

鸡 miR-17-92 基因簇靶基因 *ZFPM2* 的鉴定及功能分析

张潇飞^{1,2,3}, 宋鹤^{1,2,3}, 刘静^{1,2,3}, 张文建^{1,2,3}, 闫晓红^{1,2,3},
李辉^{1,2,3}, 王宁^{1,2,3}

1. 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030;
2. 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030;
3. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030

摘要: miR-17-92 基因簇在哺乳动物的许多生理和病理过程中发挥重要作用。本实验室前期研究发现, miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪细胞的增殖, 但其作用机制尚不清楚。为了揭示 miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪细胞增殖的作用机制, 本研究采用 CCK-8 细胞增殖检测方法分析干扰 *ZFPM2* 对前脂肪细胞的影响, 结果发现, 干扰 *ZFPM2* 能显著促进鸡前脂肪细胞的增殖($P < 0.01$); 与 CCK-8 分析结果相一致, 干扰 *ZFPM2* 可致使细胞增殖标志基因 *PCNA*、*Ki67*、*Cyclin D1* 的 mRNA 表达量明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。进一步对鸡 *ZFPM2* 基因进行生物信息学分析, 发现该基因 mRNA 的 3'UTR 有两个区域存在 miR-17-92 基因簇 4 个成员(miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 及 miR-19b)的潜在结合位点。为验证 miR-17-92 基因簇是否靶作用于鸡 *ZFPM2* 基因, 构建了鸡 *ZFPM2* 基因 3'UTR 区的荧光素酶报告基因载体(野生型)(psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-WT)及其突变型的荧光素酶报告基因载体(psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-MUT)。报告基因活性分析显示, 过表达 mi-17-92 基因簇能极显著地抑制野生型 *ZFPM2* 的报告基因活性($P < 0.01$); 转染 miR-17-5p、miR-20a 及 miR-19a 的抑制剂均能显著提高野生型 *ZFPM2* 报告基因的活性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 但这些抑制剂对突变型 *ZFPM2* 报告基因的活性无明显影响。qRT-PCR 分析发现, miR-17-5p、miR-19a 及 miR-20a 的抑制剂能显著提高内源性 *ZFPM2* 基因 mRNA 的表达水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。共转染分析发现, 尽管差异不显著, 但 miR-17-5p 和 miR-19a 的抑制剂均倾向于降低 *ZFPM2* 干扰片段的促细胞增殖作用。本研究结果表明 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 及 miR-19b 靶作用于 *ZFPM2*; miR-17-92 基因簇至少部分通过抑制 *ZFPM2* 基因表达从而促进鸡前脂肪细胞的增殖。

关键词: miR-17-92 基因簇; *ZFPM2*; 鸡前脂肪细胞; 细胞增殖

收稿日期: 2016-12-21; 修回日期: 2017-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31372299)和农业部产业体系(编号: CARS-42)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31372299) and the China Agriculture Research System (No. CARS-42)]

作者简介: 张潇飞, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: xiaofeizhang2013@163.com

通讯作者: 王宁, 博士, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: wangning@neau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-425

网络出版时间: 2017/3/15 13:04:44

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170315.1304.004.html>

Identification and analysis of *ZFPM2* as a target gene of miR-17-92 cluster in chicken

Xiaofei Zhang^{1,2,3}, He Song^{1,2,3}, Jing Liu^{1,2,3}, Wenjian Zhang^{1,2,3}, Xiaohong Yan^{1,2,3}, Hui Li^{1,2,3}, Ning Wang^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China;

2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China;

3. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: The miR-17-92 cluster plays important roles in a variety of physiological and pathological processes in mammals. Previously, we showed that miR-17-92 cluster promotes chicken preadipocyte proliferation; however, the mechanism for its action is unknown. In order to explore the mechanism by which miR-17-92 cluster promotes chicken preadipocyte proliferation, CCK8 proliferation assay was performed to determine the effect of *ZFPM2* knockdown on chicken preadipocyte proliferation. The results showed that *ZFPM2* knockdown significantly promoted chicken preadipocyte proliferation ($P < 0.01$). Consistent with the CCK8 results, the mRNA levels of cell proliferation marker genes, i.e., *Cyclin D1*, *PCNA* and *Ki67*, were markedly increased in the si-*ZFPM2*-transfected preadipocytes ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Bioinformatics analysis showed that there were two potential miRNA binding sites for the four individual members of miR-17-92 cluster in the *ZFPM2* 3'UTR, one for miR-17-5p and miR-20a and the other for miR-19a and miR-19b. To test whether *ZFPM2* is a target for the miR-17-92 cluster, the *ZFPM2* 3'UTR reporter (psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-WT) and its mutant reporter (psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-MUT) were constructed. Reporter assays showed that overexpression of miR-17-92 cluster significantly inhibited the luciferase reporter activity of psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-WT ($P < 0.01$), as compared with control vector (empty pcDNA3.1). Transfection of miR-17-5p, miR-19a and miR-20a inhibitors increased the reporter activities of psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-WT ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). In contrast, transfection of miR-17-5p, miR-19a, and miR-20a inhibitors had no obvious effect on reporter activity of psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-MUT. Further qRT-PCR analysis showed that miR-17-5p, miR-20a and miR-19a inhibitors significantly elevated the endogenous *ZFPM2* mRNA expression ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Cotransfection of either miR-17-5p or miR-19a inhibitor and si*ZFPM2* showed that both inhibitors tended to reduce only slightly the promoting effect of si*ZFPM2* on chicken preadipocyte proliferation. Taken together, these data demonstrated that *ZFPM2* is a target of miR-17-5p, miR-20a, miR-19a, and miR-19b, and that miR-17-92 cluster promotes chicken preadipocyte proliferation at least in part by targeting *ZFPM2* and inhibiting its expression.

Keywords: miR-17-92 cluster; *ZFPM2*; chicken preadipocyte; cell proliferation

MicroRNA(miRNA)是一类大小约 22 个核苷酸的非编码 RNA 分子,通过碱基互补作用结合于靶基因 mRNA 的 3'UTR,导致靶基因的 mRNA 降解或翻译抑制,从而调控靶基因的表达^[1]。研究表明,miRNA 在细胞增殖、分化、凋亡、发育以及代谢等生命活动中发挥重要的调控作用^[2]。miRNA 基因在染色体上的分布并非随机,许多 miRNA 基因紧密相邻,形成 miRNA 基因簇^[3],这些 miRNA 往往由一个共同的启动子调控,转录产生多顺反子前体转录

本,这个多顺反子转录本经过 Drosha 和 Dicer 酶加工,产生多个不同的成熟 miRNA。miR-17-92 基因簇是一个高度保守的 miRNA 基因簇,是目前备受关注的 miRNA 基因簇之一。人的 miR-17-92 基因簇定位于染色体 13q31-q32 上^[4],位于其宿主基因 *MIR17HG*(miR-17-92 cluster host gene)的第 3 内含子区^[5]。miR-17-92 基因簇编码 miR-17-5p、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b 和 miR-92 等至少 6 个成熟的 miRNA^[6]。

miR-17-92 基因簇是小鼠发育必不可少的。目前已知, miR-17-92 基因簇参与鼠 B 细胞发育、肺祖细胞增殖与分化和心脏发育等多种生物学过程。敲除 miR-17-92 基因簇会导致肺发育不全、室间隔缺损、骨骼肌畸形以及 B 细胞发育障碍等致命性畸形的发生^[7,8]。miR-17-92 基因簇在脂肪形成过程也起重要作用, 在前脂肪细胞 3T3-L1 的增殖过程中, miR-17-92 基因簇的表达水平随增殖时间的延长而逐渐升高, 过表达 miR-17-92 基因簇能促进甘油三酯的沉积, 加速前脂肪细胞的分化^[9]。miR-17-92 基因簇在多种肿瘤组织和细胞中高表达, 大量研究发现, miR-17-92 基因簇促进肿瘤的发生, miR-17-92 基因簇是第一个被确认的非编码癌基因 (oncomiR-1)^[10]。但也有报道称 miR-17-92 基因簇可以作为抑癌基因, miR-17-92 家族成员 miR-17-5p 和 miR-20a 在人乳腺肿瘤中低水平表达, 它们可能作为抑癌基因在起作用^[11]。

尽管目前对哺乳动物 miR-17-92 基因簇的功能和作用机制的研究已取得了很大进展, 但是, 有关鸟类 miR-17-92 基因簇的作用及其作用机制的研究报道并不多。Huang 等^[12]选择北京油鸡的公鸡与快大型白羽肉鸡的母鸡杂交构建鸡 (*Gallus gallus*)_{F2} 资源群体, 采用高通量测序及 qRT-PCR 方法检测了极端高腹脂鸡和低腹脂鸡个体脂肪组织中 miRNA 的表达, 结果发现, miR-17-92 基因簇成员 miR-19b-3p 是一个差异表达极显著的 miRNA, 进一步研究发现, 脂肪酸代谢关键酶基因 *ACSL* 是 miR-17-92 基因簇成员 miR-19b-3p 的靶基因, 过表达 miR-19b-3p 能促进北京油鸡前脂肪细胞增殖及分化。本实验室前期通过 miRNA 高通量测序发现, miR-17-92 基因簇成员在东北农业大学高、低脂鸡的前脂肪细胞中均有表达^[13], 进一步的功能分析发现, 过表达 miR-17-92 基因簇能促进鸡原代前脂肪细胞的增殖^[14], 但其作用机制还不清楚。

ZFPM2 又称 FOG-2 (friend of GATA), 是哺乳动物中高度保守的转录辅助因子。ZFPM2 属于 FOG 转录因子家族, 该家族调节 GATA 家族蛋白的活性。ZFPM2 通过与 GATA 因子 N 端的锌指结构特异性结合形成复合物从而调节 GATA 因子的转录活性^[15]。因细胞类型和靶基因的不同, ZFPM2 与 GATA4 的互作可以激活也可以抑制靶基因的启动子活性^[16]。

此外, ZFPM2 能直接与 p85 α (PI3K 的调节性亚单位) 结合, 干扰 PI3K 复合物的形成, 抑制 PI3K 和 AKT 的磷酸化, 从而改变细胞 PI3K-AKT 信号通路活性, 进而影响细胞的增殖、分化及凋亡等过程^[17]。

目前, 对 miR-17-92 基因簇的研究主要集中在哺乳动物, 在鸟类中并无深入的研究报道。鉴于 miR-17-92 基因簇在鸡细胞增殖中的重要作用, 本文开展了 miR-17-92 基因簇靶基因 *ZFPM2* 的鉴定及其功能分析研究。本研究结果为揭示 miR-17-92 基因簇在鸡生长发育中的作用及其作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

载体 pEasy-T1 simple vector 及菌株 Top10 均购自全式金公司 (北京); psiCHECK-2 vector 购自 Promega 公司 (美国); 鸡胚成纤维细胞系 (DF1) 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 鸡前脂肪细胞为本实验室保存的细胞系^[14]。

1.2 引物设计及合成

根据 NCBI 数据库中鸡 *ZFPM2* 基因 (XM_418380)、*Cyclin D1* 基因 (NM_205381)、*PCNA* 基因 (NM_204170) 和 *Ki67* 基因 (XM_422088.4) 的序列, 分别设计这些基因的 qRT-PCR 表达检测引物, 选择 *NONO* 基因 (NM_001031532) 作为内参基因。为构建 *ZFPM2* 基因 3'UTR 的报告基因载体, 参照鸡 *ZFPM2* 基因序列, 设计 *ZFPM2* 基因 3'UTR 区的 RT-PCR 扩增引物 ZFPM2-F2 和 ZFPM2-R2 (mRNA 区的第 3809 到 4483 位点), 上、下游引物分别携带 *Not* 和 *Xho* 酶切位点, 将 *ZFPM2* 目的片段插入 psi-CHECK2 载体得到重组质粒 psiCHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT。利用引物 miR-17-92-F1/miR-17-92-R1, 以鸡基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得两端带有 *Kpn* 和 *Xho* 的 miR-17-92 片段, 将 miR-17-92 基因簇扩增片段和 pcDNA3.1 载体分别 *Kpn* 和 *Xho* (NEB 公司, 美国) 进行双酶切, 利用 T4 DNA 连接酶 (NEB 公司, 美国) 连接得到重组质粒 pcDNA3.1-miR-17-92。所有引物均利用 Primer Premier 5.0 软件进行设计, 由上海英骏生物技术有限公司合成。引物信息详

见表 1。

1.3 miRNA 抑制剂的设计与合成

根据 miRBase 数据库(<http://www.mirbase.org>)中鸡 miR-17-5p(MIMAT0001114)、miR-19a(MI0001182)和 miR-20a(MI0001181)的序列,设计并合成 miR-17-5p 抑制剂、miR-19a 抑制剂和 miR-20a 抑制剂以及无关干扰片段 miR-NC,序列合成由苏州吉玛基因股份有限公司完成。

1.4 ZFPM2 基因干扰片段的设计和干扰效果检测

根据 NCBI 数据库中鸡 ZFPM2 基因(XM_418380)的 mRNA 序列,设计 3 对含 21 个碱基的

ZFPM2 干扰片段(siZFPM2):siZFPM2-1、siZFPM2-2 和 siZFPM2-3 以及非特异性干扰对照 si-NC,序列合成由苏州吉玛基因股份有限公司完成,序列信息见表 2。上述序列经序列相似性比对分析发现,这些序列不与任何已知基因有同源性。采用 qRT-PCR 检测各干扰片段的干扰效果。

1.5 细胞培养

DF1 细胞和鸡前脂肪细胞均培养在添加了 10% 胎牛血清(Gibco 公司,美国)及终浓度为 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基中(Gibco 公司,美国),置于 37 °C 含 5% CO₂ 和 90% 相对湿度的细胞培养箱中培养。

表 1 本文所用引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5' 3')	用途	片段大小(bp)
ZFPM2-F1	ATCAGCACCTGTTCTCGCA	qRT-PCR	160
ZFPM2-R1	GCTGGCTGTAAACCTTCTTCA		
CyclinD1-F	CTCGGAGCTACCTGCATGTTTCT	qRT-PCR	237
CyclinD1-R	TTTACGGATGATCTGTTTGGTGT		
PCNA-F	GTGCTGGGACCTGGGTT	qRT-PCR	217
PCNA-R	CGTATCCGCATTGTCTTCT		
Ki67-F	AGGTCCGTTCCCTCGTT	qRT-PCR	270
Ki67-R	CATTGTGGTCTGGGTCATC		
NONO-F	AGAAGCAGCAGCAAGAAC	qRT-PCR	115
NONO-R	TCCTCCATCCTCCTCAGT		
ZFPM2-F2	CCTCGAGGAAGTGTATTATTGGTGCCA	克隆 3'UTR	672
ZFPM2-R2	TGCGGCCCGCAACATTGAGTTTAGGGTTTTG		
mi-17-92-F1	GGTACCTTCTTTCTTTTCAGCAGG	克隆 miR-17-92 基因簇	900
mi-17-92-R1	CCTCGAGGTGTTTCAGCCTCTATCCC		

表 2 ZFPM2 的 3 个干扰片段(siZFPM2)和干扰对照 si-NC 的序列

Table 2 Sequences of the three siZFPM2 and si-NC (negative control)

引物	序列(5' 3')
siZFPM2-1	GCACCUUUCUCGCAUCUUTT AAGAUGCAGAGAACAGGUGCTT
siZFPM2-2	GGUCCACUCUUCUCCAATT UUGGAAGAAAGAGUGGACCTT
siZFPM2-3	GCAACUAUCCUCCAGUAAUTT AUUACUGGAGGAUAGUUGCTT
si-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGAGAATT

1.6 细胞转染

1.6.1 miRNA 抑制剂的转染

将 DF1 细胞接种至 12 孔板(2.5×10^5 个/孔)中,待汇合度达 30%~50%时,将 miR-17-5p、miR-19a 和 miR-20a(100 nmol/L/well)的抑制剂及无关干扰片段 miR-NC 分别转染 DF1 细胞,转染后的细胞培养于 Opti-MEM medium(Invitrogen 公司,美国)培养基中,4~6 h 后换为添加 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,转染后 48 h 收集细胞,提取 RNA。

1.6.2 siZFPM2 的转染

将鸡前脂肪细胞接种至 24 孔板(2.5×10^5 个/孔)中,待汇合度达 30%~50%时,将 *ZFPM2* 干扰片段(siZFPM2-1、siZFPM2-2 及 siZFPM2-3)及非特异性干扰对照 si-NC 分别转染细胞(100 nmol/L/well),转染后的细胞培养于 Opti-MEM medium 培养基中,4~6 h 后换为添加 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。

1.6.3 siZFPM2 与 miRNA 抑制剂的共转染

将鸡前脂肪细胞接种至 24 孔板(2.5×10^5 个/孔)中,待汇合度达 30%~50%时,将 3 个 *ZFPM2* 干扰片段 siZFPM2-1、siZFPM2-2 和 siZFPM2-3 的混合溶液(100 nmol/L/well)分别与 miR-17-5p 和 miR-19a 的抑制剂(100 nmol/L/well)共转染鸡前脂肪细胞,转染后的细胞培养于 Opti-MEM medium 培养基中,4~6 h 后换为添加 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,转染后 48 h 和 72 h,采用 CCK-8 检测细胞的增殖。

1.7 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

在确定的时间点收集细胞,采用 Trizol Reagent(Invitrogen 公司,美国)法提取细胞总 RNA。将提取的总 RNA 样品稀释至 200 μ g/L,按照 Promega Improm- (Promega 公司,美国)反转录试剂盒说明书进行反转录。qRT-PCR 反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系为:FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)(Roche 公司,德国)5 μ L, cDNA 模板 1 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.2 μ L,水 3.6 μ L,总体积为 10 μ L。反应条件:95 预变性 10 min;95 变性 15 s,60 复性延伸 60 s,共 40 个循环。以 *NONO* 基因为内参,按 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量^[18]。

1.8 双荧光素酶报告基因活性分析

将 DF1 细胞接种至 12 孔板(2.5×10^5 个/孔)中培养,待汇合度达 30%~50%时,将野生型报告基因载体(psiCHECK-2-ZFPM2-WT)和突变型报告基因载体(psiCHECK-2-ZFPM2-MUT)(0.5 μ g/well)分别与 pcDNA3.1-miR-17-92 基因簇表达载体(0.5 μ g/well)和 miR-17-5p、miR-19a 及 miR-20a(100 nmol/L/well)的抑制剂共转染 DF1 细胞。转染后细胞培养于 Opti-

MEM medium 培养基中,4~6 h 后换为添加 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,转染后 48 h 采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega 公司,美国)进行双荧光素酶检测,检测时先弃去培养基,用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次,加 100 μ L/孔细胞裂解缓冲液 RIPA,放摇床上室温振荡 15 min,取 20 μ L 细胞裂解液,加入 100 μ L 萤火虫荧光素酶检测试剂 LAR,采用化学单管检测仪测定各组萤火虫荧光素酶活性,然后加入 100 μ L 的 Stop & Glo 试剂,检测海肾荧光素酶活性。报告基因活性为海肾荧光素酶活性/萤火虫荧光素酶活性的比值,每个实验均做 3 次独立的重复。

1.9 CCK-8 细胞增殖检测

采用 CCK-8 试剂盒(同仁,日本)检测细胞的增殖,具体步骤参照 CCK-8 试剂盒操作说明书进行。在细胞转染 24 h、48 h、72 h 和 96 h 后,每孔避光加入 CCK-8 试剂 100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱孵育 2~3 h 后,采用酶联免疫检测仪,测定 450 nm 波长下的吸光值。

1.10 统计分析

运用 SAS 9.2 软件(SAS Institute Inc.)分析实验数据,数据用均数 \pm 标准差表示,采用标准 *t* 检验方法, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *ZFPM2* 在鸡前脂肪细胞增殖中的作用分析

研究发现,在非洲爪蟾(*Xenopus*)胚胎中,过表达 *ZFPM2* 的同源基因会抑制红细胞的发育^[19];在果蝇(*Drosophila*)中,过表达 *ZFPM2* 会抑制晶细胞(crystal cells)和心脏细胞的形成^[20]。本文推测 *ZFPM2* 基因可能参与鸡前脂肪细胞增殖作用。为此,本文将人工合成的 *ZFPM2* 的 3 个干扰片段 siZFPM2-1、siZFPM2-2、siZFPM2-3 分别转染鸡前脂肪细胞,转染 48 h 后提取总细胞 RNA,采用 qRT-PCR 检测 *ZFPM2* 干扰片段的干扰效果。结果发现,这 3 个 siZFPM2 片段均具有极显著的干扰效果($P < 0.01$,图 1A)。鉴于此,本文在后续 *ZFPM2* 干扰

实验中将这 3 个 siZFPM2 干扰片段混合使用。将混合的 siZFPM2 片段转染鸡前脂肪细胞,利用 CCK-8 检测

siZFPM2 对鸡前脂肪细胞增殖的影响。CCK-8 分析显示,在转染 48 h、72 h 和 96 h 后,siZFPM2 混合液的处理组细胞吸光值极显著高于对照组($P < 0.01$, 图 1B),提示干扰 ZFPM2 可促进鸡前脂肪细胞的增殖。qRT-PCR 与 CCK-8 细胞增殖检测结果一致,qRT-PCR 表达分析显示,干扰 ZFPM2 时,细胞增殖标志基因 PCNA、Ki67 和 Cyclin D1 的表达量在 48 h、72 h 和 96 h 时都显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于

对照组(si-NC)(图 1, C~E)。

2.2 鸡 ZFPM2 基因 3'UTR 区的生物信息学分析

利用 Targetscan(http://www.targetscan.org/vert_71/)和 miRanda(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)软件分析鸡 ZFPM2 基因(XM_418380)mRNA 的 3'UTR 序列。结果显示:鸡 ZFPM2 基因 3'UTR 区存在 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p、miR-19a、miR-19b 及 miR-20a 的潜在结合位点;其中,ZFPM2 基因 3'UTR 区中第 265~271 bp 处序列与 miR-19a 和 miR-19b 种子区的第 2~8 bp 处序列完全互补;第

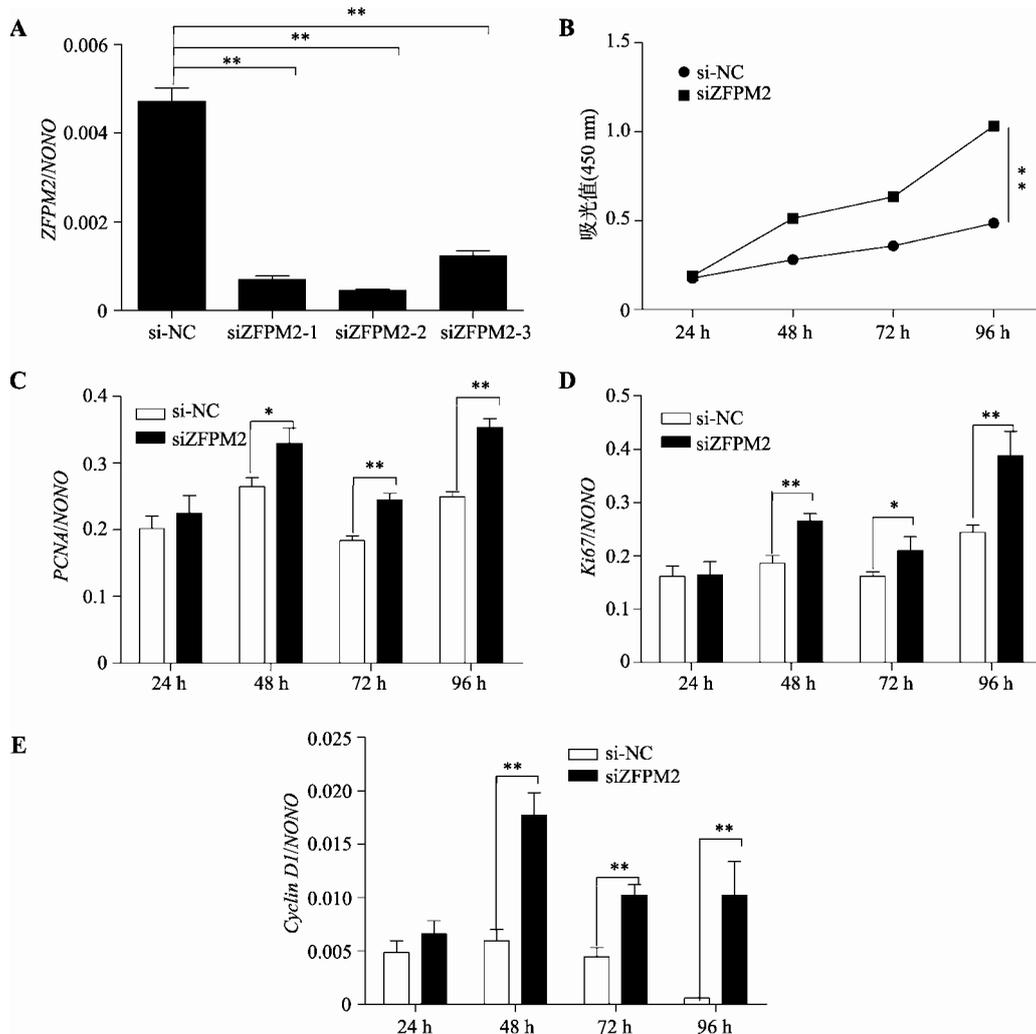


图 1 ZFPM2 干扰片段对鸡前脂肪细胞增殖的作用分析

Fig. 1 The effect of ZFPM2 knockdown on chicken preadipocyte proliferation

A: ZFPM2 不同干扰片段(siZFPM2-1、siZFPM2-2 和 siZFPM2-3)的干扰效果检测; B: 干扰 ZFPM2 基因对鸡前脂肪细胞增殖的影响; C~E: 干扰 ZFPM2 对细胞增殖相关基因(PCNA、Ki67、Cyclin D1)表达的影响。NONO 作为内参,* $P < 0.05$ 表示差异显著,** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

479~485 bp 处序列与 miR-17-5p 和 miR-20a 种子区的第 2~8 bp 处序列完全互补(图 2)。比较人(*Homo sapiens*)(NM_012082.3)、大鼠(*Rattus norvegicus*)(NM_001130501.1)、小鼠(*Mus musculus*)(NM_011766.5)、兔子(*Leporidae*)(XM_008255815.1)、狗(*Canis lupus familiaris*)(NM_001128186.1) 和 鸡 (XM_418380) 的 ZFPM2 基因 3'UTR 序列发现, 这些物种 ZFPM2 的 3'UTR 都具有 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 及 miR-19b 的潜在结合位点(图 2), 提示 ZFPM2 基因可能是 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 及 miR-19b 的靶基因。

2.3 ZFPM2 基因 3'UTR 野生型和突变型报告基因载体的构建

为验证 ZFPM2 基因是否为 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 及 miR-19b 的靶基因, 根据鸡 ZFPM2 基因(XM_418380)设计了 1 对克隆引物(ZFPM2-F2/R2), 扩增鸡 ZFPM2 基因的 3'UTR, 该区域序列包含 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 及 miR-19b 的潜在结合位点(图 3A)。将 RT-PCR 扩增片段插入 psi-CHECK2 载体, 构建 ZFPM2 基因 3'UTR 的报告基因载体 psiCHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT(野生型)。双酶切鉴定显示, 本文成功构建了野生型 ZFPM2 基因的 3'UTR 报告基因载体(图 3B)。在野生型报告基因载体基础上, 采用 DNA 合成的方法将 ZFPM2 基因 3'UTR 第 265~271 bp 处(miR-19a 和 miR-19b 结合位

点)的 4 个碱基, 由 GCAC 突变为 ATGT(图 3, C 和 D), 同时突变 ZFPM2 3'UTR 第 479~485 bp 处(miR-17-5p 和 miR-20a 结合位点)的 4 个碱基, 由 GCAC 突变为 ATGT(图 3, E 和 F), 构建出相应的突变型 ZFPM2 基因报告基因载体 psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-MUT。测序结果显示, 突变型报告基因载体 psiCHECK2-ZFPM2-3'UTR-MUT 与野生型报告基因载体 psiCHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT 的序列组成除突变位点处存在差异之外, 其他部分的序列组成完全一致, 这表明成功构建了 ZFPM2 基因 3'UTR 突变型和野生型报告基因载体。

2.4 鸡 miR-17-92 基因簇成员靶基因 ZFPM2 的鉴定

将 ZFPM2 基因的野生型报告基因载体 (psiCHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT) 分别与 mir-17-92 基因簇表达载体 (pcDNA3.1-mir-17-92) 和空表达载体 (pcDNA3.1) 共转染 DF1 细胞。报告基因活性分析显示, 与 pcDNA3.1 空载体相比, 转染 pcDNA3.1-mir-17-92 基因簇能显著降低野生型报告基因载体活性 ($P < 0.05$) (图 4A), 提示 miR-17-92 基因簇可调控 ZFPM2 基因的表达。为确认 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 和 miR-19b 靶作用于鸡 ZFPM2 基因, 将 ZFPM2 基因的野生型载体 (psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT) 和突变型报告基因载体 (psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-MUT) 分别与 miR-17-5p、miR-19a、miR-20a 的抑制剂及 miR-NC

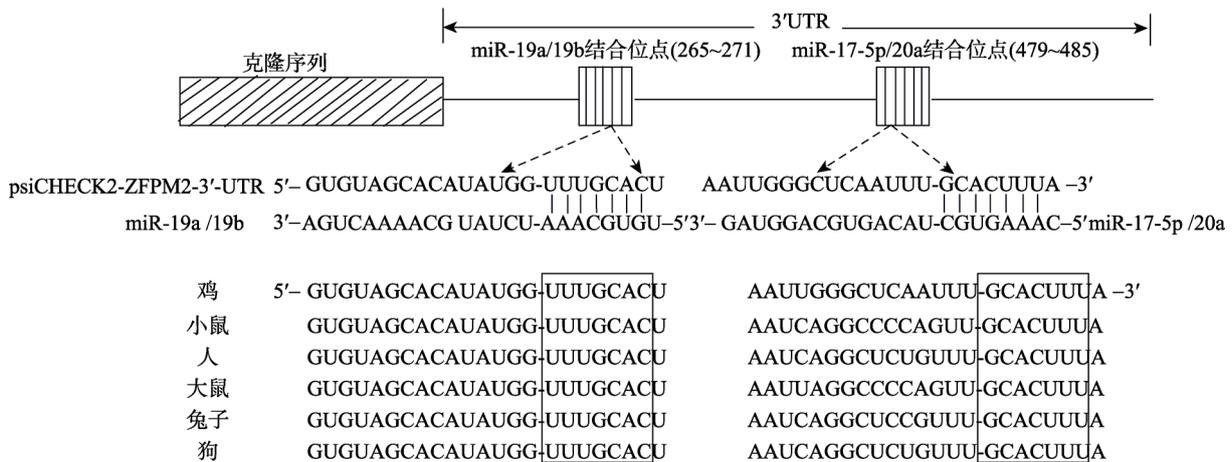


图 2 ZFPM2 基因 3'UTR 区 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 和 miR-19b 结合位点的预测分析

Fig. 2 The predicted binding sites of miR-17-5p, miR-20a, miR-19a and miR-19b in the 3'UTR of chicken ZFPM2 mRNA

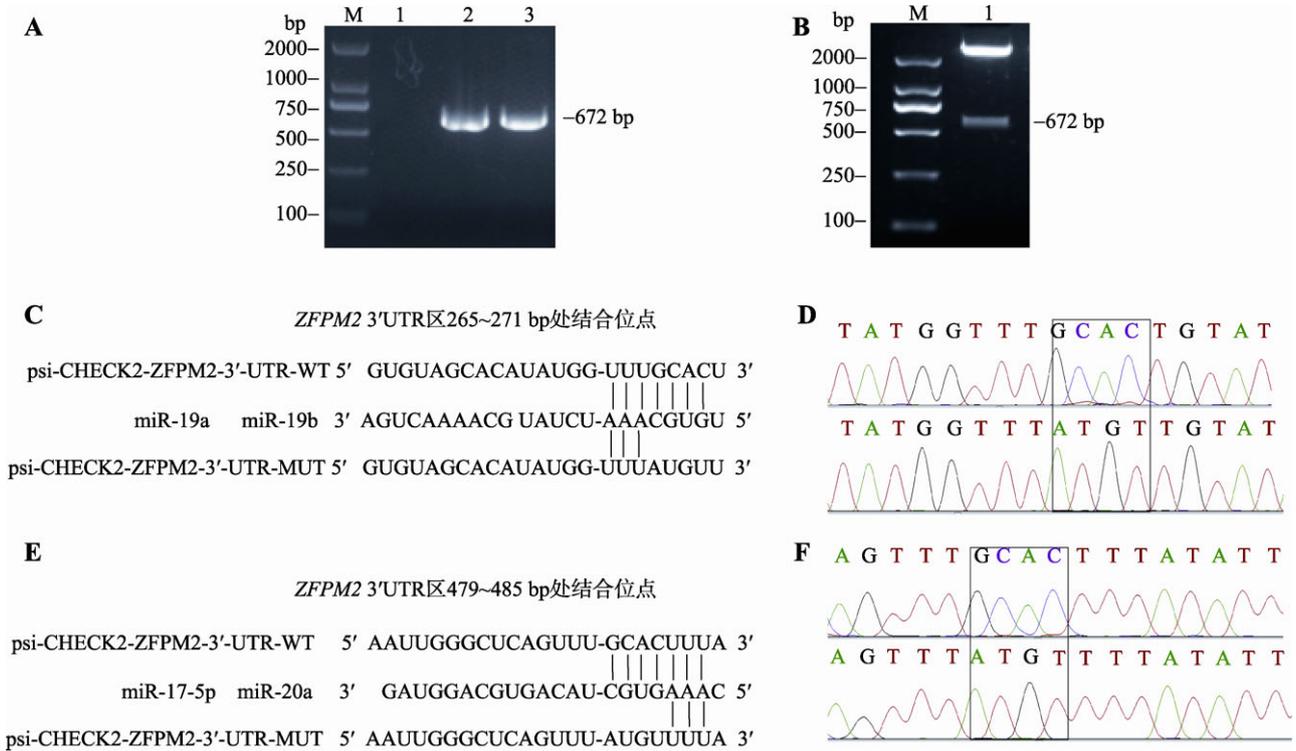


图 3 *ZFPM2* 基因 3'UTR 野生型和突变型报告基因载体的构建

Fig. 3 Construction of 3'UTR reporter vectors of wild-type and mutant *ZFPM2*

A: *ZFPM2* 基因 3'UTR 区 RT-PCR 扩增。M: 2000 bp DNA marker; 泳道 1: 空白对照; 泳道 2 和 3: *ZFPM2* 基因 3'UTR 区 RT-PCR 扩增片段; B: psiCHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-WT 质粒双酶切鉴定。M: 2000 bp DNA marker; 泳道 1: psiCHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-WT 质粒 *Not* 和 *Xho* 双酶切产物; C、D: *ZFPM2* 野生型及突变型报告基因载体与 miR-19a 和 miR-19b 结合位点的测序比对结果; E、F: *ZFPM2* 野生型及突变型报告基因载体与 miR-17-5p 和 miR-20a 结合位点测序比对结果。

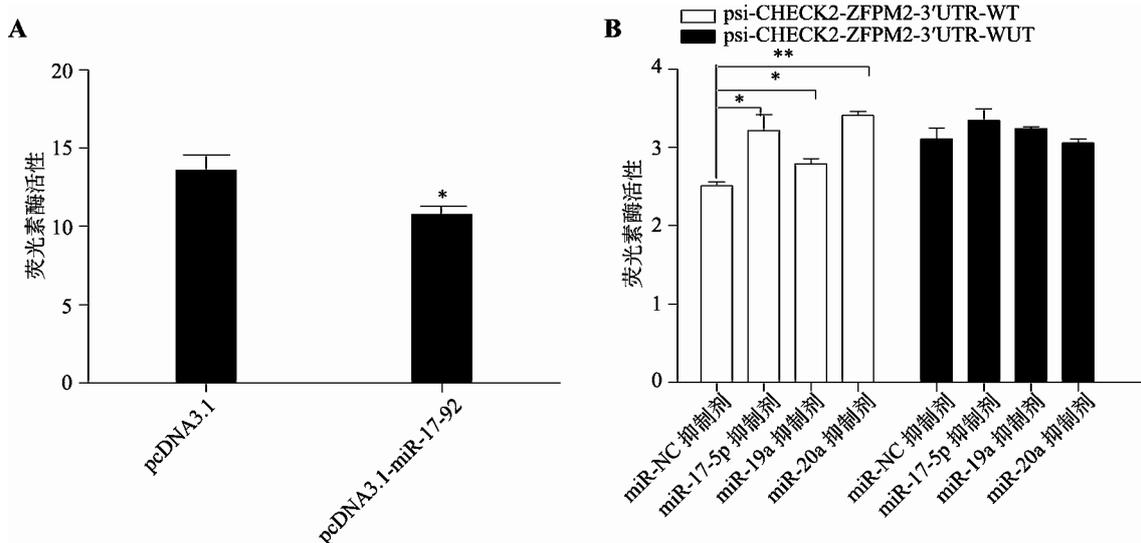


图 4 miR-17-92 基因簇靶定 *ZFPM2* 基因的报告基因鉴定

Fig. 4 Identification of miR-17-92 cluster targeting *ZFPM2* by luciferase reporter assay

A: 过表达 miR-17-92 基因簇对 *ZFPM2* 野生型 (psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-WT) 报告基因载体活性的影响; B: miR-17-5p、miR-19a、miR-20a 抑制剂对 *ZFPM2* 野生型 psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-WT 和突变型 psi-CHECK2-*ZFPM2*-3'UTR-MUT 报告基因载体活性的影响。* $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

(阴性对照)共转 DF1 细胞,由于 miR-19a 和 miR-19b 的序列相似度很高,达 95%以上,因此,只选择 miR-19a 进行实验。本研究所用的 miRNA 抑制剂都是本实验室在前期的研究中证明有效的 miRNA 抑制剂,都能显著提高其相应靶基因的报告基因活性^[14,21]。报告基因活性检测显示,与对照 miRNA-NC 相比,转染 miR-17-5p、miR-20a 和 miR-19a 的抑制剂均能显著或极显著地提高野生型报告基因载体 psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT 的活性,但是,对突变型报告基因载体 psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-MUT 荧光素酶活性的影响不显著,其中,转染 miR-17-5p 和 miR-19a 的抑制剂能显著提高野生型报告基因载体 psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT 的活性 ($P<0.05$),而转染 miR-20a 的抑制剂能极显著地提高野生型报告基因载体 psi-CHECK2-ZFPM2-3'UTR-WT 的活性 ($P<0.01$)(图 4 B)。由此可见,miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 和 miR-19b 直接靶作用于 *ZFPM2* 基因的 3'UTR,抑制其基因表达。

2.5 miR-17-92 基因簇成员对细胞内源性 *ZFPM2* 基因表达的影响

为进一步了解 miR-17-5p、miR-19a 和 miR-20a 靶作用于 *ZFPM2* 基因的作用机制,将 miR-17-5p、

miR-19a 和 miR-20a 的抑制剂以及对照 miR-NC 分别转染鸡前脂肪细胞系,24 h 和 48 h 后分别提取细胞总 RNA,采用 qRT-PCR 检测细胞内源性 *ZFPM2* 基因 mRNA 的表达水平。结果发现,与对照相比,转染 24 h 后,miR-20a 的抑制剂能显著提高 *ZFPM2* 基因 mRNA 的表达水平 ($P<0.05$),miR-17-5p 和 miR-19a 的抑制剂能极显著提高 *ZFPM2* 基因 mRNA 的表达水平 ($P<0.01$)(图 5A);转染 48 h 后,miR-17-5p、miR-19a 和 miR-20a 的抑制剂均能极显著提高 *ZFPM2* 基因 mRNA 的表达水平 ($P<0.01$)(图 5B)。这些数据提示,miR-17-5p、miR-19a、miR-19b 和 miR-20a 通过引起靶基因 mRNA 的降解,从而调控 *ZFPM2* 基因的表达。

2.6 miR-17-92 基因簇成员的抑制剂对 *ZFPM2* 促细胞增殖作用的影响

本实验室前期研究发现,miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪细胞的增殖。根据上述实验结果,本文推测 *ZFPM2* 可能介导鸡 miR-17-92 基因簇的促鸡前脂肪细胞增殖作用。为了证明这一推测,本文尝试将 miR-17-92 基因簇中不同 miRNA 成员的抑制剂和 siZFPM2 共转染鸡前脂肪细胞,然后检测细胞增殖变化情况。由于 miR-17-5p 与 miR-20a、miR-19a 和 miR-19b 的序列相似度很高,并且均具有高度保守

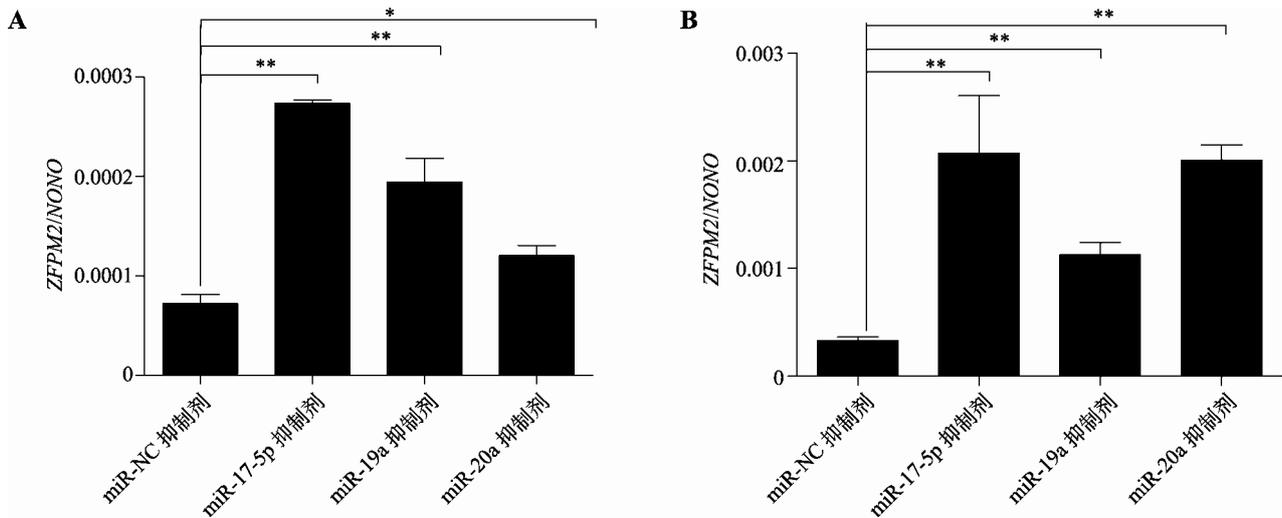


图 5 miR-17-5p、miR-19a 及 miR-20a 抑制剂对细胞内源性 *ZFPM2* 基因表达的影响

Fig. 5 The effects of miR-17-5p, miR-19a and miR-20a inhibitors on the endogenous *ZFPM2* gene expression

A: qRT-PCR 分析 miR-17-5p、miR-19a 和 miR-20a 抑制剂对 *ZFPM2* 基因表达的影响(24 h); B: qRT-PCR 分析 miR-17-5p、miR-19a 和 miR-20a 抑制剂对 *ZFPM2* 基因表达的影响(48 h)。NONO 作为内参, * $P<0.05$ 表示差异显著, ** $P<0.01$ 表示差异极显著。

的种子区域,所以本文选择 miR-17-5p 和 miR-19a 的抑制剂进行研究。结果显示,转染 48 h 和 72 h 后,与转染 siZFPM2 和 si-NC 组相比较,尽管差异不显著,但 miR-17-5p 和 miR-19a 的抑制剂均倾向于降低 siZFPM2 的促细胞增殖的作用(图 6) 提示 ZFPM2 可能介导 miR-17-92 基因簇促细胞增殖作用。

3 讨论

细胞增殖分析发现,干扰 ZFPM2 能促进鸡前脂肪细胞的增殖(图 1, B~E)。ZFPM2 基因的生物信息学分析、报告基因分析及内源性基因表达分析证实,miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 及 miR-19b 直接靶作用于 ZFPM2 (图 2、图 4、图 5),进一步用 miRNA 抑制剂和 siZFPM2 共转染分析提示,ZFPM2 可能介导 miR-17-92 基因簇的促细胞增殖作用(图 6)。

在小鼠心肌细胞中,向睿等^[22]研究证实 miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p 和 miR-20a 靶作用于 ZFPM2 基因;ZFPM2 基因功能分析显示,过表达 ZFPM2 基因能促进心肌细胞增殖并减弱 miR-17-92 基因簇对心肌细胞增殖的抑制作用。本研究发现,miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 及 miR-19b 靶作用于鸡 ZFPM2 基因。与向睿等人的报道不同,本研究发现干扰 ZFPM2 可促进细胞增殖。

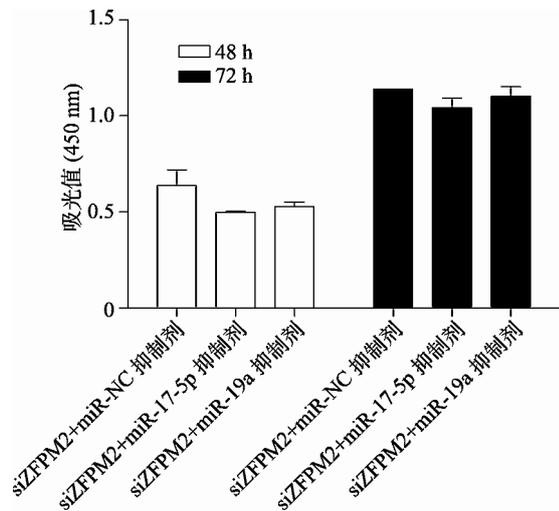


图 6 miR-17-5p 和 miR-19a 抑制剂对 siZFPM2 促前脂肪细胞增殖作用的影响

Fig. 6 Effects of miR-17-5p and miR-19a inhibitors on preadipocyte proliferation induced by siZFPM2

与本文的研究相一致,Xiao 等^[23]发现干扰 ZFPM2 基因能促进肝脏星形细胞(LX-2)的增殖。这些数据提示,ZFPM2 在细胞增殖中的作用及其作用机制在不同的细胞类型和细胞背景下是不同的,既可以促进细胞增殖也可以抑制细胞增殖。目前已发现多个这样的基因,它们在不同细胞中对细胞增殖的作用不同,在有的细胞类型中能促进细胞增殖,但在有的细胞类型中能抑制细胞增殖^[24,25]。

本研究发现干扰 ZFPM2 基因促进鸡前脂肪细胞的增殖,miR-17-92 基因簇成员靶作用于 ZFPM2。本实验室前期研究发现 miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪细胞的增殖^[14],考虑到 ZFPM2 在鸡前脂肪细胞中的作用,本文推测鸡 miR-17-92 基因簇至少是部分通过靶作用于 ZFPM2,从而促进鸡前脂肪细胞的增殖。共转染分析显示,尽管差异不显著,miR-17-92 基因簇成员 miR-17-5p 和 miR-19a 的抑制剂均倾向于减弱 siZFPM2 的促细胞增殖的作用,提示 miR-17-92 基因簇成员可能是通过抑制 ZFPM2 从而促进鸡前脂肪细胞增殖的。miR-17-5p 和 miR-19a 抑制剂的作用效果没有达到统计学差异显著,推测这可能是由于本研究采用单个 miRNA 的抑制剂所造成的。目前已知 miR-17-92 基因簇存在多个成员调控同一基因,而且这些 miRNA 成员在调控中存在协同作用^[23,26,27]。miR-17-92 基因簇的 4 个 miRNA 成员(miR-17-5p、miR-20a、miR-19a 和 miR-19b)均能靶作用于 ZFPM2,考虑到这些 miRNA 成员的协同作用,单个 miRNA 抑制剂的作用效果会比较弱。为了解 miR-17-92 基因簇成员的协同作用,本实验室曾计划构建 ZFPM2 的真核表达载体,但是很遗憾,未能扩增出鸡全长 ZFPM2 基因的 CDS。未来,将继续尝试克隆鸡 ZFPM2 基因的完整编码区序列,并构建 ZFPM2 的真核表达载体,进而分析同时过表达 ZFPM2 和 miR-17-92 基因簇对鸡前脂肪细胞增殖的影响,从而确定 ZFPM2 在 miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪细胞增殖中的作用。miRNA 的靶基因众多,而 miR-17-92 基因簇有 6 成员,因此该基因簇的靶基因会更多。除了 ZFPM2 外,未来有必要采用转录组和蛋白组分析,筛选鉴定出 miR-17-92 基因簇促进鸡前脂肪增殖的其他靶基因。

大多数 miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 不完全互补配对抑制靶基因 mRNA 的翻译, 这种基因表达调控方式只影响靶基因的蛋白表达, 并不引起靶基因 mRNA 的降解^[22,28]。但研究也发现, 许多(但不是全部)miRNA 能导致靶基因 mRNA 的降解, 从而调控靶基因的表达^[29]。本研究发现, miR-17-5p、miR-20a 和 miR-19a 的抑制剂均能极显著提高细胞内源性 *ZFPM2* 基因 mRNA 的表达水平, 提示 miR-17-5p、miR-19a 和 miR-20a 可能通过降解 *ZFPM2* 基因的 mRNA 从而调控其表达。

PI3K/AKT 信号通路是许多激素和细胞生长因子发挥作用的重要通路, 该通路调控细胞增殖、分化、凋亡以及蛋白质合成等多种生物学过程^[30]。例如, PI3K/AKT 信号通路对脂肪细胞的分化至关重要, 抑制 PI3K 的活性可显著抑制人和小鼠脂肪细胞的分化^[31~34]。PI3K/AKT 通路在肿瘤的发生发展中也起着非常重要的作用, 该通路不仅能促进肿瘤细胞的增殖和抑制细胞的凋亡, 同时还与肿瘤的侵袭和转移有关。此外, PI3K/AKT 信号通路还可以与其他影响细胞生存和增殖的信号通路相互作用^[35]。目前已知 *ZFPM2* 是 PI3K/AKT 通路的一个抑制因子^[36], *ZFPM2* 能够同 P13K 的调节亚基 p85 结合, 抑制 p85 亚基同催化亚基 p110 的结合, 从而抑制 PI3K 活性及 PI3K 信号通路^[37]。PI3K 信号通路的激活会促进细胞增殖, 而其活性的下降则抑制细胞增殖。已有研究报道, miR-200 能通过抑制 *ZFPM2* 的表达, 从而激活 PI3K-AKT 通路的活性, 促进人肝癌细胞和肝星状细胞的增殖与迁移等^[36,37]。本文推测鸡 miR-17-92 基因簇可能至少部分通过抑制 *ZFPM2* 基因的表达, 增强 PI3K-AKT 通路的活性, 从而促进鸡前脂肪细胞的增殖。

在小鼠前脂肪细胞的分化过程中, *ZFPM2* 及其同源基因 *FOG-1* 的 mRNA 表达水平随时间的增加而明显下降; 过表达 *FOG-1* 和 *ZFPM2* 能抑制脂肪细胞的分化, 但敲除 *ZFPM2* 并不会促进前脂肪细胞分化, 反而会引起细胞大量死亡, 这提示 *ZFPM2* 基因对脂肪细胞分化过程是十分重要的。进一步的研究发现, *ZFPM2* 与 GATA2 和 CTBP 相互作用, 共同调控脂肪的形成^[38]。目前, 已知 GATA 家族成员

GATA2 和 GATA3 在脂肪细胞分化中发挥重要的调控作用^[39]。张志威等^[39]发现, 过表达 *GATA2* 或 *GATA3* 基因抑制鸡 *PPAR γ* 基因的转录, 暗示 GATA2 或 GATA3 是鸡脂肪细胞分化的抑制因子。由于 GATA2/3、*ZFPM2* 和 miR-17-92 基因簇都在前脂肪细胞中表达, 未来有必要进一步分析 GATA2/3、*ZFPM2* 和 miR-17-92 基因簇在鸡前脂肪细胞分化中的相互作用。

参考文献(References):

- [1] Du TT, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 2005, 132(21): 4645-4652.
- [2] Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(4): 252-263.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [4] He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, 435(7043): 828-833.
- [5] Bahari F, Emadi-Baygi M, Nikpour P. *miR-17-92* host gene, overexpressed in gastric cancer and its expression was negatively correlated with the metastasis. *Indian J Cancer*, 2015, 52(1): 22-25.
- [6] Yan HL, Xue G, Mei Q, Wang YZ, Ding FX, Liu MF, Lu MH, Tang Y, Yu HY, Sun SH. Repression of the *miR-17-92* cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *EMBO J*, 2009, 28(18): 2719-2732.
- [7] Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the *miR-17-92* family of miRNA clusters. *Cell*, 2008, 132(5): 875-886.
- [8] Zhou ML, Ma JR, Chen SJ, Chen X, Yu XJ. MicroRNA-17-92 cluster regulates osteoblast proliferation and differentiation. *Endocrine*, 2014, 45(2): 302-310.
- [9] Wang Q, Li YC, Wang JH, Kong J, Qi YC, Quigg RJ, Li XM. *miR-17-92* cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8):

- 2889–2894.
- [10] Olive V, Jiang I, He L. *mir-17-92*, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(8): 1348–1354.
- [11] Yu ZR, Wang CG, Wang M, Li ZP, Casimiro MC, Liu MR, Wu KM, Whittle J, Ju XM, Hyslop T, McCue P, Pestell RG. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol*, 2008, 182(3): 509–517.
- [12] Huang HY, Liu RR, Zhao GP, Li QH, Zheng MQ, Zhang JJ, Li SF, Liang Z, Wen J. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in abdominal adipose tissues in chickens. *Sci Rep*, 2015, 5: 16132.
- [13] Wang WS, Du ZQ, Cheng BH, Wang YX, Yao J, Li YM, Cao ZP, Luan P, Wang N, Li H. Expression profiling of preadipocyte microRNAs by deep sequencing on chicken lines divergently selected for abdominal fatness. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117843.
- [14] Wang N, Duan K, Song H, Zhang TM, Zhang WJ, Yan XH, Wang SZ, Li H. Identification of *TP53INP1* as a targets gene of chicken miR-20a. *J Northeast Agric Univ*, 2015, 46(9): 69–74.
王宁, 段涛, 宋鹤, 张天目, 张文建, 闫晓红, 王守志, 李辉. 鸡 miR-20a 靶基因 *TP53INP1* 鉴定. 东北农业大学学报, 2015, 46(9): 69–74.
- [15] Fox AH, Liew C, Holmes M, Kowalski K, Mackay J, Crossley M. Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J*, 1999, 18(10): 2812–2822.
- [16] Lu JR, McKinsey TA, Xu HT, Wang DZ, Richardson JA, Olson EN. FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(6): 4495–4502.
- [17] Guo LX, Wang JY, Yang P, Lu Q, Zhang T, Yang YN. MicroRNA-200 promotes lung cancer cell growth through FOG2-independent AKT activation. *IUBMB Life*, 2015, 67(9): 720–725.
- [18] Mburu YK, Egloff AM, Walker WH, Wang L, Seethala RR, van Waes C, Ferris RL. Chemokine receptor 7 (CCR7) gene expression is regulated by NF- κ B and activator protein 1 (AP1) in metastatic squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN). *J Biol Chem*, 2012, 287(5): 3581–3590.
- [19] Deconinck AE, Mead PE, Tevosian SG, Crispino JD, Katz SG, Zon LI, Orkin SH. FOG acts as a repressor of red blood cell development in *Xenopus*. *Development*, 2000, 127(10): 2031–2040.
- [20] Fossett N, Tevosian SG, Gajewski K, Zhang Q, Orkin SH, Schulz RA. The friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(13): 7342–7347.
- [21] Song H, Zhang XF, Chu YK, Xing TY, Yan XH, Li H, Wang N. Chick miR-19a and miR-19b promote chicken preadipocyte proliferation by targeting LIN9. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2016, 32(8): 943–952.
宋鹤, 张潇飞, 褚衍凯, 邢天宇, 闫晓红, 李辉, 王宁. 鸡 miR-19a, miR-19b 通过靶向抑制 LIN9 促进前脂肪细胞增殖. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(8): 943–952.
- [22] Xiang R, Lei H, Chen MZ, Li QW, Sun H, Ai JZ, Chen TL, Wang HL, Fang Y, Zhou Q. The *miR-17-92* cluster regulates FOG-2 expression and inhibits proliferation of mouse embryonic cardiomyocytes. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(2): 131–138.
- [23] Xiao CC, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang BC, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased *miR-17-92* expression in lymphocytes. *Nat Immunol*, 2008, 9(4): 405–414.
- [24] Trivedi CM, Zhu WT, Wang QH, Jia C, Kee HJ, Li L, Hannehalli S, Epstein JA. Hoxp and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. *Dev Cell*, 2010, 19(3): 450–459.
- [25] Waraya M, Yamashita K, Katoh H, Ook A, Kawamata H, Nishimiya H, Nakamura K, Ema A, Watanabe M. Cancer specific promoter CpG islands hypermethylation of HOP homeobox (HOPX) gene and its potential tumor suppressive role in pancreatic carcinogenesis. *BMC Cancer*, 2012, 12: 397.
- [26] Yan XH, Wang ZP, Wang N. Characterization of the structure, function and regulation of the chicken mir-17-92 cluster. *Zool Res*, 2012, 33(5): 455–462.
闫晓红, 王志鹏, 王宁. 鸡 mir-17-92 基因簇的结构、功能及其调控. 动物学研究, 2012, 33(5): 455–462.
- [27] Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science*, 2008, 319(5871): 1785–1786.
- [28] Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(4): 545–562.
- [29] Liu Q, Fu HJ, Sun F, Zhang HM, Tie Y, Zhu J, Xing RY, Sun ZX, Zheng XF. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(16): 5391–5404.
- [30] Luetke A, Meyers PA, Lewis I, Juergens H. Osteosarcoma

- treatment-where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4): 523–532
- [31] Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T, Spiegelman BM, Kasuga M. Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 1998, 273(44): 28945–28952.
- [32] Cross M J, Stewart A, Hodgkin MN, Kerr DJ, Wakelam MJ. Wortmannin and its structural analogue demethoxyviridin inhibit stimulated phospholipase A₂ activity in Swiss 3T3 cells: Wortmannin is not a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 1995, 270(43): 25352–25355.
- [33] Tomiyama K, Nakata H, Sasa H, Arimura S, Nishio E, Watanabe Y. Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 212(1): 263–269.
- [34] Xia XM, Serrero G. Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *J Cell Physiol*, 1999, 178(1): 9–16.
- [35] Edström A, Ekström PAR. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in neuronal survival and axonal outgrowth of adult mouse dorsal root ganglia explants. *J Neurosci Res*, 2003, 74(5): 726–735.
- [36] Xiao YT, Wang J, Chen YW, Zhou KJ, Wen J, Wang Y, Zhou Y, Pan WH, Cai W. Up-regulation of miR-200b in biliary atresia patients accelerates proliferation and migration of hepatic stellate cells by activating PI3K/Akt signaling. *Cell Signal*, 2014, 26(5): 925–932.
- [37] Hyun S, Lee JH, Jin H, Nam J, Namkoong B, Lee G, Chung J, Kim VN. Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K. *Cell*, 2009, 139(6): 1096–1108.
- [38] Jack BHA, Crossley M. GATA proteins work together with friend of GATA (FOG) and C-terminal binding protein (CTBP) co-regulators to control adipogenesis. *J Biol Chem*, 2010, 285(42): 32405–32414.
- [39] Zhang ZW, Chen YC, Pei WY, Wang N, Li H. Overexpression of chicken *Gata2* or *Gata3* suppressed the transcription of *Pparγ* gene. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2012, 28(9): 835–842.
- 张志威, 陈月婵, 裴文字, 王宁, 李辉. 过表达鸡 *Gata2* 或 *Gata3* 基因抑制 *Pparγ* 基因的转录. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(9): 835–842.

(责任编辑: 赵要风)