

miR-130b 靶向 *PPAR γ* 抑制家兔前体脂肪细胞分化

何洪炳, 蔡明成, 梁小虎, 贾先波, 赖松家*

(四川农业大学动物科技学院 动物遗传育种研究所, 成都 611130)

摘要: 旨在探究 miR-130b 是否可通过靶向 *PPAR γ* 抑制家兔前体脂肪细胞的分化。采集初生新西兰仔兔肾周脂肪细胞进行原代培养, 鸡尾酒法诱导分化后, 用 RT-qPCR 分别测定前体脂肪细胞分化第 0、第 2、第 6、第 10 天 miR-130b 表达量及 *PPAR γ* (Peroxisome Proliferators-Activated Receptor γ , *PPAR γ*) 和 *C/EBP α* (CCAAT/enhancer binding protein α , *C/EBP α*) mRNA 的表达量, 生物信息学软件鉴定 miR-130b 的同源性, 预测 miR-130b 的靶基因; 前体脂肪细胞转染 miR-130b mimic 和 miR-130b inhibitor 后, 检测 miR-130b、*PPAR γ* 和 *C/EBP α* 的表达差异, 用油红 O 染色鉴定前体脂肪细胞分化程度。结果表明: 1) 在前体脂肪细胞分化过程中, miR-130b、*PPAR γ* 和 *C/EBP α* 表达量存在差异; 分化第 8 天时, 油红染色发现大量橘红色脂滴; 生物信息学软件预测 *PPAR γ* 可作为 miR-130b 的靶基因, 且 miR-130b 在哺乳动物中具有较高的同源性。2) 过表达 miR-130b 后, mimic 组 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 的表达量极显著低于 NC 组 ($P < 0.01$)。3) 抑制表达 miR-130b 后, inhibitor 组 *PPAR γ* 的表达量极显著高于 inhibitor NC 组 ($P < 0.01$), inhibitor 组 *C/EBP α* 表达量显著高于 inhibitor NC 组 ($P < 0.05$)。4) 油红 O 染色显示分化程度: inhibitor 组 $>$ NC 组 $>$ mimic 组。综上所述, miR-130b 在家兔前体脂肪细胞分化过程中差异表达, 且可通过靶向 *PPAR γ* 抑制前体脂肪细胞分化。

关键词: miR-130b; 家兔; 前体脂肪细胞; *PPAR γ*

中图分类号: S829.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)11-2076-08

miR-130b Inhibits the Differentiation of Rabbit Preadipocytes by Targeting *PPAR γ*

HE Hong-bing, CAI Ming-cheng, LIANG Xiao-hu, JIA Xian-bo, LAI Song-jia*

(Institute of Animal Genetics and Breeding, College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The aim of this study was to demonstrate that miR-130b could target *PPAR γ* to inhibit the differentiation of rabbit preadipocytes. Primary perirenal preadipocytes of New Zealand young rabbits were cultured and induced differentiation by cocktail as *in vitro* experimental model, and then the expression of miR-130b, *PPAR γ* and *C/EBP α* at 0, 2, 6, 10 d during differentiation were determined by RT-qPCR. Bioinformatics softwares were used to identify homology and predict target genes of miR-130b; The preadipocytes were transfected with miR-130b mimic and miR-130b inhibitor *in vitro*, and the expression of miR-130b, *PPAR γ* and *C/EBP α* were detected. The preadipocytes were stained with Oil Red O. The results showed that: 1) In the process of preadipocyte differentiation, the expression of miR-130b, *PPAR γ* and *C/EBP α* were variant; There were a large orange red lipid droplets with Oil Red O staining in the preadipocytes differentiated for 8 days; Bioinformatics software predicted that *PPAR γ* could be used as the target gene of miR-130b, and the sequence of miR-130b had a high homology in mammals. 2) After overexpression of miR-130b, the expression of *PPAR γ* and *C/EBP α* in mimic group were very signifi-

收稿日期: 2017-06-06

基金项目: 国家兔产业技术体系 (CARS-44-A-2); 优质特色兔配套系选育与育种材料创新 (2016NYZ0046)

作者简介: 何洪炳 (1992-), 男, 四川仪陇人, 硕士, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: 59842112@qq.com

* 通信作者: 赖松家, 教授, 主要从事牛、兔遗传育种研究, E-mail: laisj5794@163.com

cantly lower than that in NC group ($P < 0.01$). 3) After knockdowned miR-130b, the expression of PPAR γ in inhibitor group was very significantly higher than that in inhibitor NC group ($P < 0.01$), the expression of C/EBP α in inhibitor group was significantly higher than that in inhibitor NC group ($P < 0.05$). 4) Oil Red O staining showed that the degree of differentiation: inhibitor group > NC group > mimic group. miR-130b is differentially expressed in the differentiation process of rabbit preadipocytes and may inhibit the differentiation of preadipocytes by targeting PPAR γ .

Key words: miR-130b; rabbit; preadipocytes; PPAR γ

脂肪细胞主要分布在动物的皮下和内脏周围,在机体内扮演着重要的作用,如维持体型结构、储存能量、维持体温和受到机械撞击时的缓冲作用。然而太多的脂肪也会造成机体能量代谢不平衡,增加代谢性疾病(如二型糖尿病、高脂血症和脂肪肝)的风险。现有的研究认为,前体脂肪细胞是由间充质干细胞定向分化而来,进而向成熟的脂肪细胞分化。相对人和其他动物,家兔无论是肌间脂肪还是皮下脂肪的沉积都相对较少。因此,正确理解家兔前体脂肪细胞的沉积和分化,可为改善兔肉品质提供有价值的信息。

前体脂肪细胞分化发生在动物的各个生理阶段,受到许多基因和信号通路的调控。目前已发现的信号通路主要有:刺猬蛋白信号通路(Hedgehog, Hh)、丝裂原活化的蛋白激酶信号通路(Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK)、WNT(Wingless-Type MMTV integration site family members)信号通路等^[1],而分化的开始与进展取决于一氧化氮^[2]和胰岛素^[3]等各种因子的刺激。不仅如此,脂肪细胞分化还涉及到许多特异转录因子的调控。C/EBP α 和PPAR γ 是前体脂肪细胞分化的关键转录因子^[4],几乎所有前体脂肪细胞特异的基因在脂肪细胞终末分化时都受到这2个转录因子的调控,同时这2个转录因子也可作为脂肪细胞分化的标志基因。

MicroRNA(miRNA)是一类长度为19~22 nt的非编码小RNA,主要通过靶向mRNA的UTR区发挥作用,不完全靶向可抑制该mRNA发挥作用,完全靶向则会降解该mRNA^[5]。研究表明,miRNA参与前体脂肪细胞的增殖和分化,例如miRNA-21可以通过靶向TGF- β 信号通路中TGF-BR2基因抑制人脂肪组织中间充质干细胞向成熟脂肪细胞的定向分化^[6];miR-27b可以直接靶向PPAR γ 抑制3T3-L1和MSC细胞成脂分化^[7-8];miR-155可以通过靶向CREB促进3T3-L1细胞的

成脂分化^[9]。越来越多的研究证实,miR-130b在多种生命活动中发挥重要的作用。研究发现,miR-130b可促进癌细胞的增殖和侵袭^[10-12]。另外,miR-130b特异性下调可以影响肺腺上皮细胞IGF-1的分泌,并预防肺腺上皮纤维化^[13]。近年来也有文献报道miRNA-130b可调控脂肪分化,如胞外囊泡携带的miR-130b可以进入脂肪细胞,靶向转录因子PPAR γ ,抑制猪原代前体脂肪细胞的脂肪沉积^[14]。但miR-130b在家兔前体脂肪细胞分化中的作用,还不清楚。因此,本试验通过对家兔前体脂肪细胞的原代培养和构建成脂分化细胞模型,过表达和抑制表达miR-130b并诱导分化前体脂肪细胞,初步探究miR-130b在家兔前体脂肪细胞分化过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物组织采集

本试验在四川农业大学动物科技学院实验动物护理和使用委员会的批准下进行。本试验采用四川农业大学雅安校区农场饲养的新生新西兰兔作为试验兔。处死3只初生仔兔后,迅速采集心、肝、脾、肺、肾、腿肌、肾周脂肪各1g左右,快速放入液氮中保存。

1.2 RNA的抽提与反转录

采用Trizol法提取各组织和细胞总RNA。总RNA的纯度用OD_{260 nm}/OD_{280 nm}和OD_{260 nm}/OD_{230 nm}比值判定,其完整性通过1.5%琼脂糖凝胶电泳评估。参照反转录试剂盒(TaKaRa, Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis Kit 货号:1604342A和TaKaRa, PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 货号AK4002)进行miRNA和mRNA的反转录,得到各自的cDNA,保存于-20℃冰箱。

1.3 miRNA和mRNA定量检测

组织样本和细胞的miRNA-130b和mRNA的表达量用U6和GAPDH作为内参进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测,miRNA定量体系(10 μ L

体系): 5 μL SYBR green II, 0.5 μL 上游引物、0.5 μL 下游引物, 3 μL 的去 RNA 灭菌水, 1 μL cDNA。定量程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 38 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 20 s; 熔解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。mRNA 的定量体系 (10 μL 体系): 5 μL SYBR green I, 0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物, 3.2 μL 的去 RNA 灭菌水, 1 μL cDNA。定量程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s; 38 个循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ (按引物最适退火温度调节) 20 s; 熔解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。所有的 PCR 产物通过熔解曲线分析。本试验所用引物均由成都擎科生物有限公司合成(表 1)。

1.4 家兔前体脂肪细胞的分离及原代培养

在无菌条件下采集少量初生新西兰兔的肾周脂肪组织, 剪碎后, 用 0.1% I 型胶原酶消化 60 min, 完全培养基 (DMEM/F12 + 10% 胎牛血清 + 2% 青链霉素混合液) 终止消化, 再用 100 和 40 nm 的细胞筛过滤, 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 加入新的完全培养基, 吹打混匀, 接种于 T25 细胞培养瓶, 置于细胞培养箱 (5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$), 48 h 更换培养基。

1.5 转染、诱导分化及染色

当 24 孔板细胞密度达到 80% 时, 用 Lipofac-

tamine 3000 (lip3000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 转染 miR-130b-mimic 和 miR-130b-inhibitor。转染终浓度: mimic 和 mimic NC 为 50 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; miR-130b-inhibitor 和 miR-130b-inhibitor NC 为 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。转染 6 h 后换诱导分化培养基 (1.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素, 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松, 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBMX, 鸡尾酒法) 诱导分化 48 h 后替换维持分化培养基 (1.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素), 维持 48 h 替换完全培养基。用 10% 的中性甲醛固定 6 孔板细胞 30 min 后, 油红 O 染色 30 min, 在 100 倍 (100 \times) 和 200 倍 (200 \times) 显微镜下鉴定脂肪滴的含量并拍照。

1.6 靶基因预测

参考 miRBase 数据库对 miR-130b 进行同源性分析, 并用 Targetscan 对 miR-130b 进行靶基因预测。

1.7 数据分析

本试验过程均采用 3 个生物学重复和 3 个技术重复。RT-qPCR 检测的 mRNA 的表达量计算以 GAPDH 作为内参, miRNA 的表达量计算以 U6 snRNA 作为内参。所有结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算, 以“平均值 \pm 标准误”表示, 并用 SAS 8.0 检测显著性, 用 GraphPad Prism 7 进行结果作图。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	上游引物 (5'→3') Forward primer	下游引物 (5'→3') Reverse primer
miR-130b	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	TGGTGTCGTGGAGTCG(通用)
GAPDH*	AGGGCATCTTGGGCTACAC	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC
PPAR γ	CCTTCCATTTCGCAAGAGCCG	GCCGCAGACACGACACTCAA
C/EBP α	GCGGGAACGAACAACAT	GGCGGTCATTGTCACTGGTC

2 结果

2.1 miR-130b 参与家兔前体脂肪细胞分化

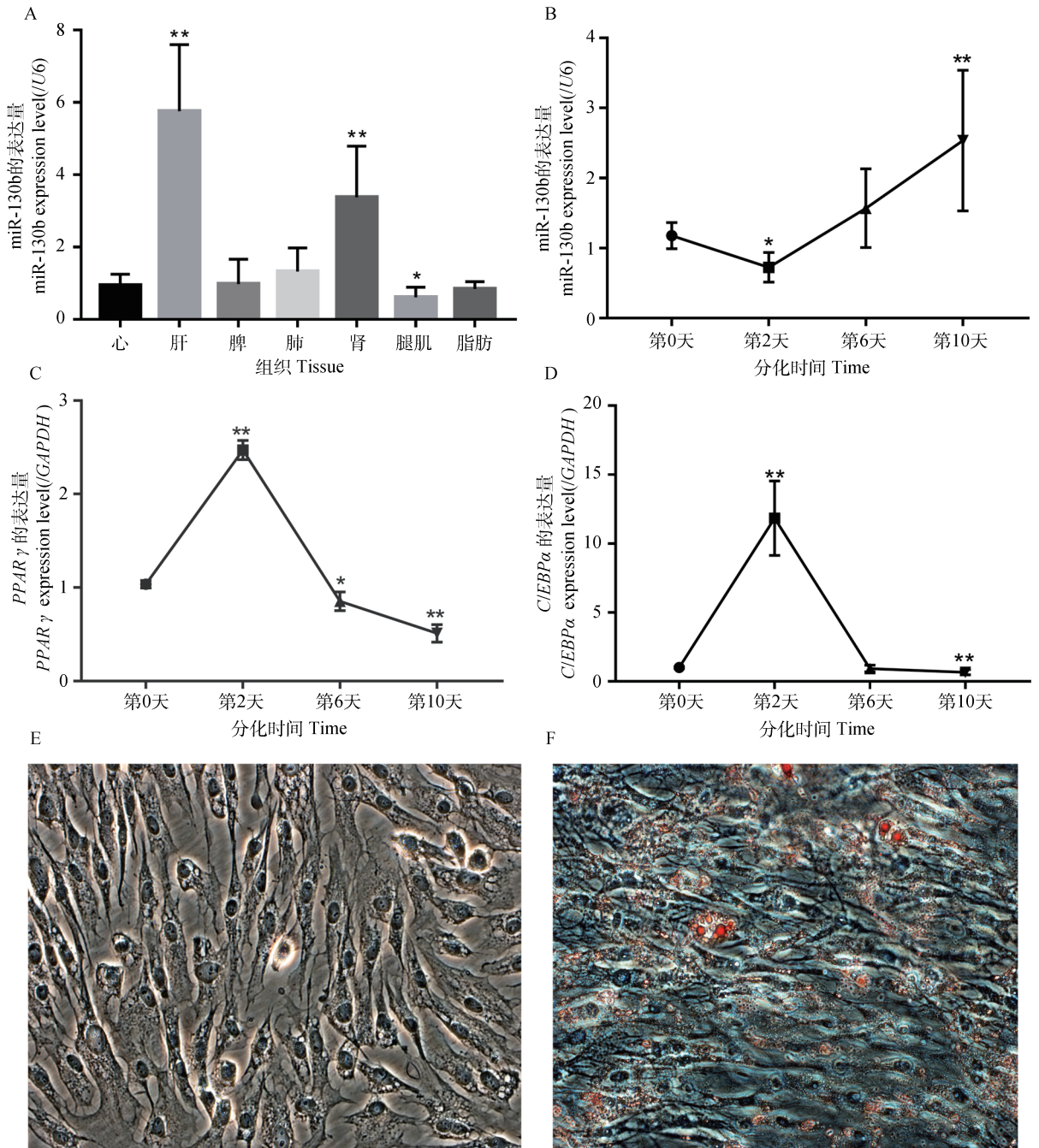
为了探明 miR-130b 在家兔各个组织中的表达谱, 试验通过 RT-qPCR 检测了 miR-130b 在初生兔各组织中的表达情况。以心肌作为对照, miR-130b 的表达量在肾和肝中极显著高于心肌 (图 1A, $P < 0.01$); miR-130b 的表达量在腿肌中显著低于心肌 (图 1A, $P < 0.05$); 在脾、肺、脂肪组织较心肌中 miR-130b 的表达量差异不显著。结果显示, miR-

130b 在家兔体内各个组织中差异表达, 广泛参与家兔生命活动的调节。

用油红 O 染色法鉴定前体脂肪细胞是否分化, 结果显示, 分化第 0 天, 细胞中并未出现橘红色脂滴 (图 1E), 诱导分化第 8 天时, 脂肪细胞中出现大量的橘红色脂滴 (图 1F)。为了进一步验证前体脂肪细胞是否分化, 笔者通过 qPCR 检测 PPAR γ 和 C/EBP α 的表达量, 发现 PPAR γ 在分化第 2 天较第 0 天极显著升高 ($P < 0.01$), 而第 6 天显著低于第 0 天 ($P < 0.05$), 第 10 天极显著低于第 0 天 (图 1C,

$P < 0.01$), *C/EBP α* 在分化第 2 天较第 0 天极显著升高 ($P < 0.01$), 而第 6 天低于第 0 天, 但差异不显著, 第

10 极显著低于第 0 天 (图 1D, $P < 0.01$)。miR-130b 在分化第 2 天时较第一天显著降低 ($P < 0.05$), 分化



A. miR-130b 在心、肝、脾、肺、肾、腿肌、脂肪的表达; B. miR-130b 在脂肪细胞分化过程中的表达; C. *PPAR γ* 在脂肪细胞分化过程中的表达; D. *C/EBP α* 在脂肪细胞分化过程中的表达; E. 诱导分化第 0 天, 脂肪细胞油红 O 染色 (100 \times); F. 诱导分化第 8 天, 脂肪细胞油红 O 染色 (100 \times)。* . $P \leq 0.05$; * . . $P < 0.01$, 下同

A. The expression of miR-130b in heart, liver, spleen, lung, kidney, leg muscle and adipose; B. Expression of miR-130b during adipocyte differentiation; C. Expression of *PPAR γ* during adipocyte differentiation; D. Expression of *C/EBP α* during adipocyte differentiation; E, F. Oil Red O staining adipogenic differentiation at day 0 and 8 (100 \times). * . $P \leq 0.05$; * . . $P < 0.01$, the same as below

图 1 miR-130b 在家兔心、肝、脾、肺、肾、腿肌、脂肪中的表达量及前体脂肪细胞的分化

Fig. 1 The expression of miR-130b in heart, liver, spleen, lung, kidney, leg muscle, fat in rabbit and the differentiation of preadipocyte

第 10 天极显著高于第 0 天(图 1B, $P < 0.01$)。结果显示,鸡尾酒法成功诱导家兔前体脂肪细胞分化,且 miR-130b 可能参与前体脂肪细胞的分化。

2.2 miR-130b 靶基因的预测

通过对 miR-130b 进行同源性分析发现,miR-

130b 在小鼠、人、大鼠、鸭嘴兽等哺乳动物中高度保守,而在鲑鱼中 3' 端有 2 个碱基的缺失。靶基因预测发现,miR-130b 的种子序列可以完全靶向 *PPAR γ* 的 UTR 区,推测 *PPAR γ* 可作为其潜在的靶向调控基因(图 2)。

小鼠	mmu-miR-130b	5' ...CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU...3'
人	hsa-miR-130b	5' ...CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU...3'
大鼠	rno-miR-130b	5' ...CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU...3'
鲑鱼	ssa-miR-130b	5' ...CAGUGCAAUAAUGAAAGGGC...3'
鸭嘴兽	oan-miR-130b	5' ...CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU...3'
		种子序列 seed sequence
	Position 272-279 of <i>PPARG</i> 3' UTR	5' ...UUUCCCUUCUCCAGUUGCACUA...3'
	miR-130b	3' ...UACGGGAAAGUAGU -AACGUGAC...5'
		Targeting site 靶向位点

图 2 同源性分析及 miR-130b 潜在靶基因的预测

Fig. 2 Homology analysis and the prediction of the potential target gene for miR-130b

2.3 过表达 miR-130b 抑制家兔前体脂肪细胞分化

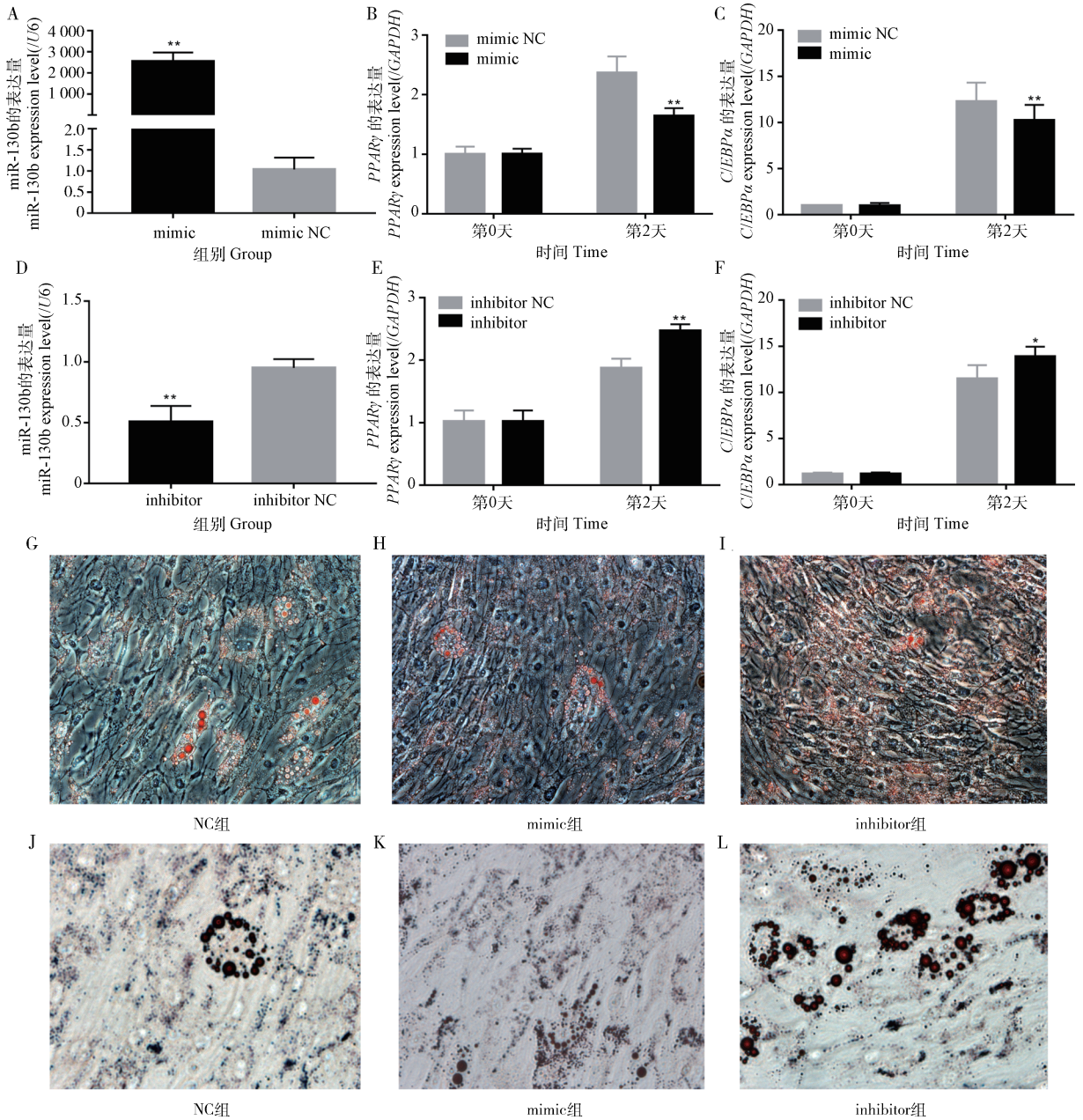
为了进一步探明 miR-130b 对家兔前体脂肪细胞的作用机制,通过构建合成 mimic(miRNA 类似物),并利用 lip3000 作为载体转染入细胞内。转染 6 h 后,相对于 NC 组,mimic 组 miRNA-130b 表达量升高 2 500 倍左右,极显著高于 NC 组(图 3A, $P < 0.01$)。在分化第 2 天时,mimic 组 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 的表达量极显著低于 NC 组(图 3B、3C, $P < 0.01$)。油红 O 染色发现,分化第 8 天 mimic 组(图 3H、3K)橘红色脂肪滴明显少于 NC 对照组(图 3G、3J)。结果表明,过表达 miR-130b 可以抑制家兔前体脂肪细胞分化。

2.4 抑制表达 miR-130b 促进家兔前体脂肪细胞分化

向前体脂肪细胞转染 miRNA-130b inhibitor 6 h 后发现,inhibitor 组 miR-130b 的表达量极显著低于 inhibitor NC 组(图 3D, $P < 0.01$);诱导分化第 2 天时 inhibitor 组 *PPAR γ* 的表达量极显著高于 inhibitor NC 组(图 3E, $P < 0.01$),*C/EBP α* 的表达量显著高于 inhibitor NC 组(图 3F, $P < 0.05$);油红 O 染色发现,分化第 8 天 inhibitor 组(图 3I、3L)橘红色脂肪滴明显多于 NC 对照组(图 3G、3J)。mimic NC 组与 inhibitor NC 组诱导分化后,油红 O 染色水平上高度一致,所以试验结果中,油红 O 染色图只用 mimic NC 作为对照组,即 NC 组。结果表明,抑制 miR-130b 的表达可以促进家兔前体脂肪细胞分化。

3 讨论

成脂分化是一个复杂的且与基因表达密切相关的过程,目前,有大量成脂分化相关基因被发现,例如 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* ,它们的结构和功能都比较清楚。*PPAR γ* 可以参与调节细胞分化、脂糖代谢和胰岛素信号等,且 *PPAR γ* 在脂肪组织中特异表达,通常在分化前期被诱导生成,对于脂肪分化起关键的作用^[15]。*C/EBP α* 并不在脂肪组织中特异性表达,但其表达量在前体脂肪细胞分化过程中显著升高,并且能启动其他脂肪细胞特异性基因的转录,如 *Ap2*、葡萄糖转运子 4(Glucose Transporter 4, GLUT4)、瘦素(Leptin)等^[16]基因,促进前体脂肪细胞进入终末分化。本试验选择 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 作为家兔前体脂肪细胞分化的标志基因,检测脂肪细胞是否分化。前人研究发现,在诱导人间充质干细胞成脂分化时,随着细胞分化,*PPAR γ* 和 *C/EBP α* 表达量逐渐升高,且第 10 天仍然显著高于第 0 天^[17]。在诱导猪前体脂肪细胞成脂分化第 8 天,*PPAR γ* 和 *C/EBP α* 表达量仍然极显著高于第 0 天^[18]。而在家兔前体脂肪细胞诱导分化过程中,*PPAR γ* 和 *C/EBP α* 均在第 2 天升高,但在第 6 天时显著低于第 0 天,第 10 天时也极显著低于第 0 天,但油红 O 染色显示,家兔前体脂肪细胞分化第 8 天时分化程度高且大量脂滴聚集。这与其他研究有不同之处,可能是由于物种不同而产生的差异,具体机制仍需进一步研究。



A. mimic 和 mimic NC 组 miR-130b 表达量; B, C. mimic 和 mimic NC 组 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 的表达量; D. inhibitor 和 inhibitor NC 组 miR-130b 表达量; E, F. inhibitor 和 inhibitor NC 组 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 的表达量; G, H, I 分别为前体脂肪细胞诱导分化第 8 天 NC 组、mimic 组和 inhibitor 组油红 O 染色 (100 \times); J, K, L 分别为前体脂肪细胞诱导分化第 8 天 NC 组、mimic 组和 inhibitor 组油红 O 染色 (200 \times)

A. The expression of miR-130b in mimic and mimic NC groups; B, C. The expression of *PPAR γ* and *C/EBP α* in mimic and mimic NC groups; D. The expression of miR-130b in inhibitor and inhibitor NC groups; E, F. The expression of *PPAR γ* and *C/EBP α* in inhibitor and inhibitor NC groups; G, H, I. Oil Red O staining adipogenic differentiation at Days 8 in NC group, mimic group, inhibitor group (100 \times); J, K, L. Oil Red O staining adipogenic differentiation at Days 8 in NC group, mimic group, inhibitor group (200 \times)

图 3 过表达和抑制表达 miR-130b 对家兔前体脂肪细胞分化的影响

Fig. 3 The effects of overexpression and inhibition of miR-130b on preadipocytes differentiation in rabbit

本研究发现, mimic NC 组与 inhibitor NC 组诱导分化时, 无论是在基因表达水平, 还是油红 O 染色水平上都高度一致, 所以试验结果中, 油红 O 染

色图只用 mimic NC 作为对照组。目前对于家兔前体脂肪细胞分化的研究屈指可数, 但关于 3T3 细胞分化的研究甚多。相较于 3T3 细胞^[18-20], 家兔前体

脂肪细胞分化第8天时,橘红色大脂滴合成较少,且小脂滴较多。笔者认为,这种差异可能是由于物种差异、前体脂肪细胞分化程度不同以及合成脂滴的能力不同造成的,具体原因,有待进一步研究。

本研究发现,miR-130b在家兔体内各个组织均有表达,说明miR-130b广泛参与到动物体内的生命活动,且在前体脂肪细胞分化的过程中存在差异表达。由此,笔者推测miR-130b可能参与调控脂肪细胞分化。为了进一步探究miR-130b在前体脂肪细胞分化过程中的作用机制,笔者通过在线生物信息学软件预测PPAR γ 可以作为miR-130b的潜在靶基因。而前人对于miR-130b的研究主要集中在肿瘤疾病相关领域,比如,miR-130b可以通过靶向肿瘤蛋白53诱导核蛋白1的表达,促进CD133(+)肝肿瘤起始细胞的生长和更新^[21];miR-130b是预后标志物,可以通过靶向STAT3抑制胰腺癌细胞的增殖和侵袭能力;miR-130b可以通过抑制PTEN的表达和Akt磷酸化在食管癌细胞中的致癌作用,从而抑制癌症的发生^[22];miR-130b也参与调控增殖和分化,研究发现,miR-130b可以靶向FMR1基因调节胚胎神经前体细胞的增殖和分化^[23];有研究发现,miR-130b参与调控脂肪细胞的脂质代谢,miR-130b可以靶向PPAR γ 辅助因子-1 α 抑制山羊乳腺上皮细胞的脂肪代谢^[24];E. K. Lee等^[25]发现,miR-130b强烈的影响脂肪细胞的分化,过表达miR-130b可以抑制脂肪细胞的分化,抑制表达miR-130b可以促进脂肪细胞的分化,进一步研究发现,miR-130b是通过靶向降解PPAR γ 抑制人前体脂肪细胞和3T3细胞的分化,本试验研究结果与其一致。过表达miR-130b后,PPAR γ 和C/EBP α 的表达量显著低于NC组,而抑制miR-130b后,PPAR γ 和C/EBP α 的表达量显著高于NC组,油红O染色结果与之一致,说明在家兔前体脂肪细胞分化的过程中,miR-130b起负调控作用,进一步证实miR-130b可通过靶向PPAR γ 抑制家兔前体脂肪细胞的分化。

4 结论

本试验结果表明,miR-130b在各个组织中均有表达,且在肾和肝组织中表达量最高,肌肉组织中表达量最低;miR-130b在家兔前体脂肪细胞分化的过程中差异表达;miR-130b过表达和抑制表达试验发现,miR-130b可以通过靶向PPAR γ 抑制家兔前体

脂肪细胞的分化。本研究结果可以为研究家兔脂肪的沉积及脂肪细胞分化的分子机制提供基础信息。

参考文献(References):

- [1] MURUGANANDAN S, ROMAN A A, SINAL C J. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(2): 236-253.
- [2] YAN H, AZIZ E, SHILLABEER G, et al. Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture[J]. *J Lipid Res*, 2003, 43(12): 2123-2129.
- [3] GABEN-COGNEVILLE A M, ARON Y, IDRIS G, et al. Differentiation under the control of insulin of rat preadipocytes in primary culture. Isolation of homogeneous cellular fractions by gradient centrifugation[J]. *BBA-Mol Cell Res*, 1983, 762(3): 437-444.
- [4] ROSEN E D, MACDOUGALD O A. Adipocyte differentiation from the inside out[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(12): 885.
- [5] GREGORY R I, CHENDRIMADA T P, COOCH N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing[J]. *Cell*, 2005, 123(4): 631-640.
- [6] KIM Y J, HWANG S J, YONG C B, et al. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(12): 3093-3102.
- [7] KIM S Y, KIM A Y, LEE H W, et al. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR γ expression[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2010, 392(3): 323-328.
- [8] LIN Q, GAO Z, ALARCON R M, et al. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis[J]. *Febs J*, 2009, 276(8): 2348.
- [9] LIU S, YANG Y, WU J. TNF α -induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2011, 414(3): 618-624.
- [10] LAI K W, KOH K X, LOH M, et al. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(8): 1456-1463.
- [11] COLANGELO T, FUCCI A, VOTINO C, et al. Mi-

- croRNA-130b promotes tumor development and is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Neoplasia*, 2013, 15(9): 1086-1099.
- [12] LI B L, LU C, LU W, et al. miR-130b is an EMT-related microRNA that targets DICER1 for aggression in endometrial cancer[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 484.
- [13] LI S, GENG J, XU X, et al. miR-130b-3p modulates epithelial-mesenchymal crosstalk in lung fibrosis by targeting IGF-1[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150418.
- [14] PAN S, YANG X, JIA Y, et al. Microvesicle-shuttled miR-130b reduces fat deposition in recipient primary cultured porcine adipocytes by inhibiting PPAR γ expression[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(5): 631-639.
- [15] FAJAS L, FRUCHART J C, AUWERX J. Transcriptional control of adipogenesis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(2): 165.
- [16] YE H W C, CAO Z, CLASSON M, et al. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins[J]. *Gene Dev*, 1995, 9(2): 168.
- [17] SHI C, MIN Z, TONG M, et al. miR-148a is associated with obesity and modulates adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells through Wnt signaling[J]. *Sci Rep-UK*, 2015, 5: 9930.
- [18] JI H L, SONG C C, LI Y F, et al. miR-125a inhibits porcine preadipocytes differentiation by targeting ERR α [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 395(1): 155-165.
- [19] GUO Y, CHEN Y, ZHANG Y, et al. Up-regulated miR-145 expression inhibits porcine preadipocytes differentiation by targeting IRS1[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(10): 1408-1417.
- [20] LIU S Y, ZHANG Y Y, GAO Y, et al. MiR-378 plays an important role in the differentiation of bovine preadipocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1552-1562.
- [21] MA S, TANG K H, CHAN Y P, et al. miR-130b promotes CD133 (+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(6): 694-707.
- [22] YU T, CAO R, LI S, et al. MiR-130b plays an oncogenic role by repressing PTEN expression in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 1-9.
- [23] GONG X, ZHANG K, WANG Y, et al. MicroRNA-130b targets Fmr1 and regulates embryonic neural progenitor cell proliferation and differentiation[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2013, 439(4): 493.
- [24] CHEN Z, LUO J, MA L, et al. MiR130b-regulation of PPAR γ coactivator-1 α suppresses fat metabolism in goat mammary epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142809.
- [25] LEE E K, LEE M J, ABDELMOHSEN K, et al. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(4): 626.

(编辑 郭云雁)