

miR-let-7a在大白猪甲状腺中的表达及其对甲状腺细胞凋亡的影响

王云霞¹ 王琪¹ 周辉云¹ 郭晓令¹ 王颖^{2*} 徐宁迎^{1*}

¹ 浙江大学 动物科学学院, 杭州 310058; ² 太原理工大学 力学学院, 太原 030024

*通讯作者, wangying03@tyut.edu.cn; nyxu@zju.edu.cn

摘要 microRNA(miRNA)是一类内源性的非编码RNA,广泛参与细胞的生长发育、分化、增殖和凋亡等生物学过程。为了研究miR-let-7a对猪(*Sus scrofa*)甲状腺的生长发育及甲状腺细胞凋亡的调控作用,本研究利用免疫荧光技术鉴定了大白猪的甲状腺组织及体外培养的甲状腺细胞,利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测了miR-let-7a在不同生长阶段大白猪甲状腺组织中的表达量变化,通过转染miR-let-7a mimics并利用流式细胞术检测了转染组与未转染组的甲状腺细胞凋亡率的差异性,同时预测了miR-let-7a与细胞凋亡相关基因的靶向关系。结果发现,甲状腺组织和细胞中的甲状腺球蛋白(thyroglobulin, TG)发出绿色荧光,表明体外培养的甲状腺细胞功能正常。qRT-PCR结果显示,胚胎期随着胚龄的增加,miR-let-7a表达量逐渐增加。出生后miR-let-7a表达量下降,于60日龄达生长期最小值,之后有所上升,至90日龄后其表达量再次下降,120日龄后随日龄的增加let-7a表达量呈现逐渐增加的趋势。凋亡结果发现,和对照组相比,转染组细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$)。根据研究结果推测,miR-let-7a的表达直接或间接影响了甲状腺细胞凋亡的调控过程。研究结果为深入研究猪甲状腺miR-let-7a的功能机制提供了有益的线索。

关键词 miR-let-7a, 甲状腺细胞, 细胞凋亡, 靶基因

Expression Variation of miR-let-7a in Thyroid and Its Effect on Apoptosis of Thyroid Cell of Yorkshire Pig(*Sus scrofa*)

WANG Yun-Xia¹ WANG Qi¹ ZHOU Hui-Yun¹ GUO Xiao-Ling¹ WANG Ying^{2*} XU Ning-Ying^{1*}

¹ College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ² College of Mechanics, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China

* Corresponding authors, wangying03@tyut.edu.cn; nyxu@zju.edu.cn

Abstract microRNA (miRNA) is a class of endogenous and noncoding RNA, which involves in many physiological processes including cell growth, development, differentiation, proliferation and apoptosis. In order to study the regulation effect of miR-let-7a on growth and development in thyroid, we identified the thyroid tissue and culuture cells *in vitro* of Yorkshire pig(*Sus scrofa*) by immunofluorescence technique and detected the expression of miR-let-7a in various growth stages in thyroid of Yorkshire pig by quantitative Real-time PCR(qRT-PCR). To study the effect of miR-let-7a on apoptosis of thyroid cells, miR-let-7a transfected mimics cells were detected to determine the differences of thyroid cell apoptosis rates between the experimental and control groups with Flow Cytometry, and predicted that the target genes of miR-let-7a were related to cell apoptosis. The results showed that thyroglobulin (TG) in thyroid tissue and cells glowed green fluorescence after identification which proved thyroid cells *in vitro* normal function. In the embryonic period, the expression of miR-let-7a increased gradually with the rise of embryo age. In the growth period, the

基金项目: 国家自然科学基金(No. 31272424)、太原理工大学引进人才项目(No. tyut-rc201334a)和国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2011AA100302)

收稿日期: 2014-06-20 接受日期: 2014-07-14

expression reached the minimum at the 60th day and then increased, but after the 90th day it decreased again and lasted to the 120th day and then increased slowly. Compared with control group, the apoptosis rate of transfected group significantly increased ($P < 0.05$). In conclusion, suggested that the changes in miR-let-7a expression might affect the regulation on thyroid cell apoptosis directly or indirectly. The study provides useful clues for further research on the functional mechanism of miR-let-7a in pigs.

Keywords miR-let-7a, Thyroid cell, Cell apoptosis, Target genes

甲状腺是动物体非常重要的腺体,主要通过分泌甲状腺激素对动物机体产生影响。甲状腺激素(thyroid hormone, TH)是哺乳动物生长发育最重要的激素之一,有T3和T4两种主要形式,其中T3的生物活性最强(张颖等, 2013)。甲状腺激素对动物的生长、分化、发育和保持代谢平衡具有极其重要的作用(Boelaert et al., 2005)。TH作用非常广泛,机体的每个细胞几乎都是甲状腺激素作用的靶细胞,其可以促进组织分化、生长和成熟;可以促进物质与能量代谢;可以促进大脑的发育(Bernal, 2005);可以调控脂肪代谢(张颖等, 2013);可以促进骨骼肌细胞的分化,改变肌细胞性质等。

microRNA(miRNA)介导的调控方式是基因表达调控机制中不可或缺的重要组成部分。目前,对于miRNA在动物组织细胞和发育阶段及其在基因表达调控中的具体作用的研究已经成为功能基因组研究的热点。miRNA是一类长度很短的非编码小分子RNA,长度约22 nt,能够通过和靶mRNA特异性的碱基配对引起靶mRNA的降解或者抑制其翻译,从而实现对基因转录后表达的调控(O'Donnell, 2005)。miRNA编码基因大多位于基因间隔区、内含子或转录子内部,且多数miRNA属内含子miRNA(intronic-miRNA)(Ying, 2009),其转录独立于其他基因,并不翻译成蛋白质。据估计,在动物的全部基因中,miRNA大约参与了20%~30%基因的表达调控(Stark et al., 2005)。通过对miRNA的研究发现,基因组的非组蛋白编码区蕴藏着重要的生命功能活动信息,miRNA参与调控了哺乳动物一系列的生物学过程,包括发育、衰老、死亡的时序调控(Ambros, 2003; Boehm, Slack, 2005)、肌细胞分化(Townley-Tilson et al., 2010)、脂肪代谢和脂肪细胞分化(Parra et al., 2010; Li et al., 2010)、脑及神经发育(Landgraf et al., 2007)、心脏发育(Zhao et al., 2005)等。对miRNA调控机制的研究为动物生长及品质调控分子研究奠定了基础,对调控动物肌肉和脂肪组织生长发育、肉品质等具有重要意义,同时有助于疾病的治疗,并会给药物设计和针

对性治疗提供一个新的平台。

miR-let-7最早是在线虫(nematoda)中发现的,是线虫发育的时间调控器(Reinhart et al., 2000),被认为是miRNA的代表。目前猪miR-let-7家族成员主要有9个,分别是let-7a、let-7c、let-7d-3p、let-7d-5p、let-7e、let-7f、let-7g、let-7i、miR-98(Wernersson et al., 2005; Cho et al., 2010; Li et al., 2011)。let-7的表达既具有组织特异性,又有时间特异性。到目前为止,已有大量研究证实let-7参与了细胞分裂分化、脑和神经发育、心肺发育等器官发育的调控过程, Madhu等(2008)研究发现,miR-let-7对癌细胞的凋亡过程有一定的调控作用。但对于其参与调控甲状腺发育的研究还十分欠缺。因此,探索miR-let-7参与甲状腺发育的调控机制具有重要的科学意义。miR-let-7a是miR-let-7家族的成员,本研究采用荧光定量PCR(qRT-PCR)方法检测let-7a在大白猪不同生长阶段甲状腺中的表达差异;研究let-7a体外过表达对猪甲状腺细胞凋亡率的影响以及对miR-let-7a与细胞凋亡相关基因靶向关系的预测,以期为进一步研究miR-let-7家族调控甲状腺发育的分子机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

选取大白猪(*Sus scrofa*)胎龄60、80、105 d和日龄25、60、90、120、150、180 d等9个生长阶段的猪甲状腺组织,-80℃冷冻保存备用。采取猪甲状腺组织制成石蜡切片保存备用。选取新鲜猪甲状腺组织进行细胞培养。

1.1.2 主要试剂及仪器

免疫荧光技术所用设备为荧光显微镜(日本Nikon ECLIPSE Ti-S),流式细胞术所用设备为BD FACSCALIBUR流式细胞仪(美国),主要试剂为抗甲状腺球蛋白抗体(anti-thyroglobulin antibody)、羊

抗兔 IgG 荧光二抗(goat anti-rabbit IgG H&L)购自 Abcam(英国), Histo-Clear II(上海桑戈), 抗褪色封固剂(SlowFade® gold antifade reagent with DAPI)购自上海英潍捷基。荧光定量 PCR 仪为 Step one plus PCR System(ABI), 引物由上海英潍捷基合成。细胞培养液为 D-MEM/F-12(美国 GIBCO), 转染试剂为 Lipofectamine®RNAiMAX Reagent(美国 Invitrogen), miR-let-7a mimics 和 NC(negative control)序列由上海英潍捷基合成:

ssc-let-7a mimics: 5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3';
NC: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'.

凋亡试剂盒(Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit)由上海世仪提供。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫荧光鉴定甲状腺组织

将制成的组织石蜡切片用 Histo-clear 脱蜡 3 次, 100%、95%、85% 和 75% 乙醇分别浸洗切片, 磷酸缓冲盐液(PBS)漂洗, 37℃ 蛋白酶 K 处理 10 min, PBS 洗 2 次, 75%、85%、95% 和 100% 乙醇脱水处理。含 0.2% TritonX-100 的 DPBS 处理 5 min, PBS 洗 3 次, DPBS 室温封闭 1 h, 去除封闭液, 加入一抗室温孵育 1 h, 清洗一抗后加入 1:1 000 稀释的荧光二抗孵育 30 min, 最后用含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 清洗二抗, 然后滴加 SlowFade® Gold Antifade Reagent (with DAPI), 置于暗处 5 min 后在荧光显微镜下观察是否会发出绿色荧光显示抗原抗体复合物。

1.2.2 猪甲状腺细胞的培养

取猪的甲状腺组织, 保存在 PBS(含双抗)中带回实验室。甲状腺组织用 75% 乙醇浸泡 10 s, 在 PBS 中清洗 3 次, 剪碎成 2 mm 大小的组织块, 在 0.03% 的胶原酶 IV 和 0.25% 胰蛋白酶中 37℃ 消化 1 h, 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 再用 PBS 制成细胞悬液, 充分吹打后过细胞筛(100 目), 离心弃上清后用 D-MEM/F-12 培养液重悬细胞后, 计数并接种于培养板中, 置于 37℃ 培养箱中进行细胞培养 24 h。

1.2.3 RNA 提取与反转录

按照天根的总 RNA 的提取试剂盒(miRcute miRNA Isolation Kit)提取 RNA, 并用核酸蛋白检测仪(美国 NANODROP 2000c)检测 RNA 纯度和浓度, 符合要求的 RNA 参照天根的反转录试剂盒(miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit)

操作说明合成 cDNA 第一链。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

首先利用通用引物和特定的 miRNA 引物进行 PCR 扩增, 再参照天根的荧光定量检测试剂盒(miRcute miRNA qPCR Detection Kit)进行 qRT-PCR 检测。反应体系: 2×miRcute miRNA Premix 10 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, miRNA 第一链 cDNA 2 μL, 50×ROX Reference Dye 1.6 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL。反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ PCR 循环中变性 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环。取各样本 cDNA 与相应的引物按照以上条件混合后进行 PCR 扩增, 每个样本重复 3 次。本研究采用相对定量 qRT-PCR 法, 内参基因为 *Met*, 引物为 *Met*-tRNA。实验结果使用 2^{-ΔΔCt} 法进行统计分析并利用 SPSS16.0 软件进行差异显著性分析。qRT-PCR 扩增引物序列如下:

Met-tRNA: CAGAGTGGCGCAGCGGAAGC;

ssc-miR-let-7a: TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTAAA。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将处于对数生长期的细胞设置成 3 组: 空白对照组, 即未转染组; 阴性对照组, 即空载体转染组; miR-let-7a mimics 转染组, 细胞密度为 1×10⁶ cells/mL。转染 24 h 后将细胞消化成单细胞悬液并收集, 按照凋亡试剂盒说明书加入试剂, 最后使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况并利用 SPSS16.0 软件对结果进行差异显著性分析。

1.2.6 靶基因预测

通过 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取 ssc-let-7a 的成熟序列及染色体定位信息, 进行引物设计以及相关分析。利用在线预测网站 (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mir-walk/micronapredictedtarget.html>) 中的 miRanda、PicTar5、Targetscan 等软件的交集对 miR-let-7a 进行靶基因预测并利用 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 和 GO (<http://www.geneontology.org/>) 等在线分析工具对靶基因进行分析以及生物学通路预测。

2 结果与分析

2.1 猪甲状腺组织及细胞的鉴定

甲状腺球蛋白(thyroglobulin, TG)为甲状腺组织特异表达的蛋白, 检测甲状腺组织 TG 的表达量,

有利于更好地评估实验用甲状腺细胞的功能。结果如图1所示。鉴定的组织切片和体外培养的甲状腺细胞发出绿色荧光,结果表明,实验所取组织和体外培养的细胞鉴定为甲状腺组织和细胞且功能正常。

2.2 miR-let-7a 在大白猪不同生长阶段甲状腺中表达量的变化

qRT-PCR 检测 miR-let-7a 在 9 个生长阶段猪甲状腺组织中相对表达量的变化情况,结果如图 2 所示,胚胎期随着胎龄的增加, miR-let-7a 表达量逐渐增加。出生后 miR-let-7a 表达量下降,于 60 日龄达生长期最小值,之后有所上升,至 90 日龄后其表达量再次下降,120 日龄后随日龄的增加 miR-let-7a 表达量呈现逐渐增加的趋势。

2.3 miR-let-7a 过表达对甲状腺细胞凋亡的影响

利用流式细胞术检测了转染 24 h 后细胞凋亡率在不同实验组间的差异(图 3),转染 24 h 后,阴性组和未转染组的细胞凋亡率分别是(15.85±1.66)%和(13.88±1.29)%,而转染组的细胞凋亡率为(20.45±2.26)%。结果表明,与未转染组相比,转染组的细胞凋亡率显著升高了,差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明 let-7a 的上调对甲状腺细胞凋亡存在一定的影响。

2.4 靶基因预测

利用在线预测网站中的 miRanda、PicTar5、Targets can 等软件的交集对 miR-let-7 进行靶基因预测并采用 DAVID 中的 KEGG 软件对其进行通路分析,

结果见表 1。预测的 hsa-let-7a(人的 miR-let-7a)的靶基因显著富集于 16 个通路中($P<0.05$)。从中筛选出 miR-let-7a 与细胞凋亡相关的靶基因 **FAS**(肿瘤坏死因子受体 6)和 **FASLG**(肿瘤坏死因子 6),具体的结合位点见图 4。

3 讨论

miR-let-7a 是 let-7 家族非常重要的成员。猪的 let-7a 定位于 9q10.2。随着研究的不断深入,已经有报道称 let-7a 在动物的生长发育、细胞的分化(Boyerinas et al., 2010)、增殖(Johnson et al., 2007)与凋亡等方面发挥越来越重要的作用。但目前对 miR-let-7a 在猪甲状腺组织中的时空表达机制的研究还鲜有报道。本研究发现 miR-let-7a 在猪胚胎

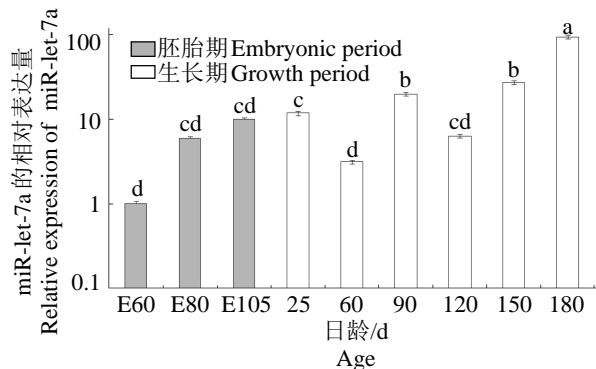


图 2 qRT-PCR 检测 miR-let-7a 不同生长阶段表达量变化
Figure 2 The expression variation of miR-let-7a at different growth stages by qRT-PCR

内参基因: **Met**; n=3; 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下同

Reference gene: **Met**; n=3; Different letters indicate significant difference($P<0.05$), the same below

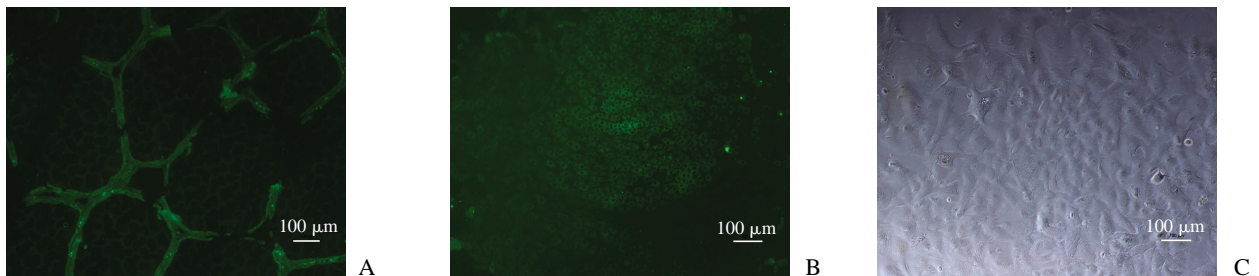


图 1 猪甲状腺 TG 的免疫荧光鉴定

Figure 1 Identification of thyroglobulin in pig thyroid by immunofluorescence

A: 猪甲状腺组织切片, 甲状腺球蛋白 TG 发出绿色荧光, 表明所取甲状腺组织功能正常; B: 猪甲状腺体外培养细胞; C: 未染色的猪甲状腺细胞

A: The pig thyroid tissue section, TG glowed green fluorescence which proved that thyroid tissue normally function; B: The pig thyroid cells *in vitro* (with green fluorescence); C: The pig thyroid cells without staining

表1 hsa-let-7a靶基因KEGG通路

Table 1 KEGG pathway for targets of hsa-let-7a

名称 Term	数目 Count	显著性 P value	校正值 Benjamini
膀胱癌 Bladder cancer	13	6.9E-04	1.2E-01
丝裂原激活的蛋白激酶信号通路 MAPK signaling pathway	44	1.3E-03	1.1E-01
黑素瘤 Melanoma	17	1.7E-03	9.5E-02
癌症通路 Pathways in cancer	51	1.9E-03	8.2E-02
慢性粒细胞白血病 Chronic myeloid leukemia	17	3.0E-03	1.0E-01
胰腺癌 Pancreatic cancer	16	5.1E-03	1.4E-01
p53 信号通路 p53 signaling pathway	15	7.5E-03	1.8E-01
细胞外基质受体相互作用 ECM-receptor interaction	17	9.6E-03	1.9E-01
转化生长因子信号通路 TGF-beta signaling pathway	17	1.3E-02	2.3E-01
溶酶体 Lysosome	21	1.4E-02	2.2E-01
II 型糖尿病 Type II diabetes mellitus	11	1.8E-02	2.5E-01
神经胶质瘤 Glioma	13	2.3E-02	3.0E-01
粘着斑 Focal adhesion	30	3.2E-02	3.7E-01
促性腺激素释放激素信号通路 GnRH signaling pathway	17	3.8E-02	3.9E-01
N-糖链生物合成 N-Glycan biosynthesis	10	4.0E-02	3.8E-01
硫酸乙酰肝素生物合成 Heparan sulfate biosynthesis	7	4.3E-02	3.9E-01

期甲状腺的表达量随着胚龄的增加呈现出逐渐增加的态势,生长期表达水平呈现先降低后增加的趋势。胚胎期的表达量变化趋势说明,miR-let-7a与胚胎期甲状腺的发生和发育有着极为重要的联系。出生后在25~60日龄时表达量下降,可能是由于仔猪断奶应激所产生的影响,断奶会从生理、营养等方面对仔猪产生生长抑制,对甲状腺的发育也会产生一定的抑制作用,从而影响到miR-let-7a的表达量,使之下降。本研究结果显示大白猪出生后miR-let-7a的表达量呈先降低后增加的趋势,于60日龄达最小值。而王燕丽(2012)等研究发现大白猪出生后血液中甲状腺激素水平随着日龄的增加

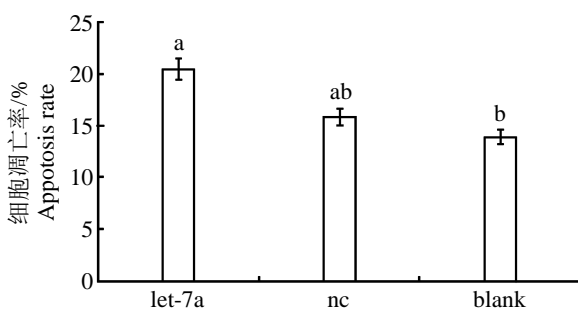


图3 流式细胞仪检测甲状腺细胞凋亡率的差异性

Figure 3 The difference in apoptosis rate of thyroid cell by flow cytometry

nc: 阴性组; 与未转染组(blank)相比, 转染组(let-7a)的细胞凋亡率显著升高

nc: Negative control; Compared with control group(blank), the apoptosis rate of transfection group(let-7a) significantly increased

呈先升高后降低的趋势,于2月龄达最大值。甲状腺主要通过甲状腺激素发挥作用,作用十分广泛,涉及到机体的生长发育、组织分化、物质代谢以及多种系统、器官的功能。由此可推测大白猪甲状腺激素表达水平的下降可能会直接或间接上调miR-let-7a的表达量,这也说明了miR-let-7a的表达对甲状腺的功能调控可能存在重要的影响。

目前对miR-let-7a的报道主要集中在其与癌症发生的关系,很多研究数据显示miR-let-7a在一些癌变组织中下调并且这种下调会诱导细胞发生癌变(Kumar et al., 2007; Liu et al., 2013), Dong等(2010)研究发现,miR-let-7a的表达在前列腺癌组织和细胞系中是显著下调的,其能够通过诱导细胞周期停滞在G0~G1期从而抑制前列腺癌细胞的生长。Colamaio等(2012)研究发现,miR-let-7a对甲状腺滤泡样肿瘤有抑制作用,并且通过miR-let-7a的过表达与沉默实验研究了其对甲状腺细胞形态的影响、对癌变与正常甲状腺细胞粘附以及迁移能

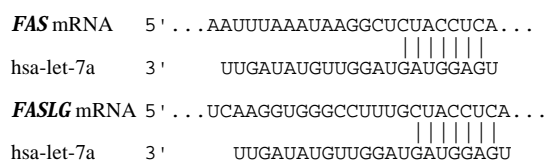


图4 miR-let-7a与FAS、FASLG基因在3'UTR的结合位点预测

Figure 4 The prediction of binding sites between miR-let-7a and FAS, FASLG genes in 3'UTR

力的影响。鉴于 miR-let-7a 对癌细胞增殖与凋亡的影响,本研究在分析了 miR-let-7a 在猪甲状腺中的表达量变化之后,对 miR-let-7a 在正常甲状腺中的作用进行了研究。研究发现通过在甲状腺细胞过表达 miR-let-7a 后,细胞凋亡率明显增加,说明 miR-let-7a 促进甲状腺细胞的凋亡,由此可推测 let-7a 可能在猪甲状腺发育过程中发挥重要的作用。miR-let-7a 对细胞凋亡的影响也为与细胞凋亡相关的 miR-let-7a 靶基因的预测提供了基础资料。

miRNA 对靶基因的转录后调控是一个非常复杂且精确的调控网络,既可以通过一个 miRNA 来调控多个基因的表达,也可以通过多个 miRNA 的组合来调控某个基因的表达。这种复杂的调控网络在细胞分化、增殖与凋亡等方面发挥着极其重要的作用(马义涛等, 2013)。本研究通过 KEGG 对 miR-let-7a 的候选靶基因进行通路分析,发现候选靶基因显著富集在 16 个通路中。候选靶基因中有两个基因与细胞凋亡有着密切的联系,分别是 *FAS* 和 *FASL*,其主要参与丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway)、p53 信号通路(p53 signaling pathway)等与细胞凋亡相关的通路。*FAS* 基因位于人染色体 10q24.1,其编码的蛋白质是一种由 362 个氨基酸组成的 I 型单跨膜糖蛋白,是肿瘤坏死因子受体家族(TNF-receptor superfamily)的一员,又称为 TNFRSF6。*FASLG* 基因位于人染色体 1q23,其编码一种由 281 个氨基酸组成的 II 型跨膜糖蛋白,是肿瘤坏死因子家族(TNF superfamily)的一员,又称为 TNFSF6,是 *FAS* 的天然配体。细胞凋亡信号的级联由 *FAS* 与 *FASL* 的交联激活(Nagata et al., 1995),即 *FAS/FASL* 的结合能够诱导细胞凋亡的发生。目前已经有大量的研究证实了 *FAS*、*FASLG* 对细胞凋亡的影响,其中对癌细胞、肿瘤细胞的作用尤其甚(Chopin et al., 2002; Yao et al., 2013)。miRNA 及其靶基因的表达构成了一个极其严密的调控网络,确保各个生理过程的正常运行。越来越多的证据表明了 miRNA 在细胞凋亡通路的调控作用(Yamada et al., 2014; Wang et al., 2011a)。Wang 等(2011b)研究发现 let-7/miR-98 直接靶向 *FAS* 3'UTR 区并且转染 miR-98 后能够下调 *FAS* 诱导的宫颈癌细胞凋亡,表明 let-7/miR-98 参与了 *FAS* 介导的细胞凋亡过程。Geng 等(2011)发现 let-7(7a,7d,7f) 与 *FAS* mRNA 的表达变化在一些癌细胞系中(包括肝癌细胞,结肠癌细胞等)是相反的,进一步验证了 miR-let-7a 与 *FAS* 之间的靶向关系,之后深入研究发现 miR-

let-7a 抑制剂使人结肠癌细胞株(HT29 cells)对 *FAS* 诱导的细胞凋亡变得敏感,进一步说明了 miR-let-7a 对细胞凋亡的作用。由此可推测,在甲状腺细胞中 miR-let-7a 对 *FAS* 和 *FASL* 表达变化以及其介导的细胞凋亡通路可能存在一定的调控作用,为进一步研究 miR-let-7a 对猪甲状腺细胞凋亡的调控机制提供了基础资料。

4 结论

本研究通过分析 miR-let-7a 在大白猪不同生长阶段的甲状腺组织中的表达量变化,探讨了 miR-let-7a 对猪甲状腺发生发育可能的作用机制。进一步研究发现,miR-let-7a 的过表达对猪甲状腺细胞的凋亡产生了促进作用。利用生物信息学软件对 miR-let-7a 的靶基因进行了预测以及通路分析,发现,miR-let-7a 与 *FAS*、*FASL* 可能存在靶向关系,综合相关研究报道,推测 let-7a 可能通过靶向 *FAS*、*FASL* 基因对甲状腺细胞的凋亡起作用。由于 *FAS*、*FASL* 与癌症之间存在很大的相关性,所以本实验也为深入研究人类的甲状腺疾病提供了新的思路和有益的线索。

参考文献

- 马义涛,李艳华,周辉云,等. 2013. 阉割对金华猪肝脏 miR-122 和 miR-378 表达量和膻味性状的影响[J]. 农业生物技术学报, 21(8): 957-964. (Ma Y T, Li Y H, Zhou H Y, et al. 2013. Effect of castration on the boar taint and the expression variation of miR-122 and miR-378 in liver of Jinhua pig(*Sus scrofa*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 21(8): 957-964.)
- 王燕丽,李艳玲,郝柱,等. 2012. 猪不同生长阶段甲状腺结构的形态计量学研究[J]. 畜牧兽医学报, 43(4): 521-526. (Wang Y L, Li Y L, Hao Z, et al. 2012. Morphometry study on the structure of thyroid gland at the different stages in pigs[J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 43(4): 521-526.)
- 张颖,姚璇,宋宜云,等. 2013. 甲状腺激素与代谢调控[J]. 生命科学, 25(2): 176-182. (Zhang Y, Yao X, Song Y Y, et al. 2013. Thyroid hormone and metabolic regulation[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 25(2): 176-182.)
- Ambros V. 2003. MicroRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing[J]. Cell, 114(2): 673-676.
- Bernal J. 2005. Thyroid hormones and brain development[J].

- Vitam Horm, 71: 95-122.
- Boehm M, Slack F. 2005. A development timing microRNA and its target regulate life span in *C.elegans*[J]. Science, 310(5756): 1954-1957.
- Boyerinas B, Park S M, Hau A, et al. 2010. The role of let-7 in cell differentiation and cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 17(1): F19-36.
- Chopin V, Toillon R A, Jouy N, et al. 2002. Sodium butyrate induces P53- independent, Fas- mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells[J]. Britain Journal of Clinical Pharmacology, 135(1): 79-86.
- Colamaio M, Cali G, Sarnataro D, et al., 2012. Let-7a down-regulation plays a role in thyroid neoplasias of follicular histotype affecting cell adhesion and migration through its ability to target the *FXRD5* (dysadherin) gene[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 97(11): E2168-2178.
- Dong Q, Meng P, Wang T, et al. 2010. MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* by targeting *E2F2* and *CCND2*[J]. Plos One, 5(4): e10147.
- Geng L, Zhu B, Dai B H, et al. 2011. A let-7/Fas double-negative feedback loop regulates human colon carcinoma cells sensitivity to Fas-related apoptosis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 408(3): 494-499.
- Johnson C D, Esquela-Kerscher A, Stefani G, et al. 2007. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells[J]. Cancer Research, 67(16): 7713-7722.
- Kumar M S, Lu J, Mercer K L, et al. 2007. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis[J]. Nature Genetics, 39(5): 673-677.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing[J]. Cell, 129(7): 1401-1414.
- Li G, Li Y, Li X, et al. 2011. MicroRNA identity and abundance in developing swine adipose tissue as determined by Solexa sequencing[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 112: 1318-1328.
- Li H, Zhou X, Wang Z, et al. 2010. Effects of microRNA-143 in the differentiation and proliferation of bovine intramuscular preadipocytes[J]. Molecular Biology Reports, 38(7): 4273-4290.
- Liu P, Qi M, Ma C, et al. 2013. Let7a inhibits the growth of endometrial carcinoma cells by targeting Aurora-B[J]. FEBS Letters, 587(16): 2523-2529.
- Nagata S, Golstein P. 1995. The Fas death factor[J]. Science, 267(5203): 1449-1456.
- O'Donnell K A, Wentzel E A, Zeller K I, et al. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. Nature, 435(7043): 839-843.
- Parra P, Serra F, Palou A. 2010. Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice[J]. Plos One, 5(9): e13005.
- Reinhart B J, Slack F A, Basson M, et al. 2000. The 21 nucleotide let-7 RNA regulates *C. elegans* developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 403(6772): 901-906.
- Stark A, Brennecke J, Bushati N, et al. 2005. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution[J]. Cell, 123(6): 1133-1146.
- Townley-Tilson W H, Callis T E, Wang D. 2010. MicroRNAs 1, 133, and 206; Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function and disease[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 42(8): 1252-1255.
- Wang H Q, Yu X D, Liu Z H, et al. 2011a. Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3[J]. The Journal of Pathology, 225(2): 232-242.
- Wang S, Tang Y, Cui H, et al. 2011b. Let-7/miR-98 regulate Fas and Fas-mediated apoptosis[J]. Genes and Immunity, 12(2): 149-154.
- Wernersson R, Schierup M H, et al. 2005. Pigs in sequence space: A 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing[J]. BMC Genomics, 6: 70.
- Yamada N, Noguchi S, Kumazaki M, et al. 2014. Epigenetic regulation of microRNA-128a expression contributes to the apoptosis-resistance of human T-cell leukaemia jurkat cells by modulating expression of Fas-associated protein with death domain (FADD) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1843(3): 590-602.
- Yao Y, Li L, Huang X, et al. 2013. SERPINA3K induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activating the Fas/FasL/caspase-8 signaling pathway[J]. FEBS Letters, 280(14): 3244-3255.
- Ying S Y, Lin S L. 2009. Intron-mediated RNA interference and microRNA biogenesis[J]. Methods in Molecular Biology, 487: 387-413.
- Zhao Y, Samal E, Srivastava D. 2005. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets hands during cardiogenesis[J]. Nature, 436: 214-220.