

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720091152069

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**miR-466a 在转基因小鼠中的过表达显著干扰了 FVB 小鼠肾组织 OREBP/NFAT5 的表达并诱发了类似于人类尿崩症的表现型**  
**Transgenic overexpression of miR-466a significantly disturbs OREBP/NFAT5 renal expression and induces phenotypes that resemble diabetes insipidus in human**

刘颖

指导教师姓名: 杨云青 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 年 月

论文答辩时间: 年 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( 杨云青 )  
课题(组)的研究成果,获得( 杨云青 )课题(组)  
经费或实验室的资助,在( 杨云青 )实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略语对照表 .....	V
第一章 前言 .....	1
1.1 转基因小鼠 .....	1
1.2 MicroRNAs (miRNAs) .....	4
1.3 渗透调控转录因子 <i>OREBP/NFAT5</i> .....	7
1.4 本文的研究目的及科学意义 .....	9
第二章 材料与方法 .....	12
2.1 实验材料 .....	12
2.2 实验方法 .....	16
2.3 数据处理与统计学分析 .....	26
第三章 结果与分析 .....	27
3.1 mIMCD3 细胞中 miR-466a-3p/5p 对 <i>OREBP/NFAT5</i> 表达的影响 .....	27
3.2 设计和构建 miR-466a 过表达转基因小鼠.....	28
3.3 miR-466a-5p/3p 在 miR-466a 转基因小鼠肾脏和其它组织中的表达 .....	30
3.4 miR-466a <sup>Tg1</sup> 小鼠肾脏尿浓缩能力的变化.....	32
3.5 miR-466a 过表达对 <i>OREBP/NFAT5</i> 及其靶基因表达的影响 .....	36
3.6 miR-466a <sup>Tg1</sup> 体重和肾脏重量分析.....	38
3.7 miR-466(a/b/c/e)-3p 与 miR-200b、miR-717 的表达模式.....	38
第四章 讨论 .....	40
参考文献 .....	43
在学期间研究成果 .....	47
致谢.....	48

## Table of Content

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>V</b>
<b>Chapter I Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 Transgenic mice.....	1
1.2 MicroRNAs (miRNAs) .....	4
1.3 OREBP (osmotic response element-binding protein) .....	7
1.4 Aims and significance of the proposed research project .....	9
<b>Chapter II Materials and Methods</b> .....	<b>12</b>
2.1 Materials .....	12
2.2 Experimental methods.....	16
2.3 Statistical analysis .....	26
<b>Chapter III Results and Analysis</b> .....	<b>27</b>
3.1 The expression of OREBP/NFAT5 in mIMCD3.....	27
3.2 Design and production of transgenic mice.....	28
3.3 Kidney and other tissue overexpression of miR-466a-5p/3p in miR-466a transgenic mice.....	30
3.4 miR-466a transgenic overexpression causes urine concentrating defects	32
3.5 miR-466a transgenic overexpression causes significant alterations in the expression of OREBP/NFAT5 and many of its target genes .....	36
3.6 Body weight and kidney weight of miR-466a <sup>Tg1</sup> .....	38
3.7 The expression pattern of miR-466(a/b/c/e)-3p , miR-200b and miR-717 in cultured mIMCD3 cells .....	38
<b>Chapter IV Discussion</b> .....	<b>40</b>
<b>References</b> .....	<b>43</b>



<b>Publication</b> .....	<b>47</b>
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>48</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

**目的** miR-466(a/b/c/e)-5p/3p miRNAs 是两组高度保守的 miRNAs, 其中-5p 组间和-3p 组间 miRNAs 的序列几乎完全一样。生物信息学分析和我们的前期研究显示, miR-466 miRNAs 可能可以在肾组织中对渗透应激调控转录因子 *OREBP/NFAT5* 进行转录后表达调控。我们因此希望研究 miR-466a 在转基因小鼠中的过表达对小鼠肾组织 *OREBP/NFAT5* 的表达和小鼠尿液浓缩机制的影响。

**方法** 通过 PCR 从小鼠基因组中扩增 miR-466a 基因序列, 将片段插入鸡  $\beta$ -actin promoter 下游构建过表达质粒 pBact-miR-466a, 然后用限制性内切酶酶切将转基因片段释放出来用于显微注射受精卵制备 FVB 遗传背景的转基因小鼠。小鼠基因型鉴定通过剪尾巴提取基因组 DNA 进行 PCR 分析。通过 Real-time RT-PCR 检测 miR-466a、*OREBP/NFAT5*、*AQP2*、*AQP3*、*UT-A2* 在转基因小鼠肾脏中表达情况。收集 1.5-2 ml 野生型 (WT) 和 miR-466a 转基因 (miR-466a<sup>Tg1</sup>) 小鼠尿液和血清测定尿液和血清中钠离子、钾离子、钙离子、镁离子、氯离子、尿素、肌酐、白蛋白等溶质含量和渗透浓度。收集雄性 8 周龄 WT 和 miR-466a<sup>Tg1</sup> 小鼠 24 小时期间的水摄入量 and 尿液排出量数据。尿浓缩能力是采用对雄性 8 周龄 WT 和 miR-466a<sup>Tg1</sup> 小鼠腹腔注射 0.4  $\mu$ g/kg/mouse 去氨加压素 (dDAVP), 收集注射药物前尿液和注射药物后 2 小时尿液以分析尿液渗透压。

**结果** 我们已创立了三个品系的 miR-466a 转基因小鼠。Real-time RT-PCR 分析发现, miR-466a<sup>Tg1</sup> 小鼠肾脏皮质和髓质中 *OREBP/NFAT5* 表达量较 WT 降低了 30% ( $p < 0.001$ ) 和 20% ( $p < 0.01$ ), *SMIT* 表达量较 WT 降低了 40% ( $p < 0.001$ ), *AQP2* 表达量较 WT 分别降低了 26% ( $p < 0.05$ ) 和 33% ( $p < 0.05$ ), *AQP3* 表达量较 WT 分别降低了 30% ( $p < 0.01$ ) 和 46% ( $p < 0.001$ ), *UT-A2* 表达量较 WT 降低了 65% ( $p < 0.01$ ), *UT-A3/5* 表达量较 WT 降低了 50% ( $p < 0.01$ ), *UTB* 表达量较 WT 分别降低了 14% ( $p < 0.05$ ) 和 30% ( $p < 0.05$ )。miR-466a<sup>Tg1</sup> 小鼠 24 小时期间的水摄入量较 WT 多约 2ml ( $p < 0.001$ ), 24 小时期间的尿液排出量较 WT 升高约 2 倍 ( $p < 0.001$ )。miR-466a<sup>Tg1</sup> 注射 dDAVP 前后尿液渗透压较 WT 低约 500 mOsmol/kg ( $p < 0.01$ )。同时, miR-466a<sup>Tg1</sup> 小鼠尿液多种溶质含量较 WT 小鼠尿液均有所下降, 同时血清多种溶质含量较 WT 小鼠血清均有所上升。

**结论** miR-466a 在转基因小鼠的过表达显著抑制了渗透调控转录因子 *OREBP/NFAT5* 及其靶基因的表达, 进而显著影响小鼠的尿液浓缩机制。miR-466a 因而是渗透调控和尿液浓缩机制的重要调控基因。

**关键词:** miR-466a, *OREBP/TonEBP/NFAT5*, 转基因小鼠; 尿崩症

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

**Background** miR466(a/b/c/e)-5p/3p miRNAs are two groups of highly conserved miRNAs, with virtually identical sequences in either the -5p group or the -3p group. Bioinformatic analyses and our previous studies indicate that these groups of miRNAs might participate in the post-transcriptional regulation of osmoregulatory transcription factor OREBP/NFAT5 in the kidney. In this study, we created transgenic mice overexpressing miR-466a-5p/3p and investigated the transcriptional regulation of OREBP/NFAT5 by miR-466a-5p/3p and the impact of this regulation on renal osmoregulation.

**Methodology** The DNA fragments of mouse miR-466a were amplified from mouse genomic DNA through PCR amplification. The resultant PCR fragments were subcloned into a vector containing the chicken  $\beta$ -actin promoter, generating the miR-466a-5p/3p overexpression vector pBact-miR-466a. The DNA fragments suitable for pronuclear microinjection were released by restriction enzymes SalI and SmaI. In order to determine the genotype of the transgenic founders (FVB background) carrying the miR-466a transgene by PCR, genomic DNA of mice was extracted from tails. The renal cortical and medullary expression of miR-466a-5p/3p, *OREBP/NFAT5* and a few of the transcriptional target genes of OREBP were analyzed by real-time RT-PCR. After that, water intake, urine excretion, urine and serum solutes of the WT and miR-466a transgenic (miR-466a<sup>Tg1</sup>) 8-week male mice were analyzed. We also investigated the urine-concentrating ability by analyzing urine osmolality before and after dDAVP (0.4  $\mu$ g/kg/mouse) injection in male WT and miR-466a transgenic mice.

**Results** We have generated three lines of transgenic mice overexpressing miR-466a-5p/3p. We also demonstrated that transgenic overexpression of miR-466a-5p/3p greatly reduced the expression of *OREBP/NFAT5* mRNA in both the renal cortex and renal medulla, and a few *OREBP/NFAT5*-regulated genes were also significantly affected. Overexpression of miR466a-5p/3p in transgenic mice caused polyuria and polydipsia in transgenic mice, in part by repressing osmoregulatory

transcription factor OREBP/NFAT5. And miR-466a-5p/3p transgenic overexpression causes urine concentrating defects.

**Conclusion** Overexpression of miR466a-5p/3p in transgenic mice causes significant down-regulation of osmoregulatory transcription factor OREBP/NFAT5 and its target genes and results in defects in urine concentration and development of mild phenotypes of polydipsia and polyuria that resemble diabetes insipidus in human. miR466(a/b/c/e)-5p/3p therefore are important regulators of renal osmoregulation and urine concentration.

**Key words:** miR-466a, OREBP/TonEBP/NFAT5, transgenic mice, diabetes insipidus

## 缩略语对照表

缩略语	英文	中文
WT	Wild type	野生型
Tg	Transgenic	转基因的
UTA、UTB	urea transporter	尿素转运蛋白
AQP	aquaporin	水通道蛋白
miRNA	MicroRNA	微小 RNA
3'UTR	3'-untranslated region	3'非翻译区
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
dDAVP	1-deamino-8-D-arginine vasopressin	去氨加压素
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
Tris	trimethylsilyl	三(羟甲基)氨基甲烷
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠

厦门大学博硕士学位论文摘要库



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.