

调节小鼠胰腺发育中 Ptf1a 基因表达的 microRNAs 的鉴定研究*

安 洋** 杨艳坤** 高 飞 朱宽钰 慕谭伟 滕春波***

(东北林业大学生命科学学院发育生物学研究室, 哈尔滨 150040)

摘要 Ptf1a, 又名 p48, 是 Ptf1 转录因子的一个亚基, 为胰腺命运决定与细胞分化必需的转录因子. 最近研究发现, Ptf1a 表达的丰度变化与发育中胰腺细胞生长、分化和胰岛 β 细胞数量密切相关. 然而, 胰腺细胞中 Ptf1a 的表达调节机制还不清楚. MicroRNAs(miRNAs)是一类约 22nt 的非编码小 RNA, 它们通过切割靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 的翻译调节基因的表达. 一些研究提示, miRNAs 参与调控胰腺发育的多个过程. 因而推测, miRNAs 可能在胰腺发育中参与调控 Ptf1a 的表达变化. 为了验证这一假设, 结合两个靶基因预测算法的结果, 获得 4 个可能调控 Ptf1a 表达的 miRNAs. 随后, 利用双荧光素酶报告系统研究发现, 预测得到 miRNAs 中的 miR-18a, miR-145 和 miR-495 能通过结合到小鼠 Ptf1a mRNA 的 3'UTR 而有效抑制其表达. 还利用 qRT-PCR 和免疫荧光染色实验研究了 miR-18a、miR-145 和 miR-495 与 Ptf1a 在小鼠胰腺发育过程中的表达模式. 结果表明, miR-18a, miR-145 和 miR-495 与 Ptf1a mRNA 及蛋白质的表达成负相关, 进一步说明 miR-18a, miR-145 和 miR-495 可能在小鼠胰腺发育中调节 Ptf1a 的表达.

关键词 miRNAs, Ptf1a, 胰腺发育, 小鼠

学科分类号 Q75, R3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00298

小鼠胰腺起源于 e8.5(胚胎期 8.5天)和 e9.5时背部和腹部内胚层上皮分别向周围间质外突形成的背腹胰芽. e12.5前, 背腹胰芽中的内胚层上皮不断增殖、分支形成管状上皮. e13.5到 e15.5, 背腹胰芽融合成为一个胰腺, 此时内分泌细胞在导管样上皮中以单细胞形式排列, 而外分泌细胞开始分化. 从 e16.5到 e19, 内分泌细胞迁移并聚集成胰岛, 开始大量分泌激素, 外分泌细胞也迅速产生大量酶类^[1,2].

近年的研究发现, 转录因子在胰腺发育过程中起着重要作用^[3]. 如 Pdx1 在内胚层上皮向胰腺细胞命运特化中非常关键, Neurogenin 3 和 NeuroD1 等在胰腺祖细胞向内分泌祖细胞分化过程中必不可少^[4,5]. Ptf1a 又名 p48, 是碱性螺旋-转角-螺旋(bHLH)类转录因子. 基因敲除与细胞世系追踪实验显示, Ptf1a 对调控内外分泌胰腺发育是必需的, Ptf1a 敲除小鼠在出生后不久就因胰腺发育不全而死亡^[6,7]. 最近对于斑马鱼的研究进一步发现, Ptf1a 调控胰腺细胞的分化存在剂量依赖性: 低水平的 Ptf1a 促进内分泌分化, 高水平 Ptf1a 抑制内

分泌分化并促进外分泌分化^[6,8]. 然而, 胰腺细胞中 Ptf1a 的表达调节机制还不清楚.

MicroRNAs(miRNAs)是一类 22nt 左右的非编码小 RNA, 它们在进化过程中高度保守, 通过切割靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 的翻译来调节基因的表达^[9,10]. 一些研究已经提示, miRNAs 在胰腺发育中起重要作用. 如 Dicer 是 miRNAs 生物合成所必需的酶, 在胰腺特异敲除 Dicer 的小鼠中, miRNAs 合成全面受阻可导致各种胰腺细胞世系的缺失^[11]. 敲除 miR-375 能导致斑马鱼内分泌胰腺发育异常, 表明它对胰腺内分泌发育也有调节作用^[12], 但目前还不知道哪些 miRNAs 能调控胰腺上皮中 Ptf1a 的表达. 为此, 我们利用靶基因预测软件 miRBase Targets Version 5 和 TargetScan Version 4.2

* 国家自然科学基金资助项目(30670304).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0451-82191784, E-mail: chunboteng@yahoo.com

收稿日期: 2009-07-31, 接受日期: 2009-09-23

对于可能调控 Ptf1a 的 miRNAs 进行预测, 然后通过双荧光素酶报告系统在 NIH3T3 细胞中分析了预测获得的 4 个 miRNAs 对于 Ptf1a 表达的调节, 筛选获得 3 个能靶向调控 Ptf1a 表达的 miRNAs. 最后通过 qRT-PCR 和免疫荧光染色分析了 3 个 miRNAs 与 Ptf1a 在小鼠发育胰腺中的表达变化关系.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物. ICR 白小鼠购自长春维通利华试验动物中心, 4~6 周龄, 体重 20~30 g, 动物饲养于人工控制条件下, 室温 22℃, 光照周期为 12 h 光照(06:00~18:00), 12 h 黑暗, 自由取食、饮水.

1.1.2 菌株和质粒. 大肠杆菌(JM109)为东北林业大学动物发育研究室保存菌株. PGM-T 载体购自 Tiangen 公司, pGL3-control 和 pRL-TK 载体购自 Promega 公司.

1.1.3 细胞系. NIH 3T3 细胞系为东北林业大学动物发育研究室保存.

1.1.4 试剂. TRIzol Reagents、Lipofectamine 2000 和胎牛血清购自 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒和实时定量 PCR 试剂盒购自 Applied Biosystems 公司, 质粒小量快速提取试剂盒, 高纯度质粒小提中量试剂盒购自 Tiangen 公司, 凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司, 限制性内切酶、*E. coli* Poly(A)聚合酶和 T4DNA 连接酶均购自 New England Biolabs 公司, miRNA 模拟体由 GenePharma 公司合成, 双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司, DMEM 液体培养基购自 Hyclone 公司.

1.2 方法

1.2.1 miRNA 的预测. 以 Ptf1a 作为靶基因的 miRNA 预测采用 Targets Version 5^[13](<http://microma.sanger.ac.uk/targets/v5>) 和 TargetScan Version 4.2^[14](http://www.targetscan.org/vert_42/).

1.2.2 小鼠胚胎胰腺总 RNA 的提取与反转录. 取 e12.5 和 e15.5 小鼠胰腺组织, 加入液氮充分研磨, 利用 Trizol 提取总 RNA, 变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 紫外分光光度计检测总 RNA 纯度和浓度, 用 DEPC 水稀释为 1 g/L, 利用 oligodT 为反转录引物, 按照 Applied Biosystems 公司反转录试剂盒说明反转录为 cDNA, 用于进行基因克隆和 mRNA 表达的定量分析.

1.2.3 Ptf1a 3'UTR-pGL3-control 荧光素酶报告载体的构建. 利用正向引物 5' cgctctagagcgctctttgtgcatattgta 3' 和反向引物 5' actggccggccgcgagcacagaattaatacagac 3' 从胚胎胰腺 cDNA 中扩增 Ptf1a mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)片段, 克隆到 PGEM-T 载体上, 测序. *Xba* I 和 *Fse* I 双酶切 Ptf1a 3'UTR 片段, 插入同样进行双酶切的 pGL3-control 质粒载体, 构建获得荧光素酶报告载体 Ptf1a 3'UTR-pGL3-control.

1.2.4 NIH3T3 细胞转染与荧光素酶检测. NIH3T3 细胞培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中. 转染前一天, 胰酶消化细胞并计数, 细胞铺板, 使其在转染日密度为 90%~95%. 对于每孔细胞, 利用 Lipofectamine 2000 转染 Ptf1a 3'UTR-pGL3-control 200 ng、pRL-TK 50 ng、miRNA 模拟体或对照 miRNA 30 nmol/L. 转染 24 h 后, 按照 Promega 公司双荧光素酶检测试剂盒说明检测不同处理组的荧光强度. 每个处理设置 3 个重复, 每个转染实验重复 3 次.

1.2.5 总 RNA 加尾、反转和 miRNAs 的实时定量 PCR. e12.5 和 e15.5 胰腺总 RNA 利用 *E. coli* Poly (A)聚合酶加尾, 酚氯仿抽提, 乙醇沉淀后融于 DEPC 水中, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 紫外分光光度计测定浓度. 加尾后 RNA 按照 Applied Biosystems 公司的 RT-PCR Reagents 试剂盒说明要求, 利用加接头的 oligodT 为反转引物进行反转录. 反转后的 cDNA 样品稀释 20 倍, 加入 Applied Biosystems 公司的 SYBR® Green PCR Master Mix 及通用检测引物和 miRNAs 特异的检测引物(表 1),

Table 1 Primer sequences in qRT-PCR

Primer name	Sequence
Oligodt-adaptor	5' GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTA TAGGTTTTTTTTTTIVN
u6 forward	5' CGCTTCGGCAGCACATATAC 3'
u6 reverse	5' TTCACGAATTTGCGTGTGCAT 3'
Universal primer	5' GCGAGCACAGAATTAATACGAC 3'
mmu-miR-145	5' CAGTTTTCCAGGAATCCCT 3'
mmu-miR-495	5' AAACAAACATGGTGCCTTCTT 3'
mmu-miR-18a	5' TAAGGTGCATCTAGTGCAGATAG 3'
mmu-miR-543	5' CATTTCGGTGCCTTCTT 3'
mmu-miR-375	5' GTTCGTTCCGGCTCGCGTGA 3'
β-Actin forward	5' CCAACCGTGAAAAGATGACC 3'
β-Actin reverse	5' TACGACCAGAGGCATACAGG 3'
GAPDH forward	5' GCCTTCCGTGTTCTACCC 3'
GAPDH reverse	5' TGCCTGCTTACCACCTTC 3'
Ptf1a forward	5' ATGGTCTCCCTCCTTGG 3'
Ptf1a reverse	5' AAAGGGTGGTTCGTTCTC 3'

在 Chromo4™ 多色实时定量 PCR 仪(Biorad)上进行 40 个循环的 qPCR 反应. 选择 U6 作为内参基因减少检测标本间的差异. 反应结束后利用 Opticon-3 软件对结果进行定量分析. 每次定量分析检测样品设置 3 个重复, 以 3 批样品进行独立表达分析.

1.2.6 mRNA 的实时定量 PCR. e12.5 和 e15.5 cDNA 样品稀释 5 倍作为检测模板检测 Ptf1a 的表达, 引物序列见表 1, β-actin 和 GAPDH 作为内参基因以减少检测标本间的差异. 实时定量 PCR 反应试剂用量根据 ABI 的 SYBR® Green PCR Master Mix 试剂盒说明加入, 在 Chromo4™ 多色实时定量 PCR 仪(Biorad)上进行 40 个循环的 qPCR 反应, 反应结束后利用 Opticon-3 软件对结果进行定量分析. 每次定量分析检测样品设置 3 个重复, 以 3 批样品进行独立表达分析.

1.2.7 免疫荧光染色. e12.5 和 e15.5 胚胎胰腺直接

进行包埋和冰冻切片, 切片厚度为 5 μm. 切片免疫荧光染色按照 Teng 等^[15]的方法进行. 切片固定后利用 10% 正常动物血清封闭, 加入亲和纯化的兔抗 Ptf1a 抗体(1:1 000, 由 Chris Wright 实验室馈赠)或同型对照. 二抗为 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1:150 稀释), 染色结束后利用正置荧光显微镜 (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss)观察拍照.

2 结果与分析

2.1 预测可能调控 Ptf1a 表达的 miRNAs

为寻找可调控 Ptf1a 表达的 miRNAs, 我们采用两个靶基因预测软件 miRBase Targets Version 5 和 TargetScan Version 4.2 进行预测. 利用 miRBase 预测得到 40 个可能调控 Ptf1a 的小鼠 miRNAs, 利用 TargetScan 预测得到了 8 个 miRNAs, 但其中 4 个与 miRBase 预测的结果不同(表 2).

Table 2 Predicted miRNAs for Ptf1a by integrating two databases

miRBase			TargetScan		Integrated results
mmu-miR-145*	mmu-miR-139-3p	mmu-miR-743a	mmu-miR-489	mmu-miR-410	mmu-miR-495
mmu-miR-22*	mmu-miR-494	mmu-miR-542-3p	mmu-miR-465c-5p	mmu-miR-496	mmu-miR-18
mmu-miR-7a	mmu-miR-495	mmu-miR-466f-5p	mmu-miR-331-5p	mmu-miR-495	mmu-miR-145
mmu-miR-18b	mmu-miR-574-3p	mmu-miR-184	mmu-miR-219	mmu-miR-216b	mmu-miR-543
mmu-miR-18a	mmu-miR-16	mmu-miR-425*	mmu-miR-671-3p	mmu-miR-18	
mmu-miR-743b-3p	mmu-miR-7a*	mmu-miR-218	mmu-miR-509-3p	mmu-miR-145	
mmu-miR-568	mmu-miR-804	mmu-miR-582-5p	mmu-miR-182	mmu-miR-691	
lmmu-miR-568	mmu-miR-195	mmu-miR-543	mmu-miR-130a	mmu-miR-543	
mmu-miR-145	mmu-miR-144	mmu-miR-433	mmu-let-7i*		
mmu-miR-871	mmu-miR-338-5p	mmu-miR-369-3p	mmu-miR-542-5p		

* The number of repeated miRNAs means the number of target sites.

为使预测结果更加可靠, 我们将两种算法所得结果取交集, 得到了 4 个 miRNAs: miR-18a、miR-145、miR-495 以及 miR-543, 这 4 个 miRNAs 的靶序列在不同物种间保守. miRBase 和

TargetScan 软件预测都显示, 4 个 miRNAs 在 Ptf1a mRNA 3'UTR 上都只有一个靶作用位点(表 3), 它们依次分布于 366 bp 长度范围内(图 1).

Table 3 Predicted consequential pairing between Ptf1a 3'UTR and 4 miRNAs

miRNA	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 218~224 of Ptf1a 3' UTR	5' ... AUAUGAUUCCUGAA-GCACCUUU...
mmu-miR-18	3' AUAGACGUGAUCUACGUGAAU
Position 234~241 of Ptf1a 3' UTR	5' ... CACCUUUGACAGAAGAACUGGAA...
mmu-miR-145	3' UUCCCUAAGGACCCUU-UUGACCCUG
Position 109~116 of Ptf1a 3' UTR	5' ... UAAUGGCAAUCAACUGUUUGUA...
mmu-miR-495	3' UUCUUCACGUGGUA---CAAACAAA
Position 310~316 of Ptf1a 3' UTR	5' ... UGAGUGUUGUAAAUAUGUUAU...
mmu-miR-543	3' UCUUCACGUGGCGC--UUACAAA

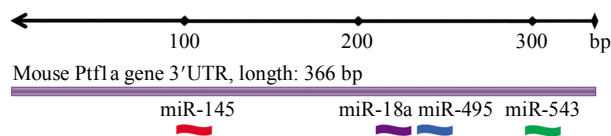


Fig. 1 Four predicted miRNAs and their target sides on Ptf1a mRNA 3'UTR

2.2 miR-18a、miR-145 和 miR-495 可直接调控 Ptf1a 的表达

为分析 4 个预测获得的 miRNAs 能否调控 Ptf1a 表达，我们首先将 Ptf1a 3' UTR 插入 pGL3-control 载体萤火虫荧光素酶基因下游，获得报告载体 Ptf1a 3'UTR-pGL3-control。然后将 Ptf1a 3' UTR-pGL3-control，海肾萤光素酶报告载体 pRL-TK 以及化学合成的 miR-18a、miR-145、miR-495、miR-543 或对照 miRNA(在小鼠细胞系中无任何靶基因)共转染进 NIH 3T3 细胞系中，通过分析荧光素酶表达变化，分析这些 miRNAs 对 Ptf1a 表达的影响。相对于对照 miRNA，miR-18a、miR-145 和 miR-495 能使 Ptf1a 3'UTR-pGL3-control 的萤火虫荧光素酶表达水平分别下降为(52.71 ± 5.37)%、(65.39 ± 3.96)%和(77.73 ± 1.16)%，而 miR-543 对荧光素酶表达无显著影响(相对于阴性对照其荧光素酶活性为(104.87 ± 14.86)%，图 2)。以上结果说明，miR-18a、miR-145 和 miR-495 可通过靶向作用于 Ptf1a mRNA 3'UTR 调控 Ptf1a 的表达。

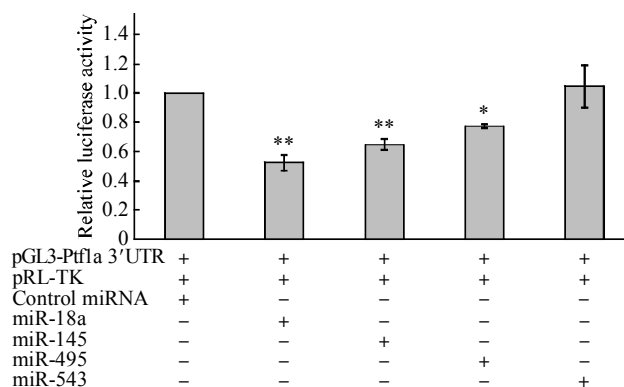


Fig. 2 Relative luciferase activity in 3T3 cells con-transfected with modified pGL3-control vectors and miRNAs

Each data represents the average of three independent experiments. The luciferase activity of “pGL3-Ptf1a 3'UTR + control miRNAs” was used as control and arbitrarily defined as 1. The y-axis represents relative luciferase activity compared with control. Error bars indicate the SD. **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

2.3 小鼠胰腺发育中 miRNAs 和 Ptf1a 的表达关系

2.3.1 实时定量 PCR. 为了检测 Ptf1a mRNA 与调控它表达的 3 个 miRNAs 在小鼠胰腺发育过程中的表达关系，我们通过实时定量 RT-PCR 对小鼠早期胰腺发育的 e12.5 和 e15.5 样品进行了检测。结果显示，如果将 e12.5 mRNA 表达量值设为 1，e15.5 小鼠胰腺中 Ptf1a mRNA 的表达量是 e12.5 表达量的(16.70 ± 2.37)倍。相对于 Ptf1a mRNA 的表达量显著升高，miR-18a、miR-145 和 miR-495 的表达量分别下降到 e12.5 表达水平的(45.19 ± 8.47)%、(44.40 ± 6.17)%以及(72.24 ± 6.17)% (图 3)。已有报道发现，能够调节胰岛素分泌的 miR-375 在斑马鱼胰腺发育过程中表达，在胰腺内分泌细胞发育中起到调控作用^[12]。我们通过实时定量 PCR 检测发现，与上述 3 个 miRNAs 不同，miR-375 在小鼠胰腺发育中表达升高，与本实验预测的 miR-375 与 Ptf1a 没有调控关系是相一致的。上述结果表明，在小鼠胰腺发育过程中 miR-18a、miR-145 和 miR-495 的表达水平与 Ptf1a 的表达成负相关，该实验结果与荧光素酶报告系统检测结果相符。

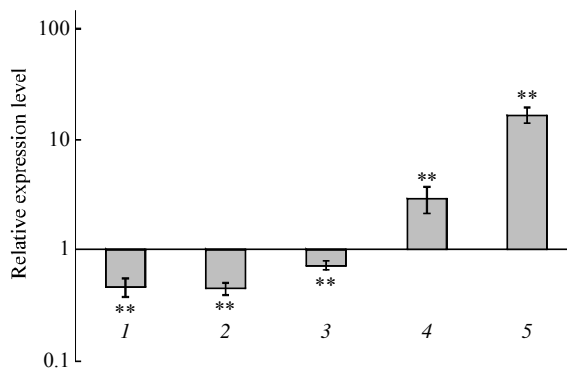


Fig. 3 Expression level of miR-18a, miR-145, miR-495, miR-375 and Ptf1a mRNA in e15.5 relative to e12.5

Expression of miRNAs and mRNA are normalized to U6 and Gapdh respectively before comparison with expression in e12.5 mice. The y-axis represents relative expression levels compared with e12.5 mice. Error bars indicate the SD. ***P* < 0.01. 1: mmu-miR-18a; 2: mmu-miR-145; 3: mmu-miR-495; 4: mmu-miR-375; 5: Ptf1a.

2.3.2 免疫荧光染色.

为了检测胰腺发育过程中 Ptf1a 蛋白表达情况，本研究通过免疫荧光染色对 e12.5 和 e15.5 胎鼠胰腺样品的冰冻切片进行了检测。免疫荧光染色结果显示，在 e12.5，Ptf1a 蛋白的表达水平很低，主要局限于胰腺未分化上皮细胞核中。随着发育的进行，Ptf1a 蛋白在 e15.5 胎鼠胰腺上皮细胞核中的表达水平明显高于 e12.5，并且其表达逐渐转向胰腺外分泌腺泡细胞(图 4)。Ptf1a

蛋白的这种表达变化与 miR-18a、miR-145 和 miR-495 在相应时间点的表达变化呈负相关。

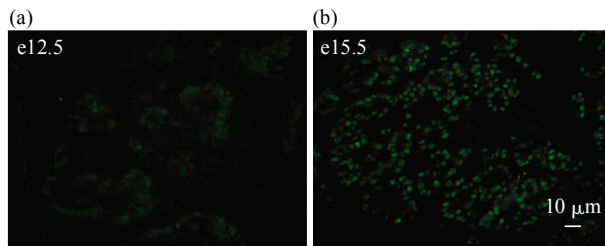


Fig. 4 Immunofluorescence analysis of ptf1a expression in e12.5(a) and e15.5(b) mouse pancreatic sections (green)

3 讨 论

miRNAs 是一类 21~25nt 长的单链 RNA, 广泛存在于真核生物中, 主要参与基因转录后水平的调控。研究表明, miRNAs 具有高度的保守性、时序性和组织特异性, 在组织和器官发育、免疫系统的控制、干细胞自我更新和分化调控等生命过程中起重要作用^[9, 16]。然而对胰腺发育中起作用的 miRNAs 还所知甚少。

本研究利用 miRNAs- 靶基因预测软件对能够调控胰腺发育关键转录因子 Ptf1a 的 miRNAs 进行了预测。miRNAs- 靶基因预测有许多算法, 我们选择 TargetScan 是由于它是最早开发用于预测哺乳动物 miRNAs 靶基因的软件, 其预测基于 3 个重要的标准: miRNAs 与靶位点间的互补性, 自由能以及靶序列的种间保守性^[13]。该软件将 RNA 间相互作用的热力学模型与序列比对分析相结合, 预测不同物种间保守的 miRNAs 结合位点。而 miRanda 是第一个 miRNAs 靶基因预测软件, 它适用范围广泛, 不受物种限制^[14]。本文认为, 结合基于 miRanda 预测算法的 miRBase 靶基因数据库和基于 TargetScanS 预测算法的 TargetScan 数据库所得结果比单独任何一种算法的结果更可靠。我们利用实验手段对结合两种预测软件找到的 4 个 miRNAs 进行分析发现, 其中 3 个 miRNAs 能够有效调节 Ptf1a 的表达。此 miRNAs 筛选策略与建立 miRNAs 的文库、芯片检测等手段相比更简便、快捷。

Ptf1a 是胰腺上皮命运决定和分化中起关键作用的转录因子, 最早在胚胎 9.5 天就开始表达, Ptf1a 突变小鼠不能形成外分泌组织^[7]。Kawaguchi 等^[18]通过在 Ptf1a 启动子后敲入 Cre 并利用 Rosa26R 小鼠进行细胞世系追踪发现, 早期胰腺上皮中 Ptf1a 表达的细胞能够形成腺泡、导管和内分泌

细胞等胰腺所有细胞类型。因而在早期胰芽中, Ptf1a 阳性细胞也代表一群未分化的祖细胞。最近对于斑马鱼的研究进一步发现, Ptf1a 调控胰腺细胞的分化存在剂量依赖性: 低水平的 Ptf1a 促进内分泌分化, 高水平 Ptf1a 抑制内分泌分化而促进外分泌分化^[6, 8], 表明在胰腺发育过程中存在一个胰腺细胞内 Ptf1a 的表达调节机制。我们结合生物信息预测与双荧光素酶报告系统研究发现, miR-18a、miR-145 和 miR-495 能够靶向作用于 Ptf1a 3' UTR 抑制 Ptf1a 的表达。利用实时定量 RT-PCR 和免疫染色研究表明, miR-18a、miR-145 和 miR-495 在分化前的胰腺上皮中高表达, 在开始分化的胰腺上皮中表达急剧下调, 与 Ptf1a mRNA 及其蛋白质的表达呈负相关, 提示 miR-18a、miR-145 和 miR-495 在小鼠胰腺上皮分化前能抑制 Ptf1a 的表达, 进而抑制胰腺上皮的分化。在胰腺上皮分化过程中, miR-18a、miR-145 和 miR-495 是否通过细胞类型特异性表达引起 Ptf1a 的差异表达, 而导致胰腺上皮走向不同的分化命运还需进一步的研究。

致谢 感谢美国田纳西州范德堡(Vanderbilt)大学医学院 Chris Wright 赠送亲和纯化的兔抗 Ptf1a 抗体, 使本研究中免疫染色能够顺利完成。

参 考 文 献

- 1 Habener J F, Kemp D M, Thomas M K, *et al.* Transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology*, 2005, **146** (13): 1025~1034
- 2 Wessells N K, Cohen J H. Early pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions, and mass effects. *Developmental Biology*, 1967, **15**: 237~270
- 3 Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn*, 2004, **229**(1): 176~200
- 4 Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, *et al.* Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(4): 1607~1611
- 5 Naya F J, Naya F J, Huang H P, *et al.* Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal entero- endocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev*, 1997, **11**(18): 2323~2334
- 6 Krapp A, Knofler M, Ledermann B, *et al.* The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev*, 1998, **12**(23): 3752~3763
- 7 Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, *et al.* The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*, 2002, **32**(1): 128~134
- 8 Lin J W, Biankin A V, Horb M E, *et al.* Differential requirement for

- Ptf1a in endocrine and exocrine lineages of developing zebrafish pancreas. *Dev Biol*, 2004, **270**(8): 474~486
- 9 He L, Hannon G J. MiRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004, **5**(7): 522~531
- 10 Song L, Tuan R S. MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2006, **78** (2): 140~149
- 11 Lynn F C, Skewes-Cox P, Kosaka Y, *et al.* MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes*, 2007, **56**(12): 2938~2945
- 12 Kloosterman W P, Lagendijk A K, Ketting R F, *et al.* Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol*, 2007, **5** (8): 203
- 13 Griffiths-Jones S, Saini H K, van Dongen S, *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(Database issue): 154~158
- 14 Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, **120**(1):15~20
- 15 Teng C B, Guo Y S, Zhang H, *et al.* Identification and characterization of LRCs in mouse pancreas. *Differentiation*, 2007, **75**(8): 702~712
- 16 An Y, An T Z, Teng C B. miRNAs play an essential role in stem cell self-renewal and differentiation. *Hereditas (Beijing)*, 2009, **31** (2): 115~122
- 17 Krapp A, Knöfler M, Frutiger S, *et al.* The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO J*, 1996, **15**(16): 4317~4329
- 18 Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, *et al.* The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature Genetics*, 2002, **32**(1): 128~134

Identification of MicroRNAs Regulating Ptf1a Expression in Mouse Pancreas Development*

AN Yang**, YANG Yan-Kun**, GAO Fei, ZHU Kuan-Yu, MU Tan-Wei, TENG Chun-Bo***

(Laboratory of Animal Development Biology, College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract Ptf1a, also known as p48, is an important bHLH transcriptional factor, functioning as an integral part of a trimeric protein complex Ptf1, which is essential for fate determination and cell differentiation of pancreas. Recent studies have found that levels of Ptf1a in developing pancreas are closely related to the growth and differentiation of pancreatic cells, as well as the number of islet β cells. However, the regulatory mechanism of Ptf1a expression is still elusive. MicroRNAs are a class of approximately 22-nucleotide, non-coding RNAs, which regulate gene expression by cleaving target mRNAs or inhibiting their translation. In addition, some studies have indicated that miRNAs participate in regulating many processes in pancreatic development. Therefore, miRNAs may regulate the expression of Ptf1a in developing pancreas. In order to verify this hypothesis, four miRNAs which may regulate the expression of Ptf1a were firstly obtained by overlapping two prediction algorithms. Subsequently, by dual luciferase reporter system *in vitro*, three of the four miRNAs, miR-18a, miR-145 and miR-495, were proved to effectively inhibit Ptf1a expression, respectively, by binding to the 3' UTR of mouse Ptf1a mRNAs. Finally, expression patterns of miR-18a, miR-145 and miR-495 and Ptf1a were detected in the mouse pancreatic development *via* qRT-PCR and immunofluorescent staining. The results showed that the expression of miR-18a, miR-145 or miR-495 is negatively correlated with that of Ptf1a mRNA and protein. Accordingly, these results indicated that miR-18a, miR-145 and miR-495 may regulate the expression of Ptf1a in developing mouse pancreas.

Key words miRNAs, Ptf1a, pancreatic development, mouse

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00298

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30670304).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-451-82191785, E-mail: chunboteng@yahoo.com

Received: July 31, 2009 Accepted: September 23, 2009