软件(TargetScan、PicTar 及 miRDB)都能预测到的 gga-mir-17-92 cluster 靶基因进行鸡 mir-17-92 基因簇 miRNAs 结合位点分析, 共获 138 个靶基因。这其中, 至少两款软件预测由相同 miRNA 调控的靶基因有 136 个。136 个靶基因中, 受到 gga-mir-17-92 cluster 中 1 个 miRNA 调控的基因仅有 22 个, 主要受 miR-17-5p, 或 miR-17-3p, 或 miR-18a, 或 miR-20a 调控; 受 2 个 miRNA 调控的基因有 91 个, 主要受 miR-19a 和 miR-19b, 或 miR-17-5p 和 miR-20a 的调控; 受 3 个 miRNA 调控的基因有 9 个, 主要受 miR-17-5p/17-3p/18a/20a/92 与 miR-19a 和 miR-19b 调控, 或受 miR-17-3p、miR-17-5p 和 miR-20a 的调控; 受 4 个 miRNA 调控的基因有 14 个, 主要受 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 和 miR-19b 的调控。这提示 gga-mir-17-92 cluster 在调控靶基因时, 该基因簇 miRNA 成员之间存在组合和协同作用。由于鸡 mir-17-92 cluster 的 mir-17 家族(miR-17-5p 和 miR-20a)和 mir-19 家族(miR-19a 和 miR-19b)内成员的同源性很高, 尤其是它们的种子序列组成完全相同(图 2), 因此, 该 miRNA 基因簇中同家族的这些种子序列完全相同的 miRNAs 的结合位点相同且它们的靶基因绝大多数是相同的。另外, 该 miRNA 基因簇不同家族成员还存在结合位点的部分重叠(miR-17 家族和 mir-19 家族)现象(图 3, 图 4), 这说明 mir-17-92 基因簇成员存在功能冗余现象。事实上, 已有研究报道 mir-17-92 基因簇的 mir-17 家族和 mir-19 家族成员协同调控 *Pten* 基因(Xiao et al., 2008)。



**图 3 mir-17-92 基因簇在 BMPR2 基因 3'UTR 的结合位点图示**  
**Fig. 3 The binding site distribution of mir-17-92 cluster miRNAs in the 3'UTR of BMPR2 gene**

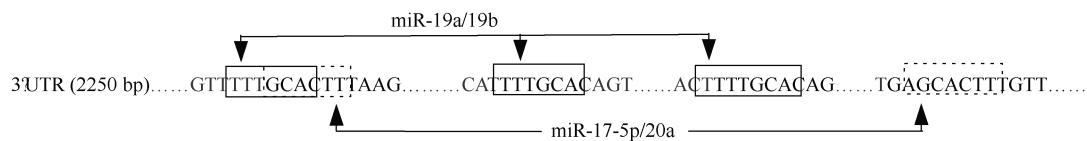


图 4 mir-17-92 基因簇在 ZNF238 基因 3'UTR 的结合位点图示

Fig. 4 The binding site distribution of miR-17-92 cluster miRNAs in the 3'UTR of ZNF238 gene

### 3 讨 论

mir-17-92 cluster 是一个在脊椎动物非常保守的 miRNA 基因簇, 这提示该 miRNA 基因簇在动物生长发育过程中发挥重要作用。实验也已证明, 敲除 mir-17-92 cluster 会导致动物发育异常(de Pontual et al, 2011), 其表达异常会导致疾病(肿瘤)的发生(Olive et al, 2010)。鸡 mir-17-92 cluster 靶基因的 GO 分析显示, 该 miRNA 基因簇除了参与 RNA 代谢、转录调控外, 还调控信号转导。进一步的 KEGG 和 Panther 通路分析显示, 该 miRNA 基因簇调控多个重要的信号通路。KEGG 通路富集分析显示, 鸡 mir-17-92 cluster 靶基因富集于 MAPK 信号通路、泛素介导的蛋白降解通路、内吞作用通路、Wnt 信号通路、TGF- $\beta$  信号通路、黏着斑通路和卵母细胞减数分裂通路。Panther 通路富集分析同样发现, 该 miRNA 基因簇靶基因富集于 TGF- $\beta$  信号通路和 Wnt 信号通路。事实上, 近年研究已发现, 多个 miRNA 参与 MAPK 信号通路、TGF- $\beta$  信号通路、Notch 信号通路、Wnt 信号通路以及 Hh 信号通路等的调控(Avraham & Yarden, 2012; Hagen & Lai, 2008)。MAPK 信号通路是 KEGG 通路分析中富集靶基因最多、P 值最小的通路( $P=4.8 \times 10^{-4}$ )。MAPK 信号通路也是细胞最为广泛存在的信号传导通路之一, 可以被许多细胞因子激活, 从而调控细胞生长、发育、分化和凋亡等许多生理学过程, 特别是细胞周期的调控。与我们的分析结果相一致, 哺乳动物实验研究已证实 mir-17-92 cluster 调控细胞周期、促进细胞增殖并抑制细胞凋亡(Lu et al, 2007; Wang et al, 2008)。多个已鉴定的 mir-17-92 cluster 靶基因, 如 E2F、E2F2、E2F3、CDKN1A 和 Rbl2 等都是细胞周期的调控因子, 这些靶基因主要是 MAPK 信号通路的下游基因; 而靶基因 MAPK9 和 MAPK14 则是 MAPK 信号通路的上游分子(Carraro et al, 2009; Trompeter et al, 2011)。综合本研究结果可知, 鸡 mir-17-92 cluster 可在不同层面调控 MAPK 信号通路。泛素介导的蛋白降解通路在细胞许多基本生命活动中发挥重要作用, 它调控细胞周

期、细胞分化、信号通路及机体发育等(Ciechanover et al, 2000)。通过泛素介导的蛋白降解通路, 鸡 mir-17-92 cluster 不仅直接调控细胞增殖和分化等, 而且可以通过该通路调控其他信号通路活性, 决定通路激活时间、信号强度以及持续时间, 并协调细胞内不同信号通路。Wnt 信号通路和 TGF- $\beta$  通路是鸡 mir-17-92 cluster 的另两个富集信号通路, 实验已证实 mir-17-92 cluster 调控经典 Wnt 信号通路的靶基因 Cyclin D1(Yu et al, 2008), mir-17-92 cluster 是 TGF- $\beta$  信号通路的强抑制剂, 它可在多个层面调控该信号通路(Li et al, 2011; Mestdagh et al, 2010)。Cadherin 是一个大的糖蛋白家族, 参与细胞间的黏附, 这类蛋白对于组织结构和生长发育非常重要(Carraro et al, 2009; Derycke & Bracke, 2004)。DAVID 功能富集分析显示, cadherin 蛋白是靶基因的第一富集簇, Panther pathway 通路分析显示, 鸡 mir-17-92 cluster 的靶基因富集于 cadherin 信号通路( $P<0.05$ ); 而 KEGG 分析发现该基因簇靶基因富集于局部黏着斑通路( $P<0.05$ ), 这些分析结果都提示, mir-17-92 cluster 调控细胞的黏附。已有实验证实 mir-17-92 cluster 参与细胞黏附的调控(Carraro et al, 2009; Mestdagh et al, 2010)。

由上述讨论分析可见, 我们对 mir-17-92 cluster 的靶生物学过程和通路分析结果是可靠的。从通路分析结果看, 鸡 mir-17-92 cluster 可在生物学过程和信号通路的多个层面发挥调控作用, 但是, 目前对 mir-17-92 cluster 的了解还不是很充分, 仅仅鉴定了少量的靶基因, 许多层面的调控还有待于实验研究证实, 而这些研究的开展将有望全面揭示 mir-17-92 cluster 的生理和病理作用及其致癌机制, 并为相关肿瘤的防治提供依据。

鸡 mir-17-92 cluster 的调控分析表明, 该基因簇成员可以协同调控同一个靶基因, 并且可以在不同层面调控同一信号通路。这种功能冗余现象具有重要的生物学意义, 这是一种防出错机制(fail-safe mechanism), 可确保细胞和机体的基因表达、生长及发育的精细调控, 保证细胞不出错, 或即使出错也不至于有大的影响。另外, 尽管 miRNA 的调控作

用小，但是这种 miRNA 基因簇的多个成员共同作用于一个信号通路的不同基因和同一个基因，就会起到放大其调控作用的目的。

鸡 mir-17-92 cluster 的保守性及其靶生物学过程和信号传导通路的分析提示，该 miRNA 基因簇在鸡的细胞增殖、分化、凋亡及生长发育过程中发

挥着十分重要作用。下一步我们将针对鸡 mir-17-92 cluster 所调控的生物学过程和信号通路，重点分析它在鸡脂肪细胞增殖和分化中的作用以及作用机制，这将有助于揭示鸡脂肪生长发育的分子调控机制，并将为优质低脂肉鸡的分子育种奠定理论基础。

## 参考文献：

- Aguda BD, Kim Y, Piper-Hunter MG, Friedman A, Marsh CB. 2008. MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(50): 19678-19683.
- Avraham R, Yarden Y. 2012. Regulation of signalling by microRNAs[J]. *Biochem Soc Trans*, **40**(1): 26-30.
- Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. 2008. The impact of microRNAs on protein output[J]. *Nature*, **455**(7209): 64-71.
- Carraro G, El-Hashash A, Guidolin D, Tiozzo C, Turcatel G, Young BM, De Langhe SP, Bellusci S, Shi W, Parnigotto PP, Warburton D. 2009. miR-17 family of microRNAs controls FGF10-mediated embryonic lung epithelial branching morphogenesis through MAPK14 and STAT3 regulation of E-Cadherin distribution[J]. *Dev Biol*, **333**(2): 238-250.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. 2000. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction[J]. *Bioessays*, **22**(5): 442-451.
- de Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, Van Haeringen A, Geneviève D, Goldenberg A, Oufadem M, Manouvrier S, Munnich A, Vidigal JA, Vekemans M, Lyonnet S, Henrion-Caude A, Ventura A, Amiel J. 2011. Germline deletion of the miR-17-92 cluster causes skeletal and growth defects in humans[J]. *Nat Genet*, **43**(10): 1026-1030.
- Derycke LDM, Bracke ME. 2004. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signaling[J]. *Int J Dev Biol*, **48**(5-6): 463-476.
- Glazov EA, McWilliam S, Barris WC, Dalrymple BP. 2008. Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLX-DIO3 genomic region in placental mammals[J]. *Mol Biol Evol*, **25**(5): 939-948.
- Hagen JW, Lai EC. 2008. microRNA control of cell-cell signaling during development and disease[J]. *Cell Cycle*, **7**(15): 2327-2332.
- Inui M, Martello G, Piccolo S. 2010. MicroRNA control of signal transduction[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**(4): 252-263.
- Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, Hur K, Yoo MW, Lee HJ, Yang HK, Kim VN. 2009. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, **37**(5): 1672-1681.
- Li L, Shi JY, Zhu GQ, Shi B. 2011. MiR-17-92 cluster regulates cell proliferation and collagen synthesis by targeting TGFB pathway in mouse palatal mesenchymal cells[J]. *J Cell Biochem*, **113**(4): 1235-1244.
- Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. 2007. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells[J]. *Dev Biol*, **310**(2): 442-453.
- Mestdagh P, Boström AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquière B, Schulte S, Dews M, Thomas-Tikhonenko A, Schulte JH, Zollo M, Schramm A, Gevaert K, Axelson H, Speleman F, Vandesompele J. 2010. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-β pathway in neuroblastoma[J]. *Mol Cell*, **40**(5): 762-773.
- Mu P, Han YC, Betel D, Yao E, Squarrito M, Ogrodowski P, de Stanchina E, D'Andrea A, Sander C, Ventura A. 2009. Genetic dissection of the miR-17-92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas[J]. *Genes Dev*, **23**(24): 2806-2811.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. *Nature*, **435**(7043): 839-843.
- Olive V, Jiang I, He L. 2010. *mir-17-92*, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**(8): 1348-1354.
- Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M. 2004. Identification and characterization of a novel gene, *C13orf25*, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma[J]. *Cancer Res*, **64**(9): 3087-3095.
- Peter ME. 2010. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step[J]. *Oncogene*, **29**(15): 2161-2164.
- Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P. 2007. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop[J]. *J Biol Chem*, **282**(4): 2135-2143.
- Tagawa H, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M. 2007. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development[J]. *Cancer Sci*, **98**(9): 1482-1490.
- Tanzer A, Stadler PF. 2004. Molecular evolution of a microRNA cluster[J]. *J Mol Biol*, **339**(2): 327-335.
- Trompeter H I, Abbad H, Iwaniuk K M, Hafner M, Renwick N, Tuschl T, Schira J, Müller HW, Wernet P. 2011. MicroRNAs MiR-17, MiR-20a, and MiR-106b act in concert to modulate E2F activity on cell cycle arrest during neuronal lineage differentiation of USSC[J]. *PLoS One*, **6**(1): e16138.
- Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the *miR-17-92* family of miRNA clusters[J]. *Cell*, **132**(5): 875-886.
- Wang Q, Li YC, Wang JH, Kong J, Qi YC, Quigg RJ, Li XM. 2008. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**(8): 2889-2894.
- Xiao CC, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang BC, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K. 2008. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes[J]. *Nat Immunol*, **9**(4): 405-414.
- Yan XH, Wang N. 2010. Connections and differences between gene expression regulated by transcription factors and MicroRNAs[J]. *Chn J Biochem Mol Biol*, **26**(10): 892-897. [闫晓红, 王宁. 2010. 转录因子与 microRNA 在基因表达调控中的功能联系及差异. 中国生物化学与分子生物学报, **26**(10): 892-897.]
- Yao J, Wang YX, Wang WS, Wang N, Li H. 2011. Solexa sequencing analysis of chicken pre-adipocyte microRNAs[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, **75**(1): 54-61.
- Yu ZR, Wang CG, Wang M, Li ZP, Casimiro MC, Liu MR, Wu KM, Whittle J, Ju XM, Hyslop T, McCue P, Pestell RG. 2008. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation[J]. *J Cell Biol*, **182**(3): 509-517.
- Yuan XY, Liu CN, Yang PC, He SM, Liao Q, Kang SL, Zhao Y. 2009. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network[J]. *BMC Syst Biol*, **3**: 65.
- Zhang R, Su B. 2009. Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3'UTR evolution[J]. *J Genet Genomics*, **36**(1): 1-6.
- Zhang ZW, An Y, Teng CB. 2009. The roles of miR-17-92 cluster in mammal development and tumorigenesis[J]. *Hereditas*, **31**(11): 1094-1100. [张振武, 安洋, 滕春波. 2009. miR-17-92 基因簇 microRNAs 对哺乳动物器官发育及肿瘤发生的调控. 遗传, **31**(11): 1094-1100.]