

miR-191 通过调控 C/EBP β 转录影响猪前体脂肪细胞分化*

刘 帅 宁小敏 李美航 仇 杨 李艳杰 董培越 杨公社**

(西北农林科技大学动物科技学院动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100)

摘要 对实验室前期 Solexa 结果进行深入挖掘, 结合生物信息学分析从不同发育阶段猪皮下脂肪组织差异表达的 miRNAs 中筛选出高丰度差异极显著的候选 miR-191. 采用腺病毒过表达 miR-191, 实时定量 PCR、Western blot 及双荧光素酶报告基因检测等技术方法, 初步研究 miR-191 对猪前体脂肪细胞分化的影响. 结果发现, miR-191 随着猪前体脂肪细胞的分化表达量逐渐增加. 与对照组相比, 过表达 miR-191 的猪前体脂肪细胞中 miR-191 转录本显著增加, 并引起 CCAAT 增强子结合蛋白 β (C/EBP β)、PPAR γ 和 aP2 的 mRNA 水平降低, 抑制了猪前体脂肪细胞分化. 同时, Western blot 结果显示, 与对照组相比过表达 miR-191 的猪前体脂肪细胞在 48 h C/EBP β 蛋白水平下降了 55%. 更重要的是, 通过 TargetScan 等算法正向筛选以及 MicroInspector 反向筛选联合获得 miR-191 候选靶基因, 经双荧光素酶报告基因检测结果证实, miR-191 可直接作用于 C/EBP β 3'UTR, 从而降低萤火虫荧光素酶活性. 综上所述, miR-191 可能通过抑制脂肪细胞分化早期标志基因 C/EBP β 的表达, 从而抑制了猪前体脂肪细胞的分化.

关键词 miR-191, C/EBP β , 猪前体脂肪细胞, 表达谱, 靶基因预测, 腺病毒, 双荧光素酶报告基因检测系统

学科分类号 Q78, S82

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00267

microRNAs (miRNAs) 是近年来发现存在于真核生物中的一类内源性非编码单链小分子 RNAs, 其大小在 19~24nt, 位于基因组非编码区, 具有高度保守性、时序性和组织特异性^[1]. 已经证实, miRNAs 可参与和调控包括时序发育^[2]、细胞增殖和凋亡^[3-4]、肿瘤发生^[5-6]、神经元发育^[6]、脂肪细胞分化^[7-9]等在内的多种生理病理过程, 是在生命中起着重要调控作用的小分子, miRNAs 已知的功能是作为基因表达的负调控因子在转录后水平调控基因的表达, 主要通过特异性识别其靶基因 mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)序列下调靶基因的表达或翻译^[10]. 脂肪细胞的发育与分化是一个动态而复杂的过程^[11]. 首先, 位于脂肪组织基质微管部分的多潜能间充质干细胞定向为前体脂肪细胞, 其次是前体脂肪细胞的增殖, 启动分化程序和终末分化. 脂肪细胞形成是一个高度协调的转录过程, 受大量的转录调节因子和自分泌、旁分泌、内分泌因子以及表观遗传的严格调控.

近期的研究表明, miRNAs 在脂肪细胞发育分化的过程中也发挥重要的作用, 其中 miR-143 是第一个被发现在脂肪细胞分化过程起调控作用的 miRNA, 其促进脂肪细胞分化是通过靶基因胞外信号调节激酶 5(ERK5)实现的^[8]. 紧接着一些 miRNAs 在脂肪细胞中发挥重要作用的研究陆续被报道. 例如, 在 3T3-L1 前体脂肪细胞中过表达 miR-103、miR-143^[9]和 miR-17/92 簇^[12]能够促进脂肪细胞分化, 然而过表达 miR-27b 和 miR-27a 能抑制 3T3-L1 前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化^[13]. 值得注意的是, 一项最近的研究指出, 在基于小鼠胚胎成纤维细胞衍生的 3T3-L1 前体脂肪细胞中,

* 国家自然科学基金(31072014)和西北农林科技大学“创新团队建设计划”资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 029-87092430, E-mail: gsyang999@hotmail.com

收稿日期: 2012-06-04, 接受日期: 2012-11-22

过表达 miR-155 能够通过调节 CCAAT 增强子结合蛋白 β (CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP β) 和 cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 的表达而抑制脂肪细胞分化^[14]。总结近年来 miRNAs 在脂肪形成过程中的研究发现, miRNAs 既可促进成脂也可抑制成脂, 如 miR-27a/b、miR-138 等可抑制成脂, Let-7、miR-21、miR-143 和 miR-378 等则可以促进脂肪细胞分化^[15]。然而, miRNAs 调控猪脂肪形成的研究罕有报道。为了更加全面地了解猪脂肪细胞不同发育阶段 miRNAs 的表达模式, 本实验室前期采用荣昌猪为模型, 利用华大基因公司的 Solexa 测序技术检测了两个不同发育时期荣昌猪背部皮下脂肪组织的 miRNAs 表达谱, 并从宏观上初步探讨了其对脂肪细胞发育以及分化、代谢等方面的调控作用, 但对 Solexa 测序结果中某个特定 miRNA 在猪脂肪细胞分化过程中作用机理的研究甚少。

miRNA 表达谱会发生变化已经在许多物种的脂肪细胞发育过程中得到了证实, 包括小鼠^[7]、人类^[8]、牛^[16]。本实验室前期 Solexa 测序结果显示, 在两个不同日龄间的荣昌猪背部皮下脂肪组织中存在 123 个差异表达的 miRNAs, 其中上调的有 93 个, 下调的有 30 个, 与 7 日龄仔猪背部皮下脂肪组织相比, miR-191 的表达量在 240 日龄成年猪背部皮下脂肪组织样本中显著上调 2.0829 倍^[17]。这一结果与 2004 年 Esau 等^[8]的 miRNA 芯片数据一致, 他们的研究结果显示, 在人类脂肪间充质干细胞分化期间有 22 个 miRNAs 差异表达, 与前体脂肪细胞相比成熟脂肪细胞中 miR-191 的表达量上调了 3.22 倍。这也符合另一个 miRNA 表达谱所显示的结果, 3T3-L1 前体脂肪细胞在分化过程中 miR-191 表达上调^[18]。先前的许多研究表明, 前体脂肪细胞和成熟脂肪细胞中 miRNAs 的表达量存在差异, 可能意味着 miRNAs 在脂肪细胞分化过程中发挥着潜在的调控作用^[7]。这些研究暗示 miR-191 可能是调控脂肪细胞形成的候选 miRNA。然而, 关于 miR-191 在调控猪前体脂肪细胞分化方面的确切作用机制尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物。3 日龄健康三元长白仔猪, 购自陕西杨凌光明猪场, 共 3 头, 体重 1.5~2.5 kg, 购半天内完成取样。180 日龄健康的三元长白猪,

于西北农林科技大学实验基地采样获得, 共 3 头, 体重 100~110 kg。动物实验遵循国家科委《实验动物管理条例》, 实验程序符合国家及提供实验动物单位制订有关实验动物福利的规章和制度。

1.1.2 质粒、菌株和细胞系。DH5 α Competent Cells 购自北京康为世纪生物科技有限公司; pMD18-T Vector 购自日本 Takara 公司; *E. coli* 菌株 BJ5183、pAd-miR-NTC (pAd-miR-nontargeting control)、pAdTrack-CMV、pAdEasy-1、含有 pAdEasy 的 BJ5183 感受态细胞、pGL3-Control、pRL-TK 和 pGL3-Basic 质粒载体均为本实验室保存; 293A 和 293T 细胞系为本实验室保存。

1.1.3 试剂。RNAiso Plus、PrimeScript[®] RT reagent Kit Perfect Real Time、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II、*Xho* I、*Kpn* I 和 T4 DNA Ligase 均购自日本 Takara 公司; *Pac* I 和 *Pme* I 购自美国 New England Biolabs 公司; Bulge-Loop[™] miRNA qRT-PCR Primer Set 购自中国 RIBOBIO 公司; Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 购自美国 Promega 公司; Opti-MEM、地塞米松 (dexamethasone)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (3-isobutyl-1-methyl xanthine, IBMX) 和胰岛素 (insulin) 均购自美国 Sigma 公司; Lipofectamine[™] 2000 购自美国 Invitrogen 公司; DMEM/F12 干粉、I 型胶原酶、胰蛋白酶和 Hepes 均购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 HyClone 公司; BSA 购自美国 Amersco 公司; HEPES 德国 Merck 公司; RIPA 裂解缓冲液购自中国 Beyotime 公司; β -actin (C4): sc-47778、C/EBP β (H-7): sc-7962 单抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 化学发光 ECL 试剂购自美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 猪前体脂肪细胞的获得及培养。取样前用 0.5% 的新洁尔灭清洗仔猪 3 遍, 电击处死。无菌分离猪肩胛及颈部皮下脂肪组织并剪碎至 1 mm³ 左右, 经 I 型胶原酶 37 $^{\circ}$ C 消化 30~45 min, 用孔径为 200 目的不锈钢筛过滤, 收集滤液 1 700 *g* 离心 5 min, 弃上清用 PBS 缓冲液重悬后离心, 重复操作 4~5 次后将沉积在离心管底的细胞团用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 高糖培养基吹打混匀制成单细胞悬液, 即可得到混合猪前体脂肪细胞。计数后的细胞以 5.0×10^4 个/cm² 密度接种, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。利用差速贴壁法对接种细胞清洗换液可得到约 90% 的前体脂肪细胞。

1.2.2 猪前体脂肪细胞的诱导分化。用含 10% 胎

牛血清的 DMEM/F12 高糖培养基, 在 37℃、5% CO₂ 条件培养猪前体脂肪细胞, 待细胞生长至完全汇合后 2 天(第 0 天)时, 换为成脂诱导培养液(以 DMEM/F12 高糖培养基为基础并含有 10%胎牛血清, 1 μ mol/L 地塞米松, 0.5 mmol/L IBMX, 5 mg/L 胰岛素). 2 天后撤去诱导剂, 换为只含 5 mg/L 胰岛素、10%胎牛血清的 DMEM/F12 高糖培养基继续培养, 之后每隔 2 天用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 高糖培养基换液. 至第 8 天约 70%的猪前体脂肪细胞呈成熟脂肪细胞表型.

1.2.3 生物信息学分析与靶基因预测. 利用网络共享资源 TargetScan(Release 6.2)(<http://www.targetscan.org/>) 及 PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertbrate.cgi)搜索 miR-191 的靶基因并取其交集, 筛选与脂肪细胞分化的相关基因; 将这些候选基因通过 MicroInspector (<http://bioinfo.uniplovdiv.bg/microinspector/>)反向筛选, 首先在最新版的 miRBase 数据库(release18.0, 2011)中下载所有的猪 miRNA 成熟序列共 228 条, 全部将其输入 MicroInspector 软件中, 设置杂交温度为 37℃, 最低自由能(MFE)为-20 kcal/mol, 再根据序列匹配、miRNA 与 mRNA 双链的热稳定性以及靶位点的保守性, 分析候选靶基因 3' UTR 与所有的 228 条 miRNA 之间可能形成的二聚体, 按照种子区规则和热稳定性逐条筛选, 寻找到与这些候选靶基因相互作用的 miRNAs; 然后将这些 miRNAs 再与 Solexa 结果对应, 观察其表达丰度及差异性; 最后

将分析结果经 miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)、RNA22(<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>)和 RNAhybrid(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>)做进一步验证.

1.2.4 miR-191 重组腺病毒表达载体的构建及鉴定. 为了更好地研究 miR-191 在脂肪细胞分化中的功能, 通过基因克隆的方法, 以猪 miR-191 stem-loop 序列(NR_038528.1)为中心在猪基因组分别向上下游各延伸 300 bp, 进而以此序列设计能扩增出包含 pre-miR-191 片段的引物(表 1). 利用表 1 中带酶切位点的上下游引物从猪基因组扩增出 pre-miR-191 片段, 克隆到 pMD[®] 18-T 载体上, 将测序正确的阳性克隆定名为 T-miR-191. 用 *Kpn* I 和 *Xho* I 分别双酶切 T-miR-191 和穿梭载体 pAdTrack-CMV 并回收目的片段进行常规连接, 经测序鉴定获得带有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因的穿梭质粒 pAdTrack-miR-191. 将 200 ng pAdTrack-miR-191 经 *Pme* I 线性化并纯化后与 pAdEasy-1 共转化入适合质粒重组的 BJ5183 感受态细胞, 将获得的同源重组子转入适合质粒大量扩增的 DH5 α 大肠杆菌中. 重组后的质粒经 *Pac* I 酶切鉴定可以释放出一条 23 kb 的大片段和一条 4.5 kb 的小片段. 之后将酶切呈阳性的单克隆测序鉴定后命名为 pAd-miR-191. 测序工作均送至上海生工生物工程技术有限公司(以下简称上海生工).

Table 1 Primers of pri-miR-191 sequence and primers with restriction site

Gene name	Primer sequence (5'~3')	GC content/%	DNA Tm/℃	PCR Products/bp
E-miR-191-F1 with <i>Kpn</i> I	CGGGGTACCATCAGAGTGGCCCCGATAAAGTA	54.84	68.65	401
E-miR-191-R1 with <i>Xho</i> I	CCGCTCGAGAATCCTACCCCGTGGATCTAAT	54.84	68.65	

1.2.5 Ad-miR-191 的包装、扩繁以及侵染原代细胞. 将 *Pac* I 线性化并纯化的重组腺病毒 pAd-miR-191 DNA 片段转染至汇合度为 60%~70%的 293A 细胞系. 转染步骤按照 Lipofectamine[™]2000 说明书操作. 转染后 24 h 便可在倒置荧光显微镜下观察, 如果有表达 EGFP 的阳性细胞则表明腺病毒已经整合到细胞内, 并开始表达报告基因和 miR-191, 转染后第 3 天可见成簇的荧光存在, 形似彗星样, 转染后第 4 至 6 天时会有大量的 EGFP

表达, 至转染后第 7 天在显微镜亮视野下可以观察到细胞出现病毒空斑或细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)现象并伴随大量细胞漂起, 荧光显微镜下能观察到最早发出成簇荧光的贴壁细胞已经漂起, 出现 EGFP 空斑. 当全部细胞发出荧光, 且 70%~80%细胞由于病毒侵噬呈现散星状漂浮现象, 表明腺病毒已经包装成完整的病毒颗粒, 此时收集细胞及培养基上清. 上清液于-70℃冻存, 细胞沉淀用 1 ml 培养上清悬浮, 于液氮和 37℃水

浴中反复冻融 4~5 次, 7 000 *g* 离心 10 min, 收集上清即为第一代病毒液, 可用于扩繁 Ad-miR-191 病毒颗粒. 同法获得对照 Ad-miR-NTC 病毒颗粒. 待猪前体脂肪细胞生长至汇合度达 70%~85% 时用扩繁后获得的重组腺病毒 Ad-miR-191 侵染, 为了诱导猪前体脂肪细胞分化, 在加毒处理 2 天后用 1.2.2 所述的方法开始诱导, 同法 Ad-miR-NTC 处理对照组.

1.2.6 油红 O 染色. 将用于染色的细胞弃去培养皿中培养液, PBS 洗 3 次, 用 4%多聚甲醛(PBS 配制)37℃ 固定 45 min, PBS 洗 3 次, 油红 O 工作溶液(储备溶液: 0.5 g 油红 O 溶于 100 ml 异丙醇; 工作溶液:油红 O 储备溶液与蒸馏水按 3:2 体积混合, 经过滤后使用)室温染色 15 min, PBS 洗 3 次, 倒置显微镜下观察照相.

1.2.7 细胞 RNA 提取及实时定量 PCR 检测. 当检测 miR-191 在猪前体脂肪细胞不同分化阶段的表达量时, 分别在诱导第 0、2、4、6、8、10 天观察细

胞形态并收集细胞, 按 Trizol 法提取脂肪细胞的总 RNA. 经 0.9%~1.2%琼脂糖凝胶电泳检测细胞总 RNA, 将 RNA 样品统一调到 200 μ g/L, 反转录和实时定量反应参照 Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Primer Set 说明书操作, 样品由 U6 表达水平标准化. 分析脂肪形成关键转录因子与脂肪细胞特异基因的表达量时反转录按照 PrimeScript® RT reagent Kit Perfect Real Time 说明书操作. 将反转录产物做 4 倍稀释, Real-time PCR 反应程序按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 操作, 表达标准化内参为 β -actin. miR-191 以及成脂标志基因的 mRNA 相对表达量数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量. miR-191 与内参 U6 的反转录特异引物及实时定量引物均由广州锐博生物科技有限公司设计合成. 成脂标志基因 PPAR γ 、C/EBP β 和 aP2 的实时定量引物及内参 β -Actin 引物(表 2)由上海生工生物工程技术有限公司合成.

Table 2 Primer sequences and parameters for real-time quantitative PCR of related genes

Gene name	Primer sequence oligonucleotides (5'~3')	GC content/%	DNA Tm/℃	GenBank Accession No.	PCR Products/bp
PPAR γ F:	AGGACTACCAAAGTGCCATCAAA	43.48	62.07	AF059245	142
PPAR γ R:	GAGGCTTTATCCCCACAGACAC	54.55	62.12		
C/EBP β F:	GCACAGCGACGAGTACAAGA	55.0	58.00	NM_001199889	98
C/EBP β R:	TATGCTGCGTCTCCAGGTTG	55.0	58.00		
β -Actin F:	GGACTTCGAGCAGGAGATGG	60.00	62.26	AY550069	138
β -Actin R:	AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG	60.00	62.14		
aP2 F:	GAGCACCATAACCTTAGATGGA	50.0	58.21	DQ450677	121
aP2 R:	AAATTCTGGTAGCCGTGACA	47.8	58.23		

1.2.8 Western blot. 将需要检测的细胞样品弃去培养皿中培养液, PBS 洗 1 次, 每小皿加入 100 μ l 含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液. 用预冷的细胞刮铲将细胞从培养皿中刮下收集入离心管, 置于冰上 30 min 使其充分裂解, 12 000 *g* 离心 10 min, 取上清, 以 Bradford 方法对总蛋白进行定量. 根据定量结果, 用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液将各蛋白质样品浓度调成一致后 95℃ 水浴变性 10 min. 取蛋白质样品 80 μ g 上样于 SDS-PAGE 胶孔中, 以 80V 恒压分离至浓缩胶后变换电压为 120V 于分离胶中充分分离蛋白质, 然后以 200 mA 恒流将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 用抗 C/EBP β 和 β -actin 的一抗(稀释比例 1:300)4℃

孵育过夜. 再与对应种属的辣根过氧化物酶偶联的二抗(anti-mouse, 稀释比例 1:2 000)室温下孵育 2 h, Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+成像系统检测目的蛋白, 并用 Quantity One 软件分析蛋白质表达量.

1.2.9 pGL3-C/EBP β 3' UTR 荧光素酶报告基因载体的构建. 根据 GenBank 上公布的猪 C/EBP β 3' UTR 登录号 FJ869121.1 设计引物(表 3), 利用表 3 中的上下游引物经 PCR 从猪基因组中扩增获得两端带有 *Xba* I 酶切位点的 C/EBP β 3' UTR 片段, 连入 pMD® 18-T 载体进行菌液 PCR 鉴定, 阳性单克隆经 *Xba* I 酶切均能释放出 215 bp 的目的条带, 再将酶切鉴定呈阳性的单克隆送上海生工测序, 测序成功质粒命名为 T-C/EBP β 3' UTR. 将测

序正确的单克隆经 *Xba* I 单酶切获得 215 bp 的 C/EBPβ 3'UTR 片段, 插入 *Xba* I 单酶切的 pGL3-Control 载体(5.2 kb)萤火虫荧光素酶报告基因下游区域, 将测序结果为 C/EBPβ 3'UTR 片段正向插入 pGL3-Control 载体的单克隆命名为 pGL3-C/EBPβ 3'UTR 荧光素酶报告基因载体.

Table 3 Primer sequences and parameters for PCR of related genes

Gene name	Primer sequence (5'~3')	GC content/%	DNA Tm/℃	PCR Products/bp
E-CEBP-F with <i>Xba</i> I	TGCTCTAGAAACCCACGTGTAAGTGTCTCAGC	50.00	66.13	215
E-CEBP-R with <i>Xba</i> I	TGCTCTAGAAAGTGTCTTAATGCTCGAACGG	45.16	64.69	

1.2.10 双荧光素酶报告基因转染及活性分析. 转染前 12~36 h 胰酶消化 293T 细胞并计数, 将细胞铺在 24 孔板中培养, 使其在转染时的汇合度达 80%~90%. 使用 Lipofectamine 2000 将双荧光素酶报告载体同 miRNAs 共转染至 293T 细胞中, 每孔细胞 pAd-miR-191 质粒或无靶位点的对照 pAd-miR-NTC 终浓度为 600 ng, pGL-3-C/EBPβ 3'UTR 或 pGL3-Basic 质粒 225 ng, pRL-TK 质粒(内参) 75 ng, Opti-MEM1 medium 与共转染混合物培养细胞 4~6 h 后换为正常生长培养基. 转染 48 h 后, 收集细胞并按照 Promega 公司双荧光素酶检测试剂盒说明书操作, 用 PerkinElmer™ VICTORx5 多标记微孔板检测仪测定不同处理组的海肾(内参)和萤火虫荧光素酶活性.

1.2.11 统计分析. 每组实验重复 3 次, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 采用 SPSS11.5 软件的 One-way ANOVA 进行方差分析与显著性检验, 用最小显著

差数法(LSD)检验不同处理之间的差异.

2 结果与分析

2.1 猪前体脂肪细胞分化过程中 miR-191 的表达

在猪前体脂肪细胞诱导分化的第 1、4、8 天分别观察细胞分化情况并对其进行油红 O 染色, 如图 1 所示, 说明分离出的前体脂肪细胞可以满足后续实验. 为了研究 miR-191 在猪前体脂肪细胞分化期间的表达动力学, 在诱导分化的第 0、2、4、6、8、10 天收集细胞, 按 Trizol 法提取总 RNA, 实时定量 PCR 检测 miR-191 的表达, 结果如图 2 所示, 体外培养的猪前体脂肪细胞在诱导分化过程中与未经处理的第 0 天对照相比, 在第 6 天 miR-191 表达量升高了 2.7 倍且在分化中后期始终保持较高水平. 符合先前的报道, 在人类脂肪间充质干细胞或 3T3-L1 前脂肪细胞向成熟脂细胞分化过程中 miR-191 表达量上调^[8, 18].

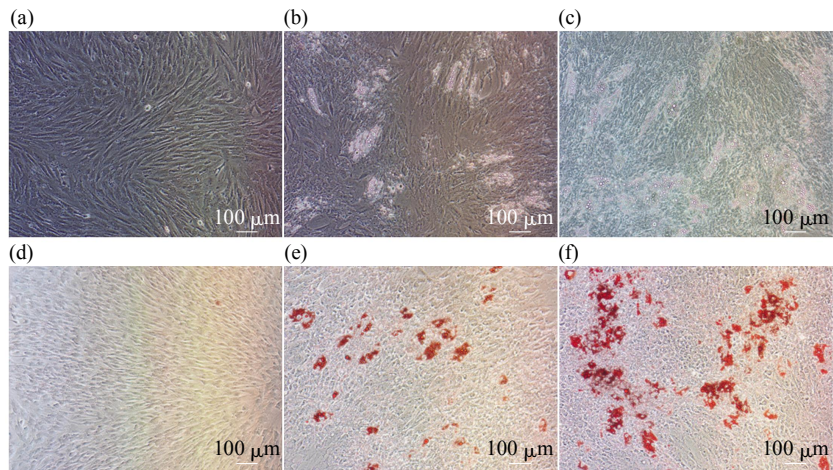


Fig. 1 The morphological observation and Oil red O of porcine adipocytes
(a) The first day of preadipocyte induction. (b)The fourth day of adipocyte induction. (c)The eighth day of adipocyte induction. (d~f) Formation of lipid droplets was observed by light microscopy and by staining with Oil Red O.

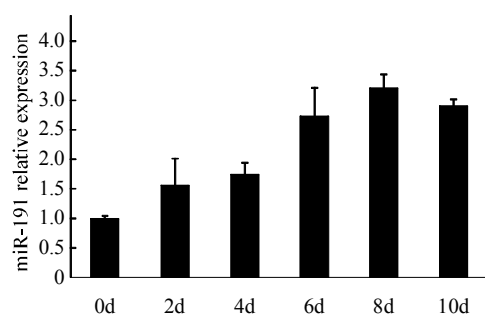


Fig. 2 Histogram displaying of miR-191 relative expression in porcine adipocytes during differentiation

The endogenous expression pattern of miR-191 at the different stage of porcine preadipocyte adipogenesis. The expression of miR-191 at indicated times was assessed by SYBR Green-based quantitative real-time PCR of 3 pigs using miR-191-specific primer sets. The data shown are averages of three independent experiments ($\bar{x} \pm s$).

2.2 利用 TargetScan 等算法预测 miR-191 与成脂相关的靶基因

将成熟脂肪细胞中高丰度表达的 miR-191 作为

研究对象, 利用 PicTar 及 TargetScan 分析其可能的作用靶点, TargetScan 与 PicTar 分别预测到了 54 个和 26 个靶基因, 取二者交集产生了 13 个靶基因. 在这个子集当中含有成脂早期关键基因 C/EBP β , 继而通过 MicroInspector 反向筛选与猪 C/EBP β 3'UTR 结合的 miRNAs, 结果筛选到 8 条与猪 C/EBP β 3'UTR 结合稳定的候选 miRNAs. 分析发现, ssc-miR-187、-1271、-503 没有出现在 Solexa 测序差异表达的结果中, 而 ssc-miR-1307、-92b-3p、-92a、-2476 在猪背部皮下脂肪组织中的表达量都非常低, 只有 ssc-miR-191 的表达丰度最高, 且在不同发育阶段的猪背部皮下脂肪组织中表达差异极显著^[17]. 再者, miRanda、RNA22 和 RNAhybrid 能快速准确计算哺乳动物 miRNA-mRNA 的二聚体自由能, 进一步验证了上述结果. 从以上 5 种算法的预测结果可以观察到 miR-191 与 C/EBP β 3'UTR 有一处结合位点且 miR-191 种子序列与 C/EBP β 3'UTR 完全互补配对 (图 3). 之前的研究表明 miR-191 与 C/EBP β 在猪皮下脂肪中均有表达. 因此, 从理论上讲 miR-191 与 C/EBP β 3'UTR 有稳定结合的可能性.

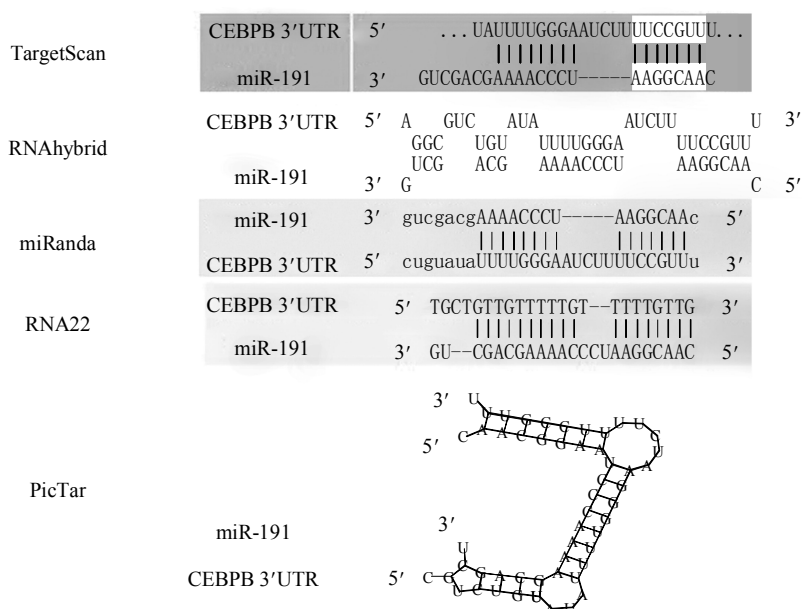


Fig. 3 Predicted the potential miR-191-C/EBP β interaction

The putative binding site in 3'UTR of C/EBP β was found. The predicted results were identical among five different algorithms, by TargetScan, RNAhybrid, PicTar, RNA22 and miRanda, respectively.

2.3 保守性及其靶基因位点分析

利用 TargetScan 等算法预测 miR-191 与靶基

因 C/EBP β 3'UTR 的结合位点如图 3 所示, 第 544~550 位碱基是 UCCGUU, 是 has-miR-191

在人类 C/EBPβ 3'UTR 中唯一的靶位点, 且该序列在多种哺乳动物中高度保守(图 4a). 根据猪 C/EBPβ mRNA 3'UTR 在 GenBank 上的登陆号 FJ869121.1, 获得猪 C/EBPβ 3'UTR 的序列, 其 280~286 位碱基是 TTCCGTT, 与人类 C/EBPβ 3'UTR 中的高度保守序列相同, 且在 ssc-miR-191 成熟序列种子区

存在与其互补配对的 AACGGAA 序列. 通过 NCBI-BLAST 比对发现, 猪与人类的 C/EBPβ 3'UTR 序列同源性可达 94%, ssc-miR-191 与 has-miR-191 的同源性为 100%. miR-191 与猪 C/EBPβ mRNA 3'UTR 的作用原理图如图 4b 所示.

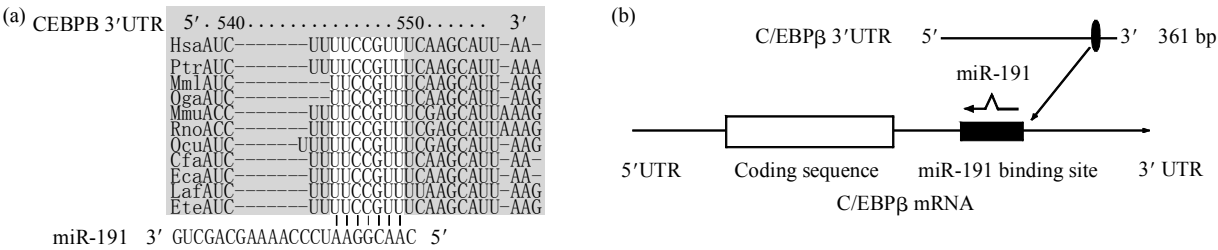


Fig. 4 Schematic diagram of predicted miR-191 target sites in the 3'UTR s of C/EBPβ

(a) The predicted, conservation of the miR-191 single binding site in the CEBPβ 3'-UTR in mammals. miR-191 seed match region was highlighted in filled with white box. Hsa, *Homo sapiens*; Ptr, *Pan troglodytes*; Mml, *Macaca mulatta*; Oga, *Otolemur garnettii*; Mmu, *Mus musculus*; Rno, *Rattus norvegicus*; Ocu, *Oryctolagus curiculus*; Cfa, *Canis familiaris*; Eca, *Equus caballus*; Laf, *Loxodonta africana*; Ete, *Els tenrecins*. (b) miR-191 is partially complementary to a region in the CEBPβ 3'-UTR in the porcine.

2.4 miR-191 对猪前体脂肪细胞分化的影响

当用 Ad-miR-NTC 与 Ad-miR-191 分别侵染猪前体脂肪细胞 48 h 后荧光显微镜下观察, 感染率几乎为 100%(图 5a, e), 收集细胞进行实时定量 PCR 检测, 结果显示, 与对照组相比经 Ad-miR-191 侵染的猪前体脂肪细胞 48 h 后, 成熟的 miR-191 表达量升高了 7.97 倍(图 6a), 证明腺病毒介导的 miR-191 能在猪前体脂肪细胞 mRNA 水平进行转录. 当成脂诱导 2 天后, 可以观察到细胞形态从梭形变为多边形, 从整体细胞群簇看, 从旋涡状变为

无规则分布(图 5b, f), 诱导后第 8 天的油红 O 染色显示, 与对照组(图 5c, d)相比 Ad-miR-191 侵染组脂滴聚集减少(图 5g, h). 为了进一步探究上述实验现象, 在猪前体脂肪细胞中过表达 miR-191 检测成脂关键转录因子或标志基因的 mRNA 和蛋白质水平. 如图 6b, Ad-miR-191 侵染猪前体脂肪细胞后成脂关键转录因子 C/EBPβ 的 mRNA 表达量与对照组相比, 在分化的第 2、4 天极显著降低, 但第 6、8、10 天差异不显著. Western blot 结果显示, C/EBPβ 蛋白水平在分化的第 2 天与第 4 天分别下

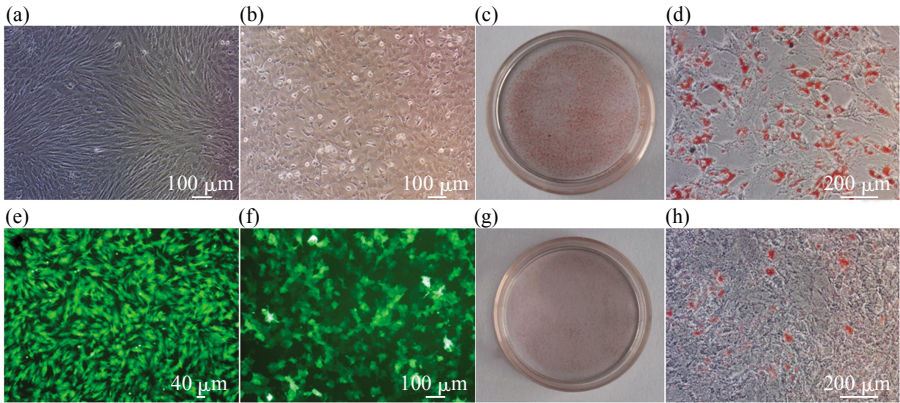


Fig. 5 The effect of miR-191 on adipogenesis of porcine preadipocyte

(a)Porcine preadipocytes before being infected by Ad-miR-191. (e) Porcine preadipocyte after being infected by Ad-pre-miR-191. (b and f) The preadipocytes were induced in the second day. (c, d and g, h) Oil red O stain of porcine preadipocytes which infected with Ad-miR-NTC and Ad-miR-191 after 8 days' induction.

降了 55%和 42%(图 7); 过表达 miR-191 以后成脂标记基因 PPAR γ 的 mRNA 表达量与对照组相比在第 4、6 天显著降低, 但第 8、10 天差异不显著(图 6c); 而 aP2 的 mRNA 表达量与对照组相比在第 2、6 天极显著降低, 在第 4、8 天显著降低, 但第 10 天差异不显著, 整体呈现有规律的波动表达

(图 6d). 这些结果表明, miR-191 可能通过调节 C/EBP β 转录减少其蛋白质表达, 进而影响 PPAR γ 的激活, 导致下游被 PPAR γ 所诱导和调控的成脂关键基因 aP2mRNA 表达降低, 最终抑制猪前体脂肪细胞分化.

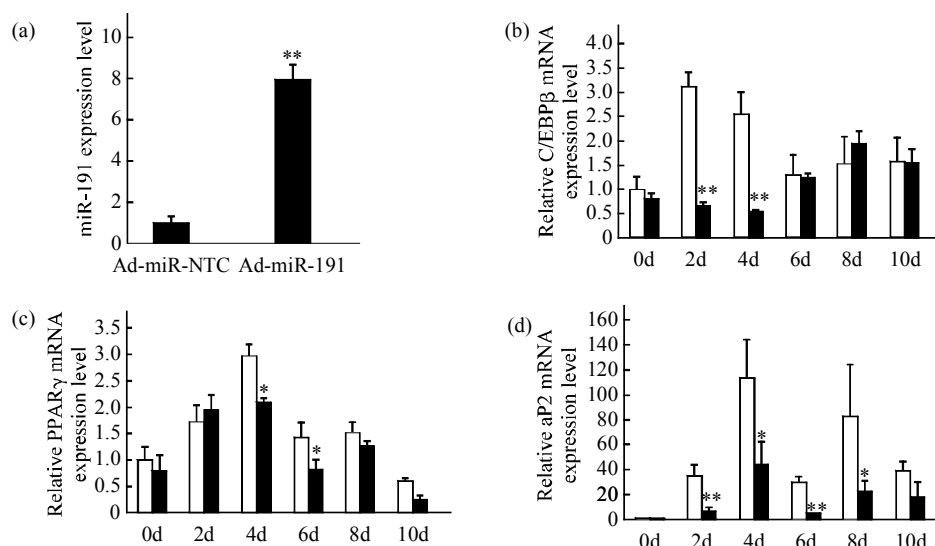


Fig. 6 miR-191 regulates expression of adipogenic marker genes

(a) The overexpression efficiency of miR-191 was detected by real-time PCR($n=3$) after being infected. Detection of exogenous miR-191 expression in porcine preadipocytes. Expression of transfected Ad-miR-191 was assessed by SYBR Green-based quantitative real-time PCR($n=3$). Data is presented as $\bar{x} \pm s$. The resource of control was the mRNA of porcine preadipocyte without any treatment and cultivated for the same days (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (b) The detection of C/EBP β mRNA expression level using real-time PCR ($n=3$) and their expression levels in Ad-miR-NTC infected porcine preadipocyte were significantly higher than that in Ad-miR-191 infected cells in day 2, 4 after induced differentiation. (c) The detection of PPAR γ mRNA expression level using real-time PCR($n=3$) and their expression level in pAd-miR-NTC infected porcine preadipocyte was significantly higher than that in Ad-miR-191 infected cells in day 4, 6 after induced differentiation. (d) The detection of aP2 mRNA expression level using real-time PCR($n=3$) and their expression level in pAd-miR-NTC infected porcine preadipocyte was significantly higher than that in Ad-miR-191 infected cells in day 2, 4, 6, 8 after induced differentiation. □: Ad-miR-NTC; ■: Ad-miR-191.

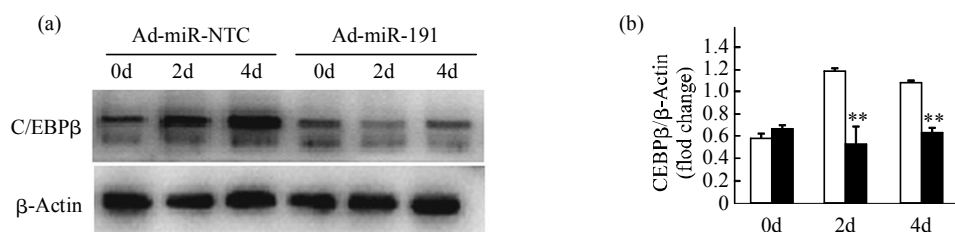


Fig. 7 miR-191 inhibits protein level of C/EBP β in porcine preadipocytes

Porcine preadipocytes were transfected with the Ad-miR-191 or Ad-miR-NTC, and treated with MDI 4d after transfection. The expressions of C/EBP β were analyzed by Western blotting(a) and quantitative determination(b). β -Actin was used as a loading control. ($n=3$, ** $P < 0.01$). □: Ad-miR-NTC; ■: Ad-miR-191.

2.5 双荧光素酶报告系统检测及分析

将 pGL3-C/EBP β 3'UTR (图 8a)与 pRL-TK 组

成双荧光素酶报告基因检测系统, 此系统与 miR-191 或 miR-NTC 共转染至 293T 细胞中, 培养

48 h 后, 分析荧光素酶表达变化. 结果显示, 转染 pRL-TK 和无启动子 pGL3-Basic 的第 4 组荧光素酶活性非常低; 而 pGL3-C/EBP β 3'UTR 和 pRL-TK 与 miR-NTC 共转染的第 3 组与没有转染 miRNA 的空对照第 1 组相比荧光素酶表达无显著差异, 说

明双荧光素酶报告基因检测系统模型可靠; 与第 3 组相比共转染 miR-191 的第 2 组荧光素酶表达水平下降了 64.29%, 统计学分析差异极显著(图 8b). 联合图 7 结果共同表明, miR-191 可直接靶向作用于 C/EBP β 3'UTR 从而调控 C/EBP β 的表达.

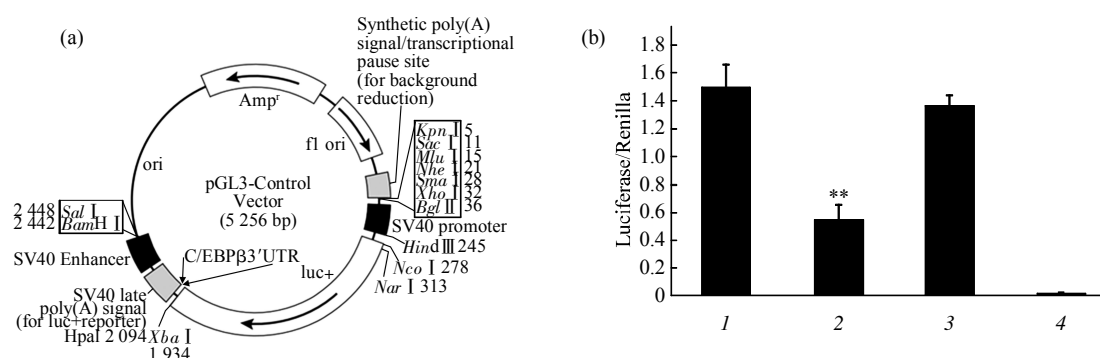


Fig. 8 miR-191 downregulates the expression of a reporter gene containing the C/EBP β 3'UTR

(a) Construction of recombinant pGL3-C/EBP β 3'UTR. The complementary miR-191-binding site found in the CEBP β 3'-UTR site was inserted into downstream of the luciferase reporter plasmid pGL3-Control. (b) 293T cells were co-transfected with pGL3-CEBP β 3'UTR, pRL-TK and miRNAs. 1: pRL-TK+pGL3-control; 2: pRL-TK+pGL3-CEBP β 3'UTR+pAd-miR-191; 3: pRL-TK+pGL3-CEBP β 3'UTR+pAd-miR-NTC; 4: pRL-TK+pGL3-Basic. Data is presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, ** $P < 0.01$).

3 讨 论

脂肪组织不仅有利于全身能量稳态而且还分泌一些蛋白质调节几个生理过程, 包括血压、免疫功能、血管生成和胰岛素抵抗^[19-20]. 因此, 更好地了解有关前体脂肪细胞分化过程中潜在的分子机制可以为许多疾病的发病机理提供新见解和理论参考, 对一些代谢性疾病, 如肥胖、II型糖尿病、动脉粥样硬化、高血压和高血脂等治疗手段的发展尤为重要, 还可以增加以前体脂肪细胞为基础的细胞疗法的可能性, 例如组织修复和美容. 当然, 在畜牧学上还可以为提高瘦肉率、降低背膘厚和增加肌肉脂肪含量提供理论依据.

虽然信号转导通路和转录因子在决定脂肪细胞命运中的作用研究已经有了很大的进展, 但我们目前认识的脂肪细胞分化机制仍然是不完整的. 最近, miRNAs 成为新出现的重要的调控基因转录后表达并被认为在脂肪细胞分化过程起关键作用的小分子^[15].

通过对实验室前期 Solexa 结果进行深入挖掘, 结合生物信息学分析从不同发育阶段猪背部皮下脂

肪组织差异表达的 miRNAs 中筛选出高丰度差异极显著的候选 miR-191. 最近的研究结果表明, miR-191 是一种在终端红细胞分化、肝癌、卵巢癌、糖尿病等多种疾病和生物过程中的重要调节因子^[21-24]. 此外, miR-191 还可作为一种分泌 miRNA 以调节一些生物学过程^[25-26]. Zampetaki 等^[26]发现, 与正常受试者相比在糖尿病患者的血浆中 miRs-20b、-21、-24、-15a、-126、-191、-197、-223、-320 及 -486 表达水平低, 而 miR-28-3p 适度地上调, 表明循环 miRNAs 可以作为新的疾病诊断预测工具. Herrera 等^[27]报道, miR-191 可在 GK 大鼠肝脏中上调自发调节糖尿病. 这些研究表明 miR-191 有可能成为 II 型糖尿病的一个新的标志因子.

为了探究 miR-191 在脂肪细胞分化过程中是否发挥作用, 利用猪的前体脂肪细胞为体外实验材料, 对 miR-191 在猪前体脂肪细胞分化各阶段的时序表达情况进行检测, 结果显示, miR-191 在前体脂肪细胞从分化第 6 天表达量明显增加, 且在脂肪细胞分化过程中表达量始终维持在较高水平(图 2). 暗示着 miR-191 可能与脂肪细胞分化存在某种潜在的联系. 接着我们构建了 miR-191 腺病毒过表达载

体, 利用包装出含有 miR-191 的腺病毒感染猪前体脂肪细胞, 结果发现, 过表达 miR-191 能显著抑制猪前体脂肪细胞分化, 减少脂质堆积, 抑制脂肪形成关键转录因子 C/EBP β 和 PPAR γ mRNA(图 6b,c) 以及一些脂肪形成标记基因, 如 aP2 mRNA 的表达(图 6d).

为了进一步阐明 miR-191 调节脂肪细胞分化的作用机制, 通过 TargetScan 6.2 和 PicTar 搜索并预测 miR-191 的保守靶基因, 根据以下分析推断, 在重叠的候选基因中, 脂肪细胞分化早期标志基因 C/EBP β 被认为是 miR-191 最稳定的靶基因. a. miR-191 种子区与 C/EBP β 3' UTR 局部互补且 miR-191 在脊椎动物中 C/EBP β 3' UTR 靶位点具有高度同源性(图 4). b. 前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化是由一组复杂的转录因子网络调控, 它们控制着成熟脂肪细胞基因表型的上百种蛋白质表达, 其中 C/EBPs 和 PPAR 转录因子家族被认为是最为重要的. 近年来, 普遍接受的观点是 PPAR γ 和 C/EBP α 为前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化的“终末通路”, 它们的表达将直接导致脂肪特异性基因, 如 aP2 的表达, 成熟细胞的基因表型随即形成^[28]. 已有研究结果显示, 在脂肪细胞分化过程中, C/EBP β 可直接同 PPAR γ 基因座结合激活其转录^[29], 若脂肪细胞发育早期缺乏 C/EBP β , 导致 C/EBP α 、PPAR γ 等细胞因子无法正常表达^[30]. c. Tang 等^[28]的研究结果表明, 在人类和小鼠的早期脂肪细胞中 C/EBP β 表达量急剧上调, 在脂肪细胞分化后期阶段有所下降, 其表达模式同 miR-191 表达模式呈负相关, 提示 miR-191 可能参与了 C/EBP β 在脂肪细胞中的表达调控过程.

为证明 miR-191 与 C/EBP β 在脂肪细胞分化过程中共同发挥作用, 以过表达 miR-191 的腺病毒感染猪前体脂肪细胞后检测 C/EBP β 的变化情况. 结果如图 7 所示, 与对照组相比, 在猪前体脂肪细胞中过表达 miR-191 之后 48 h C/EBP β 蛋白表达下降了 55%, 且 C/EBP β 的 mRNA 水平也显著下降(图 6b). 这些数据暗示, C/EBP β 蛋白的翻译可能受 miR-191 调节. 为了检验该假设, 进一步利用双荧光素酶报告基因检测系统研究 miR-191 与 C/EBP β 3' UTR 是否存在相互作用, 结果显示, 与共转染 miR-NTC、pGL3-C/EBP β 3' UTR 和 pRL-TK 的对照组相比, 共转染 pGL3-C/EBP β 3' UTR、pRL-TK 和 miR-191 处理组萤火虫荧光素酶活性下降了 62.9%, 荧光素酶报告分析表明

C/EBP β 是 miR-191 的直接靶标. 基于以上现象我们推测 miR-191 可能是通过干扰 C/EBP β 的表达进而影响下游成脂关键基因 PPAR γ 和 aP2 的激活而导致脂肪细胞分化被抑制. 这也与过表达 miR-191 后脂肪细胞分化中期 PPAR γ 和 aP2 mRNA 表达下调一致. 这意味着, 在体外研究中 miR-191 对猪前体脂肪细胞分化起负调控作用至少部分是通过 C/EBP β 介导的.

综上所述, 本研究成功构建了猪 miR-191 腺病毒过表达载体, 包装出的病毒能高效感染猪前体脂肪细胞, 且 miR-191 能够与脂肪细胞分化早期信号 C/EBP β 基因 mRNA 3' UTR 部分序列互补结合调节 C/EBP β 蛋白表达, 有效抑制 PPAR γ 和 aP2 基因 mRNA 表达并抑制了猪前体脂肪细胞分化, 揭示了 miR-191 对猪脂肪细胞分化起负调控的部分作用机制. 本研究的发现为脂肪细胞分化机制提供了一种新的见解, 这为深入研究 miR-191 的功能特性取得了基础资料, 为进一步研究猪脂肪细胞分化调控过程提供了新的理论依据.

参 考 文 献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [2] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, **403**(6772): 901-906
- [3] Brennecke J, Hipfner D R, Stark A, *et al.* bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 2003, **113**(1): 25-36
- [4] Wang Y, Lee C G. MicroRNA and cancer-focus on apoptosis. *J Cell Mol Med*, 2009, **13**(1): 12-23
- [5] Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev*, 2006, **6**(4): 259-269
- [6] Johnston R J, Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003, **426** (6968): 845-849
- [7] Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA*, 2006, **12**(9): 1626-1632
- [8] Esau C, Kang X, Peralta E, *et al.* MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2004, **279** (50): 52361-52365
- [9] Xie H, Lim B, Lodish H F. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes*, 2009, **58**(5): 1050-1057
- [10] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 1993, **75**(5): 843-854
- [11] Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract*

- Res Clin Endocrinol Metab, 2005, **19**(4): 483–499
- [12] Wang Q, Li Y C, Wang J, *et al.* miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(8): 2889–2894
- [13] Lin Q, Gao Z, Alarcon R M, *et al.* A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J*, 2009, **276**(8): 2348–2358
- [14] Liu S, Yang Y, Wu J. TNF α -induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **414**(3): 618–624
- [15] Alexander R, Lodish H, Sun L. MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, **15**(5): 623–636
- [16] Jin W, Dodson M V, Moore S S, *et al.* Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: A potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Mol Biol*, 2010, **11**: 29
- [17] Li G, Li Y, Li X, *et al.* MicroRNA identity and abundance in developing swine adipose tissue as determined by solexa sequencing. *J Cell Biochem*, 2011, **112**(5): 1318–1328
- [18] Sun T, Fu M, Bookout A L, *et al.* MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol*, 2009, **23**(6): 925–31
- [19] Kopelman P G. Obesity as a medical problem. *Nature*, 2000, **404**(6778): 635–643
- [20] Calle E E, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev*, 2004, **4**(8): 579–591
- [21] Wynendaele J, Böhne A, Leucci E, *et al.* An illegitimate microRNA target site within the 3'UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Res*, 2010, **70**(23): 9641–9649
- [22] Elyakim E, Sitbon E, Faerman A, *et al.* hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Res*, 2010, **70**(20): 8077–8087
- [23] Zhang L, Flygare J, Wong P, *et al.* miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Riok3 and Mxi1. *Genes Dev*, 2011, **25**(2): 119–124
- [24] Shen J, DiCioccio R, Odunsi K, *et al.* Novel genetic variants in miR-191 gene and familial ovarian cancer. *BMC Cancer*, 2010, **10**: 47
- [25] Hunter M P, Ismail N, Zhang X, *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 2008, **3**(11): e3694
- [26] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, *et al.* Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Research*, 2010, **107**(6): 810–817
- [27] Herrera B M, Lockstone H E, Taylor J M, *et al.* Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2010, **53**(6): 1099–1109
- [28] Tang Q Q, Zhang J W, Daniel L M. Sequential gene promoter interactions of C/EBP β , C/EBP α , and PPAR γ during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **318**(1): 213–214
- [29] Zuo Y, Qiang L, Farmer S R. Activation of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α expression by C/EBP β during adipogenesis requires a peroxisome proliferator activated receptor- γ -associated repression of HDAC 1 at the C/ebp α gene promoter. *J Biol Chem*, 2006, **281**(12): 7960–7967
- [30] Rochford J J, Semple R K, Laudes M, *et al.* ETO/MTG8 is an inhibitor of C/EBP β activity and a regulator of early adipogenesis. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(22): 9863–9872

miR-191 May Regulate Pig Preadipocyte Differentiation by Targeting The Transcription Factor C/EBP β *

LIU Shuai, NING Xiao-Min, LI Mei-Hang, QIU Yang, LI Yan-Jie, DONG Pei-Yue, YANG Gong-She**

(Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Science and Technology,
Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract Based on our previous solexa sequencing data, combining with bioinformatics analysis of microRNA expression changes in porcine adipose tissue from different growth phases in a model of obesity, we found the expression level of miR-191 was significantly different in developing swine adipose tissue. In this research, we successfully overexpressed miR-191's transcripts by recombinant adenovirus in primary cultured porcine preadipocytes, and then investigated the impact on differentiation of pig preadipocyte by Real-time quantitative PCR, Western blot. The results showed that miR-191's expression level gradually increased during differentiation. The miR-191 transcripts increased dramatically when miR-191 overexpressed compared to the control group, which caused the decrease of C/EBP β , PPAR γ and aP2's mRNA level and the sequentially repression of preadipocytes differentiation. Meanwhile, Western blotting results indicated that the expression of C/EBP β protein in primary cultured porcine preadipocytes that overexpressed miR-191 was 55% lower than that in control cells after 48 h post-transfection. Importantly, we predicted that C/EBP β was miR-191's target gene through bioinformatics software TargetScan and MicroInspector. This is conformed by dual luciferase reporter vector system assay which showed that miR-191 can target C/EBP β 3' untranslated region (3' UTR) directly and then decrease its expression. In conclusion, this study indicates that miR-191 can attenuate pig preadipocytes differentiation possibly by repressing the gene expression of C/EBP β which is one of the early marker gene of adipocytes differentiation.

Key words miR-191, C/EBP β , porcine preadipocyte, profiling, target genes forecast, adenovirus, dual-luciferase reporter assay system

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00267

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(31072014) and Program for Innovative Research Team in Northwest A & F University.

**Corresponding author.

Tel: 86-29-87092430, E-mail: gsyang999@hotmail.com

Received: June 4, 2012 Accepted: November 22, 2012