

· 基础研究 ·

microRNA-1 调控神经嵴细胞进而影响颅面发育

钦文皓¹, 赵娜¹, 袁礼婵¹, 李强^{1,2}, 郭舒瑜^{1,2}, 马俊青^{1,2*}¹南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属口腔医院口腔正畸科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 采用基因敲除斑马鱼模型, 观测 microRNA-1(miR-1)对神经嵴细胞(neural crest cell, NCC)和颅面发育的影响。方法: 用 CRISPR/Cas9 基因敲除系统敲除斑马鱼 miR-1, 观察其神经嵴衍生生物的表现。原位杂交检测 NCC 诱导分化相关基因的表达, 并用实时定量 PCR (qRT-PCR) 等检验与凋亡相关基因的表达。结果: 基因敲除组斑马鱼下颌骨严重萎缩, 色素细胞延迟出现。原位杂交显示, 受精后 24 h, tfap2a, dlx3b, ngn1 和 snailb 表达下降。qRT-PCR 结果证明 miR-1 影响凋亡相关基因的表达。结论: miR-1 参与 NCC 的调控进而影响颅面发育, 其可能通过凋亡相关通路而发挥作用。

[关键词] microRNA-1; 基因敲除; 斑马鱼; 凋亡**[中图分类号]** R329.26**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)09-1302-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200910

Regulation of microRNA-1 on neural crest cells and craniofacial development

QIN Wenhao¹, ZHAO Na¹, YUAN Lichan¹, LI Qiang^{1,2}, GUO Shuyu^{1,2}, MA Junqing^{1,2*}¹Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Department of Orthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to observe the effect of microRNA-1 (miR-1) on the development of neural crest cells and craniofacial region in the knockout zebrafish model. **Methods:** miR-1 of zebrafish was knocked out by CRISPR / Cas9 gene knock-out system. In situ hybridization was used to detect the expression of differentiation related genes in neural crest cells, and qRT-PCR was used to detect the expression of apoptosis related genes. **Results:** In the knockout group, the mandible was atrophic and the pigment cells appeared delayed. In situ hybridization showed that the expression of tfap2a, dlx3b, ngn1 and snailb decreased 24 hours after fertilization. qRT-PCR results showed that miR-1 affected the expression of apoptosis related genes. **Conclusion:** miR-1 is involved in the regulation of neural crest cells and affects craniofacial development, which may play a role by regulating apoptosis related pathways.

[Key words] microRNA-1; gene knockout; zebrafish; apoptosis

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1302-1306]

颅面发育不良引起的畸形是一种常见的出生缺陷,严重影响人类健康和美观,大多数颅面硬性组织来自神经嵴细胞(neural crest cell, NCC)。NCC是一种多功能细胞群,在发育早期神经生长过程中位于神经板边界^[1]。上皮-间质转化后, NCC沿着特定的路径迁移,在外界信号的刺激下, NCC可分化发育成颅面硬性组织、交感神经、胶质细胞、黑色素细胞等^[2]。NCC

[基金项目] 国家自然科学基金(81771029);江苏省高校优势学科建设工程(JX10531803)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jma@njmu.edu.cn

发育不良通常与许多先天性出生异常有关,包括Di-George、Treacher-Collins、CHARGE和先天性巨结肠等综合征^[3]。

microRNA(miR)是由18~25个核苷酸组成的小单链非编码RNA^[4-5],在生物体发育中起着至关重要的作用^[6]。其中,miR-1在不同物种(包括斑马鱼和人类)中高度保守,提示它在个体发育中发挥重要调控作用。在斑马鱼中,miR-1由dre-miR-1-1和dre-miR-1-2编码,得到的成熟miRNA的序列相同,即5'-uggaaugaagaaguau-3'。在人类中,miR-1

由 hsa-miR-1-1 和 hsa-miR-1-2 编码, 其成熟序列也相同, 即 5'-ggaugaaagauguau-3'^[7]。包括斑马鱼和人类在内的不同物种的成熟 miR-1 序列相同, 这种保守程度表明它们有相似的功能^[8]。miR-1 在斑马鱼肌肉中有组织特异性表达, 与哺乳动物相似^[9]。现有临床研究中, miR-1 已被证明与心脏、血管等组织器官的发育息息相关^[10-11], 但 miR-1 对于颅面部发育的影响还知之甚少。已有研究证明在反义核苷酸的作用下, 缺失 miR-1 的斑马鱼颅面 NCC 细胞分化受到影响从而影响颅面骨的发育, 本研究采用 miR-1 敲除的斑马鱼模型评价 miR-1 对 NCC 和颅面发育的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

采用 CRISPR/Cas9 系统敲除 miR-1 的 Tubingen 系斑马鱼(南京尧舜禹有限公司)。根据突变体类型, 设计鉴定野生型(WT)和突变体(KO)的引物, 引物序列见表 1。动物实验符合南京医科大学实验动物福利伦理委员会的规定并被授权。

表 1 设计鉴定野生型和突变体的引物

Table 1 Primers to identify wild type and mutant type

引物名称	引物序列(5'→3')
MiR-1 11bp wt	上游 CATATGAACAAGAGCAGCT
	下游 CTGGCTTATTTGTATTTTCAC
MiR-1 11bp mut	上游 CATATGAACAAGAGCAGAA
	下游 CTGGCTTATTTGTATTTTCAC

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼 miR-1 基因敲除 F5 纯合突变体鉴定

剪取 miR-1 敲除成鱼的少量尾鳍组织(<1 mm³), 放至 PCR 管中。向含有尾鳍组织的 PCR 管中加入 YSY buffer(南京尧舜禹公司) 10 μL。制备基因组 DNA 模板的反应条件: 65 °C 30 min, 95 °C 5 min, 16 °C 1 min, 4 °C。

基因组 DNA 片段 PCR 扩增反应体系(20 μL) 包括 2×Mastermix(南京诺唯赞公司) 10 μL, 7 μL 超纯水, 1 μL 正、反向(MiR-1 11bp wt, MiR-1 11bp mut)引物(5 μmol/L)和 1 μL 基因组 DNA 模板。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。

1.2.2 阿尔新蓝染色

首先, 受精后 96 h 斑马鱼胚胎固定, 脱水, 并用 Alcian 蓝(Sigma 公司, 美国)染色过夜, 观察颅面

部相应软骨组织的形成情况。胚胎软骨完全染色, 随后使用饱和硼酸钠中和。然后, 在 3% 过氧化氢和 1% 氢氧化钾的混合物(体积比 3:7)中进行漂白, 在 1% 胰蛋白酶中消化, 直至大部分胚胎组织脱落。用 1% 氢氧化钾溶液代替消化液, 用梯度甘油浸泡。最后用体视显微镜观察胚胎。

1.2.3 整胚原位杂交

采用 Primer 5.0 软件设计引物。收集受精后 24 h 胚胎, 用 4% 多聚甲醛固定, 甲醇梯度脱水。胚胎在 -20 °C 的甲醇中保存以备进一步使用。用甲醇/PBS 梯度稀释复水后, 用蛋白酶 K(10 μg/mL)处理胚胎。然后将胚胎预杂交 2 h, 地高辛标记探针按照标准方案进行。

1.2.4 qRT-PCR

利用 Primerpremier 5.0 软件设计目的基因上下游引物序列, 由上海生工公司合成。Caspase-3 上游 5'-ACTGCCATACTTTGTCATC-3', 下游 5'-TTCTT-TATTCAGGCTTGTC-3'; Bcl-2 上游 5'-AAATGAGG-GTCTGAACGAG-3', 下游 5'-AATAAAGCAGTGGA-GGAATC-3'; Actin 上游 5'-ATGTCACGTCGCACTTC-3', 下游 5'-GCTGCCTCTTCTTCCTCC-3'。用 mRNA 逆转录成的 cDNA 为模板, 扩增目的基因, Actin 为内参标准化目的基因。实时定量 PCR 每个样品重复 3 次。20 μL 反应体系: 2×SYBR Green 10 μL, 引物各 1 μL, cDNA 模板 2 μL, 加焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水补充至 20 μL。两步法 PCR 扩增反应条件如下: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 34 个循环; 72 °C 延伸 1 min; 72 °C 延伸 10 min; 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。采用相对定量法对溶解曲线进行分析。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS19.0 处理, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

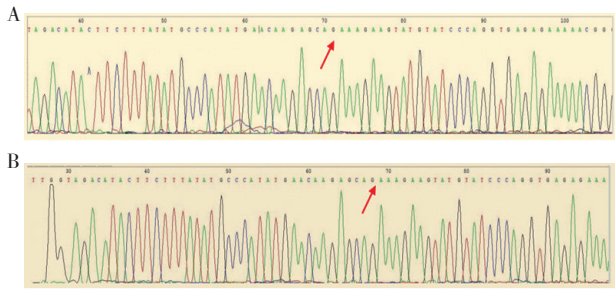
2 结果

2.1 纯合子斑马鱼基因型鉴定

随机选择敲除 miR-1 的 Tubingen 系斑马鱼 3 尾, 进行纯合突变体鉴定, 得到 2 种突变体。代表性测序结果如图 1 所示。

2.2 miR-1 敲除后斑马鱼的表型变化

从突变斑马鱼中可以观察到一系列异常改变, 包括头部变小、下颌舌弓后缩(图 2、3)。在突



A: 突变体1, 红色箭头指示自第72 bp 开始出现(-11 bp) 纯合缺失; B: 突变体2, 红色箭头指示自第68 bp 开始出现(-11 bp) 纯合缺失。

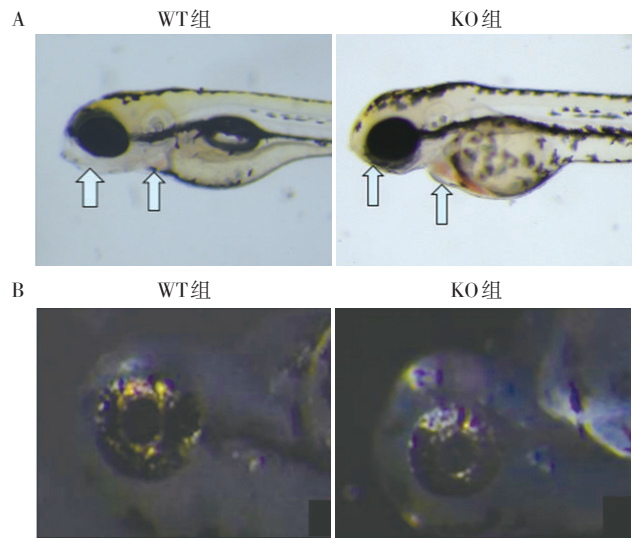
图1 各斑马鱼突变体的测序图

Figure 1 Sequence map of each zebrafish mutant

变体中, 虹膜色素(神经嵴衍生的色素细胞)数量减少。此外, 突变体心脏发育异常, 心脏增大, 提示神经嵴衍生的心脏瓣膜发育异常。

2.3 与斑马鱼颅面硬组织有关的基因原位杂交

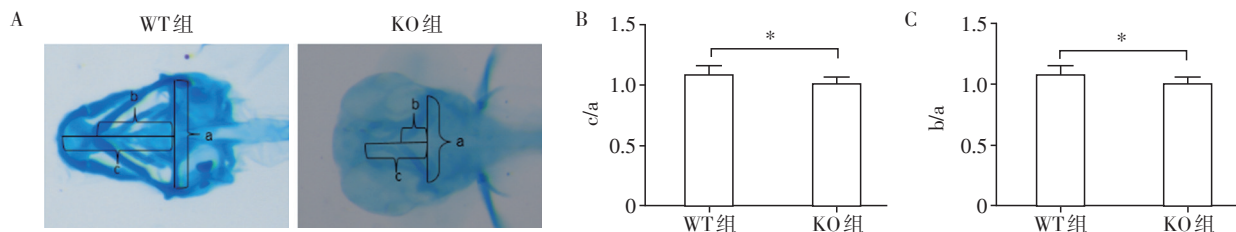
采用原位杂交检测 *foxd3*、*tfap2a*、*snailb*、*dlx3b*、*msxb*、*ngn1* 等神经嵴发育相关基因。结果显示



A: 突变斑马鱼的形态改变, 箭头从左向右依次指向下颌、心脏($\times 30$); B: 虹膜色素出现差异($\times 60$)。

图2 miR-1 敲除引起斑马鱼的形态缺陷

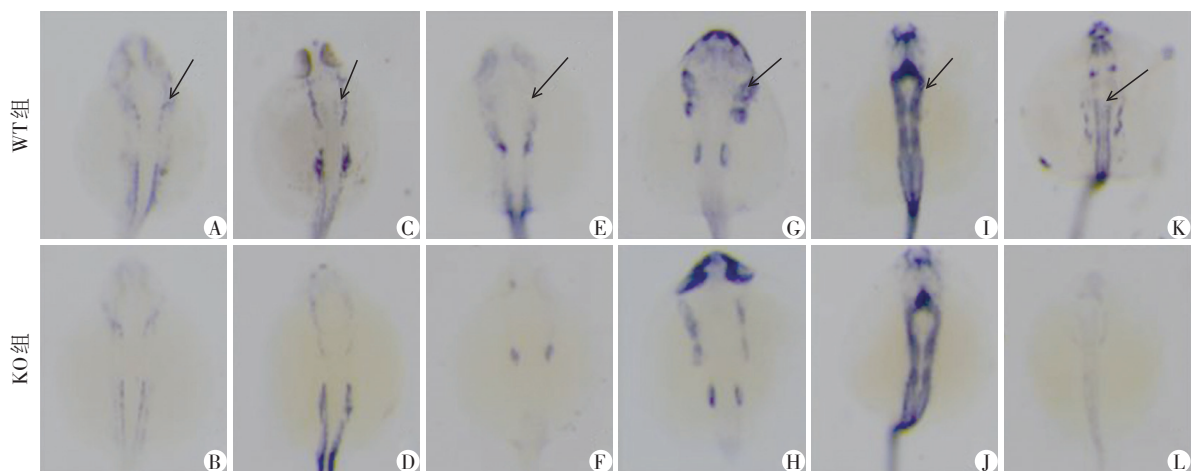
Figure 2 Morphological defects of zebrafish induced by miR-1 knockout



A: 实验组斑马鱼软骨的异常结果(阿尔新蓝染色, $\times 30$); 角舌骨上下最后端之间连线记为 a, 角舌骨最前端至 a 线垂直距离记为 b; 麦氏软骨最前端至 a 线垂直距离记为 c; B: 两组 c/a 值比较; C: 两组 b/a 值比较。两组比较, $*P < 0.05 (n=20)$ 。

图3 miR-1 敲除引起斑马鱼口咽部的软骨发育异常

Figure 3 Knockout of miR-1 caused cartilage dysplasia in the oropharynx of zebrafish



图中箭头所指区域即为基因表达的观察区域。A、B: *foxd3* 基因(20/20; 表型胚胎数占所观察胚胎数的比例, 后同); C、D: *tfap2a* 基因(18/20); E、F: *snailb* 基因(14/18); G、H: *dlx3b* 基因(17/20); I、J: *msxb* 基因(18/20); K、L: *ngn1* 基因(19/20)。

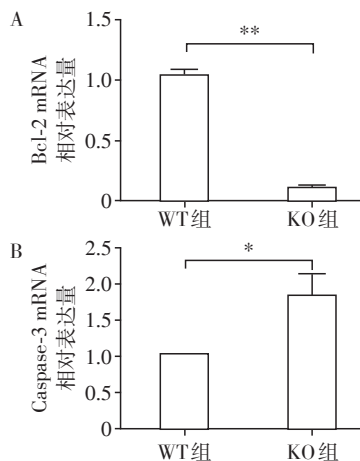
图4 神经嵴发育关键基因的原位杂交($\times 30$)

Figure 4 In situ hybridization results of key genes of neural crest development ($\times 30$)

tfap2a、snailb、dlx3b、ngn1 等表达显著下降, foxd3、msxb 表达无明显变化(图4)。

2.4 qRT-PCR 检测凋亡相关基因

取受精后 24 h 的斑马鱼进行 qRT-PCR 验证, 检测了 24 hpf 时与凋亡有关的 mRNA 表达水平, 结果显示 miR-1 敲除后, caspase-3 表达呈现上升趋势 ($P < 0.01$), Bcl-2 表达显著下降 ($P < 0.001$, 图5)。



A: 两组 Bcl-2 mRNA 相对表达量; B: 两组 Caspase-3 mRNA 相对表达量。两组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图5 凋亡相关基因的qRT-PCR的结果

Figure 5 qRT-PCR results of genes related to apoptosis

3 讨论

以往研究表明 miR-1 在心肌发育、血管生成等过程中发挥着重要作用^[12-14]。miR-1 还通过直接靶向胰岛素样生长因子的 3'-UTR 抑制软骨细胞的增殖^[15]。因此, miR-1 在胚胎发育和疾病中起着至关重要的调节作用。

Wang 等^[7]采用原位杂交技术检测 miR-1 在野生斑马鱼胚胎中的表达, 结果表明, 胚胎 24 h 斑马鱼的头部、咽部为 miR-1 主要表达场所, 注射 miR-1 反义核苷酸导致颅面软骨损伤和严重颌面部畸形, 在受精后 4 d 内, NCC 功能异常。然而, 反义核苷酸有较强的毒副作用, 目前尚不清楚上述这些表型缺陷是否与注射反义核苷酸有关。基于 miR-1 在脊椎动物胚胎发育中的已知作用以及 miR-1 在进化过程中的高度保守性, 推测 miR-1 可能参与斑马鱼神经嵴源性组织的胚胎发育, 为此, 构建了 miR-1 基因敲除斑马鱼模型, 进一步了解其在神经嵴发育中的作用。

斑马鱼胚胎发育快, 周期短, 产卵量大, 胚胎透明, 体外可直接观察。因此, 斑马鱼是研究基因

在颅面发育中作用的一种很好的模型动物^[16-18]。本研究中 miR-1 基因敲除斑马鱼模型是由基因突变产生的纯合突变, 可以用来观测 miR-1 在神经嵴中的作用。本研究发现, miR-1 敲除斑马鱼下颌骨回缩、下牙弓和舌弓缩短, 同时, 神经嵴衍生组织也出现异常, 包括异常心包水肿、色素细胞退缩等。foxd3、msxb 是神经嵴特化过程中表达的特异性标记基因^[19-21], 本研究中 KO 组 foxd3 和 msxb 表达未发生明显变化, 表明 miR-1 并不影响 NCC 的特化。头部 NCC 分流区的原位杂交结果显示, KO 组 snailb 和 tfap2a 在受精后 24 h 时表达量较 WT 组少, 表明 KO 组斑马鱼的 NCC 迁移受到抑制^[22-23]。dlx3b 在 KO 组中的表达显著降低, 其中第一和第二咽弓区变化较大(第一和第二咽弓分别分化为下颌和舌骨), 这与本研究阿尔新蓝染色结果一致。miR-1 基因敲除也导致 ngn1 表达显著降低, 表明 miR-1 在 NCC 的分化中起着重要作用^[24]。

已有研究表明, miR-1 可以抑制 caspase-3 的表达, 提示其可能影响细胞凋亡^[25]。因此, 本研究进一步观测了 miR-1 敲除后凋亡相关基因的表达, 促进凋亡的基因 caspase-3 表达量上升, 抑制凋亡相关基因 Bcl-2 则大幅下降, 这说明 miR-1 与调控凋亡的基因密切相关, miR-1 敲除可以使斑马鱼颅面部相关凋亡基因的表达发生改变, 从而影响斑马鱼颅面部的发育。

综上, 本文研究了斑马鱼 miR-1 敲除对 NCC 和颅面发育的影响, 研究结果对于揭示 miR-1 的功能有一定意义。

[参考文献]

- [1] ROGERS C D, JAYASENA C S, NIE S, et al. Neural crest specification: tissues, signals, and transcription factors [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2012, 1(1): 52-68
- [2] VENTÉO S, DESIDERIO S, CABOCHETTE P, et al. Neurog 2 deficiency uncovers a critical period of cell fate plasticity and vulnerability among neural-crest-derived somatosensory progenitors [J]. Cell Rep, 2019, 29(10): 2953-2960
- [3] GUO S, ZHANG Y, ZHOU T, et al. GATA4 as a novel regulator involved in the development of the neural crest and craniofacial skeleton via Barx1 [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(11): 1996-2009
- [4] MA Z H, SUN C X, SHI H, et al. Detection of miR-122 by fluorescence real-time PCR in blood from patients with chronic hepatitis B and C infections [J]. Cytokine,

- 2020, 131: 155076
- [5] KHOR E S, WONG P F. The roles of MTOR and miRNAs in endothelial cell senescence[J/OL]. *Biogerontology*, 2020. [2020-02-13]. DOI: 10.1007/s10522-020-09876-w
- [6] HAN W, CUI H, LIANG J, et al. Role of microRNA-30c in cancer progression[J]. *J Cancer*, 2020, 11(9): 2593-2601
- [7] WANG D, WENG Y, GUO S, et al. Sec63 microRNA-1 regulates NCC migration and differentiation by targeting [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(12): 2538-2547
- [8] LI H, HUANG K, WANG P, et al. Comparison of long non-coding RNA expression profiles of cattle and buffalo differing in muscle characteristics[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 98
- [9] SUI M, ZHENG Q, WU H, et al. The expression and regulation of miR-1 in goat skeletal muscle and satellite cell during muscle growth and development[J/OL]. *Anim Biotechnol*, 2019: 1-8. DOI: 10.1080/10495398.2019.1622555
- [10] DANAII S, SHIRI S, DOLATI S, et al. The association between inflammatory cytokines and miRNAs with slow coronary flow phenomenon [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2020, 19(1): 56-64
- [11] MONDEJAR-PARREÑO G, CALLEJO M, BARREIRA B, et al. miR-1 induces endothelial dysfunction in rat pulmonary arteries[J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(4): 519-529
- [12] CELIK S, KARBALAEI-SADEGH M, RÅDEGRAN G, et al. Functional screening identifies microRNA regulators of corin activity and atrial natriuretic peptide biogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2019, 39(23): 271-279
- [13] LI X, MA C, LUO H, et al. Identification of the differential expression of genes and upstream microRNAs in small cell lung cancer compared with normal lung based on bioinformatics analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(11): e19086
- [14] WANG S, GUO X, LONG C L, et al. SUR2B/Kir6.1 channel openers correct endothelial dysfunction in chronic heart failure via the miR-1-3p/ET-1 pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 431-439
- [15] HU W, LI T, WU L, et al. Identification of microRNA-18a as a novel regulator of the insulin-like growth factor-1 in the proliferation and regeneration of deer antler[J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(4): 703-710
- [16] SARASAMMA S, VARIKKODAN M M, LIANG S T, et al. A premier vertebrate model for biomedical research in indian scenario[J]. *Zebrafish*, 2017, 14(6): 589-605
- [17] 杨迷芳, 马兰, 严冬琳, 等. 麦考酚酸对斑马鱼胚胎颅面部发育的影响[J]. *口腔医学*, 2019, 39(2): 103-107
- [18] 黄梦圆, 李德利, 张加良, 等. 过表达 miR-155 对斑马鱼胚胎发育的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(8): 1028-1033
- [19] ZHANG P, WANG G, LIN Z, et al. Alcohol exposure induces chick craniofacial bone defects by negatively affecting cranial neural crest development [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 281: 53-64
- [20] MEULEMANS D, BRONNER-FRASER M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development[J]. *Dev Cell*, 2004, 7(3): 291-299
- [21] GAMMILL L S, BRONNER-FRASER M. Neural crest specification: migrating into genomics[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(10): 795-805
- [22] NEELATHI U M, DALLE NOGARE D, CHITNIS A B. Cxcl12a induces expression to initiate collective migration and sequential FGF-dependent neuromast formation in the zebrafish posterior lateral line primordium [J]. *Development*, 2018, 145(14): dev162453
- [23] LU J K, TSAI T C, LEE H, et al. Pectoral fin anomalies in knockdown zebrafish embryos related to the cascade effect of N-cadherin and extracellular matrix formation [J]. *J Dev Biol*, 2019, 7(3): 15
- [24] HAN J, JI C, GUO Y, et al. Mechanisms underlying melatonin-mediated prevention of fenvalerate-induced behavioral and oxidative toxicity in zebrafish[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2017, 80: 1331-1341
- [25] LIU L, YUAN Y, HE X, et al. MicroRNA-1 upregulation promotes myocardiocyte proliferation and suppresses apoptosis during heart development[J]. *Mol Med Report*, 2017, 15(5): 2837-2842

[收稿日期] 2020-02-13