

## 鸡 miR-17-92 基因簇上游调控区功能分析

程敏<sup>1,2,3</sup>, 张文建<sup>1,2,3</sup>, 邢天宇<sup>1,2,3</sup>, 闫晓红<sup>1,2,3</sup>, 李玉茂<sup>1,2,3</sup>, 李辉<sup>1,2,3</sup>, 王宁<sup>1,2,3</sup>

1. 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030;
2. 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030;
3. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030

**摘要:** miR-17-92 基因簇(miR-17-92 cluster)在细胞增殖、分化、凋亡、动物发育以及肿瘤发生等过程中发挥重要作用。目前, 人和小鼠等哺乳动物 miR-17-92 基因簇的转录调控已有深入研究, 但该基因簇在鸡等鸟类中的转录调控研究还未见报道, 主要原因在于鸟类 miR-17-92 基因簇上游的基因组序列都存在一个 gap, 且该基因簇启动子的位置和序列也还不清楚。为此, 本研究采用染色体步移的方法获得鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区序列, 并采用生物信息学分析和报告基因及截短突变技术开展该 gap 区的功能分析。染色体步移分析发现, 鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区全长 1704 bp, GC 含量达 80.11%。生物信息学分析显示, 鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区内 1 段 200 bp 的序列与人、牛、小鼠等 9 种动物 miR-17-92 基因簇上游序列保守性较高, 且该区域为人和小鼠等哺乳动物 miR-17-92 基因簇宿主基因的核心启动子区。将克隆的 gap 区序列插入 pGL3 basic 荧光素酶报告基因载体, 构建成启动子荧光素酶报告基因载体 pGL3-cMIR17HG(-4228/-2506)。荧光素酶报告基因活性分析表明, pGL3-cMIR17HG(-4228/-2506)报告基因的活性是 pGL3 basic 空载体活性的 417 倍, 证明所克隆的 gap 区片段是鸡 miR-17-92 基因簇宿主基因的启动子。为进一步分析该启动子的结构和功能, 构建 gap 区片段的 5'端缺失突变(缺失 448 bp)和 3'端缺失突变(缺失 894 bp)的荧光素酶报告基因载体。与 pGL3-cMIR17HG(-4228/-2506)相比, 5'端和 3'端缺失突变分别使启动子报告基因活性降低 19.82%和 60.14%。这些数据提示, 鸡 miR-17-92 基因簇宿主基因启动子的重要调控区位于-3400/-2506。本研究结果为进一步开展鸡 miR-17-92 基因簇的转录调控奠定了基础。

**关键词:** 鸡; miR-17-92 基因簇; 启动子; 转录调控

收稿日期: 2016-03-08; 修回日期: 2016-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31372299)和农业部产业体系项目(编号: CARS-42)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31372299) and the China Agriculture Research System (No. CARS-42)]

作者简介: 程敏, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: chengminneau@163.com

通讯作者: 王宁, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: wangning@neau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-082

网络出版时间: 2016/5/23 11:09:14

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160523.1109.002.html>

## Functional analysis of the upstream regulatory region of chicken miR-17-92 cluster

Min Cheng<sup>1,2,3</sup>, Wenjian Zhang<sup>1,2,3</sup>, Tianyu Xing<sup>1,2,3</sup>, Xiaohong Yan<sup>1,2,3</sup>, Yumao Li<sup>1,2,3</sup>, Hui Li<sup>1,2,3</sup>, Ning Wang<sup>1,2,3</sup>

1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China;

2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China;

3. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** miR-17-92 cluster plays important roles in cell proliferation, differentiation, apoptosis, animal development and tumorigenesis. The transcriptional regulation of miR-17-92 cluster has been extensively studied in mammals, but not in birds. To date, avian miR-17-92 cluster genomic structure has not been fully determined. The promoter location and sequence of miR-17-92 cluster have not been determined, due to the existence of a genomic gap sequence upstream of miR-17-92 cluster in all the birds whose genomes have been sequenced. In this study, genome walking was used to close the genomic gap upstream of chicken miR-17-92 cluster. In addition, bioinformatics analysis, reporter gene assay and truncation mutagenesis were used to investigate functional role of the genomic gap sequence. Genome walking analysis showed that the gap region was 1704 bp long, and its GC content was 80.11%. Bioinformatics analysis showed that in the gap region, there was a 200 bp conserved sequence among the tested 10 species (*Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Possum*, *Danio rerio*, *Rana nigromaculata*), which is core promoter region of mammalian miR-17-92 host gene (MIR17HG). Promoter luciferase reporter gene vector of the gap region was constructed and reporter assay was performed. The result showed that the promoter activity of pGL3-cMIR17HG (-4228/-2506) was 417 times than that of negative control (empty pGL3 basic vector), suggesting that chicken miR-17-92 cluster promoter exists in the gap region. To further gain insight into the promoter structure, two different truncations for the cloned gap sequence were generated by PCR. One had a truncation of 448 bp at the 5'-end and the other had a truncation of 894 bp at the 3'-end. Further reporter analysis showed that compared with the promoter activity of pGL3-cMIR17HG (-4228/-2506), the reporter activities of the 5'-end truncation and the 3'-end truncation were reduced by 19.82% and 60.14%, respectively. These data demonstrated that the important promoter region of chicken miR-17-92 cluster is located in the -3400/-2506 bp region. Our results lay the foundation for revealing the transcriptional regulatory mechanisms of chicken miR-17-92 cluster.

**Keywords:** chicken; miR-17-92 cluster; promoter; transcriptional regulation

MicroRNAs(miRNAs)是一类长约 22nt 的单链非编码 RNA 分子,是重要的基因转录后调节因子,通过不完全的碱基互补导致 mRNA 降解或翻译抑制,从而负调控其靶基因的表达<sup>[1-4]</sup>。通常 miRNA 分子由 RNA 聚合酶 II(RNAPII)转录形成前体转录本(Pri-miRNA),前体转录本在核酸酶 Drosha 和 RNA 结合蛋白 DGCR8 的作用下被剪切成长度约 70nt 发夹结构的前体 miRNA(Pre-miRNA),前体 miRNA 被转运出核后,经核酸酶 Dicer 进一步加工成为成熟的 miRNA<sup>[5-7]</sup>。在动物、植物及微生物中,miRNA 广泛存在且序列组成非常保守<sup>[8,9]</sup>。目前已发现,miRNA 在细胞增殖、分化、凋亡及个体发育等多种

生物学过程中发挥重要作用<sup>[10]</sup>,miRNA 调控异常会导致多种疾病和癌症的发生<sup>[11-13]</sup>。

许多 miRNA 基因常紧密相邻形成 miRNA 基因簇。miRNA 基因簇通常由一个启动子调控,以多顺反子的形式被共转录,进而加工产生多个成熟的 miRNA<sup>[14]</sup>,且这些 miRNA 往往在功能上相关<sup>[15,16]</sup>,它们或具有相同的靶基因或作用于相同的信号通路<sup>[17]</sup>。miR-17-92 基因簇是一个被广泛研究且在脊椎动物中高度保守的 miRNA 基因簇<sup>[18]</sup>,该基因簇具有 6 个串联排列的 miRNA 前体,可编码 miR-17、miR-18a、miR-20a、miR-19a、miR-19b、miR-92 等至少 6 个成熟的 miRNA<sup>[19]</sup>。人 miR-17-92 基因簇定位于染色

体 13q31.3 上, 位于其宿主基因 MIR17HG(又称 C13orf25 或 MIRHG1)的第 3 内含子<sup>[20]</sup>, 其 DNA 长度为 787 bp。研究证实, miR-17-92 基因簇功能多样, 参与哺乳动物 B 细胞发育、肺祖细胞增殖分化、脂肪细胞分化、骨髓细胞分化、血管发生、心脏再生修复等多种生长发育过程并发挥重要作用<sup>[21~24]</sup>。此外, 还发现 miR-17-92 基因簇在肺癌、B 细胞淋巴瘤等多种肿瘤细胞中高表达, 能促进癌细胞增殖, 抑制癌细胞凋亡<sup>[25~29]</sup>。miR-17-92 基因簇是第一个被认定的非编码癌基因(oncomir-1)。研究发现, 过表达 miR-17-92 基因簇可促进前列腺癌细胞的增殖和迁移、促进淋巴瘤细胞增殖、导致肺癌及胆管癌的发生等<sup>[30~33]</sup>, 敲除 miR-17-92 基因簇会导致小鼠出生死亡并伴有心脏和肺脏发育缺陷<sup>[34]</sup>, 敲除 miR-17-92 基因簇还会抑制胃癌细胞的增殖<sup>[35,36]</sup>, 在成年小鼠的睾丸中特异性敲除 miR-17-92 基因簇会导致睾丸的严重萎缩及精子生成抑制等<sup>[37]</sup>。

鉴于 miR-17-92 基因簇在哺乳动物生长发育和癌症发生中的重要作用, miR-17-92 基因簇的转录调控受到人们持续的关注。对哺乳动物的研究发现, miR-17-92 基因簇宿主基因 MIR17HG 的启动子保守性较高, 启动子区有多个保守的转录因子结合位点<sup>[38]</sup>。研究证实, 转录因子 c-Myc、N-Myc、E2F1、E2F2、E2F3、STAT3、Spi-1、Fli-3、Pim-1、cyclin D1、MXI1、AML1、ETS1、ETS2 和 NKX3.1 等能激活 miR-17-92 基因簇的表达, 而 p53、C/EBP $\beta$  和 HIF-1 $\alpha$  抑制 miR-17-92 基因簇表达<sup>[39~52]</sup>。miR-17-92 基因簇除了受到宿主基因启动子的调控外, 人 miR-17-92 基因簇宿主基因启动子下游 1.5 kb 处的 A/T 富集区也能促进该基因簇的表达<sup>[45]</sup>。

鸡(*Gallus gallus*)的 miR-17-92 基因簇在细胞增殖、分化、凋亡及生长发育过程中也发挥着十分重要的作用<sup>[17, 53~56]</sup>。研究发现, miR-17-92 基因簇能促进鸡前脂肪细胞增殖和脂肪细胞分化<sup>[57,58]</sup>。尽管哺乳动物 miR-17-92 基因簇的转录调控已有很深入的研究, 但有关鸡 miR-17-92 基因簇的转录调控研究尚未见报道。查询 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获知, 鸡、火鸡(*Meleagris gallopavo*)、中地雀(*Geospiza fortis*)、斑胸草雀(*Poephila guttata*)和虎皮鹦鹉(*Melopsittacus undulatus*)等鸟类都已进行全基因组

测序, 但这些鸟类 miR-17-92 基因簇的上游都存在一个 gap, 该基因簇启动子的位置和序列以及它的宿主基因的结构还不清楚。鸡 miR-17-92 基因簇位于 1 号染色体, 其上游 1.4 kb 处存在一段长度约为 2 kb 的 gap(chr.1 147257200-147255334)。为开展鸡 miR-17-92 基因簇的转录调控研究, 本研究选用染色体步移的方法克隆了鸡 miR-17-92 基因簇上游的 gap 区, 经序列分析和实验研究证实 miR-17-92 基因簇的启动子区位于该 gap 区。本研究结果为揭示鸡 miR-17-92 基因簇的转录调控机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

克隆载体 pEASY-Blunt Zero、pEASY-T1 Simple 及菌株 Top10 均购自全式金公司(北京); 限制性内切酶 *Kpn* I、*Sma* I 和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司(美国); 模板锁定染色体步移试剂盒购自庄盟公司(北京); DNA 纯化回收试剂盒、质粒小量制备试剂盒购自 Axygen 公司(杭州); DMEM/F12 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司(美国); 荧光素酶报告基因检测试剂盒(Dual-Luciferase® Reporter Assay System)、荧光素酶报告基因载体(pGL3-basic)、海肾荧光素酶报告基因载体(pRL-TK)购自 Promega 公司(美国); 转染试剂 Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司(美国); 鸡胚成纤维细胞系(DF1)购自上海生命科学研究院细胞资源中心; 鸡基因组为本实验室保存 AA 肉仔鸡基因组 DNA。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 染色体步移

为获得鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区的序列信息, 利用庄盟公司(北京)生产的模板锁定染色体步移试剂盒, 根据鸡 miR-17-92 基因簇与 gap 区之间的已知序列设计 3 条同向引物 SP1、SP2、SP4(分别与 gap 相距 830 bp、781 bp 和 427 bp)(表 1), 分别与试剂盒中的兼并引物进行热不对称 PCR 反应。反应体系和条件根据说明书来操作。以 AA 肉鸡基因组 DNA 作为模板进行第一轮 PCR(50  $\mu$ L 体系模板基因组用量 200 ng), 共 9 个反应, 引物分别为 SP1 和试剂盒中的兼并引物 ZFP1~ZFP9, 实验特异性反

表 1 本研究所使用的引物  
Table 1 Primers used in this study

引物	序列 (5'→3')	片段大小(bp)
SP1	GGTTCCTCTCATTGGGTTTAGATGGG	3281
SP2	CCAGTAATGGCTGTAAGTTACCCAAGC	3232
SP4	GCTGCTAAACATGCCTGCAATCCT	2878
cMIR17HG(−4228/−2506)	F: GGGTACCCAGTGGGAAAAGAGCTCGGTTGT R: CCCCGGGGAAGGGAGGGGAGAAAAGGGGGCG	1722
cMIR17HG(−3780/−2506)	F: GGGTACCCAAGGAAACTTCAGTCTAAAAAT R: CCCCGGGGAAGGGAGGGGAGAAAAGGGGGCG	1274
cMIR17HG(−4228/−3400)	F: GGGTACCCAGTGGGAAAAGAGCTCGGTTGT R: CCCCGGGGCTTGTCCGAGCGGGAATCGCTG	828
cMIR17HG(−3400/−4228)	F: CCCCGGGGCTTGTCCGAGCGGGAATCGCTG R: GGGTACCCAGTGGGAAAAGAGCTCGGTTGT	828

应的复性温度为 62℃，延伸时间 2 min。第一轮反应的 PCR 产物直接作为第二轮 PCR 反应的模板，进行第二轮 PCR，引物为 SP2 和试剂盒中的随机引物 ZSP1。第二轮反应的 PCR 产物稀释 50 倍后作为第三轮 PCR 反应的模板，进行第三轮 PCR，引物为 SP4 和试剂盒中的随机引物 ZSP2。分别取三轮 PCR 反应液，使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，选择清晰的电泳条带，进行胶回收纯化，并分别克隆到 pEASY-Blunt Zero 克隆载体上，由上海英骏生物公司进行测序。

1.2.2 生物信息学分析

利用 DNAMAN 和 ClustalW2.0(<http://www.ebi.ac.uk/>)对鸡、人(*Homo sapiens*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、牛(*Bos taurus*)、猪(*Sus scrofa*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)、负鼠(*Possum*)、青蛙(*Rana nigromaculata*)和斑马鱼(*Danio rerio*)等 10 种动物的 miR-17-92 基因簇上游序列进行比对分析。采用 Mulan(<http://mulan.dcode.org/>)预测鸡 miR-17-92 基因簇上游启动子区转录因子结合位点；采用 GENSCAN(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 和 GPMiner(<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) 等软件分析 gap 区的 GC 含量及 CpG 岛。

1.2.3 启动子报告基因载体的构建

根据染色体步移分析获得鸡 miR-17-92 基因簇上游序列，分别设计 PCR 扩增引物，用于构建启动子报告基因载体及 5'端和 3'端截短突变体的启动子报告基因载体，上、下游引物的 5'端分别加入酶切

位点 *Kpn* I 和 *Sma* I (引物信息见表 1)。以 AA 肉鸡基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增产物克隆到 pEASY-T1 Simple 克隆载体上。测序无误后，经双酶切及胶纯化回收，分别插入 pGL3 basic 荧光素酶报告基因载体上，分别获得报告基因载体质粒 pGL3-cMIR17HG(−4228/−2506)、pGL3-cMIR17HG(−3780/−2506)、pGL3-cMIR17HG(−4228/−3400)和 pGL3-cMIR17HG(−3400/−4228)。pGL3-cMIR17HG(−4228/−3400)和 pGL3-cMIR17HG(−3400/−4228)所插入的启动子片段相同，但方向相反。

1.2.4 鸡胚成纤维细胞系(DF1)的培养与报告基因活性检测

将鸡胚成纤维细胞系(DF1)细胞培养于 DMEM/F12 全培养基(含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)中，并将其置于温度 37℃、CO<sub>2</sub> 浓度 5%、相对湿度 90%的细胞培养箱中。细胞汇合度 100%时，用 0.25%胰酶消化液消化，并将细胞传代接种至 12 孔板(2.5×10<sup>5</sup> 个/孔)中，待细胞汇合度达到 80%时，分别取 1000 ng 的启动子荧光素酶报告载体 pGL3-cMIR17HG(−4228/−2506)、pGL3-cMIR17HG(−3780/−2506)、pGL3-cMIR17HG(−4228/−3400)和 pGL3-cMIR17HG(−3400/−4228)以及空报告基因载体 pGL3 basic 与 50 ng 的 pRL-TK 质粒混合，共转染 DF1 细胞。转染使用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染试剂，转染后的细胞培养于 Opti-MEMI 培养基中，5~6 h 后换为正常生长培养基。转染 48 h 后，收集细胞裂解液，并按 Promega 公司双

荧光素酶检测试剂盒说明书操作, 分别测定各组的海肾(内参)和萤火虫荧光素酶活性。

### 1.2.5 数据分析

所有实验数据均为 3 次独立重复实验结果, 运用 SAS9.2 软件(SAS Institute Inc.) 分析实验数据, 数据结果表示为  $\bar{x} \pm SD$ , \* $P < 0.05$  为差异显著, \*\* $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡 miR-17-92 基因簇上游基因组 gap 区的染色体步移分析

鸡 miR-17-92 基因簇上游的基因组序列存在 gap 区, 根据此 gap 区与鸡 miR-17-92 基因簇间的已知序列, 设计特异性引物 SP1、SP2 及 SP4, 分别与兼并引物 ZFP1~ZFP9、ZSP1、ZSP2 进行三轮 PCR 扩增, 扩增产物进行琼脂糖凝胶进行电泳分析。在 9 组实验中, 第 1、4、5、7、8、9 组的三轮 PCR 均无明显清晰条带; 而第 2 和第 3 组的第三轮 PCR 及第 6 组的第二轮 PCR 有清晰的条带(图 1A)。将这些清晰条带分别切胶回收, 克隆到 pEASY-Blunt Zero 克隆载体上并测序分析, 结果发现, 第 6 组第二轮 PCR 产物的序列长度为 3.3 kb, DNAMAN 序列比对分析发现, 该片段两端的序列恰好与鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区上下游的已知序列一致, 两端各有约 0.7 kb 的序列重叠(图 1B), 说明第 6 组第二轮 PCR 产物的序列为该 gap 区序列, 剔除两端已知重叠序列, 最终确定此 gap 区序列全长为 1704 bp, 序列已提交 GenBank(登录号: KU745420)。而对第 2 和第 3 组第三轮 PCR 产物测序结果的分析发现, 这两个片段位于鸡 3 号染色体和 5 号染色体, 与鸡 miR-17-92 基因簇的上游和下游序列均没有重叠。

利用 GENSCAN(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)分析获取的鸡 miR-17-92 基因簇上游 1704 bp 的 gap 区序列, 结果发现, 该区序列 GC 含量达 80.11%, 且存在大量重复序列。利用 GPMIner(<http://gpmminer.mbc.nctu.edu.tw/index.php>)分析鸡 miR-17-92 基因簇上游 4 kb 序列, 结果发现, 该基因簇上游存在一个 CpG 岛, 位于其上游-3494/-1170, 全长

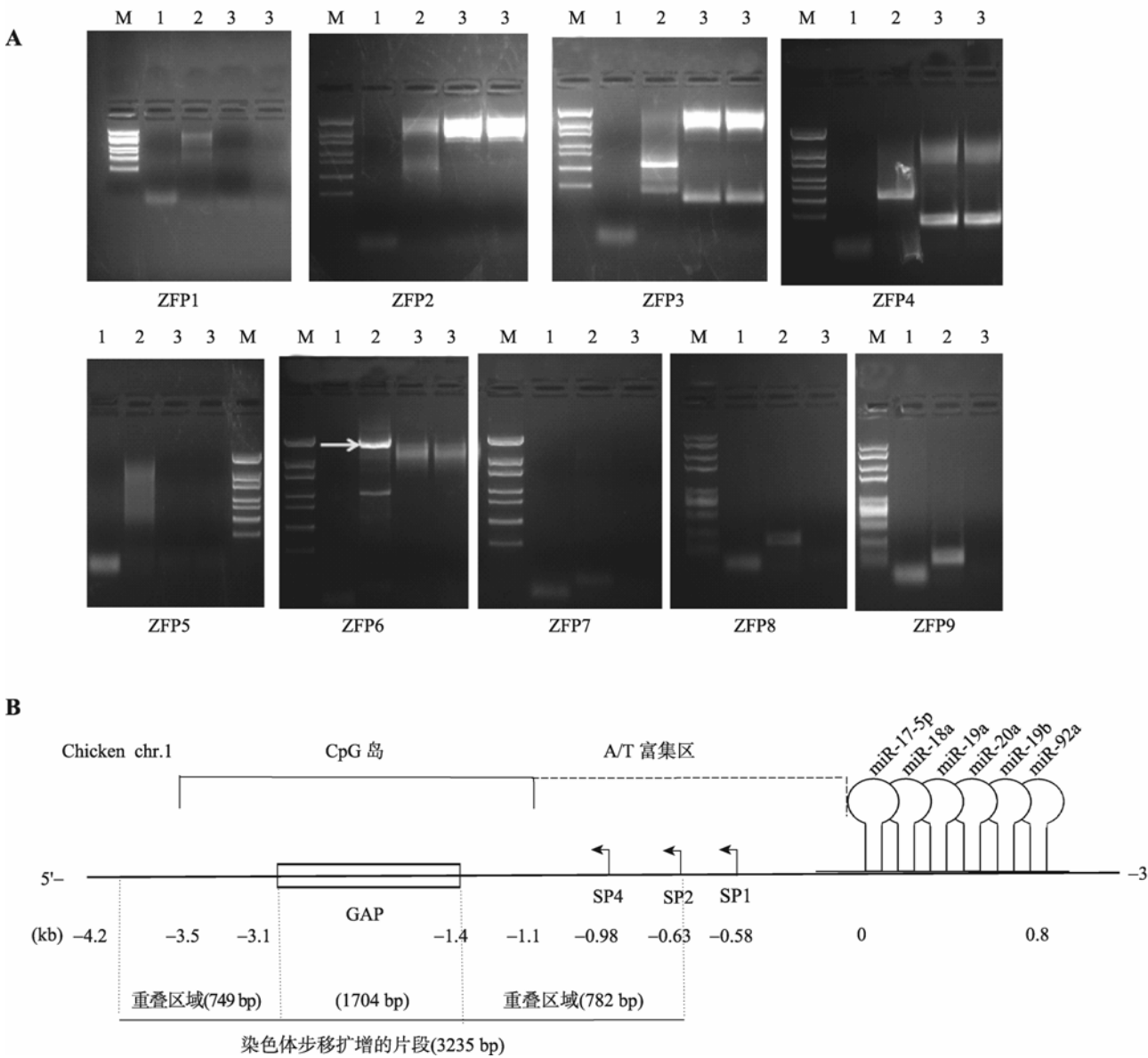
2324 bp, 整个 CpG 岛的 GC 含量为 77.62%, 另外, 还发现鸡 miR-17-92 基因簇上游存在一个 AT 富集区, 位于 chr.1:147253933-147255083, 全长 1150 bp, 其 AT 含量为 62.48%(图 1B)。

### 2.2 鸡 miR-17-92 基因簇上游序列的同源性分析

从 UCSC Genome Browser(<http://genome.ucsc.edu/>)获取鸡、人、黑猩猩、牛、猪、大鼠、小鼠、负鼠、斑马鱼和青蛙等 10 种动物 miR-17-92 基因簇上游 4 kb 的基因组序列, 其中, 鸡的 4 kb 序列中包含本研究获得的鸡 miR-17-92 基因簇上游 1704 bp 的 gap 区序列。利用 DNAMAN 对这 10 种动物 miR-17-92 基因簇上游 4 kb 序列进行比对分析。分析发现, 鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区的序列中有一段约 200 bp 的序列与其他 9 种动物 miR-17-92 基因簇上游序列高度保守, 而该区域恰好是人和小鼠等哺乳动物 miR-17-92 基因簇宿主基因 MIR17HG 的核心启动子区。利用 Mulan 软件(<http://mulan.dcode.org/>)进一步分析上述 200 bp 保守区序列。结果发现, 这个保守区内具有保守的 TATA box 和起始子(initiator), 另外, 还包含许多保守性较高的转录因子的结合位点, 如 SP1、NFY、LEF1、Myc、OCT1 和 ETS1 等(图 2)。进一步利用 ClustalW2.0(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对上述 10 种动物这 200 bp 序列进行比对分析。结果发现, 不同物种间该区域 DNA 序列的相似度仍比较高, 哺乳动物间的相似度均大于 81.7%, 其中, 人与黑猩猩的相似度为 100%, 人与牛、猪、大鼠和小鼠的相似度在 90.0%~97.4%之间; 鸡与人和黑猩猩的相似度为 77%, 而鸡与牛、猪、大鼠、小鼠及负鼠的相似度在 74.1%~76.6%之间, 与斑马鱼的相似度为 67.4%。

利用 Mulan 软件分析鸡和人 miR-17-92 基因簇及其上游 4 kb 基因组序列的相似度, 结果显示鸡与人有两段相似度较高的区域(图 3), 一段位于该基因簇序列所在区域, 鸡与人该区域序列相似度超过 70%, 部分区域相似度接近 100%(miR-18a 附近)。另一段位于鸡 miR-17-92 基因簇上游的 gap 区(鸡 miR-17-5p 上游 2.9 kb-3.2 kb), 这段序列恰是人 MIR17HG 核心启动子区及第一外显子和部分第一内含子序列区, 其中该 gap 区 5'端的 200 bp 序列与

人的序列相似度最高, 这与先前 DNAMAN 分析发现的 10 个物种 miR-17-92 基因簇上游的高度保守区相一致。这些数据提示, 鸡 miR-17-92 基因簇启动子区位于本实验中所补全的 gap 区。



**图 1 鸡 miR-17-92 基因簇的基因组结构及其上游 gap 区染色体步移分析**  
**Fig. 1 The schematic genomic structure of chicken miR-17-92 cluster and the genome walking analysis of the genomic gap**  
A : 鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区的染色体步移分析。M 表示 DNA marker(4 kb) ;1 表示第一轮 PCR 产物 ;2 表示第二轮 PCR 产物 ;3 表示第三轮 PCR 产物 ;ZFP1~ZFP9 表示在第一轮 PCR 反应中所选择的兼并引物分别为试剂盒中的引物 ZFP1~ZFP9, 将 ZFP1 规定为第 1 组, ZFP2 规定为第 2 组, 以此类推 ; 其中第 6 组第二轮测序结果为 1 号染色体 miR-17-92 基因簇上游序列, 图中箭头标出。  
B : 鸡 miR-17-92 基因簇基因组结构及染色体步移所获片段的序列分析。鸡 miR-17-92 基因簇位于一号染色体, 其上游有一个 CpG 岛和一个 AT 富集区, 其中 CpG 岛(GC 含量 77.62%)位于 miR-17-5p 编码区上游 1.1 kb~3.5 kb, AT 富集区(AT 含量 62.48%)位于 CpG 岛的下游。SP1、SP2、SP4 为染色体步移所用特异性引物的位置。图中 0 点是成熟 miR-17-5p 在基因组上的第一个核苷酸(147253923)。第 6 组第二轮 PCR 产物序列与鸡 miR-17-92 基因簇上游基因组序列的比对结果, 克隆序列全长 3235 bp, 该序列分别与鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区的两端已知基因组序列重叠, 重叠部分的位置分别为 chr.1 :147257201-147257949 和 chr.1 :147254553-147255334 , 其中与 gap 区上游重叠 749 bp, 与 gap 区下游重叠 782 bp。去掉两端的重叠区序列, 得知 gap 区全长 1704 bp。



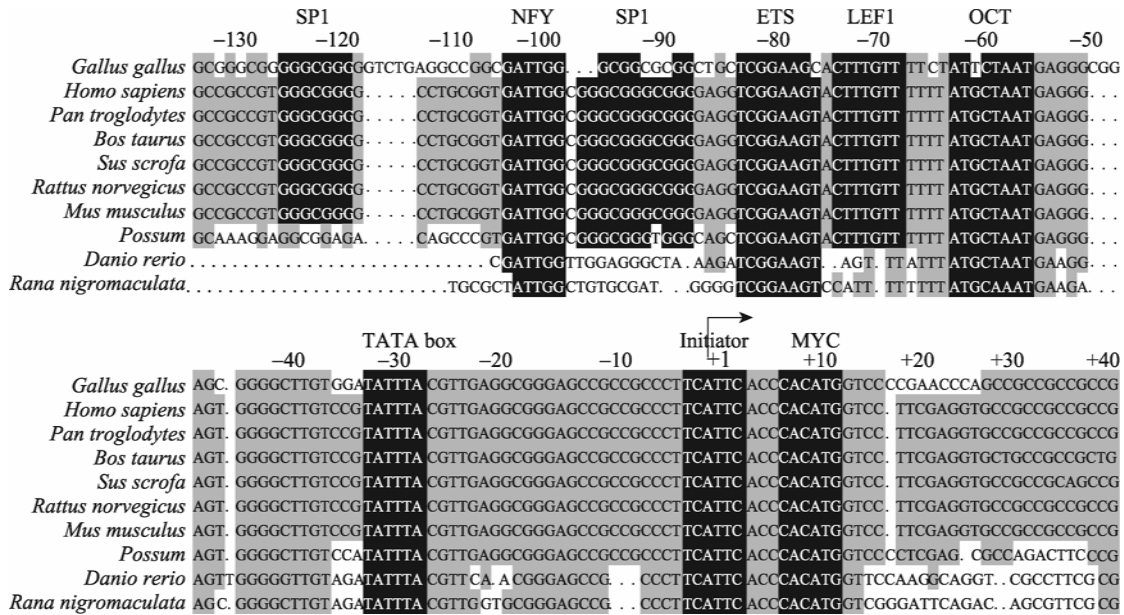


图 2 miR-17-92 基因簇上游启动子区的保守性分析

Fig. 2 Conservation analysis of the sequences upstream of miR-17-92 cluster in various animals

用 DNAMAN 软件分析 10 种动物 miR-17-92 基因簇上游 4 kb 的序列, 图中动物自上而下依次为鸡、人、黑猩猩、牛、猪、大鼠、小鼠、负鼠、斑马鱼和青蛙。序列数据来自 UCSC Genome Browser(<http://genome.ucsc.edu/>)数据库, 其中, 鸡的序列包含本研究扩增获得的 gap 区序列。DNAMAN 分析显示, miR-17-92 基因簇上游有一段约 200 bp 的高度保守序列; 木兰分析显示, miR-17-92 基因簇上游这 200 bp 的高度保守序列区域存在 TATA box、起始子(Initiator)以及多个保守的转录因子结合位点, 该保守序列位于鸡 miR-17-92 基因簇上游 3006 bp 处。图中以人的 MIR17HG 起始子标记为+1, 该保守区域位于-130/+40。



图 3 鸡和人 miR-17-92 基因簇基因组序列的保守性分析

Fig. 3 Conservation analysis of the genomic sequences of miR-17-92 cluster between chicken and human

用 Mulan 软件(<http://mulan.dcode.org/>)分析与鸡 miR-17-92 基因簇上游 4 kb 序列的保守性, 鸡 miR-17-92 基因簇上游 4 kb 序列包括本研究所获得的 gap 区序列。图中红色部分代表序列相似区域, 比对参数设定为最低有效序列相似度为 50%, 最短有效序列相似长度为 100 bp。图中标出了人 MIR17HG 基因的启动子区及外显子 1~3, 人 MIR17HG 基因的第 4 外显子位于 miR-17-92 基因簇下游 2.57 kb 处, 其序列与鸡的序列无相似区域, 未在图中标出。图中黄色线段代表鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区和 miR-17-92 基因簇所在区域。

### 2.3 鸡 miR-17-92 基因簇启动子区域的鉴定和分析

生物信息学分析提示, 鸡 miR-17-92 基因簇宿主基因的启动子区位于本实验所补齐的 gap 区内。为了验证这一结果, 本文克隆了鸡 miR-17-92 基因簇上游的 gap 区, 构建启动子报告基因载体 pGL3-cMIR17HG(-4228/-2506), 同时对这个 gap 区序列分别做两个突变体, 一个是 5'端截短突变(5'端

缺失了 448 bp), 另一个是 3'端的截短突变(3'端缺失了 894 bp), 并构建相应的 5'端截短突变体报告基因载体 pGL3-cMIR17HG(-3780/-2506)和 3'端截短突变体报告基因载体 pGL3-cMIR17HG(-4228/-3400) (图 4A)。除此之外, 还构建了 3'端截短突变体的反向插入报告基因载体 pGL3-cMIR17HG(-4228/-3400), 用作启动子的阴性对照。将这些报告基因载体分别

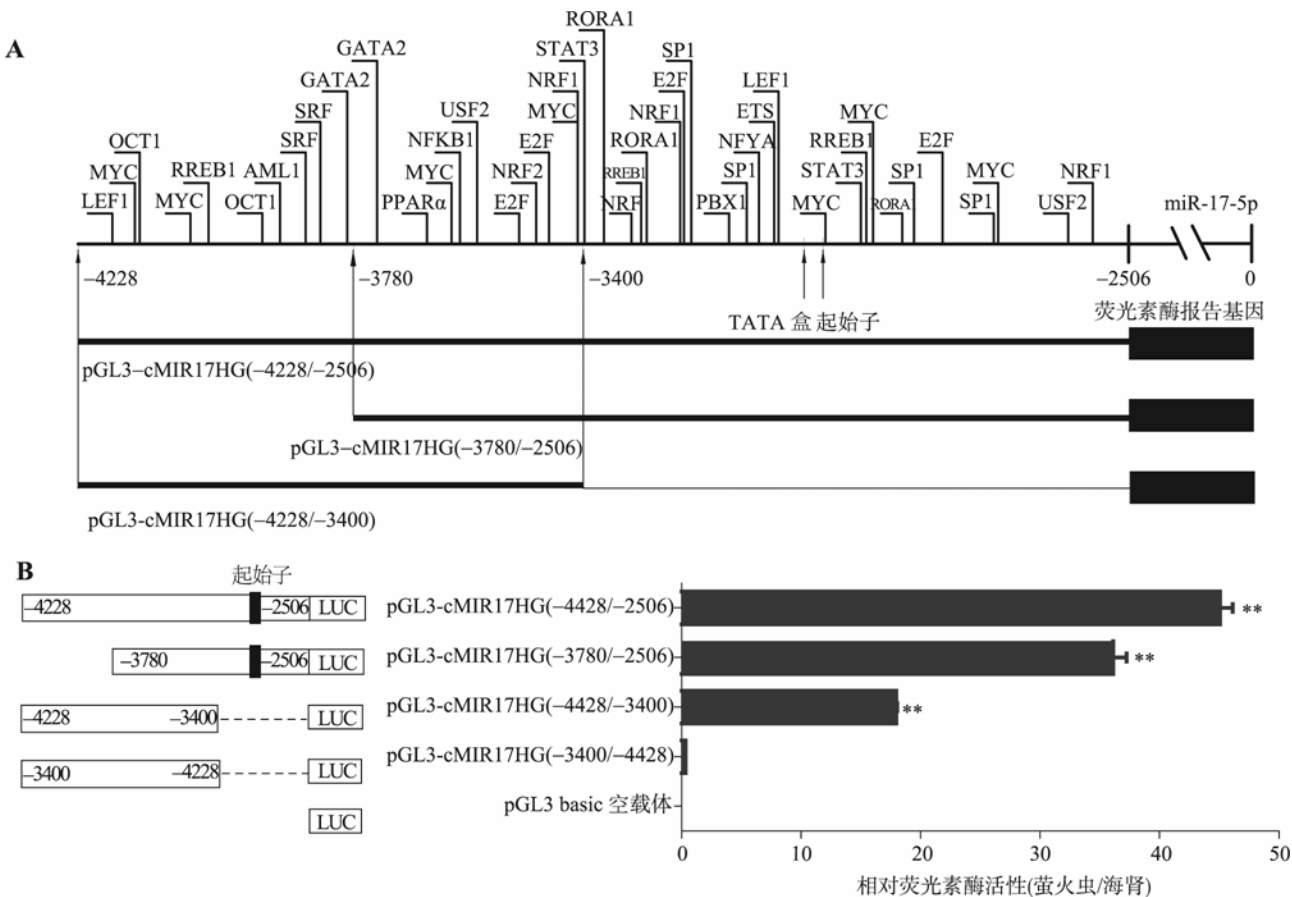


图 4 鸡 miR-17-92 基因簇启动子报告基因的活性分析

**Fig. 4 The promoter activity analysis of chicken miR-17-92 cluster**

A: 鸡 miR-17-92 基因簇上游转录因子结合位点预测分析。B: 左侧为启动子结构模式图(-4228/-2506、-3780/-2506、-4228/-3400、-3400/-4228), 以 miR-17-5p 在基因组 DNA 序列上的位置为 0 点; 右侧为启动子报告基因活性分析结果, 启动子报告基因活性以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值来表示, 数据结果表示为  $\bar{x} \pm SD$ , 各结果均与空载体结果进行比较,  $**P < 0.01$  为差异极显著。

转染鸡 DF1 细胞, 48 h 后, 检测报告基因活性。报告基因活性检测结果显示, 与对照空白报告基因载体 pGL3 basic 相比, 全长片段报告基因载体和 5'端及 3'端截短突变体报告基因载体的活性均极显著地高于对照空白载体( $P < 0.01$ )(图 4B), 其中, 全长片段的报告基因载体 pGL3-cMIR17HG(-4228/-2506)的活性是空白报告基因载体 pGL3 basic 的 417 倍, 说明该片段是鸡 miR-17-92 基因簇宿主基因的启动子。与全长片段的报告基因载体相比, 5'端截短突变体报告基因载体 pGL3-cMIR17HG(-3780/-2506)和 3'端截短突变体报告基因载体 pGL3-cMIR17HG (-4228/-3400)的活性均下降, 分别下降 19.82%和 60.14%。与预期相一致, 3'端截短突变体反向插入的启动子报

告基因载体 pGL3-cMIR17HG(-4228/-3400)启动子几乎没有活性, 与阴性对照(空白报告基因载体 pGL3 basic)相比没有显著差异(图 4B)。这些数据提示, 鸡 miR-17-92 基因簇上游启动子的重要功能区可能位于-3400/-2506 区。

3 讨论

本研究成功补全了鸡 miR-17-92 基因簇上游全部 gap 区序列, 并证实该 gap 区内存在鸡 miR-17-92 基因簇的启动子。本研究为进一步揭示鸡及其他鸟类 miR-17-92 基因簇的转录调控机制奠定了坚实的基础。虽然早在 2004 年人类就已完成鸡的全基因组测序<sup>[59]</sup>并多次更新, 但鸡基因组序列仍存在一些 gap。



鸡 miR-17-92 基因簇上游就存在一个 gap 区,但一直没有研究将其序列信息测出。目前已完成全基因组测序的其他鸟类(如虎皮鹦鹉、斑胸草雀、火鸡等)在该区域也都存在 gap。本研究首次获得鸡 miR-17-92 基因簇上游 gap 区序列(GenBank 登录号: KU745420)。序列分析发现,该 gap 区 GC 含量很高(80.11%),并存在大量重复序列,这可能就是鸡和其他鸟类一直未能测出 miR-17-92 基因簇上游 gap 区序列的重要原因之一。

染色体步移是一种重要的分子生物学研究技术,利用此技术可以从基因组中已知序列出发逐步探知其旁邻的未知序列<sup>[60]</sup>,常被用于染色体测序工作中的空隙填补,以获取完整的基因组序列以及人、动物和植物的重要调控基因,此技术也用于鉴定 T-DNA 或转座子的插入位点及人工染色体 PAC、YAC 和 BAC 的片段搭接等<sup>[61]</sup>。染色体步移通常是已知基因组 DNA 序列设计 3 条同向且复性温度较高的特异性引物,与试剂盒中低复性温度的兼并引物之间利用复性温度的差异进行热不对称 PCR 反应,理论上应对第三轮 PCR 产物进行回收测序以保证结果的正确率。本研究的染色体步移分析发现,第 6 组第二轮有两个清晰的 PCR 产物条带(图 1),其中,第一个 PCR 产物条带(约 4 kb)的清晰度高于第三轮 PCR 产物条带,且与理论预期一致,其第三轮的 PCR 产物比第二轮 PCR 产物略小;而第二个 PCR 产物带(约 750 bp)在第三轮没有出现比该扩增产物小的片段,所以本研究选择第一个 PCR 产物条带进行回收及克隆测序,并获得理想的结果。

鸡 miR-17-92 基因簇上游启动子区报告基因分析发现,3'端截短突变体启动子 pGL3-cMIR17HG (-4228/-3400)报告基因的活性极显著地低于全长片段的启动子报告基因载体 pGL3-cMIR17HG (-4228/-2506)的活性,报告基因活性下降 60.14%(图 4B),提示鸡 miR-17-92 基因簇启动子的重要功能区位于鸡 miR-17-92 基因簇上游-3400/-2506,该区域包括鸡和人与小鼠等哺乳动物 miR-17-92 基因簇宿主基因最保守的启动子区域,该区域拥有 TATA box、起始子(initiator)以及 Myc、ETS、SP1、LEF1、NFYA 等许多保守的转录因子结合位点(图 2)。鸡 miR-17-92 基因簇上游-4228/-3400 序列与其他动物

的保守性虽然不高,但 pGL3-cMIR17HG(-4228/-3400)仍然具体启动子活性(图 4B)。提示-4228/-3400 这段区域存在一些鸡所特有的转录因子结合位点。转录因子结合位点分析发现,该区域存在 Myc、AML1、OCT1、GATA2、LEF1、RREB1、SRF 等转录因子的结合位点,未来有必要验证这些转录因子是否调控鸡 miR-17-92 基因簇的转录。

miR-17-92 基因簇在动物生长发育和癌症发生中发挥重要作用<sup>[62]</sup>,揭示其转录调控机制对于了解动物生长发育和癌症发生的分子机制具有重要意义。在哺乳动物中,miR-17-92 基因簇的转录调控除了受其宿主基因 MIR17HG 启动子的控制,研究已证实人 miR-17-92 基因簇上游 A/T 富集区也能调控该基因簇的表达<sup>[45,63,64]</sup>。在鸡 miR-17-92 基因簇上游同样存在 A/T 富集区,A/T 含量为 62.48%(人为 64%),该区的序列与人 A/T 富集区序列相比,相似度不高(34%),该区域是否调控鸡 miR-17-92 基因簇的转录仍有待进一步研究。在人 miR-17-92 基因簇上游的 CpG 岛与 A/T 富集区之间存在一个非常重要的 c-Myc 的结合位点 E-box(E3),位于人 miR-17-92 基因簇上游 1.5 kb 处<sup>[9,38,39]</sup>。与人相似,鸡 miR-17-92 基因簇上游也有一个 A/T 富集区以及一个 CpG 岛(GC 含量为 77.62%,而人的为 78%),但在鸡 miR-17-92 基因簇上游 CpG 岛与 A/T 富集区之间并未找到相应的 c-Myc 结合位点 E-box,提示鸡与人 miR-17-92 基因簇的转录调控可能不完全相同。

本研究利用 GENSCAN(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)对鸡 miR-17-92 基因簇宿主基因的结构进行预测,发现鸡 MIR17HG 也有 4 个潜在的外显子,除第一外显子外,其他外显子的序列与哺乳动物的相比相似性不高。虽然 miR-17-92 基因簇其本身的序列在不同物种间高度保守,然而,其宿主基因 MIR17HG 的外显子序列保守性很低,提示 MIR17HG 基因存在的主要意义可能就是编码 miR-17-92 基因簇。

尽管本研究经测序获得了鸡 miR-17-92 基因簇上游全部 gap 区序列,并用实验证实该 gap 区内存在鸡 miR-17-92 基因簇宿主基因的启动子,但目前尚未开展鸡 miR-17-92 基因簇特定重要转录因子的转录调控研究。今后我们将采用基因突变、EMSA

以及 ChIP 等技术,重点开展在特定重要生物学过程中 miR-17-92 基因簇的转录调控机制的研究。

### 参考文献(References):

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431(7006): 350–355. [DOI]
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297. [DOI]
- [3] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522–531. [DOI]
- [4] Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*, 2005, 309(5740): 1519–1524. [DOI]
- [5] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 597–610. [DOI]
- [6] Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 2004, 432(7014): 231–235. [DOI]
- [7] Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 2003, 17(24): 3011–3016. [DOI]
- [8] Du TT, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 2005, 132(21): 4645–4652. [DOI]
- [9] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233. [DOI]
- [10] Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(4): 252–263. [DOI]
- [11] He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, 435(7043): 828–833. [DOI]
- [12] Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJM, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 2006, 124(6): 1169–1181. [DOI]
- [13] Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Homer R, Brown D, Bader AG, Weidhaas JB, Slack FJ. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene*, 2010, 29(11): 1580–1587. [DOI]
- [14] Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4663–4670. [DOI]
- [15] Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, Hur K, Yoo MW, Lee HJ, Yang HK, Kim VN. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(5): 1672–1681. [DOI]
- [16] Yuan XY, Liu CN, Yang PC, He SM, Liao Q, Kang SL, Zhao Y. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol*, 2009, 3: 65. [DOI]
- [17] Yan XH, Wang ZP, Wang N. Characterization of the structure, function and regulation of the chicken mir-17-92 cluster. *Zoolog Res*, 2012, 33(5): 455–462. 闫晓红, 王志鹏, 王宁. 鸡 mir-17-92 基因簇的结构、功能及其调控. *动物学研究*, 2012, 33(5): 455–462. [DOI]
- [18] Concepcion CP, Bonetti C, Ventura A. The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J*, 2012, 18(3): 262–267. [DOI]
- [19] Wang Q, Li YC, Wang JH, Kong J, Qi YC, Quigg RJ, Li XM. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2889–2894. [DOI]
- [20] Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*, 2004, 64(9): 3087–3095. [DOI]
- [21] Lu Y, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Dev Biol*, 2007, 310(2): 442–453. [DOI]
- [22] Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*, 2009, 324(5935): 1710–1713. [DOI]
- [23] Chen JH, Huang ZP, Seok HY, Ding J, Kataoka M, Zhang Z, Hu XY, Wang G, Lin ZQ, Wang S, Pu WT, Liao R, Wang DZ. mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res*, 2013, 112(12): 1557–1566. [DOI]
- [24] Alemdehy MF, Erkeland SJ. MicroRNAs: key players of normal and malignant myelopoiesis. *Curr Opin Hematol*, 2012, 19(4): 261–267. [DOI]
- [25] Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol*,

- 2010, 42(8): 1348–1354. [DOI]
- [26] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9628–9632. [DOI]
- [27] Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. Mir-17-5p lates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(21): 8191–8201. [DOI]
- [28] Chow TF, Mankaruos M, Scorilas A, Youssef Y, Girgis A, Mossad S, Metias S, Rafael Y, Honey RJ, Stewart R, Pace KT, Yousef GM. The miR-17-92 cluster is over expressed in and has an oncogenic effect on renal cell carcinoma. *J Urol*, 2010, 183(2): 743–751. [DOI]
- [29] Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Fujita H, Nakata K, Tanaka M. MicroRNA miR-17-5p is overexpressed in pancreatic cancer, associated with a poor prognosis, and involved in cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(8): 748–757. [DOI]
- [30] Zhou P, Ma L, Zhou J, Jiang M, Rao EY, Zhao Y, Guo F. miR-17-92 plays an oncogenic role and conveys chemo-resistance to cisplatin in human prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3392. [DOI]
- [31] Xiao CC, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang BC, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*, 2008, 9(4): 405–414. [DOI]
- [32] Zhu HQ, Han C, Wu T. MiR-17-92 cluster promotes hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2015, 36(10): 1213–1222. [DOI]
- [33] Zhu HQ, Han C, Lu DD, Wu T. miR-17-92 cluster promotes cholangiocarcinoma growth: evidence for PTEN as downstream target and IL-6/Stat3 as upstream activator. *Am J Pathol*, 2014, 184(10): 2828–2839. [DOI]
- [34] Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17-92 family of miRNA clusters. *Cell*, 2008, 132(5): 875–886. [DOI]
- [35] Wu Q, Luo GH, Yang ZP, Zhu F, An YX, Shi YQ, Fan DM. miR-17-5p promotes proliferation by targeting SOCS6 in gastric cancer cells. *FEBS Lett*, 2014, 588(12): 2055–2062. [DOI]
- [36] Park D, Lee SC, Park JW, Cho SY, Kim HK. Overexpression of miR-17 in gastric cancer is correlated with proliferation-associated oncogene amplification. *Pathol Int*, 2014, 64(7): 309–314. [DOI]
- [37] Xie RY, Lin XL, Du T, Xu K, Shen HF, Wei F, Hao WC, Lin TY, Lin X, Qin YJ, Wang HY, Chen L, Yang S, Yang J, Rong XX, Yao KT, Xiao D, Jia JS, Sun Y. Targeted disruption of miR-17-92 impairs mouse spermatogenesis by activating mTOR signaling pathway. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(7): e2713. [DOI]
- [38] Ji M, Rao EY, Ramachandradeddy H, Shen YL, Jiang CS, Chen JX, Hu YQ, Rizzino A, Chan WC, Fu K, Mckeithan TW. The miR-17-92 microRNA cluster is regulated by multiple mechanisms in B-cell malignancies. *Am J Pathol*, 2011, 179(4): 1645–1656. [DOI]
- [39] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 2005, 435(7043): 839–843. [DOI]
- [40] Grillari J, Hackl M, Grillari-Voglauer R. miR-17-92 cluster: ups and downs in cancer and aging. *Biogerontology*, 2010, 11(4): 501–506. [DOI]
- [41] Schulte JH, Horn S, Otto T, Samans B, Heukamp LC, Eilers UC, Krause M, Astrahantseff K, Klein-Hitpass L, Buettnner R, Schramm A, Christiansen H, Eilers M, Eggert A, Berwanger B. MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer*, 2008, 122(3): 699–704. [DOI]
- [42] Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*, 2007, 282(4): 2135–2143. [DOI]
- [43] Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*, 2007, 282(4): 2130–2134. [DOI]
- [44] Kayali S, Giraud G, Morle F, Guyot B. Spi-1, Fli-1 and Fli-3 (miR-17-92) oncogenes contribute to a single oncogenic network controlling cell proliferation in friend erythroleukemia. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46799. [DOI]
- [45] Thomas M, Lange-Grunweller K, Hartmann D, Golde L, Schlereth J, Streng D, Aigner A, Grunweller A, Hartmann RK. Analysis of transcriptional regulation of the human miR-17-92 cluster; evidence for involvement of Pim-1. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(6): 12273–12296. [DOI]
- [46] He M, Wang QY, Yin QQ, Tang J, Lu Y, Zhou CX, Duan CW, Hong DL, Tanaka T, Chen GQ, Zhao Q. HIF-1 $\alpha$  downregulates miR-17/20a directly targeting p21 and STAT3: a role in myeloid leukemic cell differentiation. *Cell Death Differ*, 2013, 20(3): 408–418. [DOI]
- [47] Yu ZR, Wang CG, Wang M, Li ZP, Casimiro MC, Liu MR,

- Wu KM, Whittle J, Ju XM, Hyslop T, McCue P, Pestell RG. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol*, 2008, 182(3): 509–517. [DOI]
- [48] Fontana L, Pelosi E, Greco P, Racanicchi S, Testa U, Liuzzi F, Croce CM, Brunetti E, Grignani F, Peschle C. MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(7): 775–787. [DOI]
- [49] Kabbout M, Dakhllallah D, Sharma S, Bronisz A, Srinivasan R, Piper M, Marsh CB, Ostrowski MC. MicroRNA 17-92 cluster mediates ETS1 and ETS2-dependent RAS-oncogenic transformation. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100693. [DOI]
- [50] Yan HL, Xue G, Mei Q, Wang YZ, Ding FX, Liu MF, Lu MH, Tang Y, Yu HY, Sun SH. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *EMBO J*, 2009, 28(18): 2719–2732. [DOI]
- [51] Kusy S, Gerby B, Goardon N, Gault N, Ferri F, Gerard D, Armstrong F, Ballerini P, Cayuela JM, Baruchel A, Pflumio F, Roméo PH. NKX3.1 is a direct TAL1 target gene that mediates proliferation of TAL1-expressing human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*, 2010, 207(10): 2141–2156. [DOI]
- [52] Yan Y, Hanse EA, Stedman K, Benson JM, Lowman XH, Subramanian S, Kelekar A. Transcription factor C/EBP- $\beta$  induces tumor-suppressor phosphatase PHLPP2 through repression of the miR-17-92 cluster in differentiating AML cells. *Cell Death Differ*, 2016, doi: 10.1038/cdd.2016.1. [DOI]
- [53] Kang L, Cui XX, Zhang YJ, Yang CH, Jiang YL. Identification of miRNAs associated with sexual maturity in chicken ovary by Illumina small RNA deep sequencing. *BMC Genomics*, 2013, 14: 352. [DOI]
- [54] Hicks JA, Trakooljul N, Liu HC. Discovery of chicken microRNAs associated with lipogenesis and cell proliferation. *Physiol Genomics*, 2010, 41(2): 185–193. [DOI]
- [55] Yao J, Wang YX, Wang WS, Wang N, Li H. Solexa sequencing analysis of chicken pre-adipocyte microRNAs. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(1): 54–61. [DOI]
- [56] Rathjen T, Pais H, Sweetman D, Moulton V, Munsterberg A, Dalmay T. High throughput sequencing of microRNAs in chicken somites. *FEBS Lett*, 2009, 583(9): 1422–1426. [DOI]
- [57] Wang N, Duan K, Song H, Zhang XF, Zhang TM, Zhang WJ, Yan XH, Wang SZ, Li H. Identification of *TP53INP1* as a targets gene of chicken miR-20a. *J Northeast Agric Univ*, 2015, 46(9): 69–74.  
王宁, 段逵, 宋鹤, 张潇飞, 张天目, 张文建, 闫晓红, 王守志, 李辉. 鸡 miR-20a 靶基因 *TP53INP1* 鉴定. 东北农业大学学报, 2015, 46(9): 69–74. [DOI]
- [58] Huang HY, Liu RR, Zhao GP, Li QH, Zheng MQ, Zhang JJ, Li SF, Liang Z, Wen J. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in abdominal adipose tissues in chickens. *Sci Rep*, 2015, 5: 16132. [DOI]
- [59] Dodgson JB. Chicken genome sequence: a centennial gift to poultry genetics. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 102(1–4): 291–296. [DOI]
- [60] Barski A, Jothi R, Cuddapah S, Cui KR, Roh TY, Schones DE, Zhao KJ. Chromatin poises miRNA- and protein-coding genes for expression. *Genome Res*, 2009, 19(10): 1742–1751. [DOI]
- [61] Rishi AS, Nelson ND, Goyal A. Genome walking of large fragments: an improved method. *J Biotechnol*, 2004, 111(1): 9–15. [DOI]
- [62] Zhang ZW, An Y, Teng CB. The roles of miR-17-92 cluster in mammal development and tumorigenesis. *Hereditas (Beijing)*, 2009, 31(11): 1094–1100.  
张振武, 安洋, 滕春波. miR-17-92 基因簇 microRNAs 对哺乳动物器官发育及肿瘤发生的调控. 遗传, 2009, 31(11): 1094–1100. [DOI]
- [63] Oszolak F, Poling LL, Wang ZX, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang XM, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*, 2008, 22(22): 3172–3183. [DOI]
- [64] Pospisil V, Vargova K, Kokavec J, Rybarova J, Savvulidi F, Jonasova A, Necas E, Zavadil J, Laslo P, Stopka T. Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU. 1-directed macrophage differentiation. *EMBO J*, 2011, 30(21): 4450–4464. [DOI]

(责任编辑: 赵要风)