

南极独角雪冰鱼(*Chionodraco hamatus*) miR-7132 对红细胞发生的作用研究*

胡星星¹ 王丛丛^{1,2} 产久林¹ 许强华^{1,2,3,4}①

(1. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306; 2. 大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室 上海 201306;
3. 国家远洋渔业工程技术研究中心 上海 201306; 4. 远洋渔业协同创新中心 上海 201306)

摘要 microRNA 为短链非编码 RNA, 通过与靶基因 3'UTR 序列互补在转录后水平发挥作用。已有研究表明, microRNA 在红细胞发生过程中起着重要的调控作用。南极冰鱼是目前已知的唯一仅具有无功能性血红细胞的脊椎动物。前期研究提示, 独角雪冰鱼(*Chionodraco hamatus*)头肾中高表达的 microRNAs 可能抑制着冰鱼红血球的发生。本研究针对南极冰鱼头肾中高表达的 miR-7132, 运用斑马鱼显微注射、双荧光素酶报告系统, 并结合靶基因预测等手段研究了 miR-7132 对血红细胞发生的作用机制。结果表明: 斑马鱼胚胎注射 miR-7132 后, 固蓝染色显示斑马鱼胚胎红细胞中血红蛋白的表达显著下降, 这表明 miR-7132 的过表达抑制了血红细胞生成。通过转录组数据结合比对冰鱼的全基因组序列, 获得了独角雪冰鱼血红细胞生成的血红素生物合成的限速酶(5'-aminolevulinate synthase 2, ALAS2)基因 3'UTR 序列。构建含 ALAS2 基因 3'UTR 序列的双荧光素酶报告质粒, 并与 miR-7132 共转染 293T 细胞检测荧光素酶活性变化; 构建包含绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达质粒与 miR-7132 共同注射斑马鱼胚胎, 检测 GFP 荧光强度与蛋白表达量变化。结果显示, 转染 miR-7132 的 293T 细胞荧光素酶相对活性显著降低, ALAS2 基因是 miR-7132 的一个靶基因。斑马鱼体内注射 miR-7132 的 GFP 荧光强度显著降低, 且 GFP 蛋白表达量显著减少。本研究揭示了 miR-7132 对血红细胞生成的抑制作用, miR-7132 通过抑制 ALAS2 基因的表达而抑制南极冰鱼血红细胞的发生。

关键词 南极冰鱼; miR-7132; ALAS2; 红细胞发生

中图分类号 Q71

doi: 10.11693/hyhz20151200311

微 RNA(microRNA, miRNA)是在真核生物中存在的一类长度为 22—24 个核苷酸的非编码 RNA, 主要通过其 3'UTR 结合, 在转录后水平调控基因的表达(Ambros, 2001)。自 1993 年第一个非编码小 RNA——(lin-4)被证实(Lee *et al.*, 1993), 越来越多的 microRNA 被发现并得到研究。目前为止, 在人类基因组中已经鉴定出超过 1000 种 microRNA, 并且这些 microRNA 调控了

约 50% 基因组的活性(Hartmann *et al.*, 2011)。microRNA 在脊椎动物中高度保守, 调控一系列重要的生物过程, 同时也参与一些疾病的发生, 如癌症、病毒性疾病、传染性疾病等(Shen *et al.*, 2010)。迄今为止, 也有不少关于 microRNA 对红细胞发生调控的研究报道。Felli 等(2005)发现, miR-221 与 miR-222 过表达损害红系祖细胞的正常增殖与分化, 它们主要通过抑制 Kit 受体蛋白的表达影响正常红细胞的发

* 国家自然科学基金面上项目, 31572598 号; 国家自然科学基金重大研究计划培育项目, 91131006 号; 上海市教育发展基金会和上海市教育委员会曙光计划, 13SG51 号; 教育部科学技术研究项目, 213013A 号; 上海市教委水产学高峰学科项目。胡星星, 女, 硕士研究生, E-mail: 653428452@qq.com

① 通讯作者: 许强华, 博士生导师, 教授, E-mail: qhxu@shou.edu.cn

收稿日期: 2015-12-30, 收修改稿日期: 2016-04-11

生。研究表明,在 CD_{34}^{+} 祖细胞中强制性表达 miR-223, 对红系分化重要蛋白 LMO2 的表达有明显的抑制作用,从而扰乱红系的分化进程(Felli *et al*, 2009)。

生物的造血分化是一个动态且复杂的过程,发生在生物的整体生活史中。造血过程主要由造血干细胞分化产生各种血细胞,包括红细胞、白细胞、淋巴细胞等(Ge *et al*, 2014)。其中,红细胞生成是脊椎动物造血过程中最重要的部分之一。红细胞的正常发育涉及很多转录因子的参与和调控(Tsiftoglou *et al*, 2009),包括锌指蛋白 GATA 家族成员(Dore *et al*, 2008),血红素生物合成的限速酶(5'-aminolevulinic synthase 2, ALAS2)等的参与(Harigae *et al*, 1998)。亚铁血红素作为血红蛋白的色素部分,由铁原子及原卟啉区组成。亚铁血红素的正常生物合成需要 8 种酶的辅助,为了防止此生物合成过程中有毒中间产物的积累,需要第一限速酶 ALAS(5-氨基乙酰丙酸合酶)的调节。ALAS 包含两种同工酶 ALAS1 和 ALAS2, ALAS1 在生物体内很多组织都有表达, ALAS2 只在红系祖细胞中表达,为特异调节红系发育的限速酶。ALAS2 突变会造成原卟啉合成减少,从而导致亚铁血红素合成不足引发血红细胞性贫血症(Fujiwara *et al*, 2015)。

血红细胞的产生几乎成为脊椎动物的独有特征。然而,有一类生活在极端寒冷的南极海域的脊椎动物——南极冰鱼,隶属于南极鱼亚目(Notothenioidei),在长期的适应性进化中逐渐丢失血红细胞,是目前已知的唯一缺乏具有功能性血红细胞的脊椎动物,它们主要依靠皮肤和鳃吸收溶解在水中的氧气(许强华等, 2014)。

在本项目的前期研究中,以南极独角雪冰鱼(*Chionodraco hamatus*)为研究对象,通过对血液发生主要组织头肾的 microRNA 组分分析发现,冰鱼头肾中存在大量高表达的 microRNAs, 这些高表达的 microRNAs 可能抑制着冰鱼红血球的发生(Xu *et al*, 2015)。在此基础上,本研究针对独角雪冰鱼头肾中异常高表达的 miR-7132, 利用转基因斑马鱼和细胞转染实验,首次研究了该 microRNA 在红细胞生成过程中的功能及作用机制。本研究为揭示 miR-7132 在南极冰鱼体内造血的影响机制提供了理论依据,并为进一步探讨极端低温环境条件下 microRNA 的造血作用机制与进化研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 独角雪冰鱼样本由第 31 次南极

考察队乘“雪龙”号作业采集于南极埃默里冰架。活体迅速冻存于 -80°C 超低温冰箱。冻存样本用锡箔纸包裹后放液氮中带回上海海洋大学海洋科学学院保护遗传学实验室, -80°C 保存备用。

1.1.2 实验动物与细胞 293T 细胞系(人肾上皮细胞)作为细胞转染实验的常用细胞系,其转染效率高,可便捷地获得转染后细胞内外蛋白(Meissner *et al*, 2001)。本实验中 293T 细胞培养于完全培养基中,完全培养基由 DMEM(改良 Eagle 培养基)、10%FBS(胎牛血清)和双抗(100U 青霉素, 100 μg 链霉素)组成,培养条件为 5% CO_2 , 培养温度为 37°C 。显微注射所用一细胞期斑马鱼胚胎来自本实验室饲养野生型斑马鱼,由达到性成熟的健康野生型斑马鱼繁殖所得。

1.1.3 主要试剂 Trizol 试剂(Life Technologies)、酚氯仿异戊醇(25:24:1)、异丙醇、1 $\times$ TAE 缓冲液、琼脂糖、乙醇、过氧化氢 30% 溶液、Trypsin-EDTA Solution(上海生工生物工程公司); primer 2X MIX(北京全式金生物技术公司)、DNA 胶回收试剂盒(Axygen Biosciences, USA)、反转录试剂盒、PMD18-T 载体(TaKaRa, Japan)、DNA Marker、DH5 α 感受态细胞(TaKaRa, Japan); O-Dianisidine (SIGMA, USA)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 取独角雪冰鱼的肌肉组织,依照 Trizol 法(Life Technologies)步骤提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量与完整性,分光光度法(Thermo)测定总 RNA 的浓度;采用反转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA,保存于 -20°C 备用。

1.2.2 独角雪冰鱼头肾小 RNA 组分分析 提取独角雪冰鱼头肾总 RNA,经 Hi-seq2000 Small RNA 测序仪对 RNA 组分进行分析,对测序后的初始数据进行去重处理,并与 miRNA 数据库中已知 miRNA 进行序列比对,鉴定 miRNA 类别。

1.2.3 引物设计与合成 根据本实验室对独角雪冰鱼转录组测序所得的 ALAS2 的序列,通过比对本实验室自行完成的独角雪冰鱼的全基因组序列(未发表),获得 ALAS2 的 3'UTR 序列。根据获得的 ALAS2 的 3'UTR 序列,由 Primer5.0 软件设计得到特异性引物序列,同时选取适合的酶切位点,拟扩增 ALAS2 的 3'UTR 序列(表 1)。

1.2.4 ALAS2 的 3'UTR 片段克隆 PCR 反应扩增得到 ALAS2 3'UTR 片段,反应体系 25 μL : primer 2X MIX(北京全式金生物技术公司)13 μL ,上下游引物各

表 1 引物序列与限制性内切酶
Tab.1 Primer sequence and restriction enzyme

引物名称	引物序列(5'-3')	限制性内切酶	扩增长度
pmir-ALAS2 3'UTR	F: CGAGCTCCCGGTCCTTCTGTTGTG	SacI SalI	1313bp
	R: GCGTCGACAGGCTTGCAGGGATCTGG		
Tol2-EGFP-ALAS2 3'UTR	F: ATTTGCGGCCGC CCGGTCCTTCTGTTGTG	NotI MfeI	1313bp
	R: CAATTGAGGCTTGCAGGGATCTGG		

1μL, cDNA 模板 1.5μL, 加水至 25μL。反应条件: 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 45s, 58℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 90s, 4℃ 保存。胶回收反应试剂盒(上海生工生物工程公司)回收 PCR 反应产物, 回收产物连接至 pMD18-T 载体上, 转化并筛选阳性克隆(北京天根生化科技公司), 菌液 PCR 产物送上海生工测序。

1.2.5 固蓝染色 对受精后一细胞期的斑马鱼胚胎进行显微注射, miR-7132(苏州吉玛基因公司)的注射浓度为 50μm。36h 后通过固蓝染色固定胚胎体内血红蛋白, 固蓝染液主要成分为: O-dianisidine (1.5g/L)、醋酸钠(0.1mol/L, pH4.5)、30%过氧化氢溶液、无水乙醇。经 4%多聚甲醛固定胚胎 6h 以上, 加入磷酸盐缓冲液(1×PBS)洗去胚胎表面残余的多聚甲醛与杂质, 加入适量的固蓝染液于摇床上避光染色 20min, 弃去染液加入甘油, 于显微镜下成像。应用图像处理软件 Image J 对图片中所固定的血红蛋白的区域进行统计。

1.2.6 细胞转染 转染前一天将状态良好的 293T 细胞接种于 6 孔培养板中, 于完全培养基中培养。次日, 观察到细胞密度约 70%时可进行转染, 按照转染试剂 Attractene Transfection(QIAGEN)说明书步骤, 用不含血清的培养基进行 miR-7132 与 pmir-ALAS2 3'UTR 质粒共同转染, 同时以共同转染 NC(negative control, 5' UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 3')与 pmir-ALAS2 3'UTR 质粒作为阴性对照组, 以只转染 pmir-ALAS2 3'UTR 质粒作为空白对照组, 转染后 6h 更换为完全培养基, 继续培养至 24h。收集此时的细

胞, 采用 Dual-Luciferase® 报告基因检测试剂盒(Promega, USA)检测荧光素酶活性, 依据实验数据, 计算萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶(Firefly Luc/Renilla Luc)活性的比值。

1.2.7 斑马鱼显微注射 将上述构建的 Tol2-EGFP-ALAS2 3'UTR(100ng/μL)与 miR-7132(50μm)共同注射入处于第一细胞期的斑马鱼胚胎。24h 后荧光显微镜下观察并提取胚胎总蛋白, 进行蛋白质免疫印迹(Western Blot)实验。

2 结果与分析

2.1 独角雪冰鱼 ALAS2 3'UTR 表达质粒构建

将扩增得到的 ALAS2 3'UTR 连接至 PMD18-T 载体上, 分别进行双酶切。如图 1 所示, 得到酶切产物片段长度为 1313bp, 将酶切产物连接至 pmir-GLO (Sac I, Sal I)与 Tol2-EGFP (Mfe I, Not I)表达质粒中。

2.2 miR-7132 对血红蛋白表达的影响

显微注射 miR-7132 的斑马鱼胚胎, ALAS2 蛋白的表达水平明显下降(图 2a)。这表明: ALAS2 可能是 miR-7132 的靶基因。应用图像分析软件 Image J 对固蓝染色后的结果进行分析, 统计斑马鱼胚胎血红蛋白区域的大小, 进行显著性分析。固蓝染色结果显示(图 2b), 显微注射 miR-7132 的斑马鱼胚胎体内血红蛋白的含量显著低于注射 Negative Control(NC)对照组与空白(WT)对照组, 说明 miR-7132 在一定程度上对血红蛋白的表达起到抑制作用。



图 1 表达质粒构建电泳图

Fig.1 Electrophoresis of expression plasmids construction

M1: DL5000DNA 分子标记; M2: DL2000DNA 分子标记; 1, 2: 独角雪冰鱼 ALAS2 3'UTR 片段 T 载体酶切; 3, 4: ALAS2 3'UTR 表达载体连接 3, 4(pmir-GLO, Tol2-EGFP)

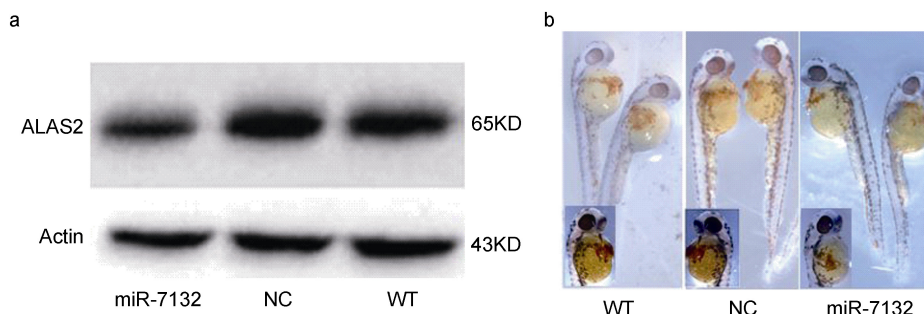


图 2 过表达 miR-7132 降低斑马鱼胚胎 ALAS2 和血红蛋白的表达水平

Fig.2 Overexpression of the miR-7132 reduced the level of hemoglobin and ALAS2 in zebrafish embryo

a: 显微注射 miR-7132 后的斑马鱼胚胎, ALAS2 蛋白的表达水平明显下降; b: 显微注射 miR-7132 后的斑马鱼胚胎, 血红蛋白的表达水平明显下降; ALAS2: 血红素生物合成限速酶; Actin: 内参基因-肌动蛋白; NC: 阴性对照(Negative Control)

2.3 miR-7132 过表达对红系分化基因 ALAS2 表达的影响

前期的研究中, 通过对独角雪冰鱼造血组织头肾中小 RNA 的组分进行分析, 发现 miR-7132 在独角雪冰鱼头肾组织中显著高表达(Xu *et al.*, 2015)。因此, 对 miR-7132 可能作用的靶基因进行生物学信息预测, 预测结果表明(图 3a), ALAS2 基因可能是 miR-7132 的靶基因, 通过 3'UTR 区域与 miR-7132 进行互补配对。

为确定 miR-7132 对红系分化相关基因 ALAS2 的作用, 将 ALAS2 的 3'UTR 靶位点附近 1313bp 片段连接至 pmirGLO 双荧光素酶报告质粒中, 构建得到 pmi-CH ALAS2 3'UTR 质粒。将 miR-7132 与 pmi-CH ALAS2 3'UTR 质粒共同转染 293T 细胞, 24h 收集细胞检测荧光素酶与海肾荧光素酶活性。结果显示, 共转染 miR-7132 与 pmi-CH ALAS2 3'UTR 质粒组的萤火虫荧光素酶的相对活性显著低于共转染 NC 与 pmi-CH ALAS2 3'UTR 质粒组(图 3b), 表明 miR-7132 在体外水平对 ALAS2 的表达具有显著抑制作用。

2.4 体内过表达 miR-7132 对独角雪冰鱼 ALAS2 基因表达的影响

为进一步验证 miR-7132 对 ALAS2 基因的作用, 构建了可在体内表达 GFP 绿色荧光蛋白基因的表达质粒, 将 ALAS2 3'UTR 连接至 GFP 荧光蛋白下游组成 Tol2-GFP-CH ALAS2 3'UTR 表达质粒。

以 miR-7132 终浓度为 50 μ m、质粒终浓度为 100ng/ μ L 的注射量以一定比例混合后显微注射斑马鱼第一细胞期胚胎, 24h 后观察胚胎荧光强度变化情况。同时, 提取斑马鱼胚胎总蛋白进行 Western blot 检测 GFP 荧光蛋白的表达。结果显示, 注射 miR-7132 后, 斑马鱼胚胎体内所表达的 GFP 荧光强度显著低

于注射 NC 的阴性对照组与空白对照组(图 4a, b)。Western blot 结果显示, 注射 miR-7132 的实验组的 GFP 蛋白表达显著低于注射 NC 的阴性对照组与空白对照组(图 4c), 表明 miR-7132 可在体内显著抑制 ALAS2 基因的表达。

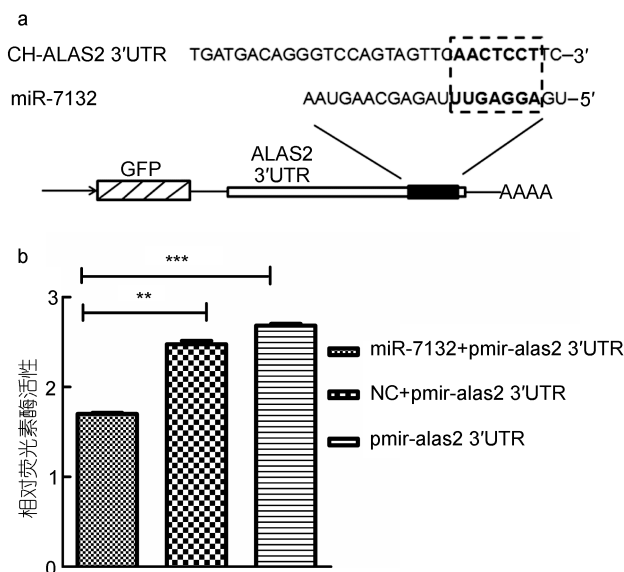


图 3 293T 细胞转染鉴定 miR-7132 对 ALAS2 的抑制作用

Fig.3 Identify the inhibition of miR-7132 on ALAS2 by the 293T cells transfection

a: miR-7132 与 ALAS2 的作用原理图; b: 双荧光素酶活性检测; NC: Negative Control, 阴性对照组; **表示 $P<0.01$; ***表示 $P<0.001$

3 讨论

红细胞的生成对于脊椎动物的造血活动是非常重要的, 红细胞数量的异常增多或减少都会导致疾病的发生, 例如异常红血球生成性贫血, 骨髓增生异常综合征等(Ge *et al.*, 2014)。因此, 对红细胞生成机制的深入研究有利于血液疾病的检测与治疗(Kim *et al.*,

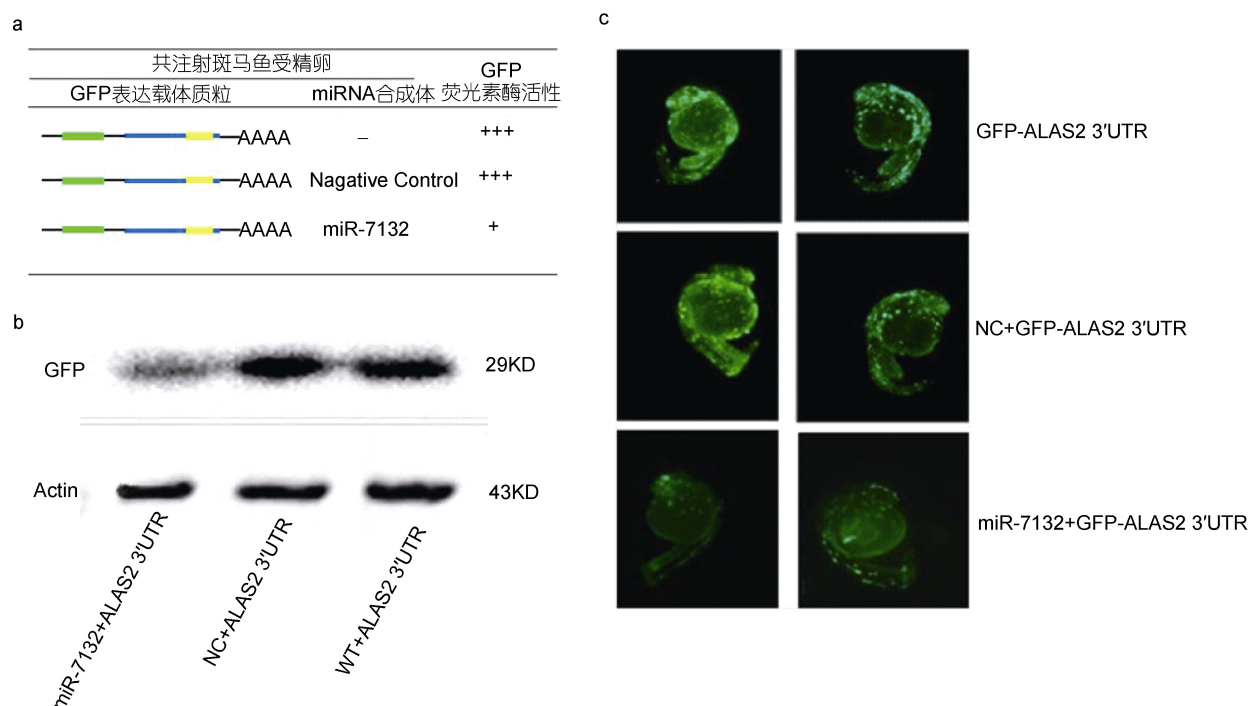


图4 体内注射 miR-7132 检测 GFP 的表达

Fig.4 Detect the expression of GFP protein by injecting miR-7132 in vivo

a: 应用 GFP 报告系统与 miR-7132 组合, 检测 GFP 荧光活性强度; b: 注射 miR-7132/NC 后, 检测 GFP 重组蛋白表达差异; c: 注射 miR-7132/NC 后, 荧光显微镜观察 GFP 的活性

2007)。血红蛋白是红细胞的重要组成部分, 是由亚铁血红素与球蛋白组成, 在生物体内负责携带氧气至全身各处以维持生命活动的正常进行(Fujiwara *et al*, 2006)。生物体内约 85%的亚铁血红素由红细胞负责合成, 亚铁血红素在红细胞中合成的第一步则需要 ALAS2 酶的催化, ALAS2 是血红素生物合成过程中最重要的限速酶之一(Barman-Aksözen *et al*, 2015)。已有研究表明, ALAS2 作为重要的造血相关转录因子参与血细胞的生成, 例如 ALAS2 缺失的鼠胚胎干细胞分化产生的红细胞亚铁血红素含量严重不足。作为红细胞的组成成分, 亚铁血红素缺乏时, 会导致异常的红细胞发生并且引发血液疾病(Harigae *et al*, 2003)。

随着对 microRNA 研究的不断深入, 研究者发现 microRNA 调控生物体内多种生物过程。microRNA 参与红细胞发生的研究也逐渐得到关注。调控红细胞生成的网络是错综复杂的, 同一个转录因子可能由多个 miRNA 对其发挥作用, 同时, 某一个 miRNA 也可能作用于多个转录因子, 且多个转录因子之间往往存在着相互作用(Kaufman *et al*, 2001)。孙红英等(2013)研究证明了 miR-218 调控 ALAS2 在红细胞分化中的作用及机制。miR-218 可以作用于 ALAS2 的

3'UTR 区域, 过表达 miR-218 使 ALAS2 的表达显著下调, ALAS2 是参与铁代谢与红细胞分化的关键基因(Ajioka *et al*, 2006), 体内缺乏 ALAS2 将引发铁粒幼细胞性贫血等血液疾病(Astner *et al*, 2005)。同时, ALAS2 表达的减少还会导致其下游基因珠蛋白表达的降低(孙红英, 2013)。Xu 等(2015)研究中, 通过对多个在南极冰鱼头肾组织中高表达的 miRNA 进行靶基因预测, 发现有 91 个 miRNA 作用于已知的 5 个红细胞生成标志基因, 其中, ALAS2 作为靶基因被最多数量的 miRNA 所作用。本研究中 miR-7132 对 ALAS2 的靶向调控作用与 Xu 等研究相吻合。

近年来, 有研究表明 miR-7132 可能与鲤鱼免疫系统的发育及免疫应答相关(Thai *et al*, 2007)。作者通过 Solexa 测序技术(Solexa 公司第二代测序技术)并结合生物信息学分析成功从鲤鱼的脾脏组织中鉴定出 192 种保守性较高的 miRNA, 其中 miR-7132 在鲤鱼脾脏中特异性表达, 由此作者推测 miR-7132 可能作用于一个或多个转录因子而参与免疫过程(陈功义等, 2015)。但是, 关于 miR-7132 参与血细胞发生的研究鲜有报道。

斑马鱼胚胎透明, 可随时进行活体观察, 受精后

24 小时心血管系统已基本形成, 便于研究心血管系统的发育和功能。此外, 通过显微注射技术可将外源基因或含标记基因的质粒高效率整合至斑马鱼基因组中, 同时结合荧光显微镜观察、胚胎染色等实验方法对基因功能进行分析(Fu *et al*, 2009; Grabher *et al*, 2011)。在 Su 等研究中, 生物信息学分析结果显示 *meis1* 为 miR-144 的靶基因, 作者运用斑马鱼胚胎显微注射技术, 向斑马鱼胚胎共注射 miR-144 与 GFP-*meis1* 3'UTR 的复合体并通过 Western blot 检测 GFP 蛋白表达, 成功验证了 miR-144 对斑马鱼造血过程的影响机制(Su *et al*, 2014)。在本研究中, 由于没有南极冰鱼的胚胎, 再加上 microRNA 在不同物种中均比较保守, 所以借助斑马鱼显微注射来研究 miR-7132 的功能, 这也是目前非模式鱼类物种功能基因验证的主要手段之一。事实上, 在注射 miR-7132 后, 我们确实发现 miR-7132 可以降低 ALAS2 蛋白的表达(图 2a)。这进一步提示, 利用斑马鱼显微注射来研究 miR-7132 的功能是可行的。

4 结论

本研究中, 通过 Hi-Seq 转录组测序技术在南极冰鱼头肾组织中首次分离并鉴定得到南极冰鱼 miR-7132 的序列, 通过生物信息学软件(miRBase 数据库, TargetScan 靶基因预测, PicTar 靶基因预测等)预测 miR-7132 潜在的靶基因。同时, 以斑马鱼作为模型进行体内实验验证, 并结合细胞转染技术(细胞内过表达 miRNA 及靶蛋白)、荧光素酶报告系统、胚胎显微注射技术等实验手段综合验证了 miR-7132 通过调节 ALAS2 的表达参与南极冰鱼红细胞生成过程。在本研究之前, 并未有 miR-7132 对红细胞生成作用的研究报道。本实验将在后续研究中, 拟对 miR-7132 进行体内敲除, 更好地研究 miR-7132 对红细胞发生的作用机制。

参 考 文 献

- 许强华, 吴智超, 陈良标, 2014. 南极鱼类多样性和适应性进化研究进展. 生物多样性, 22(1): 80—87
- 孙红英, 2013. Has-miR-218 调控 ALAS2 在红细胞分化中的作用和机制研究. 北京: 中国科学院大学硕士学位论文, 6—10
- 陈功义, 赵银丽, 李国喜等, 2015. 鲤鱼脾脏中保守 miRNA 的鉴定. 中国生物化学与分子生物学报, 31(6): 636—644
- Ajioka R S, Phillips J D, Kushner J P, 2006. Biosynthesis of heme in mammals. Biochimica et Biophysica Acta, 1763(7): 723—736
- Ambros V, 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. Cell, 107(7): 823—826
- Astner L, Schulze J O, van den Heuvel J *et al*, 2005. Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. The EMBO Journal, 24(18): 3166—3177
- Barman-Aksözen J, Minder E I, Schubiger C *et al*, 2015. In ferrochelatase-deficient protoporphyria patients, ALAS2 expression is enhanced and erythrocytic protoporphyrin concentration correlates with iron availability. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 54(1): 71—77
- Dore L C, Amigo J D, dos Santos C O *et al*, 2008. A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(9): 3333—3338
- Felli N, Fontana L, Pelosi E *et al*, 2005. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(50): 18081—18086
- Felli N, Pedini F, Romania P *et al*, 2009. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. Haematologica, 94(4): 479—486
- Fu Y F, Du T T, Dong M *et al*, 2009. Mir-144 selectively regulates embryonic α -hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. Blood, 113(6): 1340—1349
- Fujiwara T, Harigae H, Takahashi S *et al*, 2006. Differential gene expression profiling between wild-type and ALAS2-null erythroblasts: Identification of novel heme-regulated genes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 340(1): 105—110
- Fujiwara T, Harigae H, 2015. Biology of heme in mammalian erythroid cells and related disorders. BioMed Research International, 2015: 278536
- Ge L, Zhang R P, Wan F *et al*, 2014. TET2 plays an essential role in erythropoiesis by regulating lineage-specific genes via DNA oxidative demethylation in a zebrafish model. Molecular and Cellular Biology, 34(6): 989—1002
- Grabher C, Payne E M, Johnston A B *et al*, 2011. Zebrafish microRNA-126 determines hematopoietic cell fate through c-Myb. Leukemia, 25(3): 506—514
- Harigae H, Nakajima O, Suwabe N *et al*, 2003. Aberrant iron accumulation and oxidized status of erythroid-specific δ -aminolevulinate synthase (ALAS2)-deficient definitive erythroblasts. Blood, 101(3): 1188—1193
- Harigae H, Suwabe N, Weinstock P H *et al*, 1998. Deficient heme and globin synthesis in embryonic stem cells lacking the erythroid-specific δ -aminolevulinate synthase gene. Blood, 91(3): 798—805
- Hartmann D, Thum T, 2011. MicroRNAs and vascular (dys) function. Vascular Pharmacology, 55(4): 92—105
- Kaufman D S, Hanson E T, Lewis R L *et al*, 2001. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of

- the United States of America, 98(19): 10716—10721
- Kim S I, Bresnick E H, 2007. Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. *Oncogene*, 26(47): 6777—6794
- Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5): 843—854
- Meissner P, Pick H, Kulangara A *et al*, 2001. Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(2): 197—203
- Shen E, Diao X H, Wei C *et al*, 2010. MicroRNAs target gene and signaling pathway by bioinformatics analysis in the cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(3): 380—385
- Su Z H, Si W X, Li L *et al*, 2014. *MiR-144* regulates hematopoiesis and vascular development by targeting *meis1* during zebrafish development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 49: 53—63
- Thai T H, Calado D P, Casola S *et al*, 2007. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*, 316(5824): 604—608
- Tsiftoglou A S, Vizirianakis I S, Strouboulis J, 2009. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life*, 61(8): 800—830
- Xu Q H, Cai C, Hu X X *et al*, 2015. Evolutionary suppression of erythropoiesis via the modulation of TGF- β signalling in an Antarctic icefish. *Molecular Ecology*, 24(18): 4664—4678

ERYTHROPOIESIS STUDY OF MIR-7132 IN ANTARTCTIC ICEFISH *CHIONODRACO HAMATUS*

HU Xing-Xing¹, WANG Cong-Cong^{1,2}, CHAN Jiu-Lin¹, XU Qiang-Hua^{1,2,3,4}

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Ocean Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 3. National Distant-water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Collaborative Innovation Center for Distant-water Fisheries, Shanghai 201306, China)

Abstract microRNAs are small non-coding RNAs acting at post-transcriptional level by binding the target gene 3'UTR (untranslated region), and have an important effect on the erythropoiesis. *Chionodraco hamatus* is the only known vertebrates with a few non-functional erythrocytes. Previous findings showed that the highly upregulated expression of microRNAs in the head kidney of the animal could inhibit its erythropoiesis. By applying zebrafish microinjection, dual-luciferase reporter, and the target prediction method, we studied the erythropoiesis of miR-7132 that highly expressed in the head kidney. Results show that, after being injected with miR-7132, the expression level of hemoglobin in zebrafish embryos dramatically reduced as observed after o-dianisidine staining, indicating that the overexpression of miR-7132 repressed the erythropoiesis process in zebrafish embryos. The 3'UTR of ALAS2 (i.e., 5'-aminolevulinate synthase 2), the limited enzymes of hemoglobin production, was obtained from transcriptome sequencing data blasting unpublished icefish genome sequences. The dual-luciferase vector containing the 3'UTR of ALAS2 was constructed and co-transfected with miR-7132, and the activity of luciferase was detected. The expression vector containing the GFP (green fluorescent protein) fluorescent protein was constructed. Zebrafish embryos were then micro-injected with the mixture of miR-7132 and GFP plasmid, and the expression of GFP protein was detected by the western blotting. Therefore, miR-7132 could reduce significantly the relative activity of luciferase in 293T cells. The GFP fluorescent intensity could be decreased significantly when injected with miR-7132; and miR-7132 could regulate erythropoiesis in the Antarctic icefish by repressing the expression of ALAS2.

Key words Antarctic icefish; miR-7132; ALAS2; erythropoiesis