



大豆 MicroRNAs 功能性研究进展

刘峻呈, 汪芳, 冯晨, 汤晓智, 沈新春

(南京财经大学 食品科学与工程学院/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心/江苏高校粮油质量安全控制及深加工重点实验室, 江苏南京 210023)

摘要: MicroRNAs(miRNAs)是一类由 19~24 个核苷酸组成、在进化上高度保守的非编码小 RNA,能够在转录后水平实现基因的调控。miRNAs 通过调控内源性基因的表达参与大豆的生长发育、营养合成、生物胁迫以及非生物胁迫等过程。另外,miRNAs 的生物合成和作用机制在植物和动物之间具有高度相似性,而大豆 miRNAs 的高稳定性及生物可利用性促使其在两个物种间交叉作用的发生,即大豆 miRNAs 的跨物种调控。文章阐述了大豆 miRNAs 内源性调节及跨物种调控作用及其潜在应用价值,将为利用大豆 miRNAs 提高大豆品质、产量和改善人类营养健康提供理论依据。

关键词: 大豆;miRNAs;生长发育;胁迫;内源性调节;跨物种调控

Research Progress in Functions of Soybean MicroRNAs

LIU Jun-cheng, WANG Fang, FENG Chen, TANG Xiao-zhi, SHEN Xin-chun

(Food Science and Engineering College, Nanjing University of Finance and Economics/Collaborative Innovation Center of Modern Grain Circulation and Security of Jiangsu Province/Key Laboratory of Grain and Oil Quality and Safety Control and Deep Processing of Universities in Jiangsu Province, Nanjing 210023, China)

Abstract: MicroRNAs(miRNAs) are a group of non-coding small RNAs consisting of 19-24 nucleotides, which are highly conserved in evolution and can regulate genes at the post-transcriptional level. MicroRNAs(miRNAs) are involved in growth and development, nutrient synthesis, biotic stress and abiotic stress via regulating endogenous gene expression in soybean. Due to the high similarity of the biosynthesis and mechanism of miRNAs between plants and animals, the high stability and bioavailability of soybean miRNAs allow its being applied cross-species interactions between two species, which was considered as cross-kingdom regulations. In this review, we discussed the endogenous regulations and cross-kingdom regulations of soybean miRNAs and its potential applications, which provide the theoretical basis for its applications in improving the quality, nutritional values and yield of soybean as well as the human healthy.

Keywords: Soybean; miRNAs; Growth and development; Stress; Endogenous regulation; Cross-kingdom regulation

miRNAs 是真核生物中由初级转录物经一系列的剪切加工产生的一类具有调控功能的非编码小 RNAs,在转录后水平对基因表达起到重要的调节作用,降解靶 mRNAs 或抑制其翻译,是 miRNAs 调控基因的两种主要形式^[1]。miRNA(*lin-4*)于 1993 年秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中首次被发现^[2],随后 3 个研究小组于 2001 年分别从线虫、果蝇和人体中成功克隆出几十个类似 *lin-4* 的小分子 RNA,并将其命名为 microRNAs^[3-5]。研究者对于 miRNAs 的研究在各物种间不断开展,目前,已有数百个物种的上万条 miRNAs 被发现,miRNAs 在细胞分化、个体发育、疾病防治及应激反应中发挥了关键性的作用。植物 miRNAs 的系统性研究可追溯到 2002 年的拟南芥研究^[6-7],其后又开始了对于多种植物 miRNAs 的探索。2012 年,研究人员在哺乳动物的血清中发现了植物 miRNAs 的存在,提出其可以

通过胃肠道进入哺乳动物血液,进而转运到靶器官沉默相关基因的表达,首次揭示了植物 miRNAs 跨物种调控的能力^[8]。因此植物 miRNAs 开始被认为是一种潜在的“新型营养素”,甚至可能在人类疾病的治疗中起到关键性的作用。

大豆是世界范围内重要的农作物及人类主要膳食之一,目前大豆 miRNAs 已被广泛发掘,miRBase 数据库(miRBase 22 release)已收录栽培大豆(*Glycine max*)中 685 个前体 miRNAs 序列以及 757 个成熟 miRNAs 序列,野生大豆(*Glycine soja*)中 13 个前体 miRNAs 序列及 13 个成熟 miRNAs 序列。大豆 miRNAs 不但在大豆生长发育、生物及非生物胁迫以及结瘤固氮等方面展现出重要作用,同时在饮食递送、跨物种功能调控等方面的能力也相继被发现,图 1 为大豆 miRNAs 的内源性调节^[17]与跨物种调控途径^[18],大豆 miRNAs 能够通过饮食被人体

收稿日期:2019-04-11

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0400201);国家自然科学基金(21476103,31800280);江苏省自然科学基金(BK20180817);江苏省高校协同创新中心现代服务业项目(WTTFY01);江苏省研究生培养创新工程研究生科研与实践创新计划(KYCX18_1424)。

第一作者简介:刘峻呈(1994-),男,硕士,主要从事功能性食品与分子营养等研究。E-mail: JunChengL163@163.com。

通讯作者:沈新春(1966-),男,博士,教授,主要从事功能性食品与分子营养等研究。E-mail: shenxinchun@nufe.edu.cn。

吸收,其在改善大豆品质的同时,对人类健康有积极的调控作用,大豆 miRNAs 对于人体生理活性的潜在作用亟待深入研究。本研究将从大豆 miRNAs 对大豆内源性调节(生长发育、营养合成、生物胁迫及非生物胁迫)以及跨物种调控(饮食递送及功能

性调控)两个方面,阐述大豆 miRNAs 的相关研究及未来的潜在性应用,为更好地利用 miRNA 依据的生物技术培育高品质、高产量以及高营养价值的大豆品种提供理论依据。

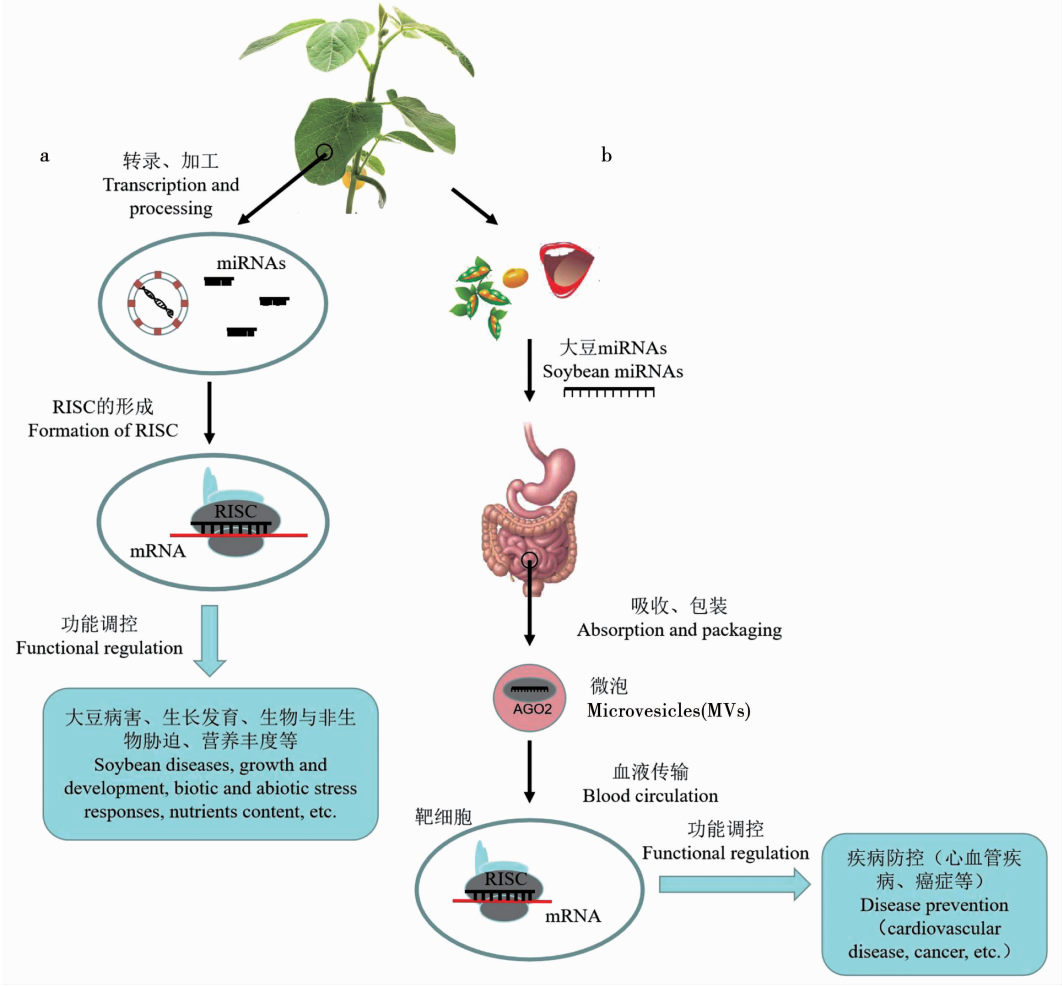


图1 大豆 miRNAs 的内源性调节(a)与跨物种调控(b)途径

Fig. 1 Endogenous regulation and cross-kingdom regulation of soybean miRNAs

1 miRNAs 对大豆生理功能的调控

大豆 miRNAs 在大豆生长的各个方面发挥着重要作用,大量研究表明,miRNAs 与大豆植株的组织分化(叶、根、茎、花等)、生长发育(从营养生长到繁殖生长)以及生物与非生物胁迫(病毒、干旱、低温、金属元素等)等有着密切的联系,因此基于大豆 miRNAs 调控机制的深入研究对于获取高品质的大豆具有重要的意义。

1.1 对大豆生长发育的调控

生长素、细胞分裂素以及乙烯等多种植物激素能够直接或间接地影响植物的生理过程,对植物生长发育具有重要的调节作用。大豆 miRNAs 作为一种转录后调控因子,在大豆的生长发育过程中不可忽视。gma-miR393 可以直接靶向生长素受体 TIR1 来调节 TIR1/AFBs 所介导的生长素信号,进而对大

豆结瘤起到关键性的调控作用^[9]。另外,研究显示大豆幼苗接种大豆根瘤菌后,gma-miR168 和 gma-miR172 在接种 3 h 后瞬间上调,随后 12 h 下降至基础水平。gma-miR159 和 gma-miR393 在 3 h 后显著上调,gma-miR160、164、166 及 169 等则出现下调现象。gma-miR160、164 以及 166 分别调节 *ARF17* (auxin response factor 17)、*NAC1* (NAM/AT-*AF/CUC1*)、以及 *HD-ZIP III* 的表达,与植物生长发育密切相关^[10]。miR160、164、166 及 169 在植物结瘤及发育中的调控机制在其它植物研究中也同样被证明^[11-14]。gma-miR167 显示可以通过抑制靶基因 *ARF8a* 和 *ARF8b* 影响生长素介导的大豆结瘤与根生长^[15],这些可能是大豆幼苗结瘤期间潜在的重要调控因子。李小平等^[16]研究发现外源生长素和黑暗处理能够诱导大豆第一复叶中 gma-miR160a 的表达,gma-miR160a 的过表达抑制了生长素响应因

子 *ARFs* 的水平,显著降低大豆叶片衰老标记基因 *CYASPI* 的表达,减缓了叶片衰老的进程。*miR172* 已被广泛证实可以通过调控植物中靶基因的表达进而控制开花时间及花器官的发育^[17-19]。研究发现,*gma-miR172a* 在开花期前,随着植物的生长水平不断增加,通过抑制其靶基因 *Glyma03g33470 (AP2)* 在 *GmGla* 介导的开花过程中发挥重要作用,同时增加了 *FT* (*flowering locus T*), *API* (*APETALA 1*) 和 *LFY* (*LEAFY*) 的表达以促进大豆中的开花^[20]。另外,当环境条件发生变化时,植物会自主地改变其发育进程,*miRNAs* 在此过程中起到关键性作用,能够调节包括开花时间、生长素合成等生理进程,有助于植物对于环境条件的适应^[21]。过表达 *gma-miR172c* 的植株则促进了植物在胁迫环境下的早期开花以响应非生物胁迫的影响^[22]。另一方面,*Kulcheski* 等^[23]通过检测花瓣,心皮和雄蕊组织中保守和新型大豆 *miRNAs* 的表达模式,发现了6个 *miRNAs* 在不同组织中的差异性表达,其中保守性 *gma-miR156* 及 *gma-miR396* 与植物繁殖过程密切相关。另一项研究显示过表达 *gma-miR156b* 能够调节植物生长发育的重要调控因子 *SPL* (*squamosa promoter-binding protein like*) 的水平,进而实现了大豆结构和产量的显著改善,这一发现为高产大豆的培育提供了理论依据^[24]。

1.2 对大豆营养物质合成的调控

大豆中含有丰富的营养成分,*miRNAs* 在大豆营养物质的生成和积累中能够起到一定的调节作用。*Gupta* 等^[25]从大豆种子中预测得到5个 *miRNAs* 可能参与到异黄酮途径的调控中,比较两种不同异黄酮含量的大豆基因型,分析发现在4个大豆种子发育时期中 *miRNAs* 出现差异性表达,其中 *gma-miR26* 和 *gma-miR28* 的差异表达显示与总异黄酮含量呈直接相关,其靶基因 *4-coumarate-CoA ligase* 以及 *Isoflavone 7-O-Glucosyltransferase* 是参与到异黄酮合成途径的2个合成酶。另外,*gma-miR393* 在响应大豆疫霉菌侵染的同时与异黄酮的合成有紧密的联系。敲除 *gma-miR393* 后大豆植株中两种异黄酮生物合成的关键酶 (*GmHID1*、*GmIFS1*) 表达显著下降,异黄酮化合物属于重要的抗菌化合物,这预示着 *gma-miR393* 介导的针对大豆疫霉菌的防御机制可能部分是由于其对异黄酮生物合成途径的正调节^[26]。另一方面,*Ye* 等^[27]研究发现大豆脂质代谢相关基因可能受28种 *miRNAs* 调控,同时发现33个 *miRNAs* 可以产生相应的 *phasiRNAs* 参与到大豆脂质代谢的调控过程中。此外,植物 *miR156* 可以靶向 *SPL9* 基因进而调控植物中花青素的积累^[28],*gma-miR156* 家族在大豆中的主要靶基因为 *SPL* 基因,尽管没有直接证据,但是其对花青素合成

的潜在调控作用值得我们关注。大豆 *miRNAs* 与次生代谢产物的联系亟待深入研究,基于 *miRNAs* 的大豆营养品质的改善,将为人类的生活和健康带来极大的利益。

1.3 对大豆生物胁迫的调控

生物胁迫(寄生虫、霉菌及病毒等)严重影响并制约了大豆的产量和品质,是影响大豆生长的关键性因素,研究表明大豆 *miRNAs* 的调控可能会成为预防大豆病害的新途径。

1.3.1 对大豆胞囊线虫胁迫的调控 大豆胞囊线虫是一种高度进化的植物寄生虫,可通过大豆根部寄生于大豆植株中生长,进而严重影响大豆的生长发育。已有文献表明宿主能诱导寄生虫的基因沉默^[29],因此 *miRNAs* 参与调控胞囊线虫基因表达的潜在机制可能成为防治植物害虫及病原体的新策略。研究发现, *gma-miR393*、*1507*、*1510*、*1515*、*171* 及 *2118* 这6种 *miRNAs* 可以调控大豆根中 *phasiRNA* 的合成从而响应大豆胞囊线虫的侵染。*gma-miR393* 可以靶向生长素受体 *TIR1/AFBs* (属于 *F-box* 家族) 参与植物的生长调控进而响应生物胁迫^[30]。此外,在感染大豆胞囊线虫的大豆植株中, *gma-miR319*、*169* 及 *390* 等多种 *miRNAs* 被发现参与到了对线虫的防控过程中^[31]。

1.3.2 对大豆疫霉菌胁迫的调控 大豆 *gma-miR393* 能够被大豆疫霉菌所诱导,其可以通过抑制生长素受体 *TIR1/AFBs* 的表达进而响应病原菌胁迫,并且低表达 *gma-miR393* 的大豆植株显示出对大豆疫霉菌的高敏感性^[26]。*gma-miR1510* 作为大豆 *miRNAs* 中的重要成员,在大豆疫霉菌胁迫中同样起到关键性的调节作用。*gma-miR1510* 在感染大豆疫霉菌期间被抑制,其可以通过调节抗病基因 *NBS-LRR* (*nucleotide binding site-leucine rich repeat*) 改变大豆对疫霉菌的抗性^[32]。*NBS-LRR* 基因是 *miRNAs* 中最丰富的靶基因之一,大豆中多种 *miRNAs* (*miR1507*、*1510*、*2109* 和 *5374* 等) 均可靶向 *NBS-LRR* 基因。到目前为止,抗病性是 *NBS-LRR* 蛋白最主要的功能之一^[33]。此外,受到大豆疫霉菌侵染时,大豆植株中的 *gma-miR1507*、*1508*、*1510*、*319*、*396*、*482* 等 *miRNAs* 的表达会受到疫霉菌的抑制,而 *gma-miR156* 及 *gma-miR171* 等则被诱导^[34]。

1.3.3 对大豆花叶病毒胁迫的调控 在大豆花叶病毒的侵染过程中, *gma-miR160*、*393* 及 *1510* 能够通过靶向生长素响应因子 *ARFs* (*auxin response factors*) 及抗病基因 *NBS-LRR* 从而降低病毒对大豆植株生长发育的影响^[35]。*ARFs* 是一类在植物信号转导和发育中起作用的转录因子,可以介导植物激素调节许多发育和生理过程, *miR160*、*167* 和 *390* 都可以直接或间接调控 *ARFs* 基因。此外, *gma-miR159a*

以及 gma-miR166 在病毒感染的大豆中表现出下调趋势,其中靶基因 *GST* (glutathione S-transferase)、*MYB* (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) 和 *HD-Zip III* (class III homeodomain-leucine zip) 可能参与与植物抗病性相关的程序性细胞死亡^[36]。

1.4 对大豆非生物胁迫的调控

在不同环境条件下,植物自身长期以来形成了一定的应对机制,这是一种复杂的、动态的调控过程,其在一定程度上保证了植物的正常生长与发育。其中,干旱、高盐、重金属、低温及营养等非生物胁迫是大豆生长发育过程中最主要的环境因素。

1.4.1 对干旱胁迫的调控 水分是植物生长与发育的重要条件,植物主要通过一系列的相关基因去响应干旱胁迫,其中 miRNAs 在这个过程中发挥了重要作用。gma-miR396 可以通过靶向生长调节因子 GRFs 家族 (growth-regulating factors) 调节大豆植株的发育并增强其耐旱性,在干旱条件下,其在叶中表达上升,根部表达降低,这种表达模式抑制了叶片的生长,减少了叶部水分的流失,同时促进根系的发育来增加水分吸收^[37],这显示出大豆 miRNAs 的空间特异性表达模式在胁迫响应中的关键作用。另一项研究显示, gma-miR166、2118a-5p 和 2118b-5p 可能通过调节 Glyma13g23680.1 (编码质子依赖性寡肽转运蛋白 POT) 和 Glyma02g10320.1 (编码 70 kD 热休克蛋白 HSP70) 基因参与大豆干旱胁迫应答^[38]。此外,过表达 gma-miR394a 的拟南芥植株表现出了更好的抗旱能力,这可能依赖于 gma-miR394a 对 F-box 基因的调控^[39]。F-box 作为最大的基因家族之一,广泛参与植物对干旱、盐碱及温度等非生物胁迫的应答,在调节植物生长发育和应激反应中具有重要作用^[40]。另外,miR169/NF-YA 是植物生长发育以及逆境响应过程中的关键调控模板^[41],过表达 gma-miR169c 可以通过抑制核因子 NF-YA3 (nuclear transcription factor Y subunit A-3) 基因,增强植物的耐旱性^[42]。除此之外,gma-miR172c 可以通过调节 *AP2* (apetala 2) 基因的表达增加植株的耐旱性及耐盐性,从而改善干旱和盐胁迫下植株的生长状况,同时加速了非生物胁迫下植物的早期开花^[23]。

1.4.2 对高盐胁迫的调控 在干旱与高盐胁迫下,大豆叶中的 gma-miR1510a 表达水平上调,其通过调控靶基因 *PPF1* (pisum sativum post-floral gene 1) 参与高盐胁迫及干旱胁迫的应答^[43]。另外,gma-miR166 在高盐胁迫下被诱导,其主要依赖于对靶基因 *PHB* (prohibitins) 的调控响应高盐胁迫。*PHB* 基因属于 HD-ZIP III 转录因子家族,gma-miR166a 的过表达抑制了拟南芥植株中 *PHB* 的表达并促进了植物本身的耐盐能力,揭示了 gma-miR166 在调控

大豆高盐胁迫方面的重要作用^[44]。

1.4.3 对金属胁迫的调控 金属离子对于植物的生长发育影响甚大,重金属在植物体内的过多积累会导致活性氧的积累,影响植物的正常发育。Huang 等^[45]通过 AlCl₃ 处理对铝具有耐受性 (BX10) 和敏感性 (BD2) 的两种大豆品种,测序分析鉴定了 32 种 miRNAs 响应 Al 胁迫。其中,大豆保守性 miRNAs (gma-miR169r、166k/o、390g、396c/k 等) 可能通过介导氧化应激以及根的生长响应 Al 胁迫。大豆特异性 miRNAs (gma-miR1507a、1507c-3p、5044 等) 可能通过靶向 *FPS1s* (farnesyl diphosphate synthase 1)、*NB-ARC* (nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, Rproteins and CED-4)、*SCPL1* (serine carboxypeptidase like 1) 等基因调控大豆对 Al 的耐受性。另一方面,gma-miR1535b 在大豆中可以响应 Cd 胁迫,其靶基因 Glyma07g38620.1 编码异戊基转移酶 (IPT),是催化从头合成细胞分裂素 (CK) 生物合成的第一步^[46]。除此之外,miR156、164 以及 390 与 Cd、Al、Mn、As、Hg 等具有紧密联系,这些为更好地研究大豆 miRNAs 在金属胁迫的调控机制中提供了参考^[47-48]。

1.4.4 对低温胁迫的调控 植物中多种 miRNAs (如 miR393、172 及 167 等) 可以响应低温胁迫,维持低温环境下植物的生长发育^[49]。李永光等^[50]发现 gma-miR1508a 与低温胁迫具有密切联系,在预测的 7 个靶基因中有 5 个与低温响应有关,其中靶基因 *PPR* (pentatricopeptide repeat) 在抵抗低温胁迫中可能起到了关键性作用^[51]。另一方面,诸多 miRNAs 能够响应大豆固氮结核时的冷胁迫,其中,gma-miR397a、166u、171p 表达上调,而 gma-miR169c、159b、319a 和 5559 的表达显著降低。gma-miR166u、169c 以及 171p 能够通过靶向 b-ZIP (basic leucine zipper)、HD-ZIP (homeodomain-leucine zip)、HAP2 等转录因子以及 GRAS 家族转录因子 (在植物生长发育以及胁迫响应中具有重要作用) 响应冷胁迫^[52]。

1.4.5 对营养胁迫的调控 大豆的生长需要磷、氮等多种营养素的支持,营养缺乏会严重延缓大豆发育过程,而 miRNAs 在应对营养胁迫中具有重要意义。吕春雨等^[53]通过构建过表达 gma-miR168 的转基因植株,在研究中发现 gma-miR168 能够提高植物对低磷的耐受性,gma-miR168 参与了脱落酸 (ABA) 和茉莉酸 (JA) 所介导的种子萌发信号,进而响应低磷胁迫,保证了植株的正常生长与发育。另一项研究显示,在低磷胁迫下,gma-miR399、2111 以及 159e-3p 显著上调,gma-miR169c/r 表达下调,它们通过参与调控相应的靶基因进而调节大豆对低磷胁迫的耐受性^[54]。另外,在短期及长期低氮胁迫下,大

豆根部与叶部表现出了不同 miRNAs 的差异表达,揭示了大豆 miRNAs 响应低氮胁迫的能力^[55]。表 1 总结了大豆 miRNAs 在不同方面的生理调控功能。

表 1 大豆 miRNAs 的功能调控

Table 1 The function regulation of soybean miRNAs

miRNA	靶基因 Target gene	功能 Function	miRNA 表达水平 Expression level of miRNA	参考文献 Reference
gma-miR26	4CL	调节大豆中异黄酮的合成	—	[25]
gma-miR28	IF7GT	调节大豆中异黄酮的合成	—	[25]
gma-miR156b	SPL	改善大豆植株的枝条结构和大豆产量	—	[24]
gma-miR159	GST	抵抗病毒侵染	下调	[36]
	MYB			
gma-miR160	MYB	调节大豆对低磷胁迫的耐受性	上调	[54]
	ARFs	抵抗大豆花叶病毒的侵染	上调	[35]
gma-miR164	NAC1	调节大豆结瘤	下调	[10]
		调节叶片衰老进程	—	[16]
		调节植物生长与发育	—	[10]
		抵抗病毒侵染	下调	[36]
gma-miR166	HD-ZIP III	调节大豆对高盐胁迫的耐受性	上调	[44]
		调节大豆的生长与发育	—	[10]
gma-miR167	b-ZIP	调节大豆固氮结节时对冷胁迫的耐受性	上调	[52]
	HD-ZIP			
gma-miR167	ARF8	调节大豆结瘤与侧根生长	—	[15]
gma-miR168	AGO1	调节大豆对低磷胁迫的耐受性	上调	[53]
gma-miR169	NF-YA	调节大豆对干旱胁迫的耐受性	下调	[42]
		调节大豆对低磷胁迫的耐受性	下调	[54]
gma-miR171p	HAP2	调节大豆固氮结节时对冷胁迫的耐受性	下调	[52]
	GRAS	调节大豆固氮结节时对冷胁迫的耐受性	上调	[52]
gma-miR172	AP2	增强植物的耐旱性及耐盐性,调节胁迫环境下植物的早期开花	上调	[22]
		调节大豆的早期开花	—	[20]
gma-miR393	TIR1/AFBs	调节大豆对大豆胞囊线虫的抗性	上调	[30]
		调节大豆对大豆疫霉菌的抗性	上调	[26]
		调节大豆生物胁迫下异黄酮的合成	上调	[26]
		调节大豆结瘤	在结瘤期间表现出不同的表达模式	[10]
gma-miR394a	ARFs	抵抗大豆花叶病毒的侵染	上调	[36]
	F-box	调节植物对干旱胁迫的耐受性	上调	[39]
gma-miR396	GRFs	调节大豆的生长发育,增强大豆耐旱性	叶部上调、根部下调	[37]
gma-miR399	PHOA	调节大豆对低磷胁迫的耐受性	上调	[54]
	PT5			
gma-miR1507	FPS1	调节大豆对 Al 胁迫的耐受性	下调	[45]
	NB-ARC			
gma-miR1508a	PPR	调节大豆对低温胁迫的耐受性	上调	[50]
				[32]
gma-miR1510	NBS-LRR	调节大豆对大豆疫霉菌及大豆花叶病毒的抗性	下调	[35]
				[32]
gma-miR1511	PPF1	调节大豆对干旱和高盐胁迫的耐受性	上调	[43]
	PPF1			

续表 1

miRNA	靶基因 Target gene	功能 Function	miRNA 表达水平 Expression level of miRNA	参考文献 Reference
gma-miR1522	ABC transporter	调节大豆中脂质合成		[27]
gma-miR1535b	<i>IPT</i>	调节大豆对 Cd 胁迫的耐受性	Cd 耐受植株中上调、 Cd 敏感植株中下调	[46]
gma-miR2111	<i>F-box</i>	调节大豆对低温胁迫的耐受性	上调	[52]
		调节大豆对低磷胁迫的耐受性	上调	[54]
gma-miR5044	<i>SCPL1</i>	减轻氧化应激,调节 Al 胁迫的耐受性	下调	[45]

2 大豆 miRNAs 是跨物种调控的潜在营养素

miRNAs 在细胞增殖分化、细胞凋亡、免疫调控、胚胎发育及生物标记物等方面具有重要意义,研究猜测超过 60% 的人类蛋白质编码基因受到 miRNAs 调节^[56],与肥胖、癌症、糖尿病等众多疾病息息相关。然而,miRNAs 的调节不仅限于内源性自主调节,而且还与饮食中 miRNAs 的外源摄取具有一定的联系。大豆作为全球范围内的主要饮食,同时含有丰富的 miRNAs,探究大豆 miRNAs 对于人体生理活性的调控功能具有深远意义。

2.1 大豆 miRNAs 的稳定性及膳食递送

植物 miRNAs 在 Dicer 加工之后存在甲基化现象,相对于动物 miRNAs 来说,3'末端的甲基化可能使得植物 miRNAs 更加稳定^[57]。Anna 等^[58]在大豆储存、加工、蒸煮和早期消化过程中通过实时 PCR 测定了 3 种 miRNAs(gma-miR166、167 及 168)的水平,与新鲜大豆相比,在贮藏、加工和蒸煮处理后的大豆中 3 种 miRNAs 的含量无明显变化,在蒸煮后的汤汁中也检测到了高水平的 miRNAs。同时,模拟消化试验显示在 75 min 的早期阶段消化之后,大豆 miRNAs 仍具有较好的完整性。因此,大豆 miRNAs 在食品加工及饮食消化过程中具有一定的稳定性,这为大豆 miRNAs 的膳食递送提供了基本条件。

植物 miRNAs 的膳食摄入机制尚不清楚,但目前认为植物成熟的 miRNAs 在饮食后于肠道吸收并被 MVs 包裹,然后通过血液循环进入体内的各个部位^[8]。近年,研究表明人体中存在大量的大豆 miRNAs,在 410 个可获得的公共小 RNA 测序数据集中,研究人员统计到几十种大豆 miRNAs 家族的存在,常见的如 gma-miR5368、156、159 以及 168 等^[59]。Chin 等^[60]在人血清中也发现了大量大豆 miRNAs 的存在,最终共鉴定得到 98 种大豆 miRNAs,其中 gma-miR159、166 及 156 等家族含量较高。Lukasik 等^[61]在猪及人的母乳外泌体中同样检测到了大豆 miRNAs 的存在,进一步证实了大豆 miRNAs 的饮食递送能力。在早期的研究中,Zhang

等^[8]发现在中国健康人体的血清中存在大约 30 种已知的植物 miRNAs,其中包含大量相同序列的大豆保守 miRNAs。由此可见,大豆 miRNAs 具有通过胃肠道进入人体或其它哺乳动物体内的能力,这预示着大豆 miRNAs 可能作为一种微量的新型营养素在人体中发挥着潜在的调控作用。

2.2 大豆 miRNAs 的潜在功能性

miRNAs 的生物合成和作用机制在动物和植物之间显示出高度的相似性,正是由于这种高度的相似性,为植物 miRNAs 的跨物种调控奠定了基础。近年来,大豆^[8]、水稻^[60]、金银花^[62]以及生姜^[63]等多种植物 miRNAs 的跨物种调控现象已被报道。表 2 总结了植物 miRNAs 的跨物种调控的最新研究成果,其中涉及了多种大豆 miRNAs 的跨物种调控作用。Chin 等^[60]在人血清及组织中检测到于大豆中高水平表达的 gma-miR159a-3p,并且其丰度与乳腺癌的发生呈负相关。模拟合成的 gma-miR159a-3p 类似物的体内和体外试验结果表明, gma-miR159a-3p 能够通过靶向编码 Wnt 信号转录因子的 TCF7 导致致癌基因 MYC 水平降低,进而抑制乳腺癌细胞生长。同时,gma-miR159a 经口服后显示出对小鼠体内乳腺肿瘤的显著抑制作用。证明大豆 miRNAs 可能是一种天然营养素,通过饮食摄入进而起到抑制肿瘤发生的关键性作用。因而经常以大豆为食有助于减小癌症的发病率,尤其是在乳腺癌、结肠癌等常见癌症的防治方面。另一方面,Hou 等^[64]研究发现在大豆及拟南芥等植物中具有相同的保守性序列的 miR156a 可以通过靶向人连接黏附分子 A (JAM-A) 基因,降低人主动脉内皮细胞 (HAEC) 在炎症诱导情况下的细胞黏附,表现出其在动脉粥样硬化防控方面的调控能力。除此之外,miR156a 还被发现可以通过调控 JAM-A 基因来抑制鼻咽癌细胞株上皮间充质转化,进而调控癌细胞的转移能力^[65]。尽管目前相关研究较少,然而大豆 miRNAs 的潜在功能性表明了其在疾病防治中的重要性,大豆作为 miRNAs 含量丰富且食用广泛的粮食作物之一,大豆 miRNAs 的跨物种研究具有重要意义,其可能成为调节哺乳动物健康的新一类微量营养素。

表2 植物 miRNAs 的跨物种调控
Table 2 The cross-kingdom regulation of plant miRNAs

miRNA	来源 Source	调控对象 Regulatory object	靶基因 Target gene	功能 Function	参考文献 Reference
miR159a	大豆、拟南芥、西兰花等	哺乳动物	<i>TCF7</i>	抑制乳腺癌细胞的增殖	[60]
miR156a	大豆、拟南芥、西兰花等	哺乳动物	<i>JAM-A</i>	降低人主动脉内皮细胞在炎症诱导情况下的细胞黏附	[64]
				抑制癌细胞上皮间充质转化,进而影响肿瘤细胞迁移及侵袭能力	[65]
miR168a	大豆、水稻、玉米等	哺乳动物	<i>LDLRAP1</i>	抑制 LDLRAP1 在肝脏中的表达,进而减少了小鼠血浆中 LDL 的去除	[8]
			<i>MYBPC1</i>	下调骨骼肌肌蛋白结合蛋白 1 的表达	[66]
miR2911	金银花	流感 A 病毒	<i>PB2, NSI</i>	抑制流感 A 病毒的复制	[62]
miR7267-3p	生姜	鼠李糖乳杆菌	<i>ycnE</i>	通过调节小鼠肠道中 <i>LGG</i> 基因的表达改善小鼠结肠炎	[63]

3 展 望

大豆作为全球范围内重要的粮食作物,品质的改善及产量的增收意义重大,利用 miRNAs 改善大豆产量和品质将成为一种新的手段。然而,大豆 miRNAs 的相关研究与应用依然不够成熟,亟待研究人员的深入探索。首先,在内源性调控方面目前研究多在逆境胁迫和生长发育方面对大豆 miRNAs 表达水平进行鉴定,而其调控机制的研究相对较少。其次,大豆中仍有大量在调控过程中可能起到了不可忽视作用的新 miRNAs 需要开发与鉴定,其大多数的功能对于我们来说仍是未知的。另外,大豆 miRNAs 在胁迫响应及生长发育中的调控机制是一个系统且复杂的过程,涉及多个 miRNAs 的不同表达模式,探索这种表达模式的特异性对于深入了解 miRNA 的调控机制意义重大。

另一方面,在跨物种调控方面大豆一直以来被作为良好的营养膳食,古时曾被视为一种中药材,在抗氧化、降血脂、预防癌症等方面具有一定的作用。大豆 miRNA 在人类未来健康改善中起到不可忽视的作用,随着对大豆的开发与利用,大豆的营养价值被研究者所重视,但是大豆中的功能性成分仍未被完全发现。miRNAs 极有可能是大豆中新一类营养因子,能够通过饮食摄入进而改善人体健康。但是,相关领域的研究仍面临众多问题,首先,生物信息学预测的假阳性率较高,确定靶基因难度较大,需要进一步借助蛋白质组学及基因组学等技术手段确认,健全和完善相关靶标预测分析系统将会成为该领域研究的一大助力。其次,miRNAs 的膳食摄入、体内传递等相关机制尚不清晰,其吸收是否具有选择性还需从更多层面进一步地研究与探讨。此外,miRNAs 不仅直接作用于哺乳动物的

靶基因,还可能通过调节肠道菌群等间接调控哺乳动物的生理功能,因此作用对象的广泛性进一步增加了相关研究的难度。

4 结 论

大豆 miRNAs 在内源性调节与跨物种调控中发挥着重要作用,miRNAs (如 gma-miR156 及 gma-miR159 等)不仅是大豆生长发育中重要的调节因子,而且通过饮食摄入后对人类疾病的防治意义重大。深入研究大豆 miRNAs 的功能作用、探索内源性调节与跨物种调控的潜在联系将为未来新型优良大豆的育种指引新方向。

参考文献

[1] Wagner A E, Piegholdt S, Ferraro M, et al. Food derived microRNAs[J]. Food & Function, 2015, 6(3): 714-718.

[2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.

[3] Lagosquintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science, 2001, 294(5543): 853-858.

[4] Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *C. elegans*[J]. Science, 2001, 294(5543): 858-862.

[5] Lee R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. Science, 2001, 294(5543): 862-864.

[6] Llave C, Carrington J C. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. Science, 2002, 297(5589): 2053-2056.

[7] Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, et al. MicroRNAs in plants[J]. Genes Development, 2002, 16(13):1616-1626.

[8] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant miR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA[J]. Cell Research, 2012, 22(1):

- 107-126.
- [9] Cai Z, Wang Y, Zhu L, et al. GmTIR1/GmAFB3-based auxin perception regulated by miR393 modulates soybean nodulation [J]. *New Phytologist*, 2017, 215(2): 672-686.
- [10] Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, et al. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 160-174.
- [11] Llave C, Xie Z X, Kasschau K D, et al. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA[J]. *Science*, 2002, 297(5589): 2053-2056.
- [12] Guo H, Xie Q, Fei J, et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to down regulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(5): 1376-1386.
- [13] Carlsbecker A, Lee J Y, Roberts C J, et al. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate[J]. *Nature*, 2010, 465(7296): 316-321.
- [14] Combier J P, Frugier F, de Billy F, et al. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(22): 3084-3088.
- [15] Wang Y, Li K, Chen L, et al. MicroRNA167-directed regulation of the auxin response factors GmARF8a and GmARF8b is required for soybean nodulation and lateral root development [J]. *Plant Physiology*, 2015, 168(3): 984-999.
- [16] 李小平, 曾庆发, 张根生, 等. 大豆 microRNA 基因 Gm-MIR160A 负调控植物叶片衰老进程[J]. *广西植物*, 2015, 35(1): 84-91. (Li X P, Zeng Q F, Zhang G S, et al. Gm-MIR160A, a class of soybean microRNA gene, negatively regulates progress of leaf senescence[J]. *Guihaia*, 2015, 35(1): 84-91.)
- [17] Aukerman M J, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-Like target genes[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2730-2741.
- [18] Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development[J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2022-2025.
- [19] Zhu Q H, Helliwell C A. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(2): 487-495.
- [20] Wang T, Sun M Y, Wang X S, et al. Over-expression of GmGla-regulated soybean miR172a confers early flowering in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(5): 645-653.
- [21] Gyula P, Baksa I, Tóth T, et al. Ambient temperature regulates the expression of a small set of sRNAs influencing plant development through NF-YA2 and YUC2 [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2018, 16(5): 356-371.
- [22] Li W, Wang T, Zhang Y, et al. Overexpression of soybean miR172c confers tolerance to water deficit and salt stress, but increases ABA sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(1): 175-194.
- [23] Kulcheski F R, Molina L G, Da F G, et al. Novel and conserved microRNAs in soybean floral whorls[J]. *Gene*, 2016, 575(2): 213-223.
- [24] Sun Z, Su C, Yun J, et al. Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soybean plants *via* the manipulation of Gm-miR156b [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(1): 50-62.
- [25] Gupta O P, Nigam D, Dahuja A, et al. Regulation of isoflavone biosynthesis by miRNAs in two contrasting soybean genotypes at different seed developmental stages [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 567-583.
- [26] Wong J, Gao L, Yang Y, et al. Roles of small RNAs in soybean defense against *Phytophthora sojae* infection [J]. *The Plant Journal*, 2014, 79(6): 928-940.
- [27] Ye C Y, Xu H, Shen E H, et al. Genome-wide identification of non-coding RNAs interacted with microRNAs in soybean [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 743-753.
- [28] Gou J Y, Felippes F F, Liu C J, et al. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1512-1522.
- [29] Sindhu A S, Maier T R, Mitchum M G, et al. Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: Expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 60(1): 315-324.
- [30] Xu M, Li Y, Zhang Q, et al. Novel miRNA and phasiRNA biogenesis networks in soybean roots from two sister lines that are resistant and susceptible to SCN race 4 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): 110-119.
- [31] Li X, Wang X, Zhang S, et al. Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): 1-10.
- [32] Cui X, Yan Q, Gan S, et al. Overexpression of gma-miR1510a/b suppresses the expression of a NB-LRR domain gene and reduces resistance to *Phytophthora sojae*[J]. *Gene*, 2017, 621: 32-39.
- [33] Mchale L, Tan X, Koehl P, et al. Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards[J]. *Genome Biology*, 2006, 7(4): 1-11.
- [34] 郭娜, 崔晓霞, 赵晋铭, 等. 大豆疫霉根腐病相关 miRNA 的鉴定[J]. *大豆科学*, 2015, 34(4): 666-670. (Guo N, Cui X J, Zhao J M, et al. Identification of miRNA resistant to *phytophthora* root rot in soybean [J]. *Soybean Science*, 2015, 34(4): 666-670.)
- [35] Yin X, Wang J, Cheng H, et al. Detection and evolutionary analysis of soybean miRNAs responsive to soybean mosaic virus[J]. *Planta*, 2013, 237(5): 1213-1225.
- [36] Jossey S. Role of virus genes in seed and aphid transmission and development of a virus-induced gene silencing system to study seed development in soybean [J]. *Dissertations & Theses-Gradworks*, 2012, 38(3): 28-34.
- [37] Liu W C, Zhou Y G, Li X W, et al. Tissue-specific regulation of gma-miR396 family on coordinating development and low water availability responses [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1112.
- [38] 张彦琴, 董春林, 杨丽莉, 等. 大豆抗旱品种响应干旱胁迫的分子机理[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(12): 3514-3520. (Zhang Y Y, Dong C L, Yang L L, et al. Molecular mechanism of drought-resistant soybean variety[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(12): 3514-3520.)
- [39] Ni Z, Hu Z, Jiang Q, et al. Overexpression of gma-miR394a confers tolerance to drought in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 427(2): 330-335.
- [40] 贾琪, 孙松, 孙天昊, 等. F-box 蛋白家族在植物抗逆响应中

的作用机制[J]. 中国生态农业学报, 2018, 166(8): 39-50. (Jia Q, Sun S, Sun T H, et al. Mechanism of F-box protein family in plant resistance response to environmental stress[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2018, 166(8): 39-50.)

[41] 徐妙云, 朱佳旭, 张敏, 等. 植物 miR169/NF-YA 调控模块研究进展[J]. 遗传, 2016, 38(8): 700-706. (Xu M Y, Zhu J X, Zhang M, et al. Advances on plant miR169/NF-YA regulation modules[J]. Hereditas, 2016, 38(8): 700-706.)

[42] Ni Z, Hu Z, Jiang Q, et al. GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress[J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82(1-2): 113-129.

[43] 王兴超. 大豆 miR1510a 的表达分析及功能验证[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016. (Wang X C. Expression and functional analysis of soybean miR1510a[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.)

[44] Htwe N M P S. 大豆逆境胁迫诱导的 miRNA 鉴定及功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015. (Htwe N M P S. Identification of stress induced miRNAs and their functional analysis in soybean[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.)

[45] Huang S C, Lu G H, Tang C Y, et al. Identification and comparative analysis of aluminum-induced microRNAs conferring plant tolerance to aluminum stress in soybean[J]. Biologia Plantarum, 2017, 62(1): 97-108.

[46] Fang X L, Zhao Y Y, Ma Q B, et al. Identification and comparative analysis of cadmium tolerance-associated miRNAs and their targets in two soybean genotypes[J]. PLoS One, 2013, 8(12): 1-13.

[47] 张路, 王利华, 桂和荣, 等. 土壤重金属胁迫与植物相关 miRNA 的研究进展[J]. 北方园艺, 2017, 41(18): 180-185. (Zhang L, Wang L H, Gui H R, et al. Progress on the soil heavy metal stress and associated miRNA of plant[J]. Northern Horticulture, 2017, 41(18): 180-185.)

[48] Noman A, Aqeel M. miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth[J]. Environmental Science & Pollution Research, 2017, 24(11): 10068-10082.

[49] 王丽丽, 赵统利, 葛金涛, 等. 植物低温胁迫响应 miRNAs 在植物抗寒研究中的应用前景[J]. 上海农业学报, 2017(6): 129-134. (Wang L L, Zhao T L, Ge J T, et al. Application prospects of plant cold-stress-responsive miRNA in cold resistance research of plants[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2017(6): 129-134.)

[50] 李永光, 艾佳, 王涛, 等. 大豆 gma-miR1508a 靶基因预测及功能分析[J]. 大豆科学, 2014, 33(4): 483-487. (Li Y G, Ai J, Wang T, et al. The target genes prediction and analysis of gma-miR1508a[J]. Soybean Science, 2014, 33:483-487.)

[51] 倪志勇, 于月华, 任燕萍, 等. 大豆 gma-miR1508a 靶基因鉴定及植物表达载体构建[J]. 大豆科学, 2015, 34(6): 1090-1092. (Ni Z Y, Yu Y H, Ren Y P, et al. Validation of selected gma-miR1508a targets and construction of its plant expression vectors[J]. Soybean Science, 2015, 34(6): 1090-1092.)

[52] Zhang S, Wang Y, Li K, et al. Identification of cold-responsive miRNAs and their target genes in nitrogen-fixing nodules of soybean[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 13596-13614.

[53] 吕春雨, 沙爱华. 大豆 microRNA168 调控植物低磷胁迫响应[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(3):321-325. (Lyu C Y, Sha A H. Response to phosphorus deficiency regulated by microRNA168 in soybean plant[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2017, 39(3):321-325.)

[54] Xu F, Liu Q, Chen L, et al. Genome-wide identification of soybean microRNAs and their targets reveals their organ-specificity and responses to phosphate starvation[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 66-95.

[55] 王业建. 大豆对低氮胁迫的形态和生理学响应及介导低氮胁迫 miRNA 的鉴定[D]. 长沙: 中南大学, 2013. (Wang Y J. Morphological and biological responses of different soybean varieties to low nitrogen and identification of low nitrogen regulated miRNA[D]. Changsha: Central South University, 2013.)

[56] Dziedzic M, Powrózek T, Orłowska E, et al. Relationship between microRNA-146a expression and plasma reninase levels in hemodialyzed patients[J]. PLoS One, 2017, 12(6): 157-163.

[57] 汪劫. 闯入动物王国的植物 miRNA[J]. 生命的化学, 2016(3): 404-408. (Wang J. Plant miRNAs that break into the animal kingdom[J]. Chemistry of Life, 2016, 3: 404-408.)

[58] Anna P, Ferro V A, Tate R J. Determination of the potential bioavailability of plant microRNAs using a simulated human digestion process[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2015, 59(10): 1962-1972.

[59] Liu Y C, Chen W L, Kung W H, et al. Plant miRNAs found in human circulating system provide evidences of cross kingdom RNAi[J]. BMC Genomics, 2017, 18(2 suppl.): 112-117.

[60] Chin A R, Fong M Y, Somlo G, et al. Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159[J]. Cell Research, 2016, 26(2): 217-228.

[61] Lukasik A, Zielenkiewicz P. In silico identification of plant miRNAs in mammalian breast milk exosomes-a small step forward[J]. PLoS One, 2014, 9(6): 83-94.

[62] Zhen Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses[J]. Cell Research, 2015, 25(1): 39-49.

[63] Teng Y, Ren Y, Sayed M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota[J]. Cell Host & Microbe, 2018, 24(5): 637-652.

[64] Hou D, He F, Ma L, et al. The potential atheroprotective role of plant miR156a as a repressor of monocyte recruitment on inflamed human endothelial cells[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2018, 57(15): 197-205.

[65] Tian Y, Cai L, Tian Y, et al. miR156a mimic represses the epithelial-mesenchymal transition of human nasopharyngeal cancer cells by targeting junctional adhesion molecule A[J]. PLoS One, 2016, 11(6): 1-21.

[66] 潘峰. 植物 miRNA-I68a 跨界调控人基因表达再分析[D]. 泉州: 华侨大学, 2016. (Pan F. A step further analysis of cross-kingdom regulation of miRNA-I68a in human cells [D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2016.)