

文章编号: 1674-5566(2016)04-0481-07

DOI:10.12024/jsou.20160101630

miR-210-5p 对南极独角雪冰鱼心脏发育的作用机制研究

郭亚南¹, 王丛丛^{1,2}, 刘云¹, 武晓会¹, 孙建飞¹, 陈程^{1,3}, 许强华^{1,2,3,4}

(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. 远洋渔业协同创新中心, 上海 201306; 4. 国家远洋渔业工程技术研究中心, 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 在心脏发育过程中起着重要的调控作用。南极冰鱼因体内缺乏功能性红细胞, 其心脏出现了补偿性增生。前期的研究提示, 独角雪冰鱼心脏中特异表达的 microRNAs 可能与冰鱼心脏的补偿性增生相关。本研究针对南极冰鱼心脏中高表达的 miR-210-5p, 运用斑马鱼显微注射、靶基因预测等手段研究了 miR-210-5p 对心脏发育的作用机制。结果表明: 斑马鱼胚胎注射 miR-210-5p 后, 出现心包膜水肿, 心脏发育畸形等现象。qRT-PCR 分析显示, 过表达 miR-210-5p 的斑马鱼胚胎中, 心脏发育相关的标志性基因 *bmp4*、*smad1*、*gata6* 以及 *tbx2b* 的表达水平下调。Western blotting 分析发现, *bmp/sm*ad 通路中的 BMP2、BMP4、SMAD1、GATA6 以及 TBX2B 的蛋白表达水平也显著下调。通过对 *tbx20* 基因 3'UTR 的靶基因生物信息学预测, 以及对其进行 GFP 荧光表达分析, 发现 *tbx20* 基因可能是 miR-210-5p 的一个靶基因。由此推测, miR-210-5p 可能通过抑制 *tbx20* 基因的表达, 并调控 *bmp/sm*ad 通路以抑制冰鱼心脏发育。

关键词: miR-210-5p; 心脏发育; *tbx20*; 南极冰鱼; *bmp/sm*ad 通路

中图分类号: Q 71, S 917 **文献标志码:** A

脊椎动物心脏发育受到许多基因的调控。目前研究较多的与心脏发育相关的基因包括 *bmp/sm*ad、*Wnt*、*FGF*、*Notch* 和视黄酸等通路^[1-4]。多个 *bmps* 家族成员被报道参与了初级阶段的心肌细胞发育与分化。*Bmp2* 可促进心脏祖系细胞的特异性分化^[5-9]; 而 *bmp4* 在小鼠心脏的房室分隔形成过程中起着很重要的作用^[10]。另外, 心脏的发育还涉及到多个锌指蛋白 GATA 家族成员的参与。*Gata6* 虽不能诱导 *bmp4* 的表达, 但能够维持 *bmp4* 的表达水平, 并且参与心肌组织内胚层和中胚层的形成^[11]。

microRNA (miRNA) 是一类长约 18 ~ 25 nt 的单链非编码小 RNA, 主要通过结合于靶基因的 3'非翻译区 (3' Untranslated Regions, 3' UTR), 抑制靶基因的翻译或导致 mRNA 降解, 从而抑制靶基因的表达^[12]。近年来, 小分子 RNA 参与心脏

发育相关基因的转录后调控时有报道。如: 研究发现 miR-1 通过钙调蛋白/NFAT 信号通路下调钙调蛋白信号负调控 *mef2a* 和 *gata4*, 进而抑制心肌细胞的增殖^[13]。

独角雪冰鱼 (*Chionodraco hamatus*, CH, 简称冰鱼) 是生活在南极深海零度以下无污染水域的底栖性鱼类。作为已知脊椎动物中唯一不含血红蛋白的类群, 冰鱼的血液循环系统发生了巨大的补偿性生理变化。与同等体重的常见含血红蛋白的南极鱼类相比, 冰鱼心脏约为其他南极鱼心脏的三倍以上, 血管明显变粗^[14]。南极冰鱼心脏是研究心脏增生发育的重要模型, 冰鱼心脏的发育与调控机制研究也是备受关注的科学问题。

前期研究中, 本实验室发现一些 microRNA 在冰鱼心脏与相同生境下其他南极鱼心脏中的表达差异显著, 其中的 miR-210-5p 表达量变化显

收稿日期: 2016-01-07 修回日期: 2016-03-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31572598); 浦江人才计划 (16PJ1404000); 国家自然科学基金重大研究计划培育项目 (91131006); 上海市教育发展基金会和上海市教育委员会曙光计划 (13SG51)

作者简介: 郭亚南 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源。E-mail: guoyanan19901118@163.com

通信作者: 许强华, E-mail: qhxu@shou.edu.cn

著。我们推测 miR-210-5p 很可能参与冰鱼心脏增生的调控。本研究针对独角雪冰鱼心脏中异常高表达的 miR-210-5p, 利用体内显微注射斑马鱼胚胎实验和转细胞实验, 首次研究得到了该 microRNA 在心脏发育中的功能及作用机制。本研究为揭示 miR-210-5p 在南极冰鱼体内心脏发育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 对心脏发育的作用机制与进化研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和样本采集

斑马鱼(AB 品系)饲养于上海海洋大学海洋科学学院 28 °C 恒温斑马鱼饲养房培养室。循环水系统购买于上海海圣公司。独角雪冰鱼采集于南极埃默里冰架和南极熊猫码头, 解剖后, 取其心脏等组织保存于 -80 °C 冰箱。

1.2 试剂

Trizol 试剂、RealBand 3-color Regular Range Protein Marker, 5 × protein loading buffer 和 β-ACTIN 一抗抗体均购于上海生工生物技术有限公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 和 pMD18-T vector 购于 TaKaRa 公司; Axygen DNA Gel Extraction Kit 购于 Axygen 公司; EcoR I 限制性内切酶和 Bam H I 限制性内切酶购于 NEB 公司; 胎牛血清购于 Gibco 公司; Attractene transfection reagent 来自凯捷生物公司; 0.45 μm PVDF 膜由 Milipore 生物公司提供; 2 × Easy Taq PCR SuperMix 购于北京全式金生物公司; Top10 感受态细胞购于天根生物公司; DMEM-高糖培养基和 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate 蛋白显影液购于 Thermo 公司; BMP4 抗体和 GFP 抗体来自 GeneTex 公司; BMP2 抗体来自杭州华安生物公司; SMAD1 来自于 abcam 公司; GATA6 抗体购于 LSBio 公司; TBX2B 由 OriGene technologies 提供; miR-210-5p 模拟体和 NC(Negative Control, 阴性对照)由上海吉玛基因生物公司合成; Eppendorf 显微注射仪和 ZEISS 高端立体显微镜均购自德国。

1.3 方法

1.3.1 斑马鱼显微注射

取健康、性成熟的斑马鱼, 于前一晚喂食后将雌雄放入产卵缸内。暗处理 10 ~ 12 h 后拿掉挡板, 使其完成交配和产卵。收集、挑选正常发育的胚胎(分两组)用于显微注射, 实验组 miR-210-5p 注射浓度为 50 μm(1 nL/卵), 对照组的处理同实验组(NC 序列: UUGUACUACACAAAAGUA CUG)。之后, 将注射好的斑马鱼胚胎饲养于斑马鱼饲养房, 饲养温度 28 °C, 光周期为明 14 h, 暗 10 h。每天记录并统计死亡率。

1.3.2 观察斑马鱼心脏发育状况

取 72 hpf (hours postfertilization, 受精后小时)斑马鱼胚胎, 用立体显微镜(ZEISS)观察并拍照, 记录心脏畸形状况。

1.3.3 总 RNA 的提取

将 72 hpf 的斑马鱼收集到 1.5 mL 离心管中, 用 1 × PBS 洗 2 遍, 利用 trizol 试剂提取总 RNA, 具体步骤按照说明书进行。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取 RNA 的完整性。用 NanoDrop2000 进行浓度测定, -80 °C 保存。

1.3.4 cDNA 的合成

利用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒进行 RNA 的反转录得到 cDNA, 具体如下: 两步法获得第一条链 cDNA, 反转体系(第一步)为 10 μL: gDNA Eraser, 1 μL; 5 × gDNA Eraser Buffer, 2 μL; Total RNA, 1 μg; 超纯水加至 10 μL, 上述混合物 42 °C, 2 min, 然后 4 °C 保存。反转录第二步反应体系为 20 μL: 混合液(第一步)10 μL; 5 × PrimeScript Buffer 2, 4 μL; PrimeScript RT Enzyme Mix1, 1 μL; RT Primer Mix 1 μL, 超纯水加至 20 μL, 上述混合液 37 °C、15 min, 85 °C、5 s, 4 °C 保存, 获得的 cDNA 保存于 -20 °C。

1.3.5 Real time qRT-PCR

使用 SYBR II ExScript RT-PCR Kit 定量 PCR (bio-rad CFX96), 体系: SYBR 10 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, 模板 1 μL, 灭菌水 7 μL。反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 3 min, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 10 min。qRT-PCR 所用引物如表 1 所示。

表 1 qRT-PCR 所用引物
Tab. 1 Primer list of qRT-PCR

基因名称 gene	上游引物(5'-3') forward primer	下游引物(5'-3') reverse primer
<i>Smad1</i>	GGCTTTACTGACCCATCCAACAAC	GCTCAAACATTCGGCATAACACCTC
<i>Bmp4</i>	GACTCCTCTGCGATTGCTTTTAA	GGCGTGATCTATTGTTCCTGTA
<i>Bmp2a</i>	GCTTCTGAGCATGTTTGGGC	CGGATCTCTCGGAGCCTTTC
<i>Gata6</i>	GTCGCGACCAGTACCTTTCA	ATGATCAGCGACAGCTCACC
<i>Tbx2b</i>	CGATTTTATTGCTGTCACTGCTTA	GCTGTTTCTTTTTTCTCTCCTTC
β -actin	GTTTGAATGGTGGGTGTGGC	GACTGAAATCCCAGTGTCTCA

1.3.6 蛋白提取

在实验组和对照组中分别取 40 枚发育 72 h 的斑马鱼卵收集到 1.5 mL 离心管中,用 1 × PBS 洗 2 遍,加入生工蛋白提取试剂溶液 A 400 μ L,溶液 B 4 μ L(转染 24 h 的 H9C2 细胞六孔板,每孔加入 200 μ L 溶液 A,2 μ L 溶液 B),混匀后冰上震荡或捣碎 10 min,静置 20 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min。取上清,使用 NanoDrop 2000 进行浓度测定,保存于 -40 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.7 Western blot

蛋白样品加入 5 × loading buffer (5% 巯基乙醇)混匀,100 $^{\circ}$ C 水浴煮沸 10 min,72 hpf 斑马鱼胚胎的上样量为 1.5 mg/泳道。80 V,30 min,100 V,1 h,SDS-PAGE 凝胶电泳样品。电转膜转移凝胶至 PVDF 膜,250 mA,1 h。5% 脱脂奶粉慢摇封闭 1 h。兔 BMP2 抗体(1:1000),兔 BMP4 抗体(1:500),兔 GFP 抗体(1:5000),兔 GATA6 抗体(1:1000),兔 SMAD1 抗体(1:1000),兔 TBX2B 抗体(1:1000)慢摇 2 h,PBST 洗涤 3 次,孵育二抗 1 h,PBST 洗涤 2 次,PBS 洗涤一次后显色处理,显影。

1.3.8 CH-EGFP-C2-tbx20-3'UTR 的表达载体构建

根据本实验室对独角雪冰鱼转录组测序所得的 *tbx20* 的 3'UTR 区域,设计含有酶切位点的引物(表 2)扩增 *tbx20*-3'UTR 片段。从独角雪冰鱼的肌肉组织中提取基因组 DNA,PCR 扩增目的片段,胶回收获取扩增片段,将 *tbx20*-3'UTR 连接到 PMD18-T 载体,并进行菌液测序。选取含有正确片段的菌液扩大培养并提取质粒,将 p-EGFP-C2 质粒和含有目的片段的 TA 克隆载体双酶切(*Eco* r1,*Bam* h1)获得目的片段。将 *tbx20*-3'UTR 和含有酶切位点的 p-EGFP-C2 置于 22 $^{\circ}$ C 连接 4 h。转化挑菌,PCR 鉴定是否为含有目的片段的

菌液。选取正确的菌液扩大培养,提取质粒并去内毒素。南极冰鱼 *tbx20*-3'UTR 片段的扩增引物如表 2 所示。

表 2 引物序列
Tab. 2 Primer list

引物名称 primer	序列 sequence
CH- <i>tbx20</i> -3'UTR-F	CCGGAATCCGCTCTGGGGAGGAGAC
CH- <i>tbx20</i> -3'UTR-R	CGCGATCCAAATGTGTTGTGACCGAGC

1.3.9 细胞转染

倒置显微镜下,观察细胞的状态,以及是否已经长满培养皿。弃去培养基,贴壁加入 2 mL PBS 液清洗 2 遍。将 0.25% 胰酶 1 mL 加入培养皿内,上下左右铺匀,室温消化 1 min 左右。加入 4 mL 的含 10% 血清的新鲜培养基,反复吹打消化好的细胞使其脱壁并分散,制成细胞悬液。六孔板中每个孔加入 150 ~ 200 μ L 的细胞悬液和 2 mL 含 10% 血清的 DAEM 培养基,吹打均匀,于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 18 h。细胞生长至铺满 50% 转染,转染步骤按照凯捷试剂说明书,转染后 6 h 换液,再过 24 h 观察细胞瞬时荧光,拍照并提取蛋白。

2 结果

2.1 miR-210-5p 生物信息学分析

独角雪冰鱼、青鳉、斑马鱼以及大鼠中的 miR-210-5p 序列表现出很大的保守性,独角雪冰鱼与青鳉,斑马鱼的 miR-210-5p 序列基本一致,与大鼠的序列相比第 2 ~ 7 个种子序列具有保守性(图 1)。

青鳉 oia-miR-210-5p	AGCCACUGACTAAGGCACAU. 20
独角雪冰鱼 CH-miR-210-5p	AGCCACUGACTAAGGCACAU. 20
斑马鱼 dre-miR-210-5p	AGCCACUGACTAAGGCACAU. 21
大鼠 rno-miR-210-5p	AGCCACUGCCCAAGGCACAUCU. 21
Consensus	agccacug c a gcaca

图 1 miR-210-5p 序列保守性分析

Fig. 1 miR-210-5p sequence conservative analysis

2.2 注射 miR-210-5p 后 72hpf 的斑马鱼发育状况

与野生型 (Wild Type, WT) 相比, 注射 miR-

210-5p 72 h 后, 斑马鱼胚胎的死亡率升高 (图 2a), 心脏畸形的胚胎数目增加 (图 2b), 心包膜出现水肿现象 (图 2c)。

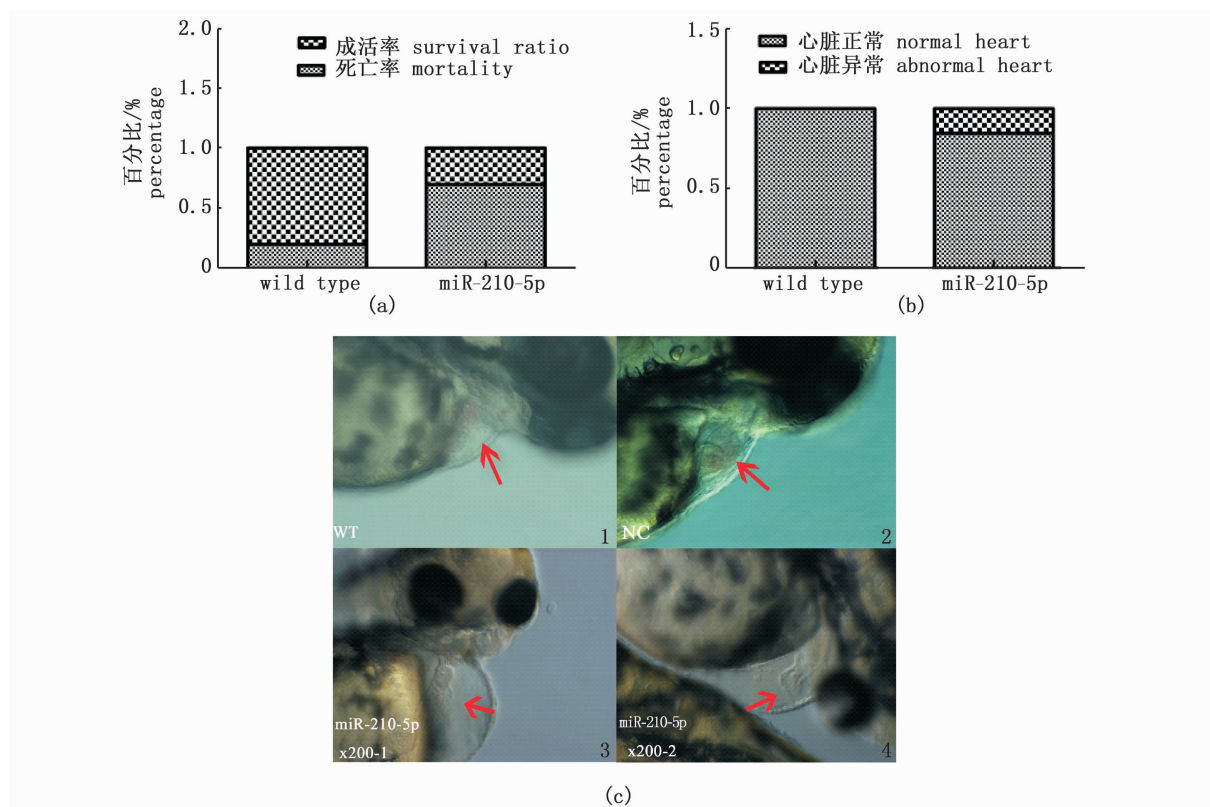


图 2 注射 miR-210-5p (50 μm) 72 hpf 斑马鱼的死亡率及心脏发育状况
Fig. 2 The mortality of 72 hpf zebrafish embryos and cardiac development after the microinjection of miR-210-5p (50 μm)

(a) 注射 miR-210-5p (50 μm , 1 nL) 受精后 72 h 内统计胚胎死亡率结果; (b) 注射 miR-210-5p 后 72 hpf 的斑马鱼胚胎心脏发育状况; (c) 注射 miR-210-5p (50 μm , 1nL) 后 72 h, 高端立体显微镜下观察斑马鱼胚胎心脏的发育状况。

(a) The statistical results of the 72 hpf zebrafish embryos mortality after miR-210-5p (50 μm , 1nL) microinjection; (b) The statistical results of the cardiac development of 72 hpf zebrafish embryos after microinjection; (c) The zebrafish heart in 200-time microscope.

2.3 过表达 miR-210-5p 斑马鱼胚胎心脏发育相关基因的表达

注射 miR-210-5p 之后, 提取 72 hpf 的斑马鱼胚胎总 RNA, qRT-PCR 和 Western blot 检测心脏发育相关基因的 mRNA 和蛋白表达。结果显示: 过表达 miR-210-5p 斑马鱼胚胎能够下调心脏发育基因 *bmp4*、*smad1* 和 *tbx2b* 的表达 (图 3a)。与对照组相比, BMP4、BMP2、SMAD1、GATA6 和 TBX2B 的蛋白表达下降 (图 3b)。

2.4 靶基因 *tbx20*

将构建好的真核表达载体 p-EGFP-CH-*tbx20*-

3'UTR 和 miR-210-5p 共同转染至 HEK293T 细胞中, 观察荧光强度。p-EGFP-CH-*tbx20*-3'UTR 空质粒转染作为空白对照, p-EGFP-CH-*tbx20*-3'UTR 和 NC 共转作为阴性对照。结果发现, 与空质粒相比, 阴性对照 (NC) 的荧光没有显著变化, 但 miR-210-5p 与质粒载体共转之后绿色荧光蛋白相对较弱 (图 4a)。另外, 我们还检测了绿色荧光蛋白的水平, 发现 miR-210-5p 与质粒共转之后, 绿色荧光蛋白的表达水平下降 (图 4b)。因此, 我们推测, miR-210-5p 很可能通过与 CH-*tbx20*-3'UTR 结合, 抑制 *tbx20* 的转录后翻译。

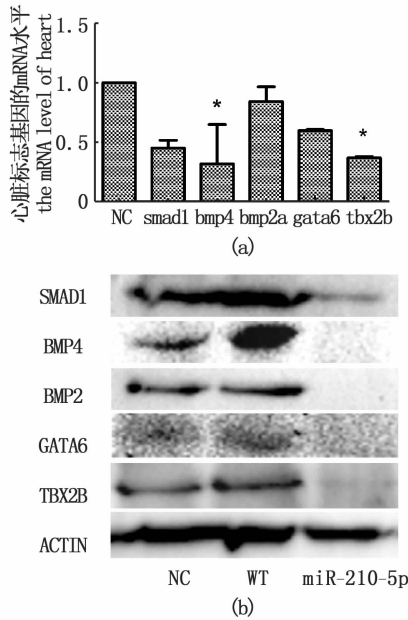


图3 定量 PCR 和 Western blot 检测斑马鱼心脏发育相关基因变化

Fig.3 Expression analysis of heart development related genes in zebrafish by qRT-PCR and Western blot

(a) 斑马鱼心脏发育相关基因 mRNA 水平 (P < 0.05); (b) western blotting 检测斑马鱼心脏发育相关基因变化. (a) The mRNA level of heart development related genes in zebrafish (P < 0.05); (b) Expression analysis of heart development related genes in zebrafish by western blotting.

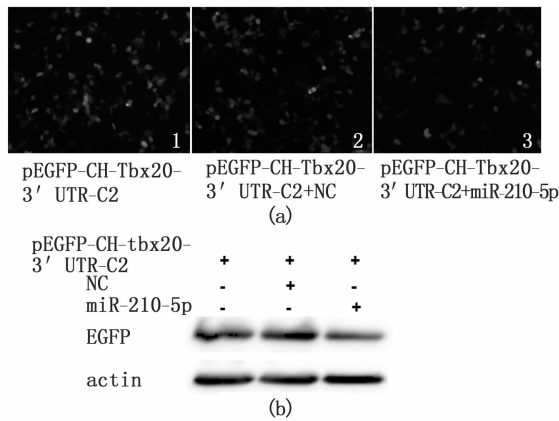


图4 转染 24 h 后检测 GFP 荧光蛋白的表达情况 Fig.4 The expression of fusion GFP protein after transfecting miR-210-5p into HEK293T cells

(a) 转染 24h 后观察细胞 GFP 的瞬时荧光表达;(b)转染 24 h 后 western blot 检测 GFP 荧光蛋白的表达. (a) Transient expression of GFP after transfection of 24 h;(b) The protein level of fusion GFP in HEK293T cells after transfection of 24 h.

3 讨论

南极气候恶劣,水域低温高氧,许多生物包括南极鱼类在进化过程中逐渐适应了环境。南极冰鱼和其他生物一样,只有获得足够的氧气才能生存,可是其体内不含血红蛋白或者具有功能的红血球,因此冰鱼的心脏产生了很大的补偿性变化,其心脏比其他南极鱼类增大了 3 倍,血管明显变粗[14]。前期研究发现,与同等环境下的南极鱼相比,南极冰鱼心脏中的某些 microRNA 的表达发生了很明显的变化,冰鱼心脏中 miR-210-5p 的表达显著升高。我们推测,miR-210-5p 与冰鱼心脏补偿性增生相关。目前也有一些与 miR-210 相关的研究,如在卵巢异位细胞系中,低氧刺激下 HIF-1α 和 miR-210 的表达量显著升高,而 miR-210 的过表达对保持细胞的活力也有一定的作用[15]。另外,阻滞 miR-210 的表达能够提高心肌梗死模型小鼠的成活率并改善其心脏功能[16]。研究显示 miR-210 能促进肾癌细胞的增殖和转移,抑制肾癌细胞的凋亡[17]。已有文献中涉及 miR-210 与心脏发育的并不多,因此本研究试图探索 miR-210-5p 对冰鱼心脏发育的调控机制,并进一步认识 miR-210 的生物学功能。

本研究将 miR-210-5p 显微注射进入斑马鱼胚胎,斑马鱼的心脏发育出现异常,表现为心包膜水肿,心脏发育畸形(图 2)。过表达 miR-210-5p 的斑马鱼胚胎,几个心脏发育相关基因 mRNA 水平的表达下调,其中 bmp4 和 tbx2b 被显著下调(图 3a)。有研究证实,bmp4 可通过增加心肌细胞 nox4 表达及其 ros 依赖性通路,诱导心肌细胞肥大、凋亡和心脏纤维化[18]。Tbx2a 和 tbx2b 在斑马鱼初级心管中表达,在受精后两天转录水平限制在房室管,在 tbx2a 和 tbx2b 突变体斑马鱼中,心室形成受阻[19]。Bmp/smad 通路在心脏发育过程中起着很重要的调控作用[4]。GATA 结合蛋白是锌指转录因子,家族中 GATA4 和 GATA6 参与内胚层的发育以及心血管系统的形成[20-23]。本文检测了 bmp/smad 通路中的几种蛋白表达,它们的蛋白表达水平均显著下调(图 3b)。因此,我们推测 miR-210-5p 极有可能是通过 bmp/smad 通路发挥作用的。

Tbx20 基因是心脏发育相关的重要因子,它是早期房室管形成和内皮细胞迁移所需的转录

因子^[24]。在房室管心肌层中, *Tbx20* 维持 *bmp2*、*tbx3* 和 *hand1* 的表达^[24]。已有研究表明, 在非洲爪蟾中, *smad1* 的抑制会特异地阻滞 *tbx20* 的表达, 而 *tbx5*、MHC 等其他许多心肌发育因子的表达不会受到影响。 *Tbx20* 是 *bmp/sm*ad 信号通路下游的一个转录靶点。 *Bmp* 家族以及下游调控基因 *smad* 家族在早期心脏发育中参与很多生物学过程, 包括心肌细胞的特化、增殖和分化^[25]。我们推测, *tbx20* 很可能是 miR-210-5p 的一个靶基因。因此, 我们将独角雪冰鱼 *tbx20* 基因的 3' UTR 区域重组到 pEGFP-C2 质粒载体上, 并和 miR-210-5p 共转染到 HEK293T 细胞中, 检测 GFP 的荧光变化。与阴性对照相比, miR-210-5p 和 pEGFP-CH-*tbx20*-3'UTR 共转染后的荧光量下降, 同时荧光蛋白的表达量也下降(图 4)。我们认为, miR-210-5p 可能是与 *tbx20* 的 3'UTR 区域结合, 抑制融合荧光蛋白的表达。在独角雪冰鱼中 miR-210-5p 很可能是通过靶向抑制 *tbx20* 的表达来抑制其心脏发育的。尽管本项目所揭示的 miR-210-5p 对心脏发育的调控作用还远远不足, 但需要指出的是, 这些结果为今后揭示南极冰鱼心脏补偿性增生的机制奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] KEEGAN B R, FELDMAN J L, BEGEMANN G, et al. Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool [J]. *Science*, 2005, 307(5707): 247–249.
- [2] MARQUES S R, LEE Y, POSS K D, et al. Reiterative roles for FGF signaling in the establishment of size and proportion of the zebrafish heart [J]. *Developmental Biology*, 2008, 321(2): 397–406.
- [3] REITER J F, VERKADE H, STAINIER D Y R. *Bmp2b* and *Oep* promote early myocardial differentiation through their regulation of *gata5* [J]. *Developmental Biology*, 2001, 234(2): 330–338.
- [4] RONES M S, MCLAUGHLIN K A, RAFFIN M, et al. *Serrate* and *notch* specify cell fates in the heart field by suppressing cardiomyogenesis [J]. *Development*, 2000, 127(17): 3865–3876.
- [5] ANDRÉE B, DUPREZ D, VORBUSCH B, et al. BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos [J]. *Mechanisms of Development*, 1998, 70(1/2): 119–131.
- [6] KLAUS A, SAGA Y, TAKEYO M M, et al. Distinct roles of Wnt/ β -catenin and *Bmp* signaling during early cardiogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(47): 18531–18536.
- [7] LEE K H, EVANS S, RUAN T Y, et al. SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chick Nkx2.5 enhancer [J]. *Development*, 2004, 131(19): 4709–4723.
- [8] SCHLANGE T, ANDRE E B, ARNOLD H H, et al. BMP2 is required for early heart development during a distinct time period [J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 91(1/2): 259–270.
- [9] SCHULTHEISS T M, BURCH J B, LASSAR A B. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis [J]. *Genes & Development*, 1997, 11(4): 451–462.
- [10] JIAO K, KULESSA H, TOMPKINS K, et al. An essential role of *Bmp4* in the atrioventricular septation of the mouse heart [J]. *Genes & Development*, 2003, 17(19): 2362–2367.
- [11] PETERKIN T, GIBSON A, PATIENT R. GATA-6 maintains BMP-4 and Nkx2 expression during cardiomyocyte precursor maturation [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(16): 4260–4273.
- [12] LEE Y S, DUTTA A. MicroRNAs in cancer [J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2009, 4: 199–227.
- [13] IKEDA S, HE A, KONG S W, et al. MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and *mef2a* genes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(8): 2193–2204.
- [14] ACIERNO R, MACDONALD J A, AGNISOLA C, et al. Blood volume in the hemoglobinless Antarctic teleost *Chionodraco hamatus* (Lönnberg) [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1995, 272(5): 407–409.
- [15] XU T X, ZHAO S Z, DONG M, et al. Hypoxia responsive miR-210 promotes cell survival and autophagy of endometrial cells in hypoxia [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2016, 20(3): 399–406.
- [16] WANG Y P, PAN X H, FAN Y Q, et al. Dysregulated expression of microRNAs and mRNAs in myocardial infarction [J]. *American Journal of Translational Research*, 2015, 7(11): 2291–2304.
- [17] LIU T Y, ZHANG H, DU S M, et al. Expression of microRNA-210 in tissue and serum of renal carcinoma patients and its effect on renal carcinoma cell proliferation, apoptosis, and invasion [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(1): gmr.15017746, doi: 10.4238/gmr.15017746.
- [18] SUN B, HUO R, SHENG Y, et al. Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2013, 61(2): 352–360.

- [19] SEDLETCAIA A, EVANS T. Heart chamber size in zebrafish is regulated redundantly by duplicated *tbx2* genes [J]. *Developmental Dynamics*, 2011, 240(6): 1548 – 1557.
- [20] KUO C T, MORRISEY E E, ANANDAPPA R, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation [J]. *Genes & Development*, 1997, 11(8): 1048 – 1060.
- [21] LAFOREST B, ANDELFINGER G, NEMER M. Loss of *gata5* in mice leads to bicuspid aortic valve [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(7): 2876 – 2887.
- [22] MOLKENTIN J D, LIN Q, DUNCAN S A, et al. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis [J]. *Genes & Development*, 1997, 11(8): 1061 – 1072.
- [23] MORRISEY E E, TANG Z H, SIGRIST K, et al. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo [J]. *Genes & Development*, 1998, 12(22): 3579 – 3590.
- [24] CAI X Q, NOMURA-KITABAYASHI A, CAI W B, et al. Myocardial *Tbx20* regulates early atrioventricular canal formation and endocardial epithelial-mesenchymal transition via *Bmp2* [J]. *Developmental Biology*, 2011, 360(2): 381 – 390.
- [25] MANDEL E M, KALTENBRUN E, CALLIS T E, et al. The BMP pathway acts to directly regulate *Tbx20* in the developing heart [J]. *Development*, 2010, 137(11): 1919 – 1929.

Functional mechanism researches of the *Chionodraco hamatus* miR-210-5p on the cardiac development

GUO Yanan¹, WANG Congcong^{1,2}, LIU Yun¹, WU Xiaohui¹, SUN Jianfei¹, CHEN Cheng^{1,3}, XU Qianghua^{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. Collaborative Innovation Center for Distant-water Fisheries, Shanghai 201306, China; 4. National Engineering Research Center for Oceanic Fisheries, Shanghai 201306, China)

Abstract: MicroRNA, a short non-coding RNA chain, plays important roles in post-transcription regulations by targeting gene 3'UTR through sequence complementary principle. Previous researches showed that microRNAs play important roles in heart development process. Heart development of the Antarctic icefish (*Chionodraco hamatus*) shows compensatory physiological enlargements due to the lack of functional red blood cells in the body. Previous studies suggested that microRNAs specifically expressed in the *C. hamatus* heart may be associated with icefish compensatory physiological enlargement. In this study, according to the highly expressed miR-210-5p, we studied the heart development functional mechanism of miR-210-5p by using zebrafish microinjection and gene's target prediction. The results showed that overexpression of miR-210-5p in 72hdf zebrafish embryos could affect zebrafish heart development, characterized by cardiac malformations such as pericardial edema. QRT-PCR analysis showed that overexpression of miR-210-5p in zebrafish downregulated heart development marker genes including *bmp4*, *smad1*, *gata6*, *tbx2b*. Western blot analysis found that the protein expression levels of BMP4, BMP2, SMAD1, GATA6 and TBX2B were downregulated. According to the bioinformatics prediction and GFP fluorescence analysis, we found *tbx20* may be a target of miR-210-5p. Therefore, we speculated that miR-210-5p might inhibit *tbx20* gene expression and might suppress heart development of *C. hamatus* through *bmp/sm* pathway.

Key words: miR-210-5p; cardiac development; *tbx20*; *Chionodraco hamatus*; *bmp/sm* pathway