

拟南芥 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 靶向 MSH6 基因参与 Cd 应激响应

成智博^{1,5} 王鹤潼² 赵强³ 张延召⁴ 贾春云¹ 何蕾^{1,5} 崔伟娜^{1,5} 台培东¹
刘宛^{1*}

(¹中国科学院沈阳应用生态研究所污染生态与环境工程重点实验室, 沈阳 110016; ²沈阳大学, 沈阳 110044; ³沈阳农业大学, 沈阳 110866; ⁴洛阳师范学院, 河南洛阳 471022; ⁵中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 *MSH6* 在激活细胞周期阻滞和修复镉诱导的 DNA 损伤等方面具有重要功能。本研究以拟南芥为实验材料, 通过生物信息学分析发现, *MSH6* 具有 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p、miRNA472-3p 等 microRNAs (miRNAs) 的作用靶点。利用烟草双荧光素酶报告系统体外验证检测发现, 与阴性对照组相比, miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 均可显著抑制荧光素酶的相对活性, 其比值分别下降了 25.5%、47.2% 和 49.5%。采用拟南芥植株瞬时侵染体内验证结果显示, miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 分别上升了 178.9%、123.6% 和 37.6%; 同时, qRT-PCR (real time quantitative reverse transcript polymerase chain reaction) 结果表明, 拟南芥幼苗在 1.25、2.5、4.0 mg · L⁻¹ Cd 胁迫 7 d 后, 与对照组相比, *MSH6* 表达显著降低, 分别下降了 20.3%、22.7% 和 38.2%。而 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 表达显著增加, 二者呈显著的负相关关系 ($r = -0.997, P < 0.01$; $r = -0.997, P < 0.01$; $r = -0.952, P < 0.05$), 表明 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 是拟南芥 Cd 胁迫响应的 miRNAs, 并且靶向 *MSH6* 基因。本研究为 DNA mismatch repair (MMR) 对 Cd 毒理调控机制的研究提供 miRNA 理论基础。

关键词 Cd; *MSH6*; miRNA; 双荧光素酶检测; 农杆菌侵染

MiRNA172b-5p, miRNA172e-5p and miRNA472-3p responded to Cd stress by targeting MSH6 gene in *Arabidopsis thaliana*. CHENG Zhi-bo^{1,5}, WANG He-tong², ZHAO Qiang³, ZHANG Yan-zhao⁴, JIA Chun-yun¹, HE Lei^{1,5}, CUI Wei-na^{1,5}, TAI Pei-dong¹, LIU Wan^{1*} (¹Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ²Shenyang University, Shenyang 110044, China; ³Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; ⁴Luoyang Normal University, Luoyang 471022, Henan, China; ⁵University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China).

Abstract: *MSH6* plays an important role in the activation of checkpoints in cell cycles and in repairing of DNA damage under Cd stress. In this study, we found that *MSH6* gene had targeting sequence of microRNAs (miRNAs), including miRNA172b-5p, miRNA172e-5p and miRNA472-3p in *Arabidopsis thaliana* by bioinformatics analysis. The results of dual luciferase reporter assay showed that miRNA172b-5p, miRNA172e-5p, and miRNA472-3p significantly reduced the related luciferase activity of reporter construct, which was decreased by 25.5%, 47.2% and 49.5%, respectively, compared with the negative control group in an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in vitro assay ($P < 0.01$). Results from *Arabidopsis thaliana* leaves injected transient expression in vivo assay showed that the over-expression level of miRNA172b-5p, miRNA172e-

5p and miRNA472-3p was 178.9%, 123.6% and 37.6%, respectively. Results of qRT-PCR (real time quantitative reverse transcript polymerase chain reaction) showed that the expression of *MSH6* was decreased by 20.3%, 22.7% and 38.2% in *Arabidopsis thaliana* leaves when exposed to 1.25, 2.5, 4.0 mg · L⁻¹ Cd stress for seven days, but the expression levels of miRNA172b-5p, miRNA172e-5p and miRNA472-3p were enhanced. There were negative relationships between these three miRNAs and *MSH6* gene ($r = -0.995$, $P < 0.01$; $r = -0.995$, $P < 0.01$; $r = -0.984$, $P < 0.05$), indicating that miRNA172b-5p, miRNA172e-5p and miRNA472-3p were Cd-responsive miRNAs and could directly target to *MSH6* gene in *Arabidopsis thaliana*. Our results provide theoretical basis of miRNA for the study of Cd toxicological mechanism regulated by DNA mismatch repair (MMR) system.

Key words: Cd; MSH6; miRNA; dual-luciferase reporter gene assay; agrobacterium infection.

经由矿产和工业生产活动、工业废水排放、磷肥使用及污水农溉等多种人类活动,镉(Cd)不断地被释放到环境中。据2014年《全国土壤污染状况调查公报》显示,其污染物点位超标率达7%。且作为重金属“五毒”元素之一,Cd有效态高且活性强,因此极易被植物吸收,继而在生物体内造成不同形式的DNA损伤(李婧等,2015;王晓娟等,2015;庞荣丽等,2016;丁通等,2018)。研究表明,Cd在生物体内可引起氧化应激反应,从而导致DNA链断裂,DNA位点突变等(Tkalec *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2014; Bagchi *et al.*, 2015)。Cd胁迫在植物体遗传、生理、生化水平引起复杂变化,但由于其耐受机理及响应调控网络尚不明确,因此植物Cd胁迫后损伤修复机制一直受到广泛关注(孙婕好等,2018)。

DNA错配修复系统(Mismatch Repair System, MMR)主要为MutS-MutL系,包含MSH2、MSH3、MSH6、MSH7、MLH1、MLH3、PMS2等基因,属于复制后修复系统,是修复DNA损伤的主要途径之一,能识别并修复错配的碱基、链内交连与加合物等多种碱基对损伤,以维持基因组的稳定性和DNA复制的准确性(钟鸣等,2012)。其中,MSH6基因是MMR家族中的重要成员之一,参与构成复合体MutSa,主要识别单碱基错配及因小缺失或插入(1~2个碱基)形成的突环与环丁烷嘧啶二聚体(CPDs)等(Casas-Marce *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2013)。而且在拟南芥和玉米的研究中发现,MSH6基因突变会导致CPDs显著上升,引起突变频率升高(Casas-Marce *et al.*, 2011)。本实验室近期研究发现,MSH6是Cd诱导DNA损伤的关键感受器,直接参与DNA损伤的识别/传递与G2/M期阻滞;但是拟南芥基因敲除突变体MSH6-KO在较高浓度Cd暴露下,依然维持了G2/M期检验点的功能,但导致内复制(多倍

体)增加(张巧丽等,2008;韩艳萍等,2009;Cui *et al.*, 2017;宋婕等,2017;Cao *et al.*, 2018)。

MiRNA(MicroRNA)是一种高度保守、长度约为20~25核苷酸的内源性非编码单链小RNA,可通过与靶mRNA碱基互补配对,致使mRNA断裂或翻译抑制,从而达到调节基因表达的目的。在医学研究中,靶向MMR的miRNA已作为人类重大疾病的标志物(Orangi *et al.*, 2019)。Ye等(2017)报道了miRNA1290可靶向作用于*hMSH2*,从而作为MMR表达缺陷的结肠癌标记物;Xicola等(2016)报道了let-7miRNA与MMR相关,从而影响结肠癌患病风险。在植物研究中,许多学者已发现miRNA在应对生物/非生物胁迫方面发挥关键作用(Zhao *et al.*, 2012; Hikmet *et al.*, 2015)。例如,Liu等(2008)通过RT-PCR和启动子分析表明,miRNA167、miRNA168和miRNA396在植物非生物胁迫反应中起重要作用;Ding等(2011)报道,Cd胁迫下,水稻幼苗miRNA162a、miRNA168a和miRNA168b等miRNAs的表达明显改变;miRNA调控小麦、水稻Cd胁迫信号反应的研究亦有报道(Ding *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2016)。研究已经证实,miRNA以调控胁迫相关基因的方式参与植物Cd应激,然而其靶向植物DNA MMR系统参与Cd应激的研究,目前国内外尚未见报道。

本研究利用生物信息学预测筛选出MSH6基因的候选miRNA;使用烟草双荧光素酶报告系统对其进行体外验证;通过拟南芥植株叶片注射瞬时侵染方法确定靶向MSH6基因的miRNA;并进一步分析了Cd胁迫条件下拟南芥幼苗MSH6基因与miRNA表达以及两者间的相关性,从而明确miRNA172b-5p、miRNA172e-5p和miRNA472-3p通过调控MSH6基因参与拟南芥Cd应激,为基于MMR调控的Cd

毒理机制研究提供 miRNA 研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

实验选用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, 哥伦比亚生态型) 为供试植物。经 10% 次氯酸钠及 70% 乙醇溶液消毒; 4 °C 春化 24~48 h; 采用 Cd 浓度为 0、1.25、2.5、4.0 mg · L⁻¹ 的 0.5×M&S 营养液于 21 °C 培养 7 d, 光暗周期为 12 h/12 h, 光照强度为 3000 lx。每个处理重复 3 次。选取相同处理的幼苗, 每条约 50~80 mg, 使用康维世纪的植物 RNA 提取试剂盒 (CW0588S) 分别提取幼苗总 RNA, 并电泳检测 RNA 质量, 保存于 -80 °C。

选用烟草为体外验证供试植物, 22 °C 恒温培养 1 个月, 光暗周期 12 h/12 h, 至 3~5 叶叶片完全张开; 同时利用拟南芥作为体内验证供试植物, 21~22 °C 恒温培养至 5~7 叶龄, 光暗周期 16 h/8 h。

1.2 拟南芥 MSH6 基因相关 miRNAs 生物信息学预测

利用 NCBI 数据库查找并获得拟南芥 MSH6 基因 CDS 序列; 采用 psRNATarget 软件, 设置 Expectation (E) 小于 2 (期望值越小可信度越高) 筛选以 MSH6 基因为靶基因的候选 miRNAs。

1.3 qRT-PCR 检测拟南芥 MSH6 基因和 miRNAs 表达情况

1.3.1 拟南芥 MSH6 基因表达定量分析

使用 Takara 公司的 PrimeScriptTM 1st strand cDNA 合成试剂盒反转录 cDNA; 靶基因表达使用 SYBR Premix

Ex Taq 在 CFX96 (BIORAD) 实时定量 PCR 仪上进行, 选取 UBQ10 作为内参基因, 扩增所用引物如表 1 所示。

1.3.2 拟南芥 miRNAs 表达定量分析

使用 Tiangen 公司的 miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒反转录 cDNA; miRNA 表达使用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒在 CFX96 (BIORAD) 实时定量 PCR 仪上进行, 选取 U6 作为内参基因, 扩增所用引物如表 1 所示。

1.4 烟草双荧光素酶报告系统与 miRNA 过表达质粒构建

本实验通过修饰 pGreen_3' UTR_sensor (Addgene 55206) 和 pGreen_GUS_competitor plasmid (Addgene ID 55208) (www.addgene.org) 分别制备双荧光素酶报告系统及 miRNA 过表达质粒。设计 MSH6 基因前体序列阳性对照及阴性对照引物序列如表 1 所示。

参照 Liu 等 (2015) 方法构建重组质粒。使用 *AvrII*、*AgeI* 酶对 3' UTR 质粒进行双酶切 (购自 NEB 公司), 使用 *XhoI*、*EcoRI* 酶 (购自 Promega 公司) 对 GUS 质粒进行双酶切; 取酶切纯化后质粒 50 ng 及双链 PCR 产物 400 ng 使用 T4 DNA 连接酶 (购自 Takara 公司) 连接; 连接产物转入 *E. coli* TOP10 感受态细胞 (购自 Sangon Biotech 公司), 于含有 50 μg · mL⁻¹ 卡那霉素的 LB-琼脂平板上 37 °C 培养 12 h; 挑选单菌落进行菌落 PCR 验证并测序。将测序验证正确质粒转入根癌农杆菌 GV3101 (PSoup) 感受态细胞 (购自上海唯地生物技术有限公司), 涂

表 1 实验用引物名称和序列

Table 1 Names and sequences of primers used in the experiment

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物序列 (5'-3')
UBQ10	CTCAGGCTCCGTGCTGATG	GTGATAGTTTTCCCACTCAACGTC
U6	CGATAAAATTGGAACGATACAGA	ATTTGGACCATTTCTCGATTTCG
athMSH6	ATTACTTAGAAAGGGCTATCGGG	AACAACCTGCACATACTTCGC
ath-miRNA172b-5p (ath-miR172e-5p)	GTCCGCAGCACCATTAAGATT	
ath-miRNA472	CGATGCTCGAAGTAGGC	
pri-ath-miRNA172b-5p	CTCGAGGTGTAGCAAGAAATTATCA	GAATTCATCCAGACTTCAATCAAT
pri-ath-miRNA172e-5p	CTCGAGTTCCCAACCTTTAGACCTC	GAATTCATATTCCCAAGAGACAGA
pri-ath-miRNA472	CTCGAGCTCTATTAGTGCAGTGAT	GAATTCATTAGGTGTATGTATGCT
athMSH6-3' UTR-172-test	CTAGGATGGTCTTGTATGCTGCTGCA	CCGGTGCAGCAGCATCAAGAACCATC
athMSH6-3' UTR-472-test	CTAGGGGAATCGGTGGAGTAGAAGAAGA	CCGGTCTTCTTACTCCACCGATTCCC
athMSH6-3' UTR-172-positive	CTAGGGTGAATCTTAATGCTGCTGCA	CCGGTGCAGCACCATTAAGATTCCACC
athMSH6-3' UTR-472-positive	CTAGGGGTATGGCGGAGTAGGAAAAA	CCGGTTTTTCTTACTCCGCCCATACCC
athMSH6-3' UTR-negative	CTAGGACAACCTTCAGGGTCAGCTAGTA	CCGGTACTAGCTGACCCTGAAGTTGTC

表格中 ath-miRNA172b-5p 与 ath-miRNA172e-5p 序列相同, 前体序列不同。Positive 标记为 MSH6 基因前体序列阳性对照, 此段序列能够与靶向 miRNA 进行完全互补配对; negative 标记为 MSH6 基因前体序列阴性对照, 此段序列与靶向 miRNAs 完全不能进行互补配对。

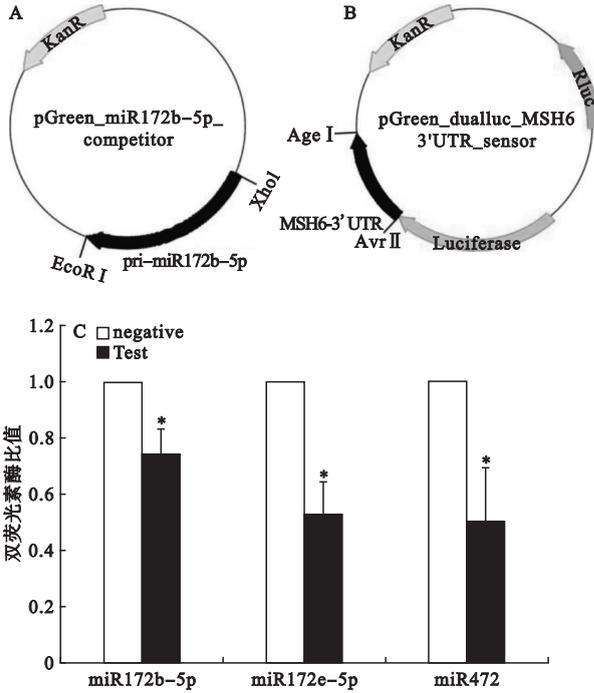


图 2 重组质粒结构示意图及双荧光素酶相对活性
Fig.2 Diagrams of the recombinant plasmids and relative activity of luciferase

A. miRNAs 过表达质粒结构图例; B. 双荧光素酶报告质粒结构图例; C. 双荧光素酶相对活性 (阳性对照为 0、阴性对照为 1, * 表示差异显著 $P < 0.05$)。

分别与含有双荧光素酶报告质粒 (阳性对照组、阴性对照组及测试组) 的农杆菌 GV3101 共同侵染烟草植株, 测定双荧光素酶比值, 并使用只含有 miRNA 过表达质粒的烟草双荧光素酶比值进行校正。如图 2C 所示, miRNA172b-5p 及 miRNA172e-5p 测试组与阴性对照相比, 双荧光素酶比值分别下降了 25.5%、47.2%, miRNA472-3p 测试组与阴性对照相比, 双荧光素酶比值下降了 49.5%。

2.3 拟南芥 MSH6 基因与 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 瞬时侵染体内验证结果

本实验利用携带 miRNA 过表达质粒的农杆菌侵染拟南芥植株进行体内验证实验。结果如图 3 所示, miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 与各自空白对照相比, 其表达量分别上升了 178.9%、123.6% 及 37.6%; 而在上述 3 组实验中, MSH6 基因与空白对照相比表达量分别下降了 20.3%、22.7% 及 38.2%。

2.4 Cd 胁迫下拟南芥 MSH6 基因和 miRNAs 表达情况

拟南芥幼苗错配修复基因 MSH6 在 Cd 胁迫 7 d

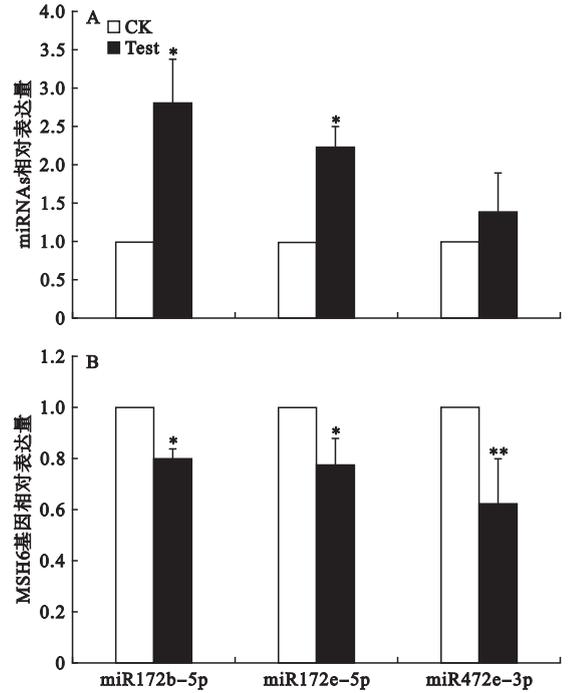


图 3 MSH6 基因与 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 体内验证结果图

Fig.3 In vivo validation of MSH6 gene with miRNA172b-5p, miRNA172e-5p and miRNA472-3p

A. 体内侵染 miRNAs 过表达质粒植株 miRNAs 表达情况 (内参基因为 U6); B. 侵染后植株 MSH6 基因表达情况 (内参基因为 UBQ10)。图中 * 表示差异显著 $P < 0.05$, ** 表示差异极显著 $P < 0.01$ 。

后表达情况如图 4A 所示, 当 Cd 处理浓度分别为 1.25、2.5、4.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与对照相比, 拟南芥幼苗 MSH6 基因表达量随 Cd 浓度增加呈现明显下降趋势, MSH6 基因表达量分别下降了 16.9%、32.3%、45.1%。

MiRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 随 Cd 胁迫浓度变化其表达变化趋势如图 4B-C 所示, 当 Cd 处理浓度分别为 1.25、2.5、4.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与对照相比, 拟南芥幼苗 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 表达量随 Cd 浓度增加呈现明显上升趋势。其中, miRNA172b-5p 表达量上升了 87.4%、132.1%、204.1%, miRNA172e-5p 表达量上升了 87.4%、132.1%、204.1%, miRNA472-3p 表达量上升了 64.1%、114.2%、129.7%。

通过 SPSS 软件对 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 与 MSH6 基因在 Cd 胁迫下表达情况进行相关性分析, 得到 Pearson 相关系数为 -0.995、-0.995 和 -0.984, 即二者间呈显著负相关 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

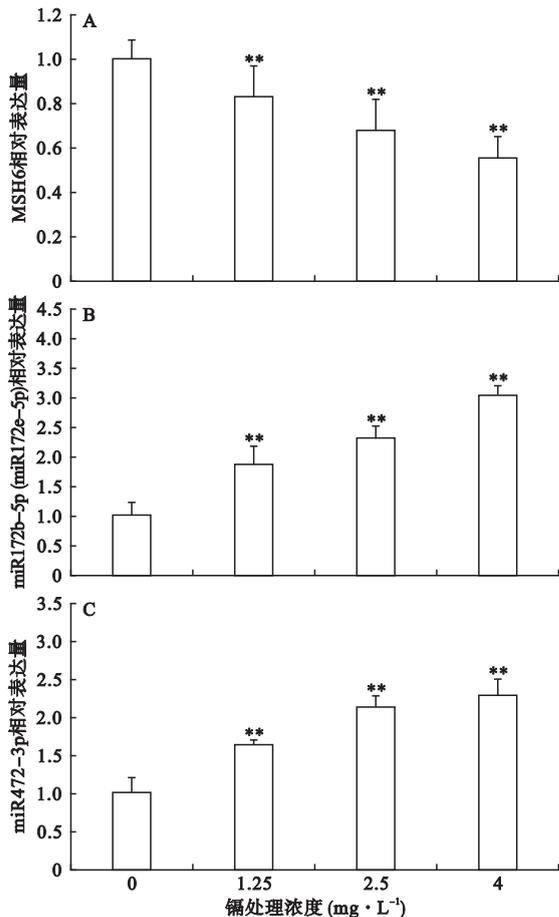


图4 Cd胁迫7 d后拟南芥幼苗MSH6基因及miRNAs表达情况

Fig.4 Expression levels of MSH6 gene and miRNAs from Cd-induced *Arabidopsis* seedlings for 7 d

A. MSH6 基因相对表达量 (内参基因为 UBQ10); B. miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 相对表达量 (内参基因为 U6); C. miRNA472-3p 相对表达量 (内参基因为 U6)。图中均以 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为对照设其表达量为 1, * 表示差异显著 $P < 0.05$, ** 表示差异极显著 $P < 0.01$ 。

3 讨论

MSH6 基因是表征 Cd 胁迫对于拟南芥遗传毒性效应的有效生物标记物 (宋婕等, 2017)。本实验室前期研究发现, MSH6 基因是 Cd 诱导拟南芥 G2/M 期阻滞的靶基因之一, 敲除 MSH6 基因会造成细胞周期 G2/M 期阻滞, 引起细胞内复制, 明确了 MSH6 基因在 Cd 胁迫下对细胞周期、细胞增殖与植物生长的重要调控作用 (宋婕等, 2017; Cao *et al.*, 2018), 然而 Cd 胁迫下错配修复基因 MSH6 调控机制尚不清楚。为应对环境中多种非生物胁迫, 生物体内产生了复杂的调控网络, 其中 miRNA 作为重要的调控因子, 可在转录后水平调控基因差异性表达 (陈芳等, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008)。

研究表明, 人体中 miRNA155 可靶向 MSH6 等基因, 通过对 DNA 损伤反应及修复途径等产生影响, 从而导致基因组突变频率增加 (Czochor *et al.*, 2016)。因此, Cd 胁迫条件下植物 miRNA 对 MSH6 基因的调控研究具有重要意义。本实验验证了 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 对 MSH6 基因的靶向调控作用, 该实验结果将有助于研究功能基因的表达调控以及植物适应逆境胁迫的分子机理。

MMR 系统的主要功能是识别和修正 DNA 复制后的错配碱基, 并且对胁迫诱导的 DNA 损伤具有识别、修复和调控作用。然而, 前期研究已发现, Cd 胁迫会造成拟南芥 MMR 系统中 MSH2、MSH6、MLH1 等基因表达明显下降, 而且呈现剂量-效应关系 (Cao *et al.*, 2018), 但其调控机制尚不明确。本实验室通过分析 MMR 基因的启动子元件与启动子胞嘧啶甲基化, 探索其在转录水平的调控机制, 但结果不显著, 无法解释表达显著下降现象 (何蕾等, 2016)。因此, 本研究利用筛选靶向 MMR 基因的 miRNAs, 探索其在转录后水平的调控机制。已有的大量研究证实, miRNA 作为植物逆境胁迫适应过程中一类重要的调控因子, 调控下游逆境相关基因表达参与植物应激。在 Cd 胁迫下, 植物 miRNA159、miRNA395、miRNA398、miRNA393 及 miRNA319 等可分别靶向 ABC、ATP、CSD、TIR1 及 TCP 等基因 (张柳伟, 2012; 肖莉等, 2013; 曾幼玲等, 2016; Ferdous *et al.*, 2017), 通过调控重金属转运、硫同化、抗氧化胁迫、生长素响应因子等途径参与重金属胁迫应答 (张林等, 2014), 然而, 对于参与细胞增殖、细胞死亡、DNA 损伤修复等多种重要功能的 MMR 基因, 其 miRNA 的靶向性研究尚未见报道。

为了验证 miRNAs 与 MSH6 基因的靶向性, 本实验采用植物双荧光素酶报告系统进行体外验证, 其原理在于 miRNA 主要通过识别靶基因 3'UTR 起作用。因此, 可将靶基因 3'UTR 区域构建至 pGreen_3'UTR sensor 载体中, 替换 *F-luc* 原始 3'UTR 区域的相应序列, 此时 *F-luc* 反映靶基因的表达情况, 而 *R-luc* 为内参。而后借由 GV3101 农杆菌将构建好的双荧光素酶质粒转染至植物叶片细胞中, 当 miRNA 过表达时, 过量 miRNA 可与替换后靶基因 3'UTR 区域转录的 mRNA 结合, 抑制其蛋白质翻译, 导致 *F-luc/R-luc* 比值下降, 从而反映植物体内 miRNA 对靶基因表达的抑制作用。在实验中我们发现, 组成

型表达的海肾荧光素酶在拟南芥中近乎无表达,可能由于海肾荧光素酶基因在拟南芥植株内转录受到抑制或存在转录后 miRNAs 调控等,导致海肾荧光素酶不能稳定表达,从而影响实验结果。因此,本实验使用烟草作为体外验证的受试植株,结果显示,miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 对 MSH6 基因的抑制率分别达到 25.5%、47.2% 及 49.5% (图 2C),表明 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 可靶向 MSH6 基因 3'UTR 区域,抑制 MSH6 基因表达。由于植物双荧光素酶报告系统具有较高的准确性,而且相比传统的 CAT、 β -Gal 等共报告基因更为灵敏、快捷(鲍春暘等,2011;耿德玉等,2012),因此,被广泛应用于 miRNAs 与基因靶向性验证(康夏等,2013;Liu *et al.*, 2015;魏斌等,2016;杨晓燕等,2018)。另外,本实验采用拟南芥植株瞬时侵染实验作为体内验证手段,结果表明,miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 的表达明显增加,分别上升了 178.9%、123.6% 及 37.6%,而 MSH6 基因的表达显著降低,分别下降了 20.3%、22.7% 及 38.2%,表明这些 miRNAs 对 MSH6 基因具有靶向调控作用,与体外验证结果一致。虽然该方法未对待检测细胞进行筛选,但相比原生质体转化验证与愈伤组织转化验证,其实验难度小、周期短;而且由于本研究中的 miRNAs 在野生型拟南芥无胁迫条件下表达较低,MSH6 基因未受到明显下调,因此检测瞬时侵染植株时,即使存在未转化成功的细胞,也可在 miRNAs 过表达转化拟南芥植株后,检测到其靶基因 MSH6 表达的明显差异(图 3A 和 3B)。

本实验中 Cd 胁迫(0、1.25、2.5、4.0 mg · L⁻¹) 7 d 后,qRT-PCR 分析结果表明,随 Cd 浓度增加,MSH6 基因的表达量显著下降(图 2A)。宋婕等(2017)报道,Cd 处理浓度高于 1.0 mg · L⁻¹时,错配修复系统受到一定程度损伤,导致 MSH6 基因表达量亦为下降趋势。为了探究 MSH6 基因表达量下降与 miRNA 的关系,本实验采用了 qRT-PCR 分析,发现随 Cd 胁迫浓度增加,miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 的表达量显著上升(图 2B-C);通过 SPSS 相关性分析,发现上述 miRNAs 与 MSH6 基因表达之间呈现显著负相关($r = -0.997$, $P < 0.01$; $r = -0.997$, $P < 0.01$; $r = -0.952$, $P < 0.05$),表明在 Cd 胁迫下 MSH6 基因受到此 3 种 miRNAs 调控导致其表达降低,说明 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 及 miRNA472-3p 通过靶向 MSH6 参与

Cd 应激响应。此外,研究表明,上述 miRNAs 除对 Cd 胁迫作出响应外,还可参与其他多种胁迫应激反应。如 miRNA472 可参与植物干旱应激反应(Akdogan *et al.*, 2016);同时可触发次级 siRNAs,通过调控 RPS5、RSG1、RSG2、PTI 及 ETI 等基因,参与植物免疫应激反应(Feng *et al.*, 2012;Boccaro *et al.*, 2014);通过调控抗病蛋白 TIR-NBS-LRR 家族、CC-NBS-LRR 家族的表达,参与植株抗病反应(Lu *et al.*, 2014)。而 miRNA172 作为植物体内极度保守的 miRNA,不仅对开花发育等生理过程有重要调节作用(Zhao *et al.*, 2015;Shivaraj *et al.*, 2018),还可响应盐胁迫应激(Gupta *et al.*, 2014);同时可通过调控 WRKY44 及 AP2 类 TOE1 等基因,参与植物干旱应激反应(Bárbara *et al.*, 2015;Akdogan *et al.*, 2016;曾幼玲等,2016)。因此,在胁迫条件下,miRNA172 及 miRNA472 均是重要的应激相关 miRNAs,通过调控免疫基因、抗病基因、生长基因、转录因子基因等多领域基因,参与植物免疫、抗病、干旱、盐胁迫等应激反应。

4 结 论

本实验通过生物信息学预测筛选出靶向 MSH6 的 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p,通过荧光素酶体外实验(荧光素酶比值分别下降了 25.5%、47.2% 和 49.5%)及拟南芥植株瞬时侵染体内实验(MSH6 基因表达量下降了 20.3%、22.7% 和 38.2%)验证了 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 是靶向拟南芥 MSH6 基因的 miRNAs。

与对照相比,1.25、2.5、4.0 mg · L⁻¹ Cd 胁迫 7 d 显著降低了错配修复基因 MSH6 表达量,而 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 表达量显著增加,且经 SPSS 相关性分析二者呈显著负相关($r = -0.997$, $P < 0.01$; $r = -0.997$, $P < 0.01$; $r = -0.952$, $P < 0.05$),从而证实 miRNA172b-5p、miRNA172e-5p 和 miRNA472-3p 通过靶向 MSH6 基因参与拟南芥 Cd 应激反应。本研究为 MMR 调控的 Cd 毒理机制研究提供了 miRNA 研究基础。

参考文献

- 鲍春暘,李军锋,张慧娜,等. 2011. 用于鉴定 microRNA 靶基因的新型双荧光素酶报告基因系统的构建及应用. 生物技术通讯, 22(5): 651-656.
- 陈芳,殷勤伟. 2005. 调控基因表达的 miRNA. 科学通报, 50(13): 3-13.

- 丁 通, 骆骄阳, 杨世海, 等. 2018. 天然药物防治镉中毒的现代研究进展. *中国中药杂志*, **43**(10): 2006-2013.
- 耿德玉, 原 媛, 郭华荣. 2012. 双荧光素酶报告基因系统的应用研究进展. *科技资讯*, **7**(21): 1.
- 韩艳萍, 刘 宛, 李艳芝. 2009. 镉胁迫对拟南芥幼苗形态生理和错配修复相关基因表达的影响研究. *农业环境科学学报*, **28**(6): 1246-1252.
- 何 蕾, 王鹤潼, 宋 婕. 2016. 拟南芥 MLH1 基因启动子甲基化作为镉胁迫生物标记物潜力评估. *生态学杂志*, **35**(5): 1386-1393.
- 康 夏, 康 菲, 杨 波. 2013. miRNA-144 靶向调节钙粘蛋白 11 对间充质干细胞成骨分化的抑制效应. *第三军医大学学报*, **35**(10): 922-926.
- 李 婧, 周艳文, 陈 森. 2015. 我国土壤镉污染现状、危害及其治理方法综述. *安徽农学通报*, **21**(24): 104-107.
- 庞荣丽, 王瑞萍, 谢汉忠, 等. 2016. 农业土壤中镉污染现状及污染途径分析. *天津农业科学*, **22**(12): 87-91.
- 宋 婕, 王鹤潼, 崔伟娜, 等. 2017. Cd 胁迫诱导拟南芥幼苗 DNA 损伤分析. *农业环境科学学报*, **36**(4): 635-642.
- 孙婕好, 刘艳秋, 李佰林, 等. 2018. 植物对镉的耐性机制以及对镉污染土壤修复的研究进展. *江苏农业科学*, **46**(7): 12-19.
- 王晓娟, 王文斌, 杨 龙, 等. 2015. 重金属镉在植物体内的转运途径及其调控机制. *生态学报*, **35**(23): 7921-7929.
- 魏 斌, 邓 霞, 卞秀娟, 等. 2016. AKT2 3'-UTR 荧光素酶报告基因载体构建及与 miRNA-625 靶向关系验证. *江苏大学学报*, **26**(3): 204-207.
- 肖 莉, 刘 春, 向世鹏, 等. 2013. MicroRNAs 在植物响应金属毒性中的作用. *衡阳师范学院学报*, **34**(3): 113-117.
- 杨晓燕, 谢 聘, 赵 倩, 等. 2018. FBXO47 3'-UTR 双荧光素酶报告载体构建及与 miR-33b-5p 靶向验证. *生物技术*, **28**(1): 13-17.
- 曾幼玲, 杨瑞瑞. 2016. 植物 miRNA 的生物学特性及在环境胁迫中的作用. *中国农业科学*, **49**(19): 3671-3682.
- 张 林, 丁艳菲, 王 熠, 等. 2014. miRNA 在植物重金属胁迫应答中的作用. *植物生理学报*, **5**(5): 599-604.
- 张柳伟. 2012. miR395 调节油菜 (*Brassica napus*) 耐镉功能的研究(硕士学位论文). 南京: 南京农业大学.
- 张巧丽, 刘 宛, 李培军, 等. 2008. 镉胁迫对拟南芥幼苗错配修复基因表达的影响. *生态学杂志*, **27**(7): 1173-1180.
- 钟 鸣, 陈 琢, 刘 宛, 等. 2012. 逆境胁迫下植物 DNA 损伤和 DNA 错配修复研究进展. *生态学杂志*, **31**(9): 2404-2411.
- Akdogan G, Tufekci ED, Uranbey S, et al. 2016. miRNA-based drought regulation in wheat. *Functional & Integrative Genomics*, **16**: 221-233.
- Bagchi D, Joshi SS, Bagchi M, et al. 2015. Cadmium and chromium induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Biochemical & Molecular Toxicology*, **14**: 33-41.
- Bárbara NF, Oswaldo VL, Xochitl AA, et al. 2015. The microRNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-Rhizobium etli nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiology*, **168**: 273-291.
- Boccaro M, Sarazin A, Thiébeaud O, et al. 2014. The Arabidopsis miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP- and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes. *PLoS Pathogens*, **10**: e1003883.
- Cao X, Wang H, Zhuang D, et al. 2018. Roles of MSH2 and MSH6 in cadmium-induced G2/M checkpoint arrest in Arabidopsis roots. *Chemosphere*, **201**: 586-594.
- Casas-Marce M, Revilla E, Fernandes M, et al. 2011. Regulation of plant MSH2 and MSH6 genes in the UV-B-induced DNA damage response. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 2925-2937.
- Cui W, Wang H, Song J, et al. 2017. Cell cycle arrest mediated by Cd-induced DNA damage in Arabidopsis root tips. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **145**: 569-574.
- Czochor JR, Sulkowski P, Glazer PM. 2016. miR-155 overexpression promotes genomic instability by reducing high-fidelity polymerase delta expression and activating error-prone DSB repair. *Molecular Cancer Research*, **14**: 363-373.
- Ding Y, Gong S, Yi W, et al. 2018. MicroRNA166 modulates cadmium tolerance and accumulation in rice. *Plant Physiology*, **177**: 1691-1703.
- Ding Y, Zhen C, Cheng Z. 2011. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Experimental Botany*, **62**: 3563-3573.
- Ferdous J, Sanchez-Ferrero JC, Langridge P, et al. 2017. Differential expression of microRNAs and potential targets under drought stress in barley. *Plant, Cell & Environment*, **40**: 11-24.
- Feng L, Daniela P, Claire B, et al. 2012. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**: 1790-1795.
- Gómez R, Spampinato CP. 2013. Mismatch recognition function of *Arabidopsis thaliana* MutSy. *DNA Repair*, **12**: 257-264.
- Gupta OP, Meena NL, Sharma I, et al. 2014. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. *Molecular Biology Reports*, **41**: 4623-4629.
- Hikmet B, Melda K, Reyyan B, et al. 2015. Stress responsive miRNAs and isomiRs in cereals. *Plant Science*, **235**: 1-13.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, et al. 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, **14**: 836-843.
- Liu Q, Axtell MJ. 2015. Quantitating plant microRNA-mediated target repression using a dual-luciferase transient expression

- system. *Methods in Molecular Biology*, **1284**: 287–303.
- Lu YB, Yang L, Qi Y, *et al.* 2014. Identification of boron-deficiency-responsive microRNAs in *Citrus sinensis* roots by Illumina sequencing. *BMC Plant Biology*, **14**: 123–139.
- Orangi E, Motovali-Bashi M. 2019. Evaluation of miRNA-9 and miRNA-34a as potential biomarkers for diagnosis of breast cancer in Iranian women. *Gene*, **687**: 272–279.
- Qiu Z, Hai B, Guo J, *et al.* 2016. Characterization of wheat miRNAs and their target genes responsive to cadmium stress. *Plant Physiology & Biochemistry*, **101**: 60–67.
- Shivaraj SM, Jain A, Singh A. 2018. Highly preserved roles of Brassica MIR172 in polyploid Brassicas: Ectopic expression of variants of Brassica MIR172, accelerates floral transition. *Molecular Genetics and Genomics*, **293**: 1121–1138.
- Tkalec M, Stefanić PP, Cvjetko P, *et al.* 2014. The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLoS ONE*, **9**: e87582.
- Wright C, Milne S, Leeson H. 2014. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: Modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive Bio-medicine Online*, **28**: 684–703.
- Xicola RM, Bontu S, Doyle BJ, *et al.* 2016. Association of a let-7 miRNA binding region of TGFBR1 with hereditary mismatch repair proficient colorectal cancer (MSS HNPCC). *Carcinogenesis*, **37**: 751–758.
- Ye L, Jiang T, Shao H, *et al.* 2017. MiR1290 is a biomarker in DNA mismatch repair deficient colon cancer and promotes resistance to 5-fluorouracil by directly targeting hMSH2. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **7**: 453–464.
- Zhao Q, Sun C, Liu DD, *et al.* 2015. Ectopic expression of the apple Md-miR172e gene alters flowering time and floral organ identity in Arabidopsis. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, **123**: 535–546.
- Zhao SZ, Jian BS, Zhi MY. 2012. Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 4597–4613.
- Zhao T, Li G, Mi S, *et al.* 2007. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes & Development*, **21**: 1190–1203.

作者简介 成智博,1992年生,女,硕士研究生,从事分子生态毒理学研究。E-mail: cheng920210@163.com
责任编辑 魏中青
