

MiR-122 在 AldoA 介导的 ob/ob 小鼠 肝脏代谢中的作用研究*

方志娟** 李 鹏** 刁文丽 蒋 琰 张辰宇 项 阳***

(南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 本实验室前期研究发现, 2 型糖尿病动物模型 ob/ob 小鼠血清中 miR-122 的含量较正常 C57BL/6 小鼠显著升高. 本文进一步研究肝脏特异性 miR-122 及其靶蛋白 AldoA(果糖 1, 6- 二磷酸醛缩酶 A)在 ob/ob 小鼠肝脏代谢中的作用. 首先, 经 qRT-PCR 技术检测发现 ob/ob 小鼠肝脏 miR-122 水平较 C57BL/6 小鼠显著下降, 而 Western blotting 分析发现 ob/ob 小鼠肝脏其靶蛋白 AldoA 的表达水平显著上升. 进一步以 miR-122 分子转染 293T 细胞后收集其分泌的微囊泡(microvesicles, MVs), 经 qRT-PCR 检测确认后采用特异性荧光染料 DiI-C18 标记 MVs, 以不同剂量尾静脉注射 BALB/c 小鼠体内, 不同时间点取肝组织做冰冻切片. 在荧光显微镜下观察证实, 包裹有 miR-122 的 MVs 通过循环系统进入肝脏, 同时 qRT-PCR 定量分析发现肝组织中 miR-122 含量显著升高, 而蛋白质印迹检测发现其靶蛋白 AldoA 在肝脏中表达显著下降. AldoA 主要催化糖酵解途径中果糖 1, 6- 二磷酸和磷酸二羟丙酮及甘油醛 -3- 磷酸之间的转变, miR-122 靶向作用 AldoA 可能在 2 型糖尿病的发生发展中发挥重要作用.

关键词 MiR-122, ob/ob 小鼠, AldoA, 2 型糖尿病

学科分类号 Q74, Q291, R34

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00097

2 型糖尿病是 21 世纪一种严重的慢性疾病, 其死亡率约占全球第五位^[1]. 胰岛素抵抗(IR)是 2 型糖尿病的一个重要特征, 主要发生在肝脏、骨骼肌和脂肪组织中. MicroRNA(miRNA)是一类内源性的长约 19~23 个核苷酸的小分子单链非编码 RNA, 由 DNA 转录产生, 通常在转录后水平和翻译水平参与调控基因表达. MiRNA 作为一种强有力的调控因子, 调节约 60%的蛋白质表达^[2]. 它参与多种生物过程, 包括生物个体发育、组织分化、细胞的增殖和凋亡、病毒感染、能量代谢、癌症的发生发展等^[3-4]. 本实验室前期研究发现, miRNA 在血清中能够稳定存在^[5], 并且可以作为癌症和其他疾病的一种新型生物标志物^[6-8].

MiR-122 是一种肝脏特异性的 miRNA, 在成熟个体肝脏中高水平表达, 占肝脏全部 miRNA 含量的 70%左右^[9]. 已有报道表明, miR-122 参与了细胞应激反应、肝癌形成以及丙型肝炎病毒(HCV)复制等多种生理病理过程^[10]. Esau 等^[11]报道

miR-122 能够调节体内脂肪代谢, 抑制正常小鼠肝脏中 miR-122 的表达能够导致肝脏脂肪酸氧化增强和肝脏脂肪合成的速率下降. 本实验室前期研究结果显示, miR-122 的表达水平在链尿霉素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病小鼠和 ob/ob 肥胖小鼠的血清中显著升高^[12], 提示 miR-122 在肝脏能量代谢中发挥着重要作用.

果糖 1, 6- 二磷酸醛缩酶 A(AldoA)是 miR-122 一个已报道的靶基因^[13-14]. 它编码的蛋白是 Aldolase A, 即果糖 1, 6- 二磷酸醛缩酶 A, 主要催化糖酵解途径中果糖 1, 6- 二磷酸和磷酸二羟丙酮及甘油醛 -3- 磷酸之间的转变.

* 国家自然科学基金资助项目(81070653, 81270907, 81370926, J1103512).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 025-83685616, E-mail: xiangy@nju.edu.cn

收稿日期: 2013-03-12, 接受日期: 2013-05-06

最近研究发现,细胞分泌的 miRNAs 作为一种新型的信号分子能够介导细胞之间的相互作用,而微囊泡(microvesicles, MVs)被证实是循环系统 miRNAs 运输的一种有效载体. MVs 是一类由细胞分泌产生,具有脂质双层膜结构、直径为 30 nm~1 μ m 的颗粒状或囊泡状物质^[15-16]. 1967 年, Wolf 等首次发现并报道了来源于血小板的 MVs, 当时命名为“platelet dust”. 经过多年研究发现,在生理和病理状况下,几乎所有类型的细胞都能够分泌 MVs. 在不同的病理条件和不同的环境下,细胞分泌的 MVs 的种类和数量均有较大差异. 部分文献已经报道在血液、尿液、腹水、脑脊液、关节滑液、乳汁以及唾液等各种体液中均发现了 MVs 的存在^[17-19]. 研究表明, MVs 在细胞分化迁移、免疫应答调控、炎症、凝血、血管生成以及肿瘤转移等生理病理过程中发挥了重要作用^[20-21]. 近年来的报道和本实验室的研究结果都说明,组织和细胞分泌的 miRNA 包裹在 MVs 中,并能够进入靶细胞发挥作用.

本研究探讨肝脏特异表达的 miR-122 在 2 型糖尿病动物模型 ob/ob 小鼠中的调控作用,不论对其病理生理过程的认识,还是对 2 型糖尿病发病机理的研究都具有重要的意义.

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠及 ob/ob 小鼠为 8 周龄、体重 20~25 g 的雄性小鼠,购于南京大学模式动物中心. U6snRNA、miR-122 的特异性 TaqMan 探针引物(ABI 公司合成); U6snRNA、AldoA 的传统正向和反向引物(Invitrogen 公司合成); 人源成熟的 has-miR-122 分子(大连 Takara 公司合成),序列为 5' UGGAGUGUGACAAUGGUG-UUUG 3'. 使用的一抗包括鼠来源 GAPDH 单克隆抗体(Santa Cruz, 6C5)及羊来源 Aldolase A 多克隆抗体(Santa Cruz, C-16),二抗为偶联了 HRP 的羊抗小鼠 IgG(Santa Cruz)及鼠抗羊 IgG(Santa Cruz). 彩色预染蛋白质分子质量标准(P0068)、显影定影试剂盒(P0020)等购自碧云天生物技术研究所在所.

1.2 方法

1.2.1 成熟 miR-122 分子对 293T 细胞的转染. 用脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)将成熟的 miR-122 分子转染入 293T 细胞(上海细胞中心). 具体操作为:准备两个 EP 管各加入

Opti-MEM 转染培养液(Gibco 公司),然后分别加入成熟 miR-122 和 Lipofectamine 2000 转染试剂,轻摇混匀. 孵育 5 min 后,将两管迅速混合并摇匀,室温静置 15~20 min. 把上述混合溶液滴加到 293T 细胞表面,静置 2 min,然后补加一定体积的 Opti-MEM 培养液,返回 37℃ 恒温培养箱培养; 5 h 后换成完全高糖 DMEM 培养液继续培养, 24 h 后分别收集细胞和培养液,细胞用 Trizol 溶解置于 -70℃ 保存备用,培养液置于 4℃ 保存备用.

1.2.2 细胞培养液中 microvesicles(MVs)的分离. 按照已有文献的报道,将收集的 293T 细胞培养液进行一系列离心以获取 MVs. 首先用 500 g 离心 10 min 除去细胞和一些大的碎片,然后是 12 500 g 离心 20 min 除去一些小的细胞碎片和垃圾,最后在超速离心机(日立公司)中以 11 000 g 离心 70 min 得到 MVs 沉淀,所有的离心都是在 4℃ 下进行. 根据实验要求,将 MVs 沉淀用 DEPC 水或生理盐水溶解.

1.2.3 Microvesicles 中总 RNA 的提取. 本实验用购于 Invitrogen 公司的 Trizol LS 试剂从细胞培养液的 MVs 中提取 RNA. 具体操作如下:取 200 μ l MVs 的 DEPC 水溶液加入到 EP 管中,与 800 μ l Trizol LS 试剂充分混合后,室温静置 10 min; 每管中加入 200 μ l 氯仿,混合后用力震荡 15 s, 4℃ 下 12 000 g 离心 20 min,将上清液 600 μ l 转移至另一 EP 管中; 在 EP 管中加入 700 μ l 异丙醇与上清液充分混合,由于 MVs 中 RNA 量较少,所以将混合液置于 -20℃ 中静置 1 h 以使 RNA 充分沉降; 在 4℃ 12 000 g 离心 30 min 后除去上清,加入 1 ml 75% DEPC 乙醇将沉淀重悬, 4℃ 12 000 g 离心 10 min; 倒去上清,将残液尽量吸净并晾干,每管加入 20 μ l DEPC 水溶解沉淀.

1.2.4 小鼠肝脏中总 RNA 的提取. 将 ob/ob 小鼠和 C57BL/6 小鼠断颈处死,取出肝脏组织速冻于液氮中,然后存于 -80℃ 备用. 采用 Trizol 试剂提取总 RNA. 取 10~30 mg 的组织内层并加入 1 ml Trizol 试剂匀浆. 静置 5 min 后,加入 200 μ l 氯仿,震荡; 静置 3 min 后,以 12 000 g 离心 15 min. 取上清液,加入等量异丙醇,混匀后静置 10 min; 离心 10 min 后得白色沉淀. 加入 1 ml 75%乙醇,离心 5 min; 倒去上清,晾干,加入 20~50 μ l DEPC 水溶解.

1.2.5 Microvesicles 的荧光标记和尾静脉注射.

DiI-C18(Sigma 公司)是一种亲脂性橙红色荧光

染料, 使用时用适量的 DMSO 溶解. 向 293T 细胞培养液中加入少许染料并染色过夜. 将细胞用 PBS 洗 3 次后换上新的高糖 DMEM 完全培养液继续培养 24 h, 收集培养液, 经过一系列的离心后获得 MVs. 用适量生理盐水溶解, 经尾静脉注射入 BALB/c 小鼠中. 将荧光标记 MVs 以 100 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{只}$ 的剂量尾静脉注射入小鼠体内, 3、12 和 24 h 后取肝组织进行冰冻切片.

收集 miR-122 转染的 293T 细胞培养液和正常培养的 293T 细胞培养液经一系列离心后获得 MVs, 经 qRT-PCR 检测确认转染成功, 用适量生理盐水溶解, 将 MVs 以 100 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{只}$ 的剂量尾静脉注射入 BALB/c 小鼠体内, 3、12 和 24 h 后取肝组织迅速置于液氮中速冻保存备用.

1.2.6 小鼠肝脏组织冰冻切片的制作和观察. 将小鼠用 1%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉后, 剪开胸腔, 暴露心脏; 从心尖插入灌注针至左心室, 剪开右心耳形成灌注液排出通道; 从左心室快速灌注 37℃ 的生理盐水约 50 ml, 至小鼠眼球无色透亮为止; 继续灌入 4℃ 的 4%多聚甲醛溶液(大治生物)约

50 ml, 至小鼠躯干、四肢僵直, 肝脏变硬; 持续 30~40 min 后, 迅速将肝脏组织用 OCT 包埋后置于 -20℃ 的切片机中(Leica 公司)速冻并进行连续冠状冰冻切片, 切片厚度为 20 μm . 用多聚赖氨酸包被的玻片(鼎国生物)对组织贴片后, 置于荧光显微镜下(Olympus 公司)观察.

1.2.7 实时荧光 qRT-PCR 检测 miR-122 及 AldoA 的 mRNA 表达水平. 检测 miR-122 水平时, 用 ABI 公司合成的 U6snRNA、miR-122 特异性 TaqMan 探针引物; 检测 AldoA 的 mRNA 水平时, 用 Invitrogen 公司合成的 U6snRNA 和 AldoA 的传统正向和反向引物. U6snRNA 作为组织中的内参, 是一种 100 nt 大小的管家基因(表 1). 具体操作步骤包括: RNA 逆转录成 cDNA, qRT-PCR 检测特异性 cDNA 的表达和数据的处理. 逆转录体系为 10 μl , 其中加入了 1 μg 总 RNA, 置于 PCR 仪(ABI 公司)中进行逆转录. qRT-PCR 体系为 20 μl , 反应体系各组分在 96 孔 PCR 板(ABI 公司)中混匀, 每个新样品加 3 个复孔, 加好后置于 ABI 7300 序列检测系统中反应.

Table 1 PCR primers used in this study

mRNA	Primers
U6snRNA	Sense primer: 5' CGGGATCCGATCCGACGCCCATCTCTAG 3'
	Antisense primer: 5' CGGTCTGACTAGTATATGTGCTGCCGAAGCG 3'
AldoA	Sense primer: 5' AAGGTAGATAAGGGTGTAGTGC 3'
	Antisense primer: 5' AAGTGCTGTGACGGTTGC 3'

1.2.8 小鼠肝脏中蛋白质的抽提. 取少量肝脏组织, 加入 200 μl 细胞裂解液, 超声波匀浆后静置于冰上 30 min, 在 4℃ 下, 以 12 000 g 离心 7 min, 将上清分装在 EP 管中保存于 -80℃ 备用; 用 BCA 法测定蛋白质浓度. 加入 5 $\times$ 上样缓冲液混匀, 95℃ 煮沸变性 5 min.

1.2.9 蛋白质印迹(Western blot)分析 AldoA 蛋白表达水平. 肝脏总蛋白中取 40 μg 加样, 电泳分离后, 小心剥胶, 160 mA 恒流将蛋白条带电转移至 PVDF 膜上, 5%脱脂牛奶封闭 1 h, 1:1 000 一抗孵育过夜, 第二天按 1:2 000 孵育二抗, 再加入荧光底物, 置暗房内用胶片显影、定影. 胶片烘干后用 Microtek 扫描仪扫描后, 使用 BandsScan 软件对条带进行灰度分析. 本实验的组织取自 ob/ob 小鼠和 C57BL/6 小鼠各 10 只进行独立重复试验.

1.3 数据处理

用 SPASS13.0 软件处理实验数据. 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据用 Student *t*-test 进行比较分析, $P < 0.05$ 视为具有统计学差异.

2 结 果

2.1 Ob/ob 小鼠及 C57BL/6 小鼠肝脏中 miR-122 的表达水平

本组前期研究发现, ob/ob 小鼠血清中 miR-122 的表达水平是 C57BL/6 小鼠的 4.5 倍左右^[12]. 本实验中, 首先用 qRT-PCR 检测了 ob/ob 小鼠和 C57BL/6 小鼠肝脏中 miR-122 的含量. 实验结果显示(图 1), 和正常对照相比, ob/ob 肥胖小鼠肝脏中 miR-122 的含量显著下降.

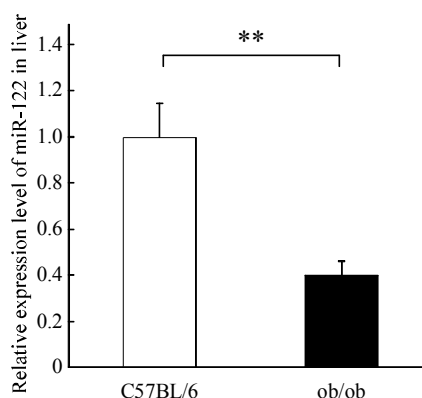


Fig. 1 Quantitative RT-PCR analysis of the relative expression level of miR-122 in liver between ob/ob mice and C57BL/6

Comparison of miR-122 relative expression level in liver using a hydrolysis probe-based qRT-PCR assay. The data is presented as the $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $**P < 0.01$.

2.2 Ob/ob 小鼠及 C57BL/6 小鼠肝脏中 AldoA 蛋白及 AldoA mRNA 的表达水平

为了探索肝脏中 miR-122 含量变化可能具有的代谢作用, 检测了其靶蛋白 AldoA 的表达水平. Western blot 分析结果如图 2 所示: 在肝脏组织中, ob/ob 小鼠的 AldoA 表达水平明显高于 C57BL/6 小鼠.

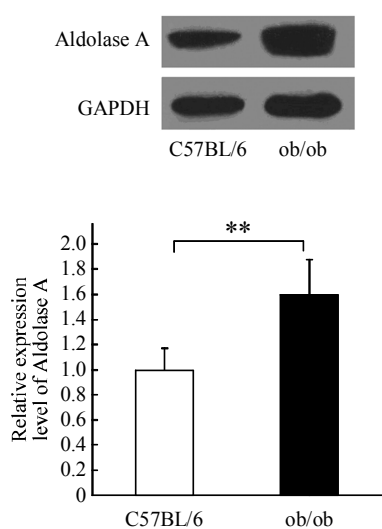


Fig. 2 Western blotting analysis of AldoA in liver of ob/ob mice and C57BL/6 mice

Quantification of protein bands was performed using the Image software. Equal protein loading was monitored by blotting the same samples with an antibody against GAPDH. The data is presented as the $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $**P < 0.01$.

我们研究了肝脏中 miR-122 靶基因 AldoA mRNA 的表达水平. qRT-PCR 分析结果如图 3 所示, ob/ob 小鼠与 C57BL/6 小鼠肝脏中 AldoA 的 mRNA 含量差异不大, 即在转录水平并没有显著差异.

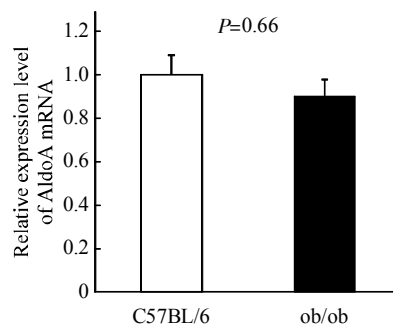


Fig. 3 Quantitative RT-PCR analysis of the relative expression level of AldoA mRNA in liver between ob/ob mice and C57BL/6

Comparison of AldoA mRNA expression level in liver using a qRT-PCR assay. The data is presented as the $\bar{x} \pm s$, $n=10$.

2.3 MVs 通过尾静脉注射进入肝脏的研究

用成熟 miR-122 对 293T 细胞进行转染 (800 pmol/dish), 收集转染后的培养液分离出的 MVs, 用 qRT-PCR 检测分离的 MVs 中 miR-122 的表达水平, 以确定 miR-122 的转染效率, 结果(图 4)显示, 转染后 293T 细胞 MVs 中 miR-122 的含量是未转染成熟 miR-122 细胞 MVs 的 40 倍, 说明 miR-122 已经成功转染.

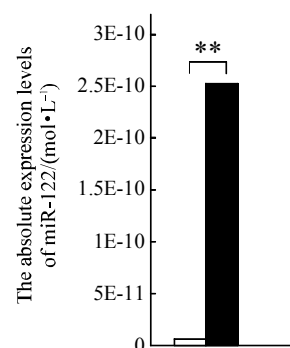


Fig. 4 Quantitative RT-PCR analysis of the absolute expression level of miR-122 in MVs

The absolute expression levels of miR-122 in MVs from 293T cells transfected with mature miR-122 or normal 293T cells were determined by quantitative RT-PCR. The data is presented as the $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $**P < 0.01$. □: lipo2000; ■: lipo2000+miR-122.

用荧光染料 DiI-C₁₈ 对 293T 细胞的 MVs 进行荧光标记. 将荧光 MVs 以 100 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{只}$ 的剂量尾静脉注射入 BALB/c 小鼠体内, 对照组则为尾静脉注入生理盐水. 3、12 和 24 h 后取肝组织进行冰冻切片, 在荧光显微镜下观察, 发现 500 $\mu\text{g}/\text{只}$ 的剂量尾静脉注射后肝脏中的荧光最

明显. 图 5 显示在 3 h 的肝组织中发现了明显的荧光, 说明荧光标记的 MVs 通过尾静脉注射进入了肝脏组织. 图中绿色和蓝色视野中没有荧光而红色视野中出现荧光, 说明 MVs 的红色荧光特异性. 形态学的观察结果说明 MVs 经循环系统进入了肝脏组织.

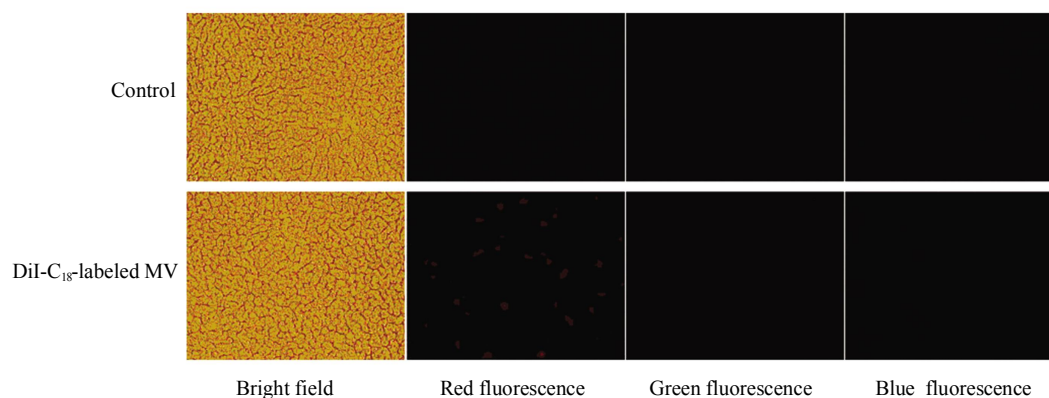


Fig. 5 The fluorescence image of DiI-C₁₈-labeled MVs in liver of BALB/c mice

MVs isolated from DiI-C₁₈-labeled 293T cells or saline solution control were injected intravenously into BALB/c mice. After 3h, the mouse liver was isolated, crysectioned and viewed under fluorescence microscopy. The red dots in the image indicates the existence of DiI-C₁₈-labeled MVs in liver. The green fluorescence and blue fluorescence were used as controls. Every ten randomly selected visual field in one slice was analyzed, $n=10$.

2.4 尾静脉注射 MVs 后肝脏中 miR-122 表达水平的变化

用 qRT-PCR 技术检测了尾静脉注射入 MVs 与生理盐水, 24 h 后两组 BALB/c 小鼠肝脏中 miR-122 的表达水平. 实验结果如图 6 所示, 注入 MVs 后 BALB/c 小鼠肝脏中 miR-122 的含量是对照组的 4.1 倍.

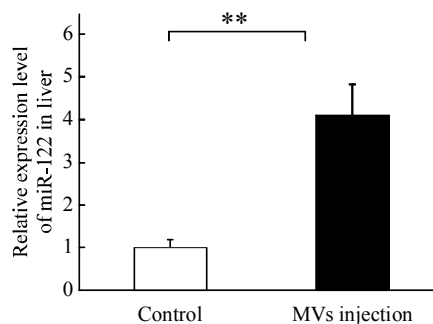


Fig. 6 Quantitative RT-PCR analysis of the relative expression level of miR-122 in liver of BALB/c mice injected with MVs

Comparison of miR-122 relative expression level in liver of BALB/c mice injected with miR-122 transfected 293T MVs and saline solution by qRT-PCR assay. The data is presented as the $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $**P < 0.01$.

2.5 尾静脉注射 MVs 后肝脏中 AldoA 蛋白的表达变化

我们检测了注射 MVs 后肝脏中 miR-122 靶蛋白 AldoA 的表达水平. Western blot 分析结果如图 7 所示: 在 BALB/c 小鼠肝脏组织中, 尾静脉注

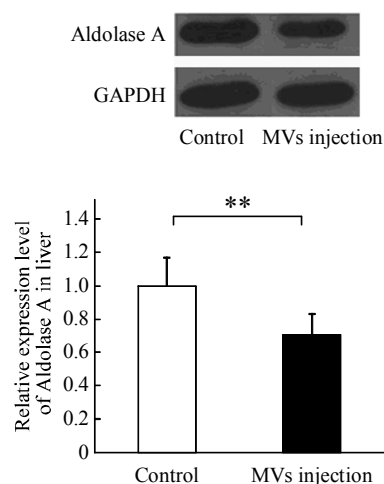


Fig. 7 Western blotting analysis of Aldolase A in liver of BALB/c mice injected with MVs

Quantification of protein bands was performed using the Image software. Equal protein loading was monitored by blotting the same samples with an antibody against GAPDH. The data is presented as the $\bar{x} \pm s$, $n=10$, $**P < 0.01$.

射包裹有 miR-122 的 MVs 后 AldoA 的表达量显著低于生理盐水对照组。

3 讨 论

本实验室前期研究证实, 循环 miRNA 在血浆/血清中稳定存在, 且能够作为许多疾病的生物标志物。但是对循环 miRNAs 的生物学功能却了解甚少。Skog 等^[22]研究发现, 体外培养的细胞分泌的 exosomes 中含有 miRNA, Hunter 等^[23]的研究也证实了人类血液 MVs 中 miRNA 的存在, 这些发现提示细胞分泌的 MVs 很有可能是循环 miRNA 运输的一个有效载体。本实验室的最新研究成果也报道了血清和培养的 THP-1 细胞分泌的 MVs 中 miRNA 及其生物学功能^[24], 证明 MVs 是 miRNA 运输的有效载体, 而且还可能运输循环 miRNA 到靶细胞进行细胞间的交流。

2 型糖尿病是世界范围内常见的一种异质性代谢失调综合征^[25], 目前认为 2 型糖尿病的发病原因是多种因素共同作用的结果, 包括遗传和环境因素影响 β 细胞的功能和组织的胰岛素敏感性^[26-27]。最近几年, 一些研究报道了 miRNAs 可能成为参与 2 型糖尿病发病机理的一种新的因素。

本研究结果显示: ob/ob 肥胖小鼠的血清中含有高水平的肝脏特异性 miR-122, 而肝脏中 miR-122 含量相应下降; AldoA 蛋白在 ob/ob 肥胖小鼠肝脏中的表达水平显著高于正常 C57BL/6J 小鼠。因此我们推测在 2 型糖尿病的发展过程中, 肝细胞能够分泌更多的 miR-122 进入血液而导致肝脏中 miR-122 的减少, 从而能够通过调节代谢相关靶基因的表达式来改变肝细胞的相关生物学功能。有关 miR-122 靶向作用 AldoA 的研究已有明确报道^[13-14]。AldoA 与体内糖的摄取和吸收等代谢过程是紧密联系的。有研究表明, AldoA 在胰岛素刺激的葡萄糖转运体(GLUT4)胞外转运中发挥着重要作用^[28]。Hittel 等^[29]研究发现, 肥胖者腹直肌中 AldoA 的表达水平相对于正常对照组是显著上升的。

在本文的研究中, AldoA 蛋白在 ob/ob 肥胖小鼠肝脏中的表达水平显著高于在正常 C57BL/6J 小鼠肝脏中的表达, 而用成熟 miR-122 对 293T 细胞进行转染, 收集转染后的培养液分离出 MVs, 经 qRT-PCR 检测确认转染成功, 通过尾静脉注入到小鼠体内, 发现小鼠肝脏中 miR-122 的含量明显上升, 而 AldoA 蛋白的表达量显著下调。我们的研究结果证明, 肝脏中 miR-122 含量的下降能够导致

AldoA 这个糖代谢相关酶表达的增加, 肝细胞分泌的 miR-122 以 MVs 的方式进入循环系统, 可能在调节胰岛素抵抗的形成及 2 型糖尿病的发展中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Sanghera D K, Blackett P R. Type 2 diabetes genetics: beyond GWAS. *J Diabetes Metab*, 2012, **3**(198): 6948-6970
- [2] Friedman R C, Farh K K, Burge C B, *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, **19**(1): 92-105
- [3] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, **431**(7006): 350-355
- [4] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [5] Chen X, Ba Y, Ma L J, *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, **18**(10): 997-1006
- [6] Chen X, Hu Z, Wang W, *et al.* Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis. *Int J Cancer*, 2011, **130**(7): 1002
- [7] Liu R, Zhang C, Hu Z, *et al.* A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer*, 2011, **47**(5): 784-791
- [8] Zhang C, Wang C, Chen X, *et al.* Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem*, 2010, **56**(12): 1871-1879
- [9] Chang J, Nicolas E, Marks D, *et al.* miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol*, 2004, **1**(2): 106-113
- [10] Girard M, Jacquemin E, Munnich A, *et al.* miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*, 2008, **48**(4): 648-656
- [11] Esau C, Davis S, Murray S F, *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metab*, 2006, **3**(2): 87-98
- [12] Li S, Chen X, Zhang H, *et al.* Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res*, 2009, **50**(9): 1756-1765
- [13] Elmén J, Lindow M, Silahtaroglu A, *et al.* Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucl Acids Res*, 2008, **36**(4): 1153-1162
- [14] Fabani M M, Gait M J. miR-122 targeting with LNA/2'-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA-peptide conjugates. *RNA*, 2008, **14**(2): 336-346
- [15] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**(8): 569-579
- [16] Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles:

- artefacts no more. Trends Cell Biol, 2009, **19**(2): 43–51
- [17] Simpson R J, Lim J W, Moritz R L, *et al.* Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. Expert Rev Proteomics, 2009, **6**(3): 267–283
- [18] Lee T H, D'Asti E, Magnus N, *et al.* Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer-the emerging science of cellular 'debris'. Semin Immunopathol, 2011, **33**(5): 455–467
- [19] Pap E, Pallinger E, Pasztoi M, *et al.* Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. Inflamm Res, 2009, **58**(1): 1–8
- [20] Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. Curr Opin Cell Biol, 2004, **16**(4): 415–421
- [21] Mathivanan S, Ji H, Simpson R J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. J Proteomics, 2010, **73**(10): 1907–1920
- [22] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol, 2008, **10**(12): 1470–1476
- [23] Hunter M P, Ismail N, Zhang X, *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS One, 2008, **3**: e3694
- [24] Zhang Y, Liu D, Chen X, *et al.* Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. Mol Cell, 2010, **39**(1): 133–144
- [25] Engelgau M M, Geiss L S, Saaddine J B, *et al.* The evolving diabetes burden in the United States. Ann Intern Med, 2004, **140**(11): 945–950.
- [26] Scheen A J. Pathophysiology of type 2 diabetes. Acta Clin Belg, 2003, **58**(6): 335–341
- [27] Unger J, Parkin C G. Type 2 diabetes: an expanded view of pathophysiology and therapy. Postgrad Med, 2010, **122**(3): 145–157
- [28] Kao A W, Noda Y, Johnson J H, *et al.* Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. J Biol Chem, 1999, **274**(25): 17742–17747
- [29] Hittel D S, Hathout Y, Hoffman E P, *et al.* Proteome analysis of skeletal muscle from obese and morbidly obese women. Diabetes, 2005, **54**(5): 1283–1288

Role of miR-122 Targeting AldoA in The Metabolism of ob/ob Mice*

FANG Zhi-Juan**, LI Peng**, DIAO Wen-Li, JIANG Ting, ZHANG Chen-Yu, XIANG Yang***

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract In previous study, our group have found that there is a significant increased level of miR-122 in the serum of ob/ob mice, an animal model of type 2 diabetes. Here, we further investigated the role of miR-122 targeting AldoA in the liver of ob/ob mice. First, a significant decrease of miR-122 level and a notable increase of AldoA expression was found in the liver of the ob/ob mice. Second, mature miR-122 was transfected into 293T cells and then MVs isolated from 293T cells were collected; qRT-PCR was applied to confirm that miR-122 was rich in MVs. Third, specific fluorescent dye DiI-C₁₈-labeled MVs were injected intravenously into BALB/c mice; the frozen section of liver was observed through fluorescent microscopy. Finally, miR-122 targeting AldoA in the metabolism of ob/ob mice was confirmed by qRT-PCR and Western blotting. AldoA mainly catalysed the transformation between dihydroxyacetone phosphate, glyceraldehyde-3- phosphate and fructose 1, 6 - bisphosphate in glycolytic pathway. MiR-122 may play an important role in the pathogenesis of ob/ob mice through AldoA pathway.

Key words miR-122, ob/ob mice, AldoA, type 2 diabete

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00097

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81070653, 81270907, 81370926, J1103512).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-25-83685616, E-mail: xiangy@nju.edu.cn

Received: March 12, 2013 Accepted: May 6, 2013