



舒嘉傲,曹少先,孟春花,等. 湖羊 lncRNA-269 的鉴定及转录调控分析[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):174-182.

SHU Jia'ao, CAO Shaoxian, MENG Chunhua, et al. Identification and transcriptional regulation analysis of lncRNA-269 in Hu sheep[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 174-182.

湖羊 lncRNA-269 的鉴定及转录调控分析

舒嘉傲^{1,2}, 曹少先², 孟春花², 钱勇², 张俊², 张建丽², 丁强², 李隐侠^{1,2*}, 李齐发¹

(1.南京农业大学动物科技学院,江苏南京 210095;2.江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏南京 210014)

摘要: [目的] 本文旨在研究湖羊长链非编码 RNA-269 (long no-coding RNA-269, lncRNA-269) 序列特征、表达模式和转录调控, 为后续开展 lncRNA-269 的功能研究提供理论基础。 [方法] 以湖羊为研究对象, 采用 5'/3' RACE 结合 PCR 扩增方法获得其序列全长, 利用 RT-qPCR 方法鉴定其在湖羊组织中的表达模式, 并利用 PCR 方法扩增其启动子区, 鉴定其启动子区特征, 分析其转录调控情况。 [结果] 湖羊 lncRNA-269 全长 3 146 bp, 组织表达谱显示其在湖羊各组织中广泛表达, 且在健康卵泡中显著高表达, 其表达水平与 NR5A1 mRNA 水平和血清中雌二醇 (E₂) 水平呈正相关。荧光素酶活性分析发现在 lncRNA-269 启动子区的 -359~-17 nt 有 1 个转录激活基序, 在 -1 485~-942 nt 有 1 个转录抑制基序。JASPAR 软件预测发现在 lncRNA-269 转录抑制启动子区域存在 FOXO3、PDX1 等转录因子结合位点, 在转录激活区域有 SMAD4、YY1 等转录因子结合位点。过表达 SMAD4 可显著提升 lncRNA-269 启动子区荧光素酶活性, 染色质免疫沉淀 (ChIP)-PCR 试验进一步确认了 SMAD4 特异性与 lncRNA-269 启动子区结合。 [结论] 湖羊 lncRNA-269 在健康卵泡中显著高表达, 其启动子区存在一个转录激活区域和一个转录抑制区域, 转录因子 SMAD4 可通过与 lncRNA-269 启动子区结合显著上调 lncRNA-269 的启动子活性。

关键词: 湖羊; 卵巢卵泡; lncRNA-269; 5'/3' RACE; 染色质免疫沉淀 (ChIP)

中图分类号: S826

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)01-0174-09

Identification and transcriptional regulation analysis of lncRNA-269 in Hu sheep

SHU Jia'ao^{1,2}, CAO Shaoxian², MENG Chunhua², QIAN Yong², ZHANG Jun²,
ZHANG Jianli², DING Qiang², LI Yinxia^{1,2*}, LI Qifa¹

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: [Objectives] The paper aimed to study the sequence characteristics, expression patterns and transcriptional-regulation of lncRNA-269 of Hu sheep in order to provide theoretical basis for further research on its function. [Methods] Taking Hu sheep as the object, the full length of its sequence was obtained by 5'/3' RACE combined with PCR. RT-qPCR was used to identify its expression pattern in Hu sheep tissues; its promoter sequence was amplified using PCR method; the characteristics of its promoter region was identified, and its transcriptional regulation was analyzed. [Results] The total length of lncRNA-269 in Hu sheep was 3 146 bp, which was widely expressed in various tissues of Hu sheep, and significantly expressed in healthy follicles. Its expression level was positively correlated with NR5A1 mRNA and serum E₂ level. The luciferase activity analysis showed that there was a transcriptional activation motif between -359 and -17 nt in lncRNA-269 promoter region, and a transcriptional inhibition motif between -1 485 and -942 nt. JASPAR software predicted that some transcription factor binding sites such as FOXO3 and PDX1 existed in transcriptional inhibition region, and SMAD4 and YY1 existed in transcriptional activation region. The overexpression of SMAD4 significantly increased the luciferase activity of lncRNA-269, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) and PCR (ChIP-PCR) assay further confirmed the specificity of SMAD4 binding to lncRNA-269 promoter region. [Conclusions] lncRNA-269 was highly expressed in the healthy follicles of Hu sheep. There was a transcriptional activation region and a transcriptional inhibition region in its promoter region. The transcription factor SMAD4 could significantly up-regulate the promoter activity of lncRNA-269 by binding with the lncRNA-269 promoter region.

Keywords: Hu sheep; ovaries follicles; lncRNA-269; 5'/3' RACE; chromatin immunoprecipitation (ChIP)

长链非编码 RNA (long no-coding RNA, lncRNA) 是非编码 RNA 家族的重要成员之一, 一般通过影响临近基因表达 (顺式作用) 和调控远端基因表达 (反式作用) 2 种方式^[1-2] 来调控细胞增殖和凋亡^[3]、雌激素

收稿日期: 2022-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32102550)

* 通信作者: 李隐侠, 副研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: liyxmh@126.com。

和孕激素的分泌^[4]、DNA 损伤与卵巢早衰^[5]、卵母细胞的成熟等多种生物学进程^[6]。在猪卵巢颗粒细胞中,lncRNA *TCONS_00814106* 作为一种竞争性内源 RNA,通过吸收 miR-1343 调节转化生长因子 β 受体 1 (*TGFBRI*) 的表达,进而促进猪颗粒细胞 (GC) 的增殖并抑制凋亡^[7]。在小鼠卵巢中,lncRNA *Xist* 通过与细胞核中 pre-miR-23b 或 pre-miR-29a 结合阻止两者向细胞质输出,导致 miR-23b-3p/miR-29a-3p 成熟度降低,从而上调 miR-23b-3p/miR-29a-3p 的靶基因突触融合蛋白基因 (*STX17*) 表达,进而调控小鼠围产期卵母细胞丢失^[8]。lncRNA *Rose* 定位于细胞质,其表达下调导致小鼠卵母细胞减数分裂和早期的胚胎发育的异常,说明 lncRNA *Rose* 在哺乳动物卵母细胞成熟和胚胎发育中发挥重要功能^[9]。在人的卵巢颗粒细胞系 (KGN) 中,lncRNA *HCP5* 通过 miR-27a-3p/IGF-1 轴调控 KGN 中细胞的增殖^[7],同时也可通过影响邻近基因 *mutS* 同源物 5 (*MSH5*) 转录和 DNA 损伤修复参与调控卵巢早衰^[5]。lncRNA 还参与调节选择性剪接、细胞分化和细胞周期调节,并参与调节许多疾病的发生。例如:Wu 等^[10] 发现 lncRNA *BC200* 可参与细胞周期、调节癌症细胞的生长和侵袭;Zhang 等^[11] 证实 lncRNA *MALAT1* 通过调节颗粒细胞 TGF- β 信号参与多囊卵巢综合症 (PCOS) 的病理生理过程。功能性 lncRNA 在人类和其他哺乳动物中的研究已有多例,而在高繁殖力湖羊中的发掘和相关功能还有待探索。

NR5A1 基因是孤儿核受体 NR5A (nuclear receptor 5A) 家族第一个被发现的成员,也是一种重要的转录因子,与哺乳动物雌性生殖、卵泡发育、类固醇生成等关系密切^[12-13]。*NR5A1* 基因定位于绵羊的 3 号染色体,在湖羊中的研究发现 *NR5A1* 参与调控湖羊的卵泡发育^[14],在核心启动子区鉴定的 -388G/C 突变与湖羊的产羔数显著关联^[15],说明 *NR5A1* 基因是湖羊繁殖性能调控的关键基因。在湖羊 *NR5A1* 基因邻近处发现一个 lncRNA-105611269 (简称 lncRNA-269),前期预试验发现湖羊血清中 lncRNA-269 RNA 的表达水平与 *NR5A1* 表达水平和雌二醇 (E_2) 水平呈正相关,推测其可能通过顺式作用影响 *NR5A1* 表达从而参与调控湖羊繁殖。但 lncRNA-269 在湖羊中的序列特征及转录调控还未见报道。因此,本试验以湖羊为研究对象,扩增 lncRNA-269 基因全序列并分析其序列特征,检测其在湖羊组织中表达模式,扩增启动子区,分析启动子区活性和转录因子对 lncRNA-269 的转录调控作用,为解析 lncRNA-269 在湖羊卵巢中调控机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验中用来进行 lncRNA-269 组织表达谱鉴定的湖羊组织、全血和血清来自江苏省农业科学院六合动物试验基地羊场。湖羊屠宰后取其心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、卵巢、子宫和肌肉组织于液氮保存并带回实验室,转入 -80 °C 冰箱保存用于 DNA 和 RNA 的提取及后续试验。用来分离卵泡和卵巢颗粒细胞的湖羊卵巢来自江苏省太仓市东林屠宰场,新鲜卵巢取出后置于 37 °C 生理盐水中,6 h 以内带回实验室,分离颗粒细胞并培养用于后续研究。

1.2 湖羊卵巢卵泡分离以及卵巢颗粒细胞的分离和培养

湖羊卵巢用生理盐水冲洗干净,用剪刀剪去周围多余组织,再用生理盐水清洗 2 遍。用手术剪刀和镊子剥离中等大小卵泡 (直径 3~5 mm),观察卵泡状态和卵泡液的澄清度区分健康卵泡和闭锁卵泡。抽取每个卵泡的卵泡液,离心后上层卵泡液用来测雌二醇和孕酮的水平,进一步确认卵泡状态;下层颗粒细胞用来提取 RNA 备用;用注射器抽取直径 3~5 mm 健康卵泡中的卵泡液,1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃上清液,用 PBS 冲洗 2 遍,再加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (Gibico 公司) 混匀铺板,24 h 后换液,观察颗粒细胞密度后进行后续试验。

1.3 湖羊 RNA、DNA 的提取及雌二醇和孕酮水平测定

采用高纯度 RNA 提取试剂盒 (上海浦迪生物科技有限公司) 提取湖羊各组织 RNA 和卵巢颗粒细胞 RNA,采用常规酚/氯仿方法提取组织 DNA,并用 Nanodrop2000 检测 RNA 和 DNA 的浓度和纯度,-80 °C 保存备用。使用 ELISA 检测试剂盒 (北方生物科技有限公司) 检测卵泡液中雌二醇和孕酮水平。

1.4 引物设计、PCR 扩增与测序

根据 NCBI GenBank 数据库中湖羊 lncRNA-269 预测序列 (序列号:XR_003588618.2),设计湖羊 lncRNA-269 全长引物 (包括 RNA 部分序列和 5'、3' 调控区序列的引物)、定量 PCR 引物和启动子荧光素酶报告载体引物,由南京擎科生物科技有限公司合成。具体引物设计如表 1。PCR 扩增体系为 25 μ L,包括

2×*Taq* Master Mix (Dye Plus) 酶 12.5 μL, 双蒸水 8.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, 湖羊基因组 DNA 2 μL。PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 62 °C 15 s, 72 °C 1 min, 循环 35 次; 72 °C 5 min。PCR 产物经 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 切取目的条带, 使用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (北京擎科生物科技股份有限公司) 纯化回收并连接 pMD19-T 载体 (TaKaRa), 转化 DH5α 后涂于含氨苄青霉素的 LB 培养板 (氨苄青霉素浓度 100 μg·mL⁻¹), 37 °C 倒置培养过夜后挑取单克隆摇菌, PCR 鉴定后送北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	大小/bp Size	退火温度/°C Anneal temperature	用途 Usage
P1-5'GSP	R: CAGTTGGGGAGGAATACAGAAGCAGGC		67.5	5'RACE
P2-3'GSP	F: TCCTCCCTAACCCCTCACCTTACTGC		69.2	3'RACE
P3	F: GTGGTCACCTTGGAGGGCAGACACATC R: GCTCTGATGGACTGTCTAGGCTGGTGA	1 065	65.0	RACE 扩增已知片段
P4	F: TGCAGCAGATAAGATTCCTCACTCCCA R: GGCAGCTTCCACAGCTTCACTAGGGAC	885	66.5	RACE amplification of known fragments
P5-plnc269-1F	F: CTAGCTAGCGTCCATCATCTGGGTCATAT R: CCGCTCGAGGTAAGAACCAGAGTAGTC	342	66.0	
P6-plnc269-2F	F: CTAGCTAGCGTACATAGGTGTAAGTAGCC R: CCGCTCGAGGTAAGAACCAGAGTAGTC	588	58.2	lncRNA-269 启动子区载体构建
P7-plnc269-3F	F: CTAGCTAGCAGGCAATAGTAAGAGATAAA R: CCGCTCGAGGTAAGAACCAGAGTAGTC	924	62.5	Construction of lncRNA-269 promoter vector
P8-plnc269-4F	F: CTAGCTAGCCTCTTACACACCCAAACCTA R: CCGCTCGAGGTAAGAACCAGAGTAGTC	1 468	62.5	
P9-SMAD4	F: ATAGCTAGCTTCGCTGCTTCCAAAAGATC R: GTCAAGCTTGCCATGCCTGAAAAGTTCTAAGT	1 949	68.0	SMAD4 过表达载体构建 Construction of SMAD4 overexpression vector
P10-GAPDH	F: GGAATCATGACCACGGTCCAT R: TCAGATCCAGAACCAGACACGT	220	60.0	RT-qPCR
P11-lnc269	F: AGATGCAAGATCTACCTACG R: CCGTGCCTTTACATTTCTA	143	53.0	
P12-SBE	F: TCCATCATCTGGGTCATATATAG R: GCTGTGGCTTAGAGGACAACCTC	226	58.0	ChIP-PCR
P13-SBE-M	F: TATTATCAGTGCTAAGGTCC R: GCTACTGAAGTGTTTACCCATT	260	56.5	

1.5 RT-qPCR

使用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 逆转录试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司) 将 RNA 逆转录为 cDNA, 包括 500 ng 总 RNA、4×gDNA wiper 4 μL, 加 RNase-free ddH₂O 补充至 16 μL, 42 °C 反应 2 min; 随后在反应产物中加 5×HiScript III qRT SuperMix 4 μL, 37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 s。用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Low Rox Premixed) 定量试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司) 进行 RT-qPCR。反应体系 (20 μL): 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix (Low ROX Premixed) 10 μL, ddH₂O 7.2 μL, 上、下游引物各 0.4 μL, cDNA 模板 2 μL; 反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 熔解曲线 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。以 *GAPDH* 为内参基因, 每个样品至少重复 3 次试验, 采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算目的基因的相对表达水平。

1.6 5'/3'RACE 扩增

根据扩增获得的序列设计 5' 和 3' 特异性引物 (5' GSP 和 3' GSP) 用于 lncRNA-269 cDNA 末端的快速扩增。具体步骤: 1) 5'/3' RACE-Ready cDNA 合成: 以湖羊卵巢组织 mRNA 为模板合成 5' 和 3' RACE 的 ready cDNA, 包括 mRNA 1 μg, 5'/3' CDS Primer 2 μL, dNTP Mix 2 μL, RNase-free 双蒸水补充至 13 μL/14 μL, 于 PCR 仪中 72 °C 反应 3 min 后置于冰上; 加入 5×FS Buffer 4 μL, 10×Enzyme Mix 2 μL, 5' TS Oligo (5' 扩增添加) 1 μL, 于 PCR 仪中 42 °C 反应 90 min, 70 °C 反应 15 min 后置于 4 °C 保存。2) 配制 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 反应体系 (20 μL): 5'/3' RACE-Ready cDNA 2 μL, 5'/3' GSP (10 μmol·L⁻¹) 2 μL, 10×Universal Primer Mix (UPM) 2 μL, 2×PCR Mix 10 μL, 双蒸水 4 μL; 反应程序: 98 °C 1 min, 98 °C 10 s, 63 °C 15 s, 72 °C 3 min, 25 个循环; 72 °C 5 min。以 cDNA 末端快速扩增产物为模板, 设计巢式短引物进行普通 PCR 扩增, 产物连接到 pMD19-T 载体后送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序, 获取 lncRNA-269 5' 和 3' 序列。

1.7 载体构建、细胞转染及荧光素酶活性试验

设计带有保护碱基和酶切位点的特异性引物扩增不同长度的湖羊 lncRNA-269 启动子区片段和 SMAD4 CDS 区(表 1)。随后分别利用限制性核酸内切酶 *Xho* I/*Nhe* I 和 *Nhe* I/*Hind* III 酶切目的载体和目的片段,置于 16 °C 金属浴中连接过夜,对产物进行转化并挑取单克隆送公司检测。使用转染试剂 Lipofectamine 3000(Invitrogen 公司)将 pcDNA3.1-SMAD4 质粒转染湖羊卵巢颗粒细胞,48 h 后收集细胞并提取 RNA 和蛋白进行表达水平检测;将 pGL3-lnc-269 的 4 个截短质粒转染卵巢颗粒细胞,48 h 后用荧光素酶活性检测试剂盒(Promega 公司)检测萤火虫荧光与海肾荧光活性并计算相对荧光活性(萤火虫荧光与海肾荧光的比值),分析 lncRNA-269 启动子区特征。

1.8 生物信息学分析

采用 Promoter 2.0 在线软件预测湖羊 lncRNA-269 的潜在启动子区。采用 JASPAR 在线公共数据库(<http://jaspar.genereg.net/>)分析湖羊 lncRNA-269 基因核心启动子区潜在的转录因子结合位点。采用 CPC 在线软件(<http://cpc2.cbi.pku.edu.cn/>)预测序列扩增拼接得到的 lncRNA-269 的蛋白编码能力。

1.9 染色质免疫沉淀(ChIP)-PCR 试验

将湖羊卵巢颗粒细胞体外培养于 10 cm 细胞培养皿中 48 h,依次加入 135 μ L 37%多聚甲醛、220 μ L 2.5 mol·L⁻¹甘氨酸,再置于 37 °C 摇床 110 r·min⁻¹ 振摇 10 min,促使蛋白质与染色质交联。收集细胞并利用超声波破碎仪将染色质碎片化。超声波破碎仪参数:40%输出功率,30 个循环,每个循环打开破碎 5 s、关闭冷却 15 s。随后,在该体系中依次添加蛋白酶抑制剂和预先配制好的 Protein A+G beads 与 SMAD4 一抗混合物,并置于 4 °C 条件下振摇孵育过夜,充分调取 SMAD4-DNA 复合物。最后利用 5 mol·L⁻¹氯化钠溶液解除交联,纯化后得到与 SMAD4 富集的 DNA 片段。以添加 IgG 一抗作为阴性对照组,以基因组 DNA 作为阳性对照组(Input)。设计引物 SBE(SMAD4 binding element)和 SBE-M 分别扩增含有 SMAD4 结合位点和不含 SMAD4 结合位点的 DNA 片段,用于检验 SMAD4 特异和非特异性结合情况。引物信息见表 1。

1.10 数据统计分析

利用 SPSS v20.0 和 GraphPad Prism v6 软件进行方差分析和差异显著性检验。试验结果以平均值 \pm 标准误($\bar{x}\pm SE$)的形式表示,2 组不同处理间差异显著性检验采用双尾 *t* 测验法进行分析;采用 SPSS 20.0 软件中 ANOVA 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 湖羊 lncRNA-269 全序列扩增

分别设计 5'GSP 和 3'GSP 引物,利用 RACE 方法克隆 lncRNA-269 5'UTR 和 3'UTR 序列,设计 2 对引物 P3 和 P4 扩增中间段序列,结果显示每对引物中间都有重叠区域(图 1-A)。5'RACE 和 3'RACE 分别获得比较明显的 PCR 条带,经过序列比对分析发现,5'RACE 和 3'RACE 分别扩增获得 611 和 1 020 bp 序列,P3 和 P4 引物分别获得 1 065 和 885 bp 序列(图 1-B)。经过序列比对和拼接,最终得到湖羊 lncRNA-269 全序列,全长 3 146 bp,与 NCBI 预测的全长同源性 99.4%。通过 CPC 在线工具预测发现 lncRNA-269 转录本的蛋白编码能力为 0.045,说明 lncRNA-269 无蛋白编码能力。

2.2 湖羊 lncRNA-269 组织表达分析

经 RT-qPCR 检测,结果(图 2)发现 lncRNA-269 在湖羊肾、脾、肝、肺、子宫、卵巢、大肠、小肠和肌肉组织中均广泛表达,而在肌肉组织中相对低表达,在肾脏、脾脏和卵巢中相对高表达。

分离卵巢卵泡,根据卵泡液中 E₂/孕酮比值并结合卵泡外观情况,区分健康卵泡和闭锁卵泡,RT-qPCR 检测发现 lncRNA-269 在湖羊健康卵泡中的表达水平显著高于闭锁卵泡($P<0.05$)。

2.3 湖羊 lncRNA-269 表达水平和 NR5A1 表达水平与血清 E₂ 水平的关系

以湖羊全血 cDNA 为模板,RT-qPCR 检测 lncRNA-269 RNA 和 NR5A1 mRNA 的表达水平,并与对应羊血清中 E₂ 水平进行关联分析。结果(图 3)发现:lncRNA-269 RNA 表达水平与 NR5A1 mRNA 表达水平呈正相关, R^2 为 0.522 2;lncRNA-269 RNA 与血清中 E₂ 水平呈正相关, R^2 为 0.654 1。推测 lncRNA-269 可能与 NR5A1 的表达及 E₂ 的合成存在关联。

2.4 湖羊 lncRNA-269 启动子区序列扩增与特征分析

将 5'RACE 得到的 lncRNA-269 转录起始位点 T 命名为+1,向前扩增湖羊 lncRNA-269 的启动子区。

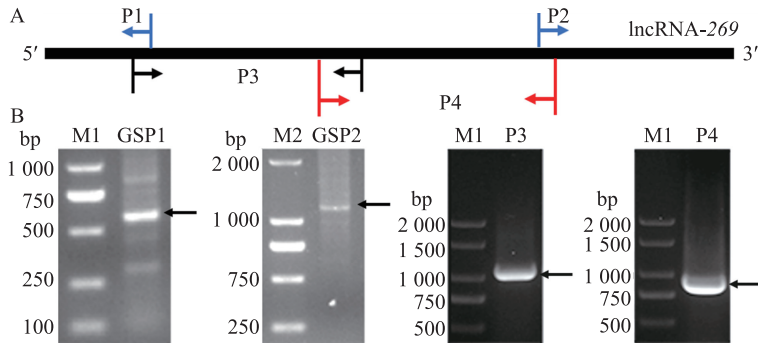


图 1 湖羊 lncRNA-269 5'UTR 和 3'UTR 及中间序列引物设计示意图(A)和序列扩增(B)

Fig. 1 Schematic diagram of primer design(A) and amplification(B) of 5' UTR, 3' UTR and middle segment sequence in lncRNA-269 of Hu sheep

M1. 1 000 DNA 标准品; M2. 2 000 DNA 标准品; GSP1 和 GSP2 分别是用 5'/3'RACE 的特异性扩增引物扩增的 lncRNA-269 特异性条带; P3 和 P4 分别是用特异性引物扩增的 lncRNA-269 序列。

M1. 1 000 DNA marker; M2. 2 000 DNA marker; GSP1 and GSP2 are specific amplification bands with 5'/3'RACE specific amplification primers, respectively; P3 and P4 are lncRNA-269 sequences with specific primers, respectively.

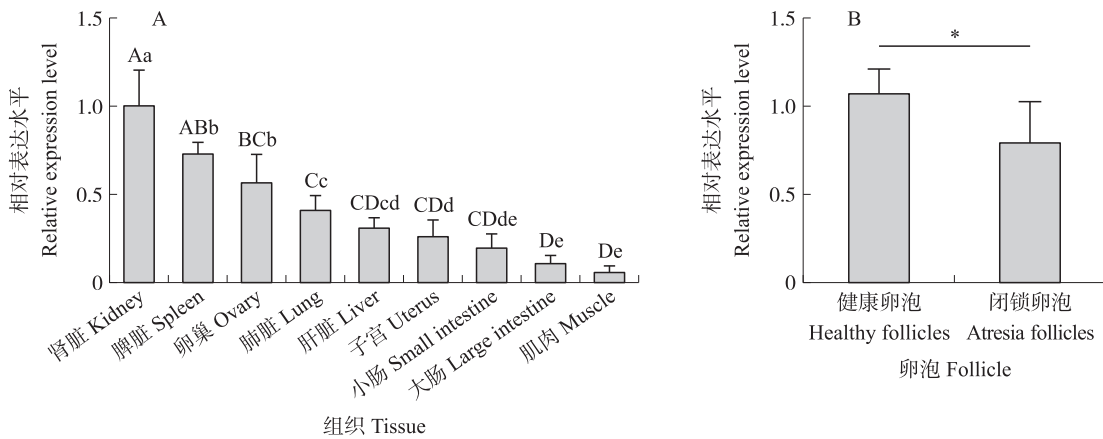


图 2 lncRNA-269 在湖羊不同组织(A)和卵泡(B)中的表达水平

Fig. 2 The expression level of lncRNA-269 in Hu sheep different tissues(A) and follicles(B)

不同大写字母代表差异极显著 ($P < 0.01$), 不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。Different uppercase letters represent significant differences ($P < 0.01$), while different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$). * $P < 0.05$. The same as follows.

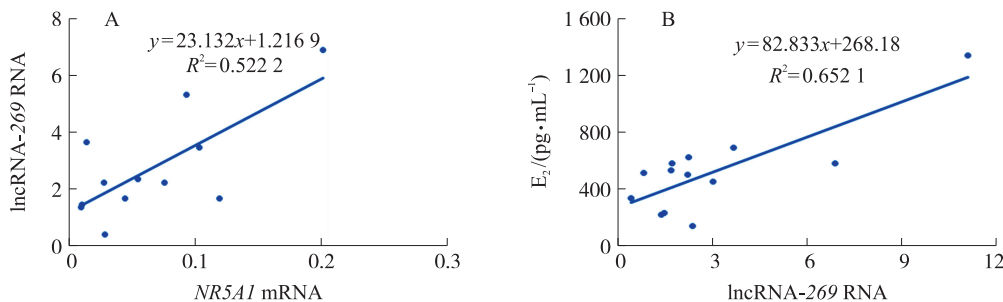


图 3 lncRNA-269 RNA 与 NR5A1 mRNA (A) 相对表达水平和血清中 E₂ 水平 (B) 的相关性

Fig. 3 Correlation between relative expression level of lncRNA-269 with NR5A1 mRNA(A) and E₂ level in serum(B) of Hu sheep

PCR 扩增得到 1 485 bp 的湖羊 lncRNA-269 的启动子序列。JASPAR 软件预测发现, lncRNA-269 启动子区存在很多转录因子结合位点(图 4), 如 SMAD4、MYB、FOXO3 和 YY1 等, 提示这些转录因子结合位点可能参与调控 lncRNA-269 的转录。

分段扩增 lncRNA-269 启动子区序列, 构建荧光素酶报告载体。荧光素酶活性分析结果(图 5)显示: 与 pGL3-basic 相比, plncRNA-269-1(-359 ~ -17 nt) 的荧光素酶活性极显著升高 ($P < 0.01$), 而 plncRNA-

269-1(-359~-17 nt)与 plncRNA-269-2(-359~-360 nt)和 plncRNA-269-3(-941~-606 nt)间差异不显著,但是 plncRNA-269-4(-1 485~-942 nt)荧光素酶活性下降,且与 plncRNA-269-1、plncRNA-269-2 和 plncRNA-269-3 间差异显著,表明湖羊 lncRNA-269 基因在-359~-17 nt 区域内存在正调控的转录因子结合位点,在-1 485~-942 nt 区域存在负调控的转录因子结合位点。

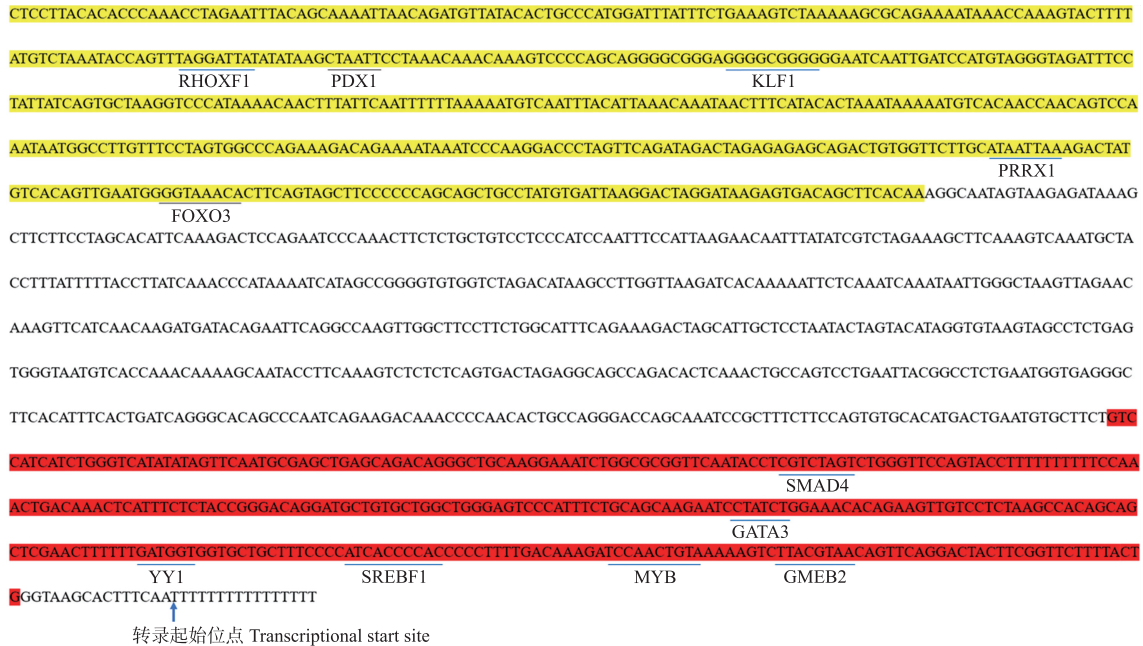


图 4 lncRNA-269 启动子区序列特征分析

Fig. 4 The analysis of the promoter sequence characterization of lncRNA-269

红色标记代表转录激活区;黄色标记代表转录抑制区。

The red mark represents the transcriptional activation region; yellow mark represents transcriptional inhibition region.

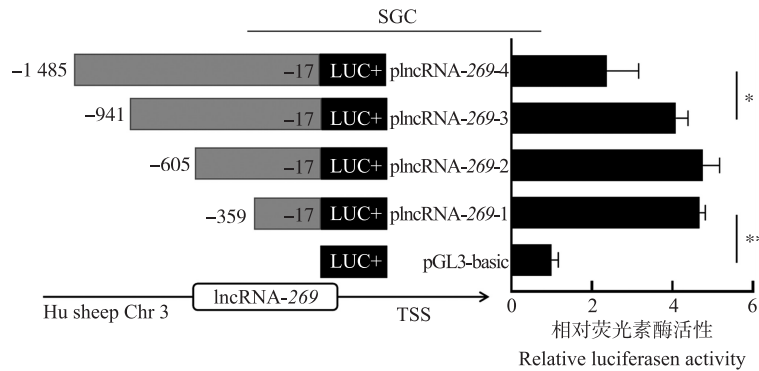


图 5 lncRNA-269 启动子区序列鉴定

Fig. 5 Promoter identification of lncRNA-269

SGC:绵羊卵巢颗粒细胞 Sheep granulosa cells;TSS:转录起始位点 Transcription start site. ** $P < 0.01$. The same as follows.

2.5 转录因子 SMAD4 调控湖羊 lncRNA-269 的启动子活性

为了研究转录因子 SMAD4 是否参与调控 lncRNA-269 启动子活性,构建 SMAD4 过表达载体 pcDNA3.1-SMAD4 (图 6-A) 及 SBE (SMAD4 结合元件) 突变型核心启动子区荧光素酶报告载体 P4 (plncRNA-269-4-Mut)。将 pcDNA3.1-SMAD4 转入卵巢颗粒细胞, SMAD4 mRNA 和蛋白水平显著增加 (图 6-B、C)。将 SMAD4 过表达载体分别与含有野生型 SBE 和突变型 SBE 的 lncRNA-269 启动子区荧光素酶载体共转,结果发现,过表达 SMAD4 后,湖羊卵巢颗粒细胞中 lncRNA-269 启动子区活性极显著升高 ($P < 0.01$),但是对 SBE 突变型启动子区的荧光素酶活性无显著影响 (图 6-D)。说明 SMAD4 可通过湖羊 lncRNA-269 核心启动子区的 SBE 调控湖羊 lncRNA-269 的转录活性。

为了更进一步分析 SMAD4 与 lncRNA-269 启动子区 SBE 位点的结合情况,利用 SMAD4 特异性抗体开展了 ChIP-PCR 试验。结果 (图 7) 显示,SMAD4 蛋白可富集 SBE 的 DNA 片段,证明转录因子 SMAD4 通

过与启动子区的 SBE 位点直接结合进而增强 lncRNA-269 的转录活性。

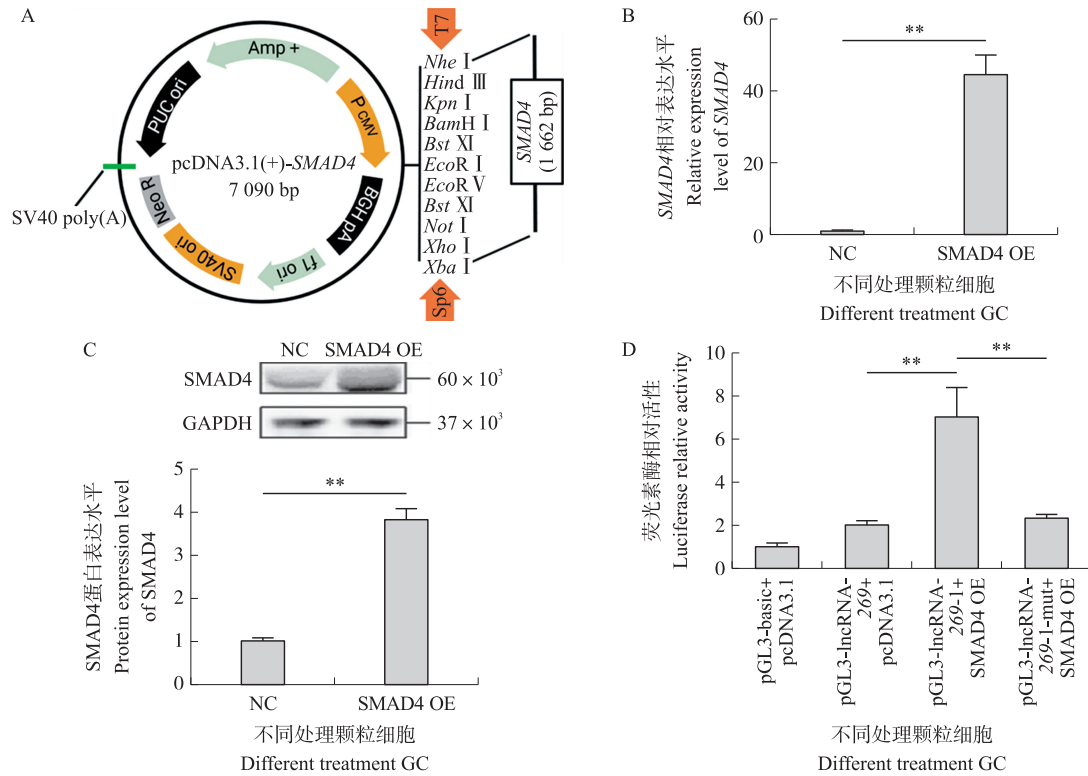


图 6 转录因子 SMAD4 调控湖羊 lncRNA-269 启动子活性

Fig. 6 Transcription factor SMAD4 regulates the promoter activity of lncRNA-269 in Hu sheep

A. SMAD4 过表达载体构建示意图; B、C. 过表达 SMAD4 后上调卵巢颗粒细胞中 SMAD4 mRNA 和蛋白表达水平; D. SMAD4 上调湖羊 lncRNA-269 启动子活性。NC. 对照; SMAD4 OE. 过表达 SMAD4。

A. Schematic diagram of construction of SMAD4 overexpression vector; B, C. Overexpression of SMAD4 upregulated mRNA and protein level of SAMD4 in ovarian granulosa cells; D. SMAD4 upregulated the promoter activity of lncRNA-269 in Hu sheep. NC. Control; SMAD4 OE. SMAD4 overexpression.

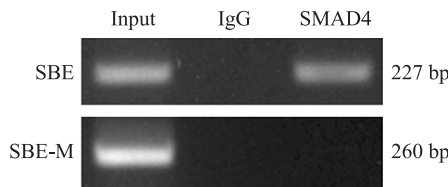


图 7 ChIP-PCR 试验鉴定 SMAD4 与 lncRNA-269 启动子区特异性结合

Fig. 7 The specific binding of SMAD4 and lncRNA-269 promoter using ChIP-PCR assay

Input 和 IgG 分别指阳性对照和阴性对照。Input and IgG represent positive and negative control, respectively.

3 讨论与结论

lncRNA 是哺乳动物基因组中很多基因座产生的多种转录产物,随着高通量测序技术的不断发展,大量功能性的 lncRNA 被挖掘和鉴定,参与多种生命进程包括动物的生长、繁殖、肉质等^[16-18]。在晋南牛中鉴定的一个 lncRNA *ADNCR*,其通过靶向 miR-204 调控前脂肪细胞中 *SIRT1* 基因表达,从而抑制脂肪生成,且在其内含子 1 中发现一个新的 SNP g.1263T>A 突变,该突变与晋南牛的体重、胸围和臀长等生长指标显著相关^[19]; Hanper 绵羊中 lncRNA *Xist* 和 *Gtl2* 参与调控卵泡发育,进而调控绵羊的繁殖力^[20]。本研究鉴定的 lncRNA-269 组织表达谱发现其在湖羊卵巢中表达量较高,且在健康卵泡中高表达,推测 lncRNA-269 可能参与调控湖羊卵泡发育,进一步研究发现 lncRNA-269 的表达水平与绵羊繁殖力关键激素 E₂ 水平呈正相关,说明 lncRNA-269 可能参与调控湖羊繁殖性能。

研究发现大多数 lncRNA 在染色质上富集,很大一部分 lncRNA 具有顺式作用潜力,顺式作用的 lncRNA 依赖其转录的基因座,通过激活、抑制或者其他方式调节靶基因表达进而发挥生物学功能^[21]。在

小鼠上皮细胞中,定位于细胞核中的 lnc-*Cxcl2* 通过与 *Cxcl2* 基因启动子结合,募集核糖核蛋白 La,从而顺式调控 *Cxcl2* 基因的转录^[22];在肺细胞中,lnc-*HMGAI* 通过顺式作用调控 *HMGAI* 基因表达^[23]。本研究鉴定的 lncRNA-269 定位于绵羊的 3 号染色体,与调控湖羊卵泡发育和产羔数的 *NR5A1* 基因毗邻^[14],lncRNA-269 RNA 的表达水平与 *NR5A1* mRNA 的表达水平呈现正相关,推测 lncRNA-269 可能通过顺式作用调控 *NR5A1* 表达进而参与调控湖羊繁殖性能。

为了解析 lncRNA-269 的表达调控,采用 RACE 方法结合 PCR 克隆技术获得了 lncRNA-269 全长,在鉴定其转录起始位点的基础上,扩增获得其启动子序列,荧光素酶活性分析发现其启动子区存在一个转录激活区域(-359~-17 nt)和一个转录抑制区域(-1 485~-942 nt),软件预测发现一些转录因子结合位点如 SMAD4、YY1、FOXO3、PDX1 等与 lncRNA-269 启动子区结合。已有研究表明,转录因子可通过调控 lncRNA 启动子活性参与调控生物学进程,如转录因子叉头框 C1 (FOXC1)通过调控 *LINC00301* 启动子活性促进非小细胞肺癌肿瘤发生并触发免疫抑制微环境^[24];转录因子上游刺激因子 1 (USF1)诱导 lncRNA *HAS2-AS1* 上调,促进胶质瘤细胞的侵袭和迁移^[25]。本研究预测的与 lncRNA-269 启动子区结合的转录因子可能通过参与调控其启动子活性发挥调控作用。

转录因子 SMAD4 不仅是 TGF- β 信号通路中的介质和效应器,而且还是一种多功能调节剂,通过与靶基因启动子区 SBE 基序结合,调控靶基因表达,进而调控生物学功能包括细胞增殖、分化、凋亡等^[26-28]。例如,在地塞米松诱导的人骨髓间充质干细胞 (hBMSC) 中,SMAD4 通过转录激活 *GCN5* 表达抑制细胞凋亡,促进成骨的分化^[29];SMAD4 作为猪 *CYP19A1* 的转录因子,通过与 *CYP19A1* 基因启动子区内的 SMAD4 结合元件 (SBE) 直接结合,增强猪卵巢颗粒细胞中 *CYP19A1* 的表达和功能^[30];SMAD4 作为转录因子结合到 *FZD4* 启动子促进其表达进而调控卵巢颗粒细胞凋亡^[31];SMAD4 通过与猪 miR-183-96-182 簇启动子区 SBE 基序结合激活 miR-183-96-182 簇表达,下调其靶基因叉头框 O1 (*FOXO1*) 表达进而抑制卵巢颗粒细胞的凋亡^[32];SMAD4 也可直接作用于 lncRNA *SDNOR* 启动区 SBE 位点提高其启动子活性^[31];本研究也发现转录因子 SMAD4 通过与 lncRNA-269 启动子区 SBE 位点特异性结合而上调 lncRNA-269 的启动子活性,表明 lncRNA-269 转录受到转录因子 SMAD4 的调控。

综上,本研究鉴定了绵羊 3 号染色体邻近 *NR5A1* 基因的 lncRNA-269,其在健康卵泡中显著高表达,与 *NR5A1* 表达水平和血清中 E_2 水平呈正相关,说明其可能通过顺式作用调控 *NR5A1* 表达进而调控湖羊繁殖性能;分析荧光素酶活性发现 lncRNA-269 启动子区存在一个正调控区(-359~-17 nt)和一个负调控区(-1 485~-942 nt),在正调控区发现的转录因子 SMAD4 参与调控 lncRNA-269 的转录。此结果为解析 lncRNA-269 的功能及其与 *NR5A1* 基因之间的调控关系奠定了理论依据。

参考文献 References:

- [1] Joung J,Engreitz J M,Konermann S,et al. Genome-scale activation screen identifies a lncRNA locus regulating a gene neighbourhood[J]. Nature,2017,548(7667):343-346.
- [2] Lewandowski J P,Lee J C,Hwang T,et al. The *Firre* locus produces a trans-acting RNA molecule that functions in hematopoiesis[J]. Nature Communications,2019,10:5137.
- [3] Zhao W Y,Geng D H,Li S Q,et al. LncRNA HOTAIR influences cell growth,migration,invasion,and apoptosis via the miR-20a-5p/*HMGAI* axis in breast cancer[J]. Cancer Medicine,2018,7(3):842-855.
- [4] Liu G L,Liu S X,Xing G L,et al. Retraction notice to lncRNA PVT1/microRNA-17-5p/PTEN axis regulates secretion of E_2 and P_4 , proliferation,and apoptosis of ovarian granulosa cells in PCOS[J]. Molecular Therapy-Nucleic Acids,2022,28:593.
- [5] Wang X Y,Zhang X Y,Dang Y J,et al. Long noncoding RNA HCP5 participates in premature ovarian insufficiency by transcriptionally regulating MSH5 and DNA damage repair via YB1[J]. Nucleic Acids Research,2020,48(8):4480-4491.
- [6] Li M H,Niu M H,Feng Y Q,et al. Establishment of lncRNA-mRNA network in bovine oocyte between germinal vesicle and metaphase II stage[J]. Gene,2021,791:145716.
- [7] Hu H Y,Fu Y F,Zhou B,et al. Long non-coding RNA TCONS-00814106 regulates porcine granulosa cell proliferation and apoptosis by sponging miR-1343[J]. Molecular and Cellular Endocrinology,2021,520:111064.
- [8] Zhou M,Liu X Q,Qiukai E,et al. Long non-coding RNA Xist regulates oocyte loss via suppressing miR-23b-3p/miR-29a-3p maturation and upregulating STX17 in perinatal mouse ovaries[J]. Cell Death Disease,2021,12(6):540.
- [9] Iyyappan R,Aleshkina D,Zhu L K,et al. Oocyte specific lncRNA variant Rose influences oocyte and embryo development[J]. Non-Coding RNA Research,2021,6(2):107-113.
- [10] Wu K M,Xu K W,Liu K Z,et al. Long noncoding RNA BC200 regulates cell growth and invasion in colon cancer[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2018,99:219-225.

- [11] Zhang D, Tang H Y, Tan L, et al. MALAT1 is involved in the pathophysiological process of PCOS by modulating TGF β signaling in granulosa cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 499: 110589.
- [12] Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(3): 562–578.
- [13] Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, discovery, and classification of lncRNAs[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 1008: 1–46.
- [14] 李隐侠, 张俊, 钱勇, 等. 湖羊 *NR5A1* 基因 SNPs 筛选及其与产羔数的关联分析[J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(1): 124–132.
Li Y X, Zhang J, Qian Y, et al. SNPs selection of *NR5A1* and its association analysis with litter size in Hu sheep[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 33(1): 124–132 (in Chinese with English abstract).
- [15] Li Y X, Zhang J, Qian Y, et al. Mutation-388 C>G of *NR5A1* gene affects litter size and promoter activity in sheep[J]. *Animal Reproduction Science*, 2018, 196: 19–27.
- [16] Lian Z Q, Zou X A, Han Y R, et al. Role of mRNAs and long non-coding RNAs in regulating the litter size trait in Chuanzhong black goats[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2020, 55(4): 486–495.
- [17] Li M X, Liu Y, Xie S, et al. Transcriptome analysis reveals that long noncoding RNAs contribute to developmental differences between medium-sized ovarian follicles of Meishan and Duroc sows[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 22510.
- [18] Zhang Z K, Li J, Guan D, et al. A newly identified lncRNA MAR1 acts as a miR-487b sponge to promote skeletal muscle differentiation and regeneration[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9(3): 613–626.
- [19] Jin Y Y, Yang Q, Zhang M, et al. Identification of a novel polymorphism in bovine lncRNA ADNCR gene and its association with growth traits[J]. *Animal Biotechnology*, 2019, 30(2): 159–165.
- [20] Liu A J, Liu M H, Li Y X, et al. Differential expression and prediction of function of lncRNAs in the ovaries of low and high fecundity Hanper sheep[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2021, 56(4): 604–620.
- [21] Gil N, Ulitsky I. Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2020, 21(2): 102–117.
- [22] Liu S, Liu J Q, Yang X E, et al. cis-acting lnc-Cxcl2 restrains neutrophil-mediated lung inflammation by inhibiting epithelial cell CXCL2 expression in virus infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(41): e2108276118.
- [23] Stewart G, Sage A, Martinez V, et al. P2.03-47 deregulation of a novel cis-acting lncRNA in non-small cell lung cancer may control HMGAI expression[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2019, 14(10): S702.
- [24] Sun C C, Zhu W, Li S J, et al. FOXC1-mediated LINC00301 facilitates tumor progression and triggers an immune-suppressing microenvironment in non-small cell lung cancer by regulating the HIF1 α pathway[J]. *Genome Medicine*, 2020, 12(1): 77.
- [25] Wang J, Gu J, You A, et al. The transcription factor USF1 promotes glioma cell invasion and migration by activating lncRNA HAS2-AS1[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8): BSR20200487.
- [26] Wu M, Wang H Y, Kong D C, et al. miR-452-3p inhibited osteoblast differentiation by targeting Smad4[J]. *Peer J*, 2021, 9: e12228.
- [27] Hu W, Dong A, Karasaki K, et al. Smad4 regulates the nuclear translocation of Nkx2-5 in cardiac differentiation[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 3588.
- [28] Li M N, Liang W W, Zhu C Y, et al. Smad4 mediates Bmf involvement in sheep granulosa cell apoptosis[J]. *Gene*, 2022, 817: 146231.
- [29] Ma M N, Zhang J B, Gao X M, et al. miR-361-5p mediates SMAD4 to promote porcine granulosa cell apoptosis through VEGFA[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1281.
- [30] Li Q Q, Du X, Pan Z X, et al. The transcription factor SMAD4 and miR-10b contribute to E2 release and cell apoptosis in ovarian granulosa cells by targeting *CYP19A1*[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2018, 476: 84–95.
- [31] Du X, Li Q Q, Yang L, et al. SMAD4 activates Wnt signaling pathway to inhibit granulosa cell apoptosis[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11: 373.
- [32] Yao W, Wang S Q, Du X, et al. SMAD4 inhibits granulosa cell apoptosis via the miR-183-96-182 cluster and FoxO1 axis[J]. *Reproductive Sciences*, 2022, 29(5): 1577–1585.

责任编辑: 周广礼 范雪梅