

植物 microRNA 对重金属胁迫响应的调控*

丁艳菲^{1, 2)**} 朱 诚^{2, 1)**}, *** 王珊珊¹⁾ 刘海丽²⁾

¹⁾ 浙江大学生命科学院, 浙江大学植物生理学与生物化学国家重点实验室, 杭州 310029;

²⁾ 中国计量学院生命科学院, 杭州 310018)

镉是重要的重金属污染物, 它严重影响植物生长, 并危害人体健康. 植物的重金属耐受机理很复杂, 需从多个角度阐述. 但参与重金属应答的调节性基因研究较少, 重金属响应调控网络并不清楚. microRNA(miRNA)是一类新型的调控基因表达的小分子 RNA, 广泛参与植物的生长发育及多种逆境胁迫应答. 最近研究发现, miRNA 在水稻镉胁迫响应中扮演重要角色^[1]. miRNA 微阵列芯片分离得到了水稻中 19 个镉胁迫应答相关的 miRNA. 除了 miR528 表达显著上升, miR166、miR171、miR168、miR162、miR396、miR390、miR156、miR1432 和 miR444 等表达均下降. 这些 miRNA 基因启动子区的重金属响应元件(metal responsive element, MRE)和下游可能调控的靶基因的分析表明, miRNA 是镉胁迫应答调控网络中的重要成员, 且围绕 miRNA, 形成了若干新的重金属应答调控途径.

1 重金属抗性机理与 microRNA

重金属(镉、砷、汞等)引起的土壤污染问题日益严重. 重金属不仅影响植物的生长发育、品质及产量, 并可通过食物链进入人体, 危害人体健康. 植物在长期进化过程中, 产生了对重金属的多种抗性, 包括限制重金属离子吸收、重金属的外排、细胞壁束缚、跨膜转运、液泡储存、抗氧化响应等^[2-3]. 参与这些过程的重金属耐性基因逐渐得到鉴定与功能描述, 如植物螯合肽(phytochelatins, PC)和金属硫蛋白(metallothionein, MT)可络合重金属, 使重金属浓度降低. 低亲和性离子转运蛋白(low affinity cation transporter, LCT1)、ABC 型蛋白(ATP-binding cassette transporters, ABC)和天然抗性相关巨噬蛋白(natural resistance associated macrophage proteins, Nramp)等转运体也在重金属

抗性中发挥重要作用^[2-5]. 但是它们一般为直接参与代谢过程的功能性基因, 其基因表达调控网络并不清楚, 参与植物重金属胁迫应答的调节基因资源发掘尚待开展^[2-6]. MicroRNA(miRNA)就是一类新型的调控基因表达的小分子 RNA, 主要在转录后水平负调控靶基因的表达^[7-9]. 植物 miRNA 通过调控靶基因的表达, 广泛参与植物的生长发育、细胞代谢、器官形态建成、激素分泌、信号转导、胁迫应答等过程^[8-12].

近年来研究表明, miRNA 参与植物重金属胁迫应答^[12-13]. Yang 等发现在甘蓝型油菜和蒺藜苜蓿中, 部分 miRNA 的表达可受到镉的诱导与调节^[14-15]. 他们还构建镉胁迫下水稻幼苗的 small RNA 文库, 克隆了 19 个新的 miRNA, 并发现其中多数 miRNA 在镉胁迫下表达发生变化^[16]. Sunkar 等^[17]发现, 拟南芥在高铜、高铁胁迫下, miR398 表达降低, 其所调控的 Cu/Zn 超氧化物歧化酶表达上调, 从而提高了拟南芥对重金属胁迫的耐受性. 以上研究虽可鉴定重金属相关的 miRNA, 但多采用 Northern blot 和 RT-PCR 等方法, 这些方法费时耗力, 检测的通量不高. 生物芯片技术可高通量、高灵敏度、高特异性地检测 miRNA 的表达, 但它们自发展以来多应用于医学领域, 以检测 miRNA 在不同组织、不同发育时相、不同疾病状态下的表达

* 浙江省自然科学基金重点资助项目(Z3100327), 国家自然科学基金资助项目(31170251, 31071348), 中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室资助项目(090102), 2009 年度浙江省研究生创新科研项目资助.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0571-86914510, E-mail: pzhch@cjlu.edu.cn

收稿日期: 2011-09-28, 接受日期: 2011-11-09

为主^[18-20], 在植物 miRNA 研究方面应用较少. 直至近几年, 微阵列芯片技术才开始应用到植物 miRNA 的研究领域^[21-23]. 本实验即采用 miRNA 微阵列芯片技术, 检测镉胁迫下水稻 miRNA 的表达, 得到一批镉胁迫应答相关的 miRNA^[1]. 结合上游的重金属响应元件 MRE 分析以及下游的靶基因预测与验证等工作, 寻找并获得参与逆境胁迫响应的关键基因, 进而完善植物逆境胁迫响应的分子网络, 为利用生物技术手段改善作物的抗逆性提供依据.

2 镉胁迫相关 miRNA 的靶基因参与的代谢过程与信号通路

植物 miRNA 功能的发挥通过下游靶基因的表达调节而实现. 作者对微阵列芯片分离获得的镉胁迫相关 miRNA 的靶基因分析显示, 这些靶基因多为调节性基因, 包括调控下游基因表达的转录因子, 参与信号转导的信号分子如蛋白激酶、钙调素结合蛋白等^[1, 24].

2.1 转录因子

在镉胁迫相关 miRNA 的靶基因中, 转录因子占到绝大多数. 这些转录因子参与调控多种植物生长发育过程, 主要包括信号传导^[25]、细胞代谢^[26-27]、根与叶器官分化^[28-30]、花器官的形成与生殖^[31]等, 显示出 miRNA 在生物体基因表达调控网络中的中心位置^[11]. miR166 的靶基因即为一类转录因子: 同源异型域——亮氨酸拉链蛋白(homeodomain-leucine zipper protein, HD-Zip). miR166 通过调节 HD-Zip 转录因子的表达调控叶的极性、花器官、维管细胞和韧皮部细胞的发育, 进而影响植物的形态建成^[11, 29-30]. HD-Zip 转录因子除了调节植物的生长发育, 还在逆境胁迫响应中发挥作用. 拟南芥的 HD-Zip 转录因子 *Atb6-6/7/12* 受到干旱和外源 ABA 的诱导表达^[32]; 水稻的 HD-Zip 家族成员也受到干旱胁迫的调节^[33]. 这暗示逆境条件下植物生长调节过程中 miRNA 的潜在作用, 以及 miRNA 在逆境胁迫应答相关基因的表达调控网络中的重要地位.

2.2 蛋白激酶

miR390 的靶基因为富含亮氨酸的类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinase, RLK)^[34]. Lee 等^[35]发现水稻的 LRR 型类受体蛋白激酶 OsRLK1 受低温和盐胁迫诱导表达. 作者发现 RLK 蛋白激酶受镉胁迫诱导表达^[1]. 生物信息学分析表明, RLK 可能在胁迫响应及信号转导中发挥作用. 尽管重金属

应答过程中的信号转导研究较少^[2], 有关 RLK 蛋白激酶在重金属胁迫中的作用也尚未见报道, 镉胁迫相关 miRNA 的获得为研究参与重金属信号转导的蛋白激酶提供了思路. 重金属相关 miRNA 所调控靶标的进一步挖掘与研究, 可成为重金属耐性关键基因克隆鉴定的切入点.

2.3 钙信号分子

miR1432 和 miR444d 经预测靶向 EF 手型钙结合蛋白(EF hand calcium binding protein)和钙调素结合蛋白, 它们均为钙 - 钙调素信号传导途径中的重要蛋白^[36-37]. 钙调素(calmodulin, CaM)是一种钙结合蛋白, 它在信使系统 - 蛋白质磷酸化 - 细胞效应过程中具有重要作用, 介导多种生物和代谢过程. 而镉可诱导植物钙信号发生变化, 并诱导提高 CaM 基因的表达^[38]. 作者研究发现, miR1432 和 miR444d 在镉胁迫下表达下降, 暗示其靶基因钙调素结合蛋白和 EF hand 钙结合蛋白表达上升^[1]. 这一结果第一次通过 miRNA, 将钙信号与镉胁迫应答网络联系起来, 为进一步研究镉胁迫下植物钙信号转导的分子机制提供了思路(图 1).

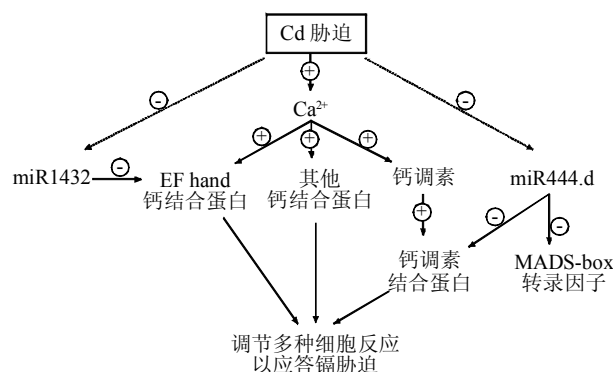


Fig. 1 Model proposed for cross talk between miRNA and Ca^{2+} and their role in the regulation of Cd response

图 1 miRNA 与 Ca^{2+} 信号转导在镉胁迫响应中的共同调节作用

+: 上调; -: 下调.

3 miRNA 对靶基因的表达调节及自身的上游表达调控

作者对 3 个 miRNA/靶基因对, miR166/HD-Zip、miR390/RLK 和 miR168/AGO, 进行镉胁迫不同时间下的表达检测, 结果表明, 这几个靶基因的表达虽然均受到其 miRNA 的负调控, 但它们并不是在所有时间点均呈现出绝对的负调控关系, 如镉胁迫 12 h miR166 与其靶基因 HD-Zip 均表达上调^[1].

Sire 等^[39]报道拟南芥中 miR171/*SCL6*、miR398/*CSD2* 也并非呈现出完美的相反表达模式. 这些暗示 miRNA 对靶基因的调控模式很复杂. 一种 miRNA 可调控多个靶基因和多个信号转导通路^[17, 26, 29], 有的则与其他 miRNA 共同调控一个靶基因^[30], miRNA 可在翻译水平负调控靶基因^[40], miRNA 也可受到其靶基因的反馈调控(miR168 的靶基因表达的 AGO 蛋白是 miRNA 生物合成与作用路径中的关键蛋白)^[41]. 镉胁迫下 miR168/*AGO* 的表达并不完全相反, 也暗示 miR168 既可介导其靶基因 *AGO* 的降解, 又可受到 *AGO* 对其表达的反馈调控^[1, 41].

在 miRNA 的调控网络中, miRNA 对下游靶基因的表达调控研究较多, 而 miRNA 自身的上游表达调控研究相对较少. Yamasaki 等^[42]研究发现, SPL7 转录因子通过结合 GTAC 顺式元件, 从而调控 miR398 的表达. 作者对水稻 miRNA 基因上游的顺式作用元件分析显示, 重金属响应元件 MRE 更多地存在于微阵列芯片分离得到的镉相关 miRNA 基因上游^[1]. 此结果暗示, 这些 miRNA 在镉胁迫响应过程中的地位: 围绕 miRNA, 其上游的调控因子与下游的靶基因组成了一个完整的调控网络. miRNA 处于基因表达调控的中心位置, 是基因进行精细调控必不可少的重要手段, 进而调节细胞的生命活动.

4 研究展望

随着 miRNA 微阵列芯片和 Solexa 测序等高通量技术的应用, 越来越多的植物 miRNA 得到克隆与鉴定, 但真正明确其功能的 miRNA 却很少. 作者利用 miRNA 微阵列芯片分离获得重金属镉胁迫相关的 miRNA, 初步探明了 miRNA 在镉胁迫应答基因调控网络中的地位. 但是这些 miRNA 究竟如何发挥作用? 其具体功能与作用机制是什么? miRNA 功能的发挥依赖于对其下游靶基因的表达调节. 因此, 重金属相关 miRNA 靶基因的进一步鉴定和功能探究应该成为未来研究的重点. miRNA 对靶基因的调控很复杂, 是否还存在其他的靶基因? 如果靶基因编码转录因子, 下游又可调控哪些基因? 值得研究.

与医学领域的 miRNA 研究相比, 多种小 RNA 技术在植物 miRNA 研究中应用较少^[43], 因此, 今后可利用 miRNA 的过表达和沉默、过表达 miRNA 作用位点突变的靶基因等技术手段, 进一步研究植

物 miRNA 在重金属胁迫应答中的功能及其作用机制, 这将有助于阐明植物对重金属耐性的生理分子机理及其中的信号通路, 也可为通过小分子 RNA 的遗传操作改良作物的抗逆性提供思路.

参 考 文 献

- [1] Ding Y, Chen Z, Zhu C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). J Exp Bot, 2011, **62**(10): 3563–3573
- [2] Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta, 2001, **212**(4): 475–486
- [3] Hall J L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J Exp Bot, 2002, **53**(366): 1–11
- [4] Cobbett C. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu Rev Plant Biol, 2002, **53**: 159–182
- [5] Kim D Y, Bovet L, Kushnir S, et al. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2006, **140**(3): 922–932
- [6] Jonak C, Nakagami H, Hirt H. Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. Plant Physiol, 2004, **136**(2): 3276–3283
- [7] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. Cell, 2009, **136**(4): 669–687
- [8] Jones-Rhoades M W, Bartel D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. Mol Cell, 2004, **14**(6): 787–799
- [9] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annu Rev Plant Biol, 2006, **57**: 19–53
- [10] 许振华, 谢传晓. 植物 microRNA 与逆境响应研究进展. 遗传, 2010, **32**(10): 1018–1030
Xu Z H, Xie C X. Hereditas(Beijing), 2010, **32**(10): 1018–1030
- [11] Rubio-Somoza I, Weigel D. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. Trends Plant Sci, 2011, **16**(5): 258–264
- [12] Khraiweh B, Zhu J K, Zhu J H. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. Biochim Biophys Acta, doi:10.1016/j.bbagrm.2011.05.001
- [13] Ding Y, Zhu C. The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. Biochem Biophys Res Commun, 2009, **386**(1): 6–10
- [14] Zhou Z S, Huang S Q, Yang Z M. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. Biochem Biophys Res Commun, 2007, **374**(3): 538–542
- [15] Xie F L, Huang S Q, Guo K, et al. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. FEBS Lett, 2007, **581**(7): 1464–1474
- [16] Huang S Q, Peng J, Qiu C X, et al. Heavy metal-regulated new microRNAs from rice. J Inorg Biochem, 2009, **103**(2): 282e–287
- [17] Sunkar R, Kapoor A, Zhu J K. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. Plant Cell, 2006, **18**(8): 2051–2065

- [18] 骆明勇, 田志刚, 徐 智, 等. 一种检测 microRNA 表达的微阵列芯片的研制及应用. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(1): 31-41
- Luo M Y, Tian Z G, Xu Z, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(1): 31-41
- [19] He P, Nie Z, Chen J, *et al.* Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori*. BMC Genomics, 2008, **9**: 248
- [20] 陈润生. MicroRNA, lncRNA 与神经退行性疾病. 生物化学与生物物理进展, 2010, **37**(8): 826-833
- Chen R S. Prog Biochem Biophys, 2010, **37**(8): 826-833
- [21] Liu H, Tian X, Li Y, *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. RNA, 2008, **14**(5): 836-843
- [22] Li B S, Qin Y R, Duan H, *et al.* Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*. J Exp Bot, 2011, **62**(11): 3765-3779
- [23] Zhou L G, Liu Y H, Liu Z C, *et al.* Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. J Exp Bot, 2010, **61**(15): 4157-4168
- [24] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. J Exp Bot, 2007, **58**(2): 221-227
- [25] Yoon E K, Yang J H, Lim J, *et al.* Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in *Arabidopsis* lateral root development. Nucleic Acids Res, 2010, **38**(4): 1382-1391
- [26] Rodriguez R E, Mecchia M A, Debernardi J M, *et al.* Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. Development, 2010, **137**(1): 103-112
- [27] Wang L, Gu X, Xu D, *et al.* miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in *Arabidopsis*. J Exp Bot, 2011, **62**(2): 761-773
- [28] Wu G, Poethig R S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. Development, 2006, **133**(18): 3539-3547
- [29] Boualem A, Laporte P, Jovanovic M, *et al.* MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. Plant J, 2008, **54**(5): 876-887
- [30] Jung J H, Park C M. MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis*. Planta, 2007, **225**(6): 1327-1338
- [31] Wang J W, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. Cell, 2009, **138**(4): 738-749
- [32] Söderman E, Hjelström M, Fahleson J, *et al.* The HD-Zip gene ATHB6 in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. Plant Mol Biol, 1999, **40**(6): 1073-1083
- [33] Agalou A, Purwantomo S, Overnäs E, *et al.* A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members. Plant Mol Biol, 2008, **66**(12): 87-103
- [34] Sunkar R, Girke T, Jain P K, *et al.* Cloning and characterization of microRNAs from rice. Plant Cell, 2005, **17**: 1397-1411
- [35] Lee S C, Kima J Y, Kima S H, *et al.* Trapping and characterization of cold-responsive genes from T-DNA tagging lines in rice. Plant Sci, 2004, **166**(5): 69-79
- [36] Lu C, Jeong D H, Kulkarni K, *et al.* Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(1): 4951-4956
- [37] Sunkar R, Zhou X F, Zheng Y, *et al.* Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. BMC Plant Biol, 2008, **8**(12): 25
- [38] 赵士诚. 镉诱导植物氧化代谢与钙信使的变化及分子机理[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008
- Zhao S C. Cadmium-induced Changes in Oxidative Metabolism and Calcium Messenger of Plant and Their Molecular Mechanisms [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008
- [39] Sire C, Moreno A B, Garcia-Chapa M, *et al.* Diurnal oscillation in the accumulation of *Arabidopsis* microRNAs, miR167, miR168, miR171 and miR398. FEBS Lett, 2009, **583**(6): 1039-1044
- [40] Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, *et al.* Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. Science, 2008, **320**(5880): 1185-1190
- [41] Vaucheret H, Mallory A C, Bartel D P. AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. Mol Cell, 2006, **22**(1): 129-136
- [42] Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, *et al.* SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2009, **21**(1): 347-361
- [43] 马 宁, 高 旭. 转基因动物在 microRNA 研究中的应用. 生物化学与生物物理进展, 2009, **36**(9): 1095-1100
- Ma N, Gao X. Prog Biochem Biophys, 2009, **36**(9): 1095-1100

Regulation of Heavy Metal Stress Response by Plant microRNAs*

DING Yan-Fei^{1,2)**}, ZHU Cheng^{2, 1)**}, WANG Shan-Shan¹⁾, LIU Hai-Li²⁾

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

⁽²⁾ College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract This paper focuses on the role of microRNAs (miRNAs) in response to cadmium (Cd) stress in rice. A number of Cd-responsive miRNAs in rice were identified by using microarray assay and quantitative Real-time PCR. The downstream targets were mainly regulatory genes which encoded transcription factors and protein kinases. These target genes were reported to be associated with metabolic processes and signal pathways. Promoter analysis showed that metal stress-responsive *cis*-elements tended to occur more frequently in the promoter regions of Cd-responsive miRNAs. These findings suggested that miRNAs played an important role in Cd tolerance in rice, and highlighted a heavy metal tolerance network involving miRNAs in plants.

Key words microRNA, cadmium, microarray, response, regulation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00354

*This work was supported by grants from Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Z3100327), The National Natural Science Foundation of China (31170251, 31071348), The State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute (090102) and 2009 Zhejiang Innovation Program for Graduates.

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-571-86914510, E-mail: pzhch@cjlu.edu.cn

Received: September 28, 2011 Accepted: November 9, 2011