

高通量 miRNA 活性谱检测发现 BHK21 细胞中 miR-206 高活性

田文洪^{1,2*}, 董小岩^{2*}, 王刚³, 郑刚², 周庆璋¹, 董哲岳², 吴小兵²

1 吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130012

2 北京五加和分子医学研究所有限公司, 北京 101111

3 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 100052

田文洪, 董小岩, 王刚, 等. 高通量 miRNA 活性谱检测发现 BHK21 细胞中 miR-206 高活性. 生物工程学报, 2013, 29(7): 1016–1026.

Tian WH, Dong XY, Wang G, et al. High activity level of miR-206 discovered in BHK21 cells by high-throughput miRNA activity profiling. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 1016–1026.

摘 要: 用我们建立的活细胞 miRNA 活性谱检测技术测定 BHK21、HEK293 和 Vero 三种肾来源细胞系中 58 种 miRNA 活性谱, 发现 miR-206 在 BHK21 细胞中具有特征性高活性。鉴于 miR-206 是典型的横纹肌特征性 miRNA, 进一步以小鼠成肌细胞 C2C12 及人胚肾细胞 HEK293 为对照, 检测了 BHK21 细胞中 miR-206 的活性及表达水平。之后, 用马血清诱导培养 BHK21 细胞, 检测诱导前后 BHK21 细胞中骨骼肌肌球蛋白重链 (Slow skeletal myosin heavy chain, MHC) 表达情况, miR-206 活性和表达水平以及受 miR-206 负调控的 Connexin43(Cx43) 的表达水平。结果发现, miR-206 在 BHK21 细胞中活性和表达水平都明显高于 C2C12 细胞; 马血清诱导后, BHK21 细胞中 MHC 表达水平升高, miR-206 活性和表达水平都升高, 而 Cx43 表达水平下降。结果提示 BHK21 细胞具有成肌细胞特性。本研究首次发现 BHK21 细胞中 miR-206 的高活性, 从 miRNA 角度证实了 BHK21 细胞来源于肾间质细胞, 而不是肾实质细胞。研究结果还提示 BHK21 细胞有可能作为一种体外模型用于 miR-206 的功能研究。

关键词: miR-206, BHK21 细胞, miRNA 活性

Received: November 14, 2012; **Accepted:** March 25, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA020810), Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2008BAI54B04-08), Program of Science and Technology Commission Foundation of Beijing (No. Z121102002912040).

Corresponding author: Xiaobing Wu. Tel/Fax: +86-10-56315298; E-mail: wxb@bybp.com.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA020810), 国家科技支撑计划 (No. 2008BAI54B04-08), 北京市科委基金 (No. Z121102002912040) 资助。

网络出版时间: 2013-06-20

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130620.1056.001.html>

High activity level of miR-206 discovered in BHK21 cells by high-throughput miRNA activity profiling

Wenhong Tian^{1,2*}, Xiaoyan Dong^{2*}, Gang Wang³, Gang Zheng², Qingzhang Zhou¹, Zheyue Dong², and Xiaobing Wu²

¹ School of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, Jilin, China

² Beijing FivePlus Molecular Medicine Institute, Beijing 101111, China

³ National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Abstract: Activities of 58 miRNAs for BHK21, HEK293, and Vero cell lines were screened using the high-throughput miRNA activity profiling method. miR-206 activity was found specifically high in BHK21. Considering miR-206 was recognized as a muscle-specific miRNA, we further detected the expression and activity level of miR-206 in BHK21 cells, with myoblast cells C2C12 as positive control and HEK293 cells as negative control. Then, we induced BHK21 by culturing with medium containing 2% horse serum (HS) and tested expression level of slow skeletal myosin heavy chain (MHC), activity and expression levels of miR-206, and expression level of Connexin43 (Cx43) which was reported negatively regulated by miR-206. Results demonstrated that activity and expression levels of miR-206 were both higher in BHK21 cells than in C2C12 cells. After induction of HS, MHC expression level was increased in BHK21 cells. The activity and expression levels of miR-206 were further enhanced. The Cx43 expression level was decreased. These results suggested that BHK21 had the characters of myoblast cells. In conclusion, we firstly discovered that miR-206 activity was specifically high in BHK21 cells, suggesting that BHK21 cells were derived from interstitial cells other than parenchyma cells of kidney from miRNA point of view. Our study also indicated that BHK21 cells were able to be used as models *in vitro* for research of miR-206 function.

Keywords: miR-206, BHK21 cells, miRNA activity

microRNAs (miRNAs) 作为动物体内源性的非编码小 RNA, 通过抑制基因表达, 调节多种生理过程, 是动物细胞内重要的转录后调节因子^[1-3]。miRNA 的表达和活性具有明显的组织特异性^[4-6], 与多种生理病理过程密切相关^[7-9]。不同细胞系因其来源和建立过程的差异呈现出不同的 miRNA 表达和活性谱。因此 miRNA 表达和活性谱有可能成为一种生物标记用于细胞系的区分和鉴定。BHK21 细胞来源于金黄地鼠肾脏组织, 是一种广泛应用的细胞系^[10]。BHK21 细胞与其他肾脏组织来源细胞 (如 Vero、HEK293 和 MDCK) 明显不同, 被鉴定为成纤维细胞^[11]。该差异是否也体现在 miRNA 水平上,

值得进一步研究。

本课题组最近建立了一种活细胞中 miRNA 活性谱检测技术^[12]。本研究拟将该技术应用于 BHK21、HEK293 和 Vero 三种肾脏来源细胞的 miRNA 活性谱检测, 比较分析找出 BHK21 细胞中特异性高活性 miRNA, 并用 QRT-PCR 方法进行验证, 为从 miRNA 水平揭示 BHK21 细胞的特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

miRNA Asensor 和 Control Asensor 分别为 miRNA 活性检测和对照传感器。传感器为携带

萤火虫荧光素酶 (Firefly luciferase, Fluc) 表达框和分泌型荧光素酶 (*Gussia* luciferase, Gluc) 表达框的腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 载体, 其中 Fluc 表达框用于校正不同传感器之间转导效率差异, Gluc 表达框中含有 miRNA 靶序列, 用于检测 miRNA 活性^[12]。Control Asensor 的 Gluc 表达框不携带任何 miRNA 靶序列, miRNA Asensor 的 Gluc 表达框携带单个的完全互补的 miRNA 靶序列。Control Asensor 和 miRNA Asensor 均由北京五加和分子医学研究所制备和保存。BHK-21 [C-13] (ATCC No. CCL-10)、HEK293 (ATCC No. CRL-1573)、Vero (ATCC No. CCL-81) 和 C2C12 细胞 (ATCC No. CRL-1772) 购自 ATCC。DMEM 培养基购自北京清大天一生物技术有限公司。胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、马血清 (Horse serum, HS) 和 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。细胞总蛋白提取试剂盒-I 购自北京普利莱生物技术有限公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒为 Pierce 产品。鼠抗 MHC 一抗和鼠抗 β -actin 一抗为 Abcam 公司产品。鼠抗 Cx43 一抗为 Cell Signaling Technology 公司产品。碱磷酶标记马抗鼠二抗为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。BCIP/NBT 为德国 Calbiochem 公司产品。Fluc 和 Gluc 活性检测试剂盒分别为 Promega 和 NEB 公司产品。TaqMan MicroRNAs Assay 试剂盒为 ABI 公司产品。

1.2 生物信息学分析

利用 microRNAviewer (<http://people.csail.mit.edu/akiezun/microRNAviewer>) 在线工具分析 miRNA 序列同源性^[13], 找出人、小鼠、大鼠和

斑马鱼中成熟序列完全相同的 miRNA 种类, 从本课题组已经制备好的 260 种 miRNA Asensors 中, 找出相应的 miRNA Asensor。从 NCBI 的蛋白数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) 中搜索获得人、小鼠、大鼠和斑马鱼 Cx43 蛋白序列, 应用 Vector NTI11.5 软件进行序列比对分析; 从 NCBI 的 GenBank 中搜索获得人、小鼠、大鼠和斑马鱼 Cx43 蛋白相应 mRNA 的 3'UTR 序列, 根据种子序列 (Seed sequence) 原则^[14-15] 预测 miRNA 靶序列。

1.3 miRNA 活性检测阵列制备

根据 1.2 所叙述方法, 选择获得 58 种 miRNA Asensor。按照一定的顺序用 Liquidator 96 手动移液工作站将 Control Asensor 和 miRNA Asensor 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔所加 miRNA Asensor 量为 2.5×10^8 vg (viral genome)/20 μ L, 每种 miRNA Asensor 三个复孔。然后, 将 96 孔细胞培养放入超净工作台中自然干燥完全, 获得 miRNA 活性检测阵列 miRNA Asensor array, 放于 2~8 $^{\circ}$ C 保存。每次制备多套 miRNA Asensor array。取出一套 miRNA Asensor array, 加入 BHK21 细胞, 48 h 后按照说明书用 Fluc 活性检测试剂盒测定 Fluc 表达活性, 根据文献报道的公式计算出本套 miRNA Asensor array 的转导系数 (Transduction coefficient, TC)^[12], 用于校正不同 Asensor 之间的转导效率差异。

1.4 BHK21、HEK293 和 Vero 细胞 miRNA 活性谱检测

用 10% FBS DMEM 培养基将 BHK21、HEK293 和 Vero 细胞分别以 1×10^4 /孔的密度接种 miRNA Asensor array, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2

孵箱中培养。48 h 后, 每孔吸取 20 μ L 细胞培养上清, 用 Gluc 活性检测试剂盒参照说明书检测 Gluc 活性。计算 Control Asensor 的 Gluc 活性与 miRNA Asensor 的 Gluc 活性的比值, 即抑制倍数 (Inhibiting fold, IF)。用 miRNA Asensor 的 IF 值与 TC 值的乘积, 即相对抑制倍数 (Relative inhibiting fold, RIF) 表示 miRNA 活性。

1.5 倒置显微镜观察 BHK21 形态变化和 Western blotting 检测 MHC 和 Cx43 蛋白表达

BHK21 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿 (10% FBS, DMEM), 待细胞 90% 融合度时, 弃去培养基, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 弃去 PBS, 更换为 2% HS DMEM 培养细胞, 设置 10% FBS DMEM 培养条件为对照。48 h 后, 倒置显微镜观察 BHK21 细胞并拍照。然后, 消化收集细胞, 用 PBS 清洗 2 次, 蛋白抽提试剂盒-I 提取细胞总蛋白, BCA 法蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。取 20 μ g 细胞总蛋白上样, 10% SDS-PAGE 变性电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上。膜用含 5% (W/V) 脱脂奶的 TBST (含 0.1% Tween 20 的 TBS) 封闭后, 分别与鼠抗 MHC 一抗 (1 : 100)、鼠抗 Cx43 一抗 (1 : 1 000) 和鼠抗 β -actin 一抗 (1 : 5 000) 孵育, 接着再分别与碱磷酶标记马抗鼠二抗 (1 : 1 000) 孵育。最后, BCIP/NBT 试剂盒显色并拍照。

1.6 miR-206 活性检测

细胞接种于 96 孔细胞培养板 (1×10^4 个细胞/孔), Control Asensor 和 miR-206 Asensor 分别以 2.5×10^8 vg 感染接种细胞, 每种 Asensor 三个复孔, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。48 h 后, 用 Gluc 活性检测试剂盒测定细胞培养上清

Gluc 活性, Fluc 活性检测试剂盒测定细胞裂解 Fluc 活性。利用 Fluc 活性值计算 miR-206 Asensor 的 TC 值, Gluc 活性值计算 IF 值, 计算 TC 值与 IF 值的乘积, 获得 RIF 值, 用于表示 miR-206 活性。

1.7 QRT-PCR 检测细胞中 miR-206 表达

Trizol 试剂提取细胞内总 RNA, BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪测定提取 RNA 浓度。TaqMan MicroRNAs Assay 试剂盒测定细胞内 miR-206 表达水平, 测定过程参照试剂盒说明书。选择细胞内小 RNA U6 作为内参, 细胞内 miR-206 的相对表达水平用 2 的 ΔC_t 值的次方表示, 其中 ΔC_t 值为 U6 的 C_t 值和 miR-206 的 C_t 值的差值。

1.8 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS16.0 软件, 应用独立样本 t 检验分析处理数据, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 BHK21、HEK293 和 Vero 三种细胞 58 种 miRNA 活性谱的获得

首先, 在本课题组已有的 260 种 miRNA 活性检测传感器 miRNA Asensor 中, 以 miRbase 数据库中 miRNA 序列为依据, 通过序列同源性分析, 找出了 58 种在人、小鼠、大鼠和斑马鱼中成熟序列完全相同的 miRNA (表 1), 选择其相应的 miRNA Asensor, 参考以前报道的方法^[12], 制备获得 58 种 miRNA 的活性检测阵列 miRNA Asensor array。然后, 利用该阵列检测获得了 BHK21、HEK293 和 Vero 三种细胞中 58 种 miRNA 活性。

表 1 miRNA 成熟序列表

Table 1 Mature sequences for miRNAs

miRNA	Matrue sequence (5'-3')	miRNA	Matrue sequence (5'-3')
miR-9	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA	miR-101	TACAGTACTGTGATAACTGAA
miR-133a	TTTGGTCCCCCTTCAACCAGCTG	miR-103	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
miR-206	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG	miR-106b	TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT
miR-10a	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG	miR-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA
miR-15a	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	miR-122	TGGAGTGTGACAATGGTGTGTTG
miR-16	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG	miR-124	TAAGGCACGCGGTGAATGCC
miR-17-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	miR-126	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG
miR-18a	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATAG	miR-127-3p	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT
miR-19a	TGTGCAAATCTATGCAAACTGA	miR-128	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT
miR-20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	miR-129-5p	CTTTTTCGGTCTGGGCTTGC
miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAAACTGA	miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGGGG
let-7a	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	miR-137	TTATTGCTTAAGAATACGCGTAG
let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	miR-138	AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG
let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	miR-142-3p	TGTAGTGTTCCTACTTTATGGA
let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT	miR-142-5p	CATAAAGTAGAAAGCACTACT
let-7e	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT	miR-144	TACAGTATAGATGATGTACT
let-7f	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	miR-145	GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCT
let-7g	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT	miR-146a	TGAGAACTGAATTCCATGGGTT
let-7i	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	miR-150	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG
miR-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	miR-181a	AACATTCAACGCTGTGCGGTGAGT
miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	miR-192	CTGACCTATGAATTGACAGCC
miR-29a	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA	miR-194	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA
miR-29b	TAGCACCATTGAAATCAGTGTT	miR-195	TAGCAGCACAGAAATATTGGC
miR-29c	TAGCACCATTGAAATCGGTTA	miR-196b	TAGGTAGTTTCCTGTTGTTGGG
miR-32	TATTGCACATTACTAAGTTGCA	miR-199a-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTTA
miR-33a	GTGCATTGTAGTTGCATTGCA	miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGT
miR-34a	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT	miR-204	TTCCCTTTGTATCCTATGCCT
miR-34c-5p	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC	miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC
miR-96	TTTGGCACTAGCACATTTTGTCT	miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGGGT

58 miRNAs mature sequences are shown in the table, which are high conserved and with the identical sequences among *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, and *Danio rerio*.

在 3 种细胞中, 58 种 miRNA 总活性明显不同, 其中 BHK21 细胞最高, HEK293 细胞次之, Vero 细胞最低; 相同的 miRNA 在 3 种细胞中的活性不尽相同, 呈现出不同的活性谱特征 (图 1)。其中肌肉特异性表达的 miR-206 在 BHK21 细胞中的 RIF 值为 34.30 ± 4.31 , 而在 HEK293 和 Vero 细胞的 RIF 值分别为: 1.85 ± 0.15 和 1.43 ± 0.13 , 表明 BHK21 细胞中 miR-206 的活性明显高于 HEK293 和 Vero 细胞。随后我们对该现象进行了进一步研究。

2.2 miR-206 在 BHK21 细胞中高活性及高表达

为了验证 miR-206 在 BHK21 细胞中的高活

性, 以 miR-206 高表达细胞株 C2C12 为阳性对照, miR-206 不表达细胞株 HEK293 为阴性对照^[16], 利用 miR-206 Asensor 分别检测了 BHK21、HEK293 和 C2C12 三种细胞中的 miR-206 活性, QRT-PCR 法检测了 3 种细胞的 miR-206 表达水平。结果显示, BHK21 和 C2C12 细胞中 miR-206 活性都较高, 且 BHK21 细胞明显高于 C2C12 细胞, 差异具有统计学意义, HEK293 细胞中则未检测到 miR-206 活性 (图 2A); 与活性水平类似, BHK21 和 C2C12 细胞中 miR-206 的表达水平都较高, 且 BHK21 细胞明显高于 C2C12 细胞, 差异具有统计学差异, HEK293 细胞中仍未检测到

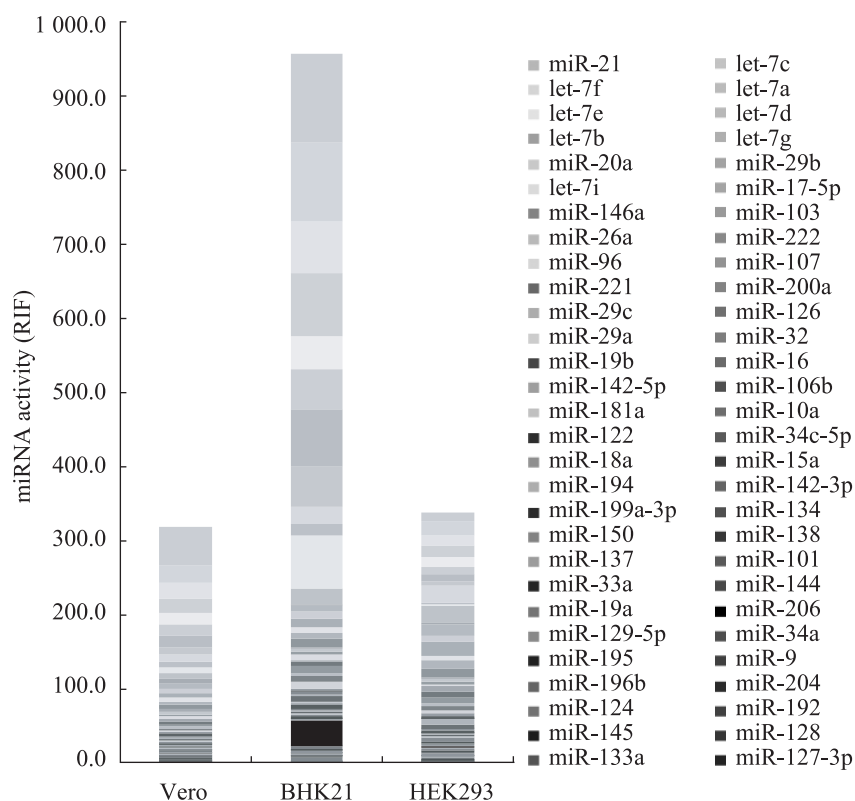


图 1 BHK21、HEK293 和 Vero 细胞中 58 种 miRNA 活性谱

Fig. 1 miRNA activity profile for BHK21, HEK293, and Vero cells. 58 miRNA activities were detected using miRNA Asensor array. Each miRNA activity was shown. And miR-206 activity was presented as dark black.

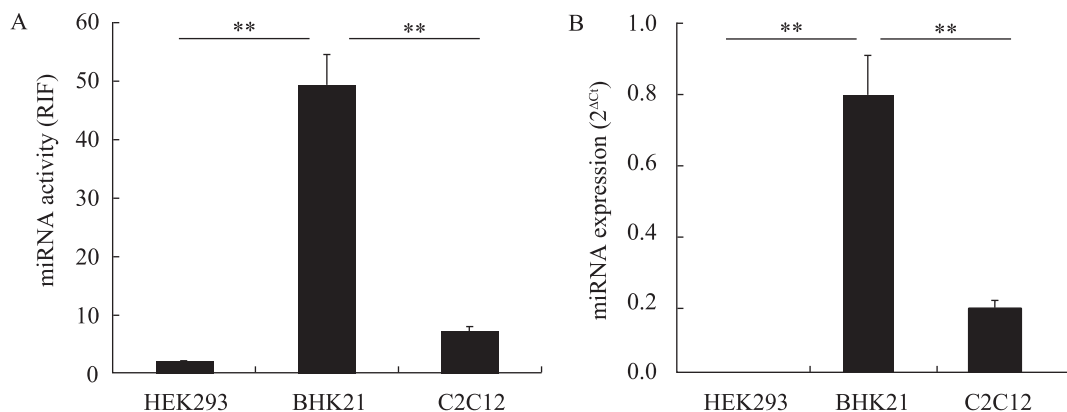


图2 HEK293、BHK21和C2C12细胞中miR-206活性及表达水平

Fig. 2 miR-206 activity and expression levels in HEK293, BHK21, and C2C12 cells. (A) miR-206 activity level in the three cell lines. miR-206 activity was assayed in the three cell lines using miR-206 Asensor. And miRNA activity was represented by relative inhibiting fold (RIF). (B) miR-206 expression level in the three cell lines. miR-206 expression level was detected by QRT-PCR. $2^{\Delta C_t}$ was used to indicate miR-206 expression level. $\Delta C_t = C_{tU6} - C_{tmiRNA}$. RIF, relative inhibiting fold. Error bars correspond to $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). Student's *t*-test was used to examine statistical significance of differences. $**P<0.01$.

miR-206的表达(图2B)。结果证实了BHK21细胞中miR-206的高活性及高表达。

2.3 马血清诱导后BHK21细胞变化

以前的研究表明BHK21细胞培养中撤除牛血清、换成马血清培养,能够诱导细胞分化并表达产生肌肉特异性蛋白,呈现出横纹肌细胞特点^[17]。考虑到miR-206在肌肉细胞发育过程中发挥重要作用^[18-19],我们比较分析了换成马血清诱导培养前后BHK21细胞中形态特征和肌肉特异性蛋白表达情况以及miR-206活性和表达水平。结果显示马血清培养BHK21细胞48 h后,细胞变长,部分细胞发生融合出现多核细胞(图3A),而且细胞骨骼肌肌球蛋白重链(Slow skeletal myosin heavy chain, MHC)表达升高(图3B),表明BHK21细胞向横纹肌细胞分化。马血清诱导培养48 h后,miR-206活性和表达水平都明显上升,且差异都具有统计学意义(图3C

和图3D)。

为了进一步揭示马血清诱导培养BHK21细胞后miR-206的升高是否引起了相应的基因负调控作用,用Western blotting检测了诱导培养前后BHK21细胞中连接蛋白Connexin43(Cx43)的表达情况。之所以选择Cx43蛋白,是因为在人、小鼠、大鼠和斑马鱼细胞中Cx43基因mRNA的3'UTR区都能发现miR-206的种子序列(表2)。Cx43基因在人、小鼠、大鼠和斑马鱼之间具有较高的保守性,人和小鼠以及人和大鼠之间的氨基酸序列同源性达99.7%,大鼠和小鼠之间的氨基酸同源性为100%,人和斑马鱼之间的同源性也高达60.3%(表2)。检测结果显示,诱导48 h后BHK21细胞中Cx43蛋白表达下降(图3E),与以前报道的miR-206抑制C2C12细胞表达Cx43蛋白,从而调节C2C12细胞发育成肌细胞的研究结果相一致^[20]。

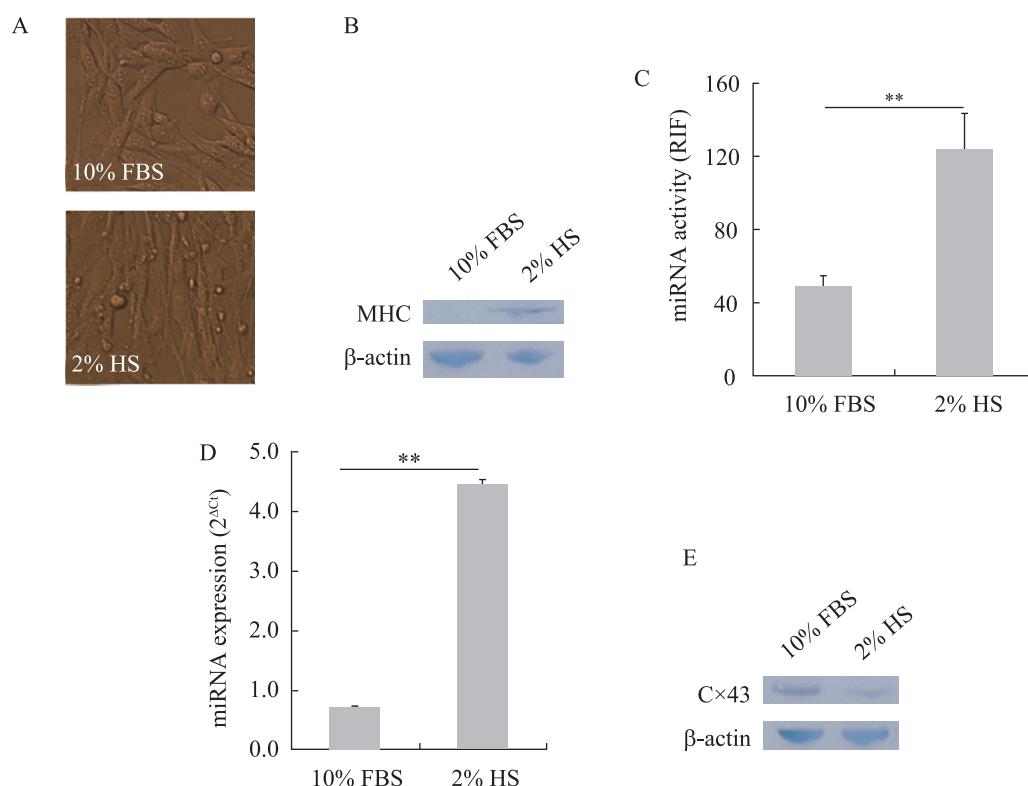


图3 马血清诱导培养后 BHK21 细胞的变化

Fig. 3 Changes after differentiation of BHK21 induced by 2% HS. (A) Morphological changes in BHK21 cells induced by 2% HS. Cells were examined by Leica DMI3000 M Simply Microscopy (200×). (B) BHK21 expressed skeletal muscle protein when induced by 2% HS. Slow skeletal myosin heavy chain(MHC) was assayed by Western blotting in BHK21 induced with or without 2% HS. (C) miR-206 activity increased in BHK21 induced by 2% HS. miR-206 activity was assayed in BHK21 when it was cultured in the medium with 10% FBS or 2% HS using miR-206 Asensor, respectively. miRNA activity was presented as relative inhibiting fold (RIF). (D) miR-206 expression level increased in BHK21 induced by 2% HS. In the two different culture conditions, miR-206 expression level was tested by QRT-PCR in BHK21. $2^{\Delta C_t}$ was used to indicate miR-206 expression level. (E) Cx43 expression decreased in BHK21 induced by 2% HS. Expression of Cx43 was assayed by Western blotting in BHK21 induced with or without 2% HS. $\Delta C_t = C_{tU6} - C_{tmiRNA}$. RIF: relative inhibiting fold. Error bars correspond to $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). Student's *t*-test was used to examine statistical significance of differences. ** $P < 0.01$.

表2 *Connexin 43* 基因生物信息学分析

Table 2 Bioinformatics analysis of *Connexin 43* gene

	AA	Homology (%)	miR-206 targets predicted in the 3'UTR
Danio_rerio (BC049297.1)	283	60.3	1(2381–2387)
Mus_musculus (NM010288.3)	383	99.7	2(1858–1864; 2982–2988)
Rattus_norvegicus (NM012567.2)	383	99.7	2(1822–1828; 3010–3016)
Homo_sapiens (NM000165.3)	383	100.0	2(1877–1883; 3008–3014)

Cx43 was conserved and had miR-206 targets in its mRNA's 3'UTR. Amino acid (AA) sequence of Cx43 was aligned and high conservation was found among *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, and *Danio rerio*. Typical mRNAs of Cx43 from the four species were selected and potential miR-206 targets were found using 'seed' sequence.

3 讨论

BHK21、HEK293 和 Vero 细胞是 3 种常见的肾组织来源细胞株。不同于 HEK293 和 Vero 细胞, BHK21 细胞来源于 1 日龄的金黄地鼠肾组织, 并鉴定为成纤维细胞^[11]。已有的研究还表明 BHK21 细胞具有某些横纹肌细胞的特性^[16], 提示 BHK21 的独特性。miRNA 作为一种广泛存在于后口动物中的转录后调节因子, 其表达和活性呈现出明显的时空特异性, 与多种生理病理过程密切相关, 具有成为生物标记的潜力^[21-24]。本研究试图用我们建立的活细胞 miRNA 活性谱检测技术比较 BHK21、HEK293 和 Vero 三种常见的肾细胞的 miRNA 活性谱, 从 miRNA 水平上揭示 BHK21 细胞的特性。

我们首先扫描获得了 BHK21、HEK293 和 Vero 三种细胞中 58 种 miRNA 活性谱, 比较发现 miR-206 在 BHK21 细胞中特征性高活性。随后, 以成肌细胞 C2C12 为阳性对照, 人胚肾细胞 HEK293 为阴性对照, 进一步证明了 BHK21 细胞中 miR-206 的高活性及高表达。最后, 采用马血清诱导培养 BHK21 细胞, 发现 miR-206 活性和表达水平都升高, 并且 miR-206 的靶基因之一 Cx43 蛋白的表达明显下调。

miR-206 作为一种肌肉特异性 miRNA, 主要在肌肉组织及其来源细胞系中表达^[25]。BHK21 细胞在马血清诱导培养下部分细胞发生融合出现多核细胞, 能够表达横纹肌特征性蛋白, 表明 BHK21 细胞具有成肌细胞特性。本研究首次发现 miR-206 在 BHK21 细胞中的高活性和高表达, 从 miRNA 水平上揭示了 BHK21 细胞的成肌细胞特征。而且 BHK21 细胞为成纤维细胞, 区别于

同为肾脏来源的上皮细胞样的 HEK293 和 Vero 细胞, 说明 BHK21 细胞可能来源于肾脏的间质细胞。

BHK21 细胞经马血清诱导后, miR-206 的活性和表达水平明显升高, 且细胞间连接蛋白 Cx43 的表达水平下降。保守性序列分析发现 BHK21 细胞的 Cx43 基因的 3'UTR 区存在 miR-206 的靶序列, 说明 miR-206 可能通过抑制 Cx43 蛋白的表达参与马血清诱导的 BHK21 发育分化过程。提示 BHK21 细胞可以作为一种有效的细胞模型, 用于 miR-206 的功能和表达活性调节机制研究。

miR-206 在 BHK21 细胞中特征性高活性和高表达, 提示 miR-206 可以作为一种生物标记分子, 用于 BHK21 细胞的鉴定。BHK21 细胞在诱导分化后 miR-206 活性和表达水平明显升高, 提示 miR-206 可能作为一种向肌细胞分化的分子标志物。

BHK21 细胞表达 miRNA 种类和成熟序列信息的缺乏限制了 BHK21 细胞中 miRNA 表达和功能性研究。本研究通过 miRNA 成熟序列同源性分析确定了 58 种 BHK21 细胞中可能表达的 miRNA 及序列信息, 利用活细胞 miRNA 活性谱检测技术初步了解了 58 种 miRNA 在 BHK21 细胞中的活性水平, 为这些 miRNA 的功能研究提供了基础。

总之, 利用活细胞 miRNA 活性谱检测技术, 首次在 BHK21 细胞中发现了 miR-206 特征性高活性, 并验证了这一发现, 初步探索了 miR-206 在 BHK21 细胞经马血清诱导分化过程中可能的作用机制, 表明 miR-206 可以作为一种 BHK21

细胞特征性的生物标记。本研究还提示 BHK21 可以用作 miR-206 功能研究的细胞模型, BHK21 细胞来源于金黄地鼠肾脏, 探索非肌肉来源细胞中 miR-206 的表达机制, 可能有助于揭示 miR-206 肌肉特异性表达的原因。这是我们下一步拟开展的工作。

REFERENCES

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [2] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431(7006): 350–355.
- [3] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 2008, 9(2): 102–104.
- [4] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 735–739.
- [5] Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 2005, 309(5732): 310–311.
- [6] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007, 129(7): 1401–1414.
- [7] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301(5631): 336–368.
- [8] Schichell R, Boyerrinas B, Park SM, et al. MicroRNAs: key players in the immune system differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5959–5974.
- [9] Sun W, Julie Li YS, Huang HD, et al. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed Eng*, 2010, 12: 1–27.
- [10] Pay TW, Boge A, Menard FJ, et al. Production of rabies vaccine by an industrial scale BHK 21 suspension cell culture process. *Dev Biol Stand*, 1985, 60:171–174.
- [11] Stoker M and Macpherson I. Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives. *Nature*, 1964, 203: 1355–1357.
- [12] Tian W, Dong X, Liu X, et al. High-throughput functional microRNAs profiling by recombinant AAV-based microRNA sensor arrays. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e29551.
- [13] Kiezun A, Artzi S, Modai S, et al. miRviewer: a multispecies microRNA homologous viewer. *BMC Res Notes*, 2012, 5: 92.
- [14] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120(1): 15–20.
- [15] Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 2005, 3(3): e85.
- [16] McCarthy JJ. MicroRNA-206: The skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(11): 682–691.
- [17] Schaart G, Pieper FR, Kuipers HJH, et al. Baby hamster kidney (BHK-21/C13) cells can express striated muscle type proteins. *Differentiation*, 1999, 46(2): 105–115.
- [18] Tauli R, Bersani F, Foglizzo V, et al. The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation. *J Clin Invest*, 2009, 119(8): 2366–2378.
- [19] Chen JF, Tao Y, Li J, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol*, 2010, 190(5): 867–879.
- [20] Anderson C, Catoe H, Werner R. miR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(20): 5863–5871.
- [21] Mitchell PS, Parkin RK, Kroth EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based

- markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10513–10518.
- [22] Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(8): 1273–1281.
- [23] Mattie MD, Benz CC, Bowers J, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer*, 2006, 5:24.
- [24] Corsini LR, Bronte G, Terrasi M, et al. The role of microRNAs in cancer: diagnostic and prognostic biomarkers and targets of therapies. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(Suppl 2): S103–109.
- [25] Politz JC, Zhang F, Pederson T. MicroRNA-206 colocalizes with ribosome-rich regions in both the nucleolus and cytoplasm of rat myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 18957–18962.

(本文责编 郝丽芳)

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。